## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

# FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

# ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENGENHARIA DE PROCESSOS

# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BLENDAS E COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE FIBROÍNA DE SEDA E ALGINATO DE SÓDIO

Autora: Mariana Agostini de Moraes Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas

2010

# FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

| M791o | Moraes, Mariana Agostini de<br>Obtenção e caracterização de blendas e compósitos<br>poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio /<br>Mariana Agostini de MoraesCampinas, SP: [s.n.],<br>2010. |
|-------|---|
|       | Orientador: Marisa Masumi Beppu.<br>Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de<br>Campinas, Faculdade de Engenharia Química.  |
|       | 1. Biopolímeros. 2. Membranas. 3. Biomateriais. I.<br>Beppu, Marisa Masumi. II. Universidade Estadual de<br>Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.<br>Título.                                |

Título em Inglês: Production and characterization of polymeric blends and composites of silk fibroin and sodium alginate
Palavras-chave em Inglês: Biopolymers, Membranes, Biomaterials
Área de concentração: Engenharia de Processos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Vanessa Petrilli Bavaresco, Ângela Maria Moraes
Data da defesa: 27/04/2010
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Mariana Agostini de Moraes e aprovada em 27 de abril de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu - Orientadora

Profa. Dra. Vanessa Petrilli Bavaresco

Jugela Jains Jurals Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

Profa. Pra. Marisa Masumi Beppu - Orientadora

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Érico e Simone, e ao meu irmão Daniel, pelo apoio incondicional, incentivo e carinho durante a realização deste trabalho. Aos meus tios, primos e avós que sempre me apoiaram, em especial, à minha prima Lucia. Ao Nei, pelo amor e compreensão.

À professora Marisa Masumi Beppu, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades que tem me oferecido.

Ao meu querido amigo e ex-orientador, professor Luis Antonio de Almeida Pinto, por todos os seus ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Aos meus primeiros mestres, professores Antonio Francisco Aimi e Antonio Beal, pelos primeiros ensinamentos de química e de laboratório de química, que despertaram a minha curiosidade pela ciência.

Ao professor Theo Guenter Kieckbusch, por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização dos testes mecânicos e teste de permeabilidade ao vapor d'água. Agradeço também às suas alunas, Mariana Altenhofen e Andrea Bierhalz, pela ajuda e aconselhamento em alguns pontos desta dissertação.

À professora Sandra Cristina Rocha e à técnica Camila Soster de Carvalho, pela ajuda na análise de ângulo de contato em água.

À professora Olga Higa e à Dr<sup>a</sup> Andrea Rodas (IPEN-USP), pela realização dos testes de citotoxicidade.

Aos técnicos Celso Camargo (DTF/FEQ/UNICAMP), Kelly Palma (FEQ/UNICAMP) e Disney Thomazelli (DTP/FEQ/UNICAMP), pelas análises térmicas, de MEV e DRX e de DMA, respectivamente. E à técnica Márcia Antonelli (IQ/UNICAMP) pela ajuda nas análises de infravermelho.

A todos os colegas de laboratório, em especial à Grínia Nogueira, Raquel Weska e Mariana Silva, pela amizade, companheirismo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original." (Albert Einstein)

#### **RESUMO**

A utilização de polímeros de fontes renováveis vem sendo amplamente estudada tanto no campo biomédico quanto nas indústrias de embalagens. Polímeros naturais são, em geral, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser obtidos a custos relativamente baixos. Biopolímeros como o alginato de sódio e a fibroína de seda vêm se destacando como potenciais matériasprimas para a fabricação de membranas e de biomateriais. O objetivo deste trabalho foi explorar a possibilidade de se formar membranas de fibroína de seda com alginato de sódio, a fim de conjugar as propriedades desses biopolímeros, visando possíveis aplicações como biomaterial. Foi estudada a incorporação da fibroína no alginato de sódio sob diferentes formas, como a incorporação na forma de fios (para a obtenção de compósitos) e como solução (para a obtenção de blendas). Na obtenção da blenda de fibroína e alginato foi observada a formação de uma membrana composta majoritariamente de alginato, contendo glóbulos de fibroína, indicando separação microscópica de fases. Entretanto ocorreu interação entre os domínios hidrofílicos dos dois materiais, fato confirmado pelo DRX. A blenda apresentou espectro de FTIR similar ao do alginato, porém com picos característicos de conformação folha-β da fibroína. Para as análises de intumescimento em água, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor d'água, resistência à tração, análises térmicas e citotoxicidade, a blenda apresentou comportamento intermediário entre seus componentes, contudo mais voltado para o alginato, presente em maior proporção na mesma. Através da formação da blenda com alginato de sódio foi possível melhorar as propriedades físicas da membrana quando comparadas com a membrana de fibroína pura. Com a incorporação dos fios de fibroína no alginato obteve-se um compósito com boa interação fibramatriz, observada pelos testes mecânicos e MEV. Os compósitos eram bastante maleáveis e apresentavam elevada resistência ao rasgo. As análises térmicas apresentaram picos de degradação dos dois componentes separadamente. Nenhuma das membranas obtidas neste trabalho apresentou citotoxicidade, sendo a viabilidade celular mantida entre 70 e 100%. Os materiais resultantes possuem potencial para serem explorados como biomateriais, entretanto testes específicos de utilização devem ser realizados.

Palavras-chave: Biopolímeros, membranas, biomateriais, fibroína de seda, alginato de sódio.

#### ABSTRACT

The use of polymers from renewable sources has been widely studied in the biomedical field as much as in the packaging industries. Natural polymers are, in general, biodegradable, biocompatible and can be obtained at low costs. Biopolymers such as sodium alginate and silk fibroin are potential raw-materials for production of membranes and biomaterials. The aim of this study was to explore the possibilities of forming membranes of silk fibroin with sodium alginate, in order to conjugate the properties of those biopolymers, for biomaterial applications. The incorporation of fibroin in sodium alginate under different forms was studied, such as the incorporation of silk as fibers (to obtain composites) or as solution (to obtain blends). The fibroin and alginate blend membrane was mainly composed by alginate, with fibroin globular domains, indicating micro-phase separation. However, interaction in the hydrophilic domains of the materials has occurred, confirmed by XRD. The blend presented FTIR spectrum similar to alginate, but with characteristic peaks of fibroin  $\beta$ -sheet conformation. For the degree of swelling in water, water contact angle, water vapor permeability, tensile strength, thermal analyses and cytotoxicity tests, the blend presented intermediate behavior between its components, however closer to alginate, which was present in higher proportion. Through the blend formation with sodium alginate, it was possible to improve the physical properties of the fibroin membrane. A composite with good fiber-matrix interaction was obtained through the incorporation of fibroin fibers in the alginate matrix. This fact was confirmed by mechanical tests and SEM. These composites were flexible and presented high resistance to tear. The thermal analyses presented degradation peaks of the two components, separately. None of the membranes prepared in this study presented cytotoxicity and the cellular viability was maintained between 70 and 100%. The materials present high potential to be explored as biomaterials, therefore specific tests are still necessary.

Keywords: Biopolymers, membranes, biomaterials, silk fibroin, sodium alginate.

# SUMÁRIO

| RESUMO  | vii  |
|---|------|
| ABSTRACT  | viii |
| SUMÁRIO   | ix   |
| LISTA DE FIGURAS  | xii  |
| LISTA DE TABELAS  | xv   |
| 1 INTRODUÇÃO  | 1    |
| 2 OBJETIVOS   | 2    |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA   | 3    |
| 3.1 Fibroína de seda  | 3    |
| 3.2 Alginato  | 6    |
| 3.3 Blendas poliméricas   | 9    |
| 3.3.1 Blendas com fibroína de seda                              |      |
| 3.3.1.1 Blendas de fibroína de seda com alginato de sódio       | 11   |
| 3.4 Plastificantes  |      |
| 3.5 Compósitos  |      |
| 3.5.1 Compósitos com fibroína de seda                           | 16   |
| 3.6 Biomateriais  |      |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS   | 22   |
| 4.1 Matérias-primas   |      |
| 4.2 Preparo das soluções  |      |
| 4.3 Preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio |      |
| 4.3.1 Tratamento nas membranas                                  |      |
| 4.4 Preparo dos compósitos                                      | 24   |
| 4.5 Caracterizações   | 25   |
| 4.5.1 Microscopia óptica (MO)                                   |      |

| 4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)     |    |
|---|----|
| 4.5.3 Difração de raios X (DRX)                     | 26 |
| 4.5.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)    | 27 |
| 4.5.5 Intumescimento em água                        | 27 |
| 4.5.6 Permeabilidade ao vapor d'água                |    |
| 4.5.7 Ângulo de contato                             |    |
| 4.5.8 Ensaios mecânicos                             |    |
| 4.5.8.1 Resistência à tração                        |    |
| 4.5.8.2 Resistência à propagação do rasgo           |    |
| 4.5.9 Análises térmicas                             |    |
| 4.5.9.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) |    |
| 4.5.9.2 Termogravimetria (TGA)                      |    |
| 4.5.9.3 Análise dinâmico-mecânica (DMA)             |    |
| 4.5.10 Citotoxicidade indireta                      |    |
| 4.5.11 Calcificação quimicamente induzida           |    |
| 5 RESULTADOS  | 36 |
| 5.1 Blendas de fibroína e alginato de sódio         |    |
| 5.1.1 Tratamento nas membranas                      |    |
| 5.1.2 Caracterizações das blendas                   | 43 |
| 5.1.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)   |    |
| 5.1.2.2 Difração de raios X (DRX)                   |    |
| 5.1.2.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)  | 51 |
| 5.1.2.4 Intumescimento em água                      | 54 |
| 5.1.2.5 Permeabilidade ao vapor d'água              | 56 |
| 5.1.2.6 Ângulo de contato                           |    |

| 5.1.2.7 Ensaios mecânicos  |
|--|
| 5.1.2.8 Análises térmicas61                                      |
| 5.1.2.9 Citotoxicidade indireta                                  |
| 5.2 Compósitos de fios de fibroína de seda e alginato de sódio69 |
| 5.2.1 Caracterizações dos compósitos71                           |
| 5.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)71              |
| 5.2.1.2 Intumescimento em água72                                 |
| 5.2.1.3 Permeabilidade ao vapor d'água73                         |
| 5.2.1.4 Testes mecânicos75                                       |
| 5.2.1.5 Análises térmicas  |
| 5.2.1.6 Citotoxicidade indireta                                  |
| 5.2.1.7 Calcificação quimicamente induzida85                     |
| 6 DISCUSSÃO FINAL  |
| 7 CONCLUSÕES91   |
| 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS                               |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS93                                     |

# LISTA DE FIGURAS

| Figura 1: Estrutura primária da fibroína de seda. Fonte: Nogueira, 20054  |
|---|
| Figura 2: Conformação estrutural folha-β. Fonte: Nelson e Cox, 20004  |
| Figura 3: Conformação estrutural hélice-α. Fonte: Chasin e Mowshowitz, 20095  |
| Figura 4: Estrutura química do ácido α-L-gulurônico (G) e do ácido β-D-manurônico (M).<br>Adaptado de: Drury <i>et al.</i> , 2004                                       |
| Figura 5: Estrutura estereoquímica dos blocos GG, MM e GM. Fonte: Chaplin, 2010   |
| Figura 6: Representação esquemática da ligação por pontes de hidrogênio entre a fibroína e o alginato de sódio. Fonte: Liang e Hirabayashi, 199212                      |
| Figura 7: Representação esquemática e fotografias das amostras utilizadas para o teste de propagação do rasgo   |
| Figura 8: Micrografia óptica de luz transmitida da blenda alginato:fibroína 75:25 com alginato dissolvido em água, obtido em testes preliminares. Ampliação de 40 vezes |
| Figura 9: Fotografia da membrana da blenda alginato:fibroína 75:25, com glicerina, estudada neste trabalho  |
| Figura 10: Fotografia da membrana de alginato tratada com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em etanol 50%, por 2 h, após imersão em água                                   |
| Figura 11: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (a) e da superfície de fratura (b) das membranas da blenda (1), fibroína pura (2) e alginato puro (3)43  |
| Figura 12: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (a) e da superfície de fratura (b) da membrana da blenda após extração da fibroína                       |
| Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura da superfície da membrana da blenda sem glicerina, após extração da fibroína   |
| Figura 14: Representação esquemática do processo de obtenção da blenda e extração dos glóbulos de fibroína  |
| Figura 15: Modelo para o dobramento da cadeia de fibroína, formação das micelas e formação dos glóbulos de fibroína. Adaptado de: Jin e Kaplan, 2003                    |
| Figura 16: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 24 h de tratamento   |

| Figura 17: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), sem tratamento  |
|---|
| Figura 18: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 2 h de tratamento  |
| Figura 19: Espectros de infravermelho para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c)  |
| Figura 20: Perfil típico de tensão em ensaio de tração em membranas de blenda de fibroína de seda e alginato de sódio   |
| Figura 21: Termogramas de DSC para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c)61  |
| Figura 22: Curvas termogravimétricas das membranas de fibroína, blenda e alginato62   |
| Figura 23: Curvas de massa residual diferencial para as membranas de fibroína, blenda e alginato.   |
| Figura 24: Curvas termodinamicomecânicas da membrana de fibroína64  |
| Figura 25: Curvas termodinamicomecânicas da membrana da blenda65  |
| Figura 26: Curvas termodinamicomecânicas da membrana de alginato65  |
| Figura 27: Viabilidade celular das membranas de fibroína, blenda e alginato67   |
| Figura 28: Histograma de viabilidade celular das membranas da blenda para o extrato não diluído   |
| Figura 29: Fotografia e micrografia eletrônica de varredura do compósito com 20% (massa) de fios de fibroína obtido em testes preliminares  |
| Figura 30: Fotografias das membranas de alginato (a), compósito com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d)  |
| Figura 31: Micrografias da superfície dos compósitos contendo 20% (a), 40% (b) e 60% de fios de fibroína (c)  |
| Figura 32: Perfil típico de força em ensaio de tração em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda  |
| Figura 33: Micrografia da superfície de fratura após a realização do teste de tração das membranas de alginato (a), compósito com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d). |
| Figura 34: <i>Pull out</i> do compósito contendo 20% de fios de fibroína  |

| Figura 35: Perfil típico de força em ensaio de propagação do rasgo em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda  |
|--|
| Figura 36: Termogramas de DSC para as membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d)  |
| Figura 37: Curvas termogravimétricas das membranas de alginato e compósitos  |
| Figura 38: Curvas de massa residual diferencial para as membranas de alginato e compósitos82   |
| Figura 39: Viabilidade celular das membranas de alginato e dos diferentes tipos de compósitos.83   |
| Figura 40: Histograma de viabilidade celular das membranas do compósito para o extrato não diluído   |
| Figura 41: Fotografia (a) e micrografia óptica de luz polarizada (b) das membranas de alginato após imersão em solução de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1) e K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2). Aumento de 10 vezes |
| Figura 42: Fotografia (a) e micrografia óptica de luz polarizada (b) das membranas da blenda (1) e de fibroína (2) após imersão em solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . Aumento de 10 vezes                      |
| Figura 43: Fotografia (a), micrografia óptica de luz polarizada, aumento 10 vezes (b) e  |

# LISTA DE TABELAS

| Tabela 1: Caracterizações realizadas nas membranas da blenda e dos compósitos25   |
|---|
| Tabela 2: Quantidades das soluções salinas, Tris e HCl utilizados no preparo do SBF 1,5x35  |
| Tabela 3: Resumo dos testes preliminares de formação da blenda, com proporçãoalginato:fibroína de 25:75, 50:50 e 75:25                    |
| Tabela 4: Resultados dos testes de estabilização das membranas  |
| Tabela 5: Perda de massa das membranas de alginato após tratamento e lavagem.       42  |
| Tabela 6: Bandas de amida e comprimentos de onda das conformações seda I e seda II da         fibroína.         52                        |
| Tabela 7: Principais picos obtidos nas membranas de fibroína, blenda e alginato53   |
| Tabela 8: Grau de intumescimento das membranas de fibroína, blenda e alginato.       54   |
| Tabela 9: Relação de espessura das membranas da blenda em teste de intumescimento em água.  |
| Tabela 10: Valores de transmissão de vapor d'água, espessura e permeabilidade ao vapor d'água         das membranas da blenda.         56 |
| Tabela 11: Valores médios de ângulo de contato para as diferentes membranas.       57   |
| Tabela 12: Resultados do teste de resistência à tração das membranas de fibroína, blenda ealginato, após 2 e 24 h de tratamento           |
| Tabela 13: Resultados do teste mecânico para os compósitos analisados nos testes preliminares.  |
| Tabela 14: Grau de intumescimento da membrana de alginato e dos diferentes compósitos72   |
| Tabela 15: Relação de espessura das membranas de compósitos em teste de intumescimento em água.      73                                   |
| Tabela 16: Valores de transmissão e de permeabilidade ao vapor d'água das membranas dos compósitos.         74                            |
| Tabela 17: Valores de força na ruptura, espessura e tensão na ruptura dos compósitos analisados.  |
| Tabela 18: Valores de força de resistência à propagação do rasgo dos compósitos.       79   |

## 1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais têm um papel importante na engenharia tecidual, com o objetivo de reparar ou substituir tecidos e órgãos danificados ou inutilizados devido a doenças, acidentes e envelhecimento (Du *et al.*, 2009).

As propriedades químicas, físicas e mecânicas de um material polimérico são fundamentais para determinar o desempenho de um determinado dispositivo como biomaterial. Grande parte dos polímeros (naturais ou sintéticos) possuem propriedades mecânicas adequadas para aplicações biomédicas tanto em tecido moles como em tecidos duros. Além disso, a presença de grupos funcionais em suas cadeias permite modificações químicas e bioquímicas, principalmente em sua superfície, expandindo o seu campo de aplicação (Abramson *et al.*, 2004).

Porém, em alguns casos, os biopolímeros podem apresentar propriedades indesejadas, como alta taxa de degradação ou propriedades mecânicas insatisfatórias. Uma forma de melhorar as propriedades desses materiais é combinando-os com outros polímeros (naturais ou sintéticos), a fim de conjugar suas propriedades.

A fibroína de seda tem sido estudada nos últimos anos para aplicação na cicatrização de feridas e na engenharia tecidual devido à sua afinidade com células de tecidos ósseos, cartilaginosos, e de tendões e ligamentos (Vepari e Kaplan 2007; Altman *et al.*, 2003). Possui boa permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, compatibilidade sanguínea adequada e acelera a formação de colágeno e proliferação de fibroblastos (Kweon *et al.*, 2008). Já o alginato possui ação hemostática e é capaz de manter um ambiente com umidade adequada para a cicatrização de feridas e queimaduras, promovendo a cicatrização e a formação de tecido granulado (Roh *et al.*, 2006). Além disso, foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como curativo em humanos (Kim *et al.*, 2000).

O alginato de sódio é bastante promissor como segundo componente de blendas e compósitos com fibroína de seda, porém membranas de fibroína de seda e alginato juntos foram pouco estudadas na literatura (Liang e Hirabayashi, 1992; Lee *et al.*, 2004a; Roh *et al.*, 2006), sendo que estes dois biopolímeros são materiais potenciais para aplicação na área médica. Desta maneira, a falta de informações a respeito destes materiais torna necessário o estudo detalhado das características físicas, químicas e de citocompatibilidade de blendas e compósitos de fibroína de seda e alginato de sódio.

## **2 OBJETIVOS**

Este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

## **Objetivo geral:**

Obtenção e caracterização de blendas e compósitos de fibroína de seda com alginato de sódio.

## **Objetivos específicos:**

- Obtenção de membranas de alginato de sódio com fibroína de seda em solução (para a obtenção das blendas) e na forma de fios (para a obtenção dos compósitos);

- Caracterização química e física das blendas a fim de verificar sua estrutura química, cristalinidade, morfologia, estabilidade térmica, resistência mecânica e miscibilidade entre os componentes da blenda;

 Caracterização de compósitos de fibroína de seda e alginato de sódio, com diferentes quantidades de fios de fibroína incorporados, sendo avaliadas principalmente as propriedades mecânicas e a interação fibra-matriz dos compósitos;

- Realização de testes de citotoxicidade para avaliar a possibilidade de aplicação das membranas na área de engenharia tecidual.

# **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 3.1 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. Cada uma destas sedas tem uma seqüência de aminoácidos diferente e, portanto, possui diferentes propriedades (Altman *et al.*, 2003). Condições diferentes no processamento da seda, como o clima, ambiente, nutrição do artrópode e velocidade de formação do fio também influenciam diretamente as propriedades mecânicas do fio de seda formado (Hakimi *et al.*, 2007).

As sedas mais estudadas são as produzidas pelo bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*) e por aranhas do gênero *Nephila clavipes*. Porém, apesar da seda da aranha possuir melhores propriedades mecânicas, ela não é comercializada para a indústria têxtil ou utilizada em aplicações biomédicas devido à natureza predatória das aranhas, o que restringe sua criação em condições confinadas. Além disso, a aranha produz quantidades pequenas de seda, quando comparada com a produção do bicho-da-seda (MacIntosh *et al.*, 2008).

O casulo do bicho-da-seda é composto primariamente por sericina e fibroína. A sericina é responsável por envolver as fibras da fibroína, como uma espécie de cola. Alguns casos de hipersensibilidade à seda já foram relatados e atribuídos à sericina, porém sabe-se que se a mesma for retirada é possível obter membranas adequadas para utilização como biomaterial (Altman *et al.*, 2003).

A estrutura química da fibroína é composta predominantemente por glicina, alanina, serina e, em menor quantidade, tirosina, sendo que a fração molar destes quatro aminoácidos representa 90% de sua estrutura (Sashina *et al.*, 2006). A fibroína apresenta uma região cristalina, com repetições dos aminoácidos em seqüência, e uma região amorfa, com a maioria dos aminoácidos residuais com uma cadeia de lados volumosos e polares, sendo mais abundantes em fibroínas de seda selvagem. As propriedades de tensão das fibras da seda dependem principalmente da estrutura cristalina, enquanto as propriedades físicas, como retenção de umidade e resistência química, dependem do estado da região amorfa (Mori e Tsukada, 2000). A estrutura primária da fibroína pode ser visualizada na Figura 1.



Figura 1: Estrutura primária da fibroína de seda. Fonte: Nogueira, 2005.

A fibroína, como a maioria das proteínas, possui três tipos principais de conformações da estrutura secundária: folha- $\beta$ , hélice- $\alpha$  e enovelamento aleatório presentes em proporções diferentes (Canevarolo Jr., 2006). As conformações do tipo hélice- $\alpha$  e enovelamento aleatório também são chamadas de seda I, enquanto que a conformação do tipo folha- $\beta$  é denominada de seda II.

A conformação do tipo folha- $\beta$  é a forma mais estável, onde as cadeias da fibroína são ligadas por pontes de hidrogênio entre os segmentos adjacentes das cadeias polipeptídicas. A estrutura  $\beta$  tende a interagir com outra estrutura  $\beta$ , por pontes de hidrogênio entre os grupos carbonila de uma com os grupos amino de outra (Nelson e Cox, 2000; Cozzone, 2002). Sua estrutura pode ser visualizada na Figura 2.



Figura 2: Conformação estrutural folha- $\beta$ . Fonte: Nelson e Cox, 2000.

Na conformação do tipo hélice- $\alpha$  (Figura 3) os polipeptídios estão ligados ao redor de um eixo imaginário longitudinal, formando uma espiral ou hélice. Esta é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os grupos C=O dos resíduos dos aminoácidos da cadeia principal e os grupos N-H na seqüência de aminoácidos, sendo também estabilizada por interações de Van der Waals (Cozzone, 2002). Esta conformação confere elasticidade macroscópica, devido à possibilidade de estiramento máximo da cadeia (Nelson e Cox, 2000).



Figura 3: Conformação estrutural hélice-α. Fonte: Chasin e Mowshowitz, 2009.

A conformação enovelamento aleatório, predominante em proteínas, é uma estrutura aleatória, sem nenhuma periodicidade, onde as moléculas podem se ligar de todas as formas possíveis. Normalmente, esta conformação é apresentada em cadeias poliméricas amorfas (Canevarolo Jr., 2006).

As três conformações moleculares da fibroína coexistem em sua estrutura, porém podem ser feitos tratamentos físicos e químicos utilizando altas temperaturas, solventes orgânicos, como o etanol e o metanol, umidade elevada e força mecânica, para promover a transição da conformação seda I, menos estável, para a seda II, estável e insolúvel em água (Kawahara *et al.*, 2006; Putthanarat *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2008).

Um importante fator a ser considerado na produção de membranas de fibroína é o pH. Em valores de pH entre 8 e 9, a fibroína apresenta principalmente conformação enovelamento aleatório, quando em solução. Nesta conformação estrutural, um maior número de grupos ativos fica exposto, permitindo assim uma maior interação entre a fibroína e outros materiais (Du *et al.*, 2009).

A fibroína na forma de fios, como todas as proteínas fibrosas, é insolúvel em água devido à alta concentração de aminoácidos residuais hidrofóbicos no seu interior e em sua superfície (Nelson e Cox, 2000). A solubilidade pode ser relacionada com a capacidade de um número substancial de grupos polares, localizados na superfície, solvatar na água através de ligações de hidrogênio. Esta capacidade de solvatação dependerá do pH, da força iônica do solvente e da temperatura (Farfán, 1994). A fibroína é dissolvida em soluções concentradas de ácidos e em soluções aquosas e orgânicas de sais (Sashina *et al.*, 2006).

Os fios de fibroína são biodegradáveis e altamente cristalinos, com estrutura folha- $\beta$  bem alinhada. Possuem alta resistência à tensão, boa elasticidade e resiliência. Fios de fibroína são altamente estáveis, iniciando sua degradação térmica em temperaturas acima de 150 °C (Lee *et al.*, 2005).

A fibroína tem sido utilizada em aplicações biomédicas como sutura desde o final do século 19, provando ser um biomaterial eficiente para este tipo de utilização (MacIntosh *et al.*, 2008). Vários pesquisadores têm investigado a fibroína como um recurso promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua biocompatibilidade, alta permeabilidade ao oxigênio e vapor d'água, biodegradabilidade, mínima reação inflamatória, possibilidade de esterilização e preparo com diferentes morfologias, alta estabilidade térmica e resistência microbiana (Um *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002).

Existem alguns artigos de revisão relatando as aplicações potenciais da fibroína no campo biomédico, como pele artificial e sistemas de liberação controlada (Ki *et al.*, 2009), substrato para imobilização enzimática, lentes de contato com alta permeabilidade ao oxigênio e biosensores para a detecção de doenças (Mori e Tsukada, 2000) e cultura de células de vários tecidos, incluindo tecido ósseo, cartilaginoso e de ligamentos (Vepari e Kaplan, 2007; MacIntosh *et al.*, 2008).

## 3.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo de cadeia linear obtido da parede celular de algas marinhas marrons e bactérias, e é responsável por promover rigidez e flexibilidade às mesmas. A maioria dos alginatos é extraída de algas colhidas de seu habitat natural, uma vez que o seu cultivo é muito caro, o que inviabilizaria sua aplicação industrial (Rinaudo, 2008).

A principal fonte de extração do alginato são as algas marinhas marrons e o seu preparo envolve lavagem e maceração das algas, seguido pela extração do alginato utilizando solução de carbonato de sódio ou hidróxido de sódio. O extrato é filtrado e o alginato é isolado por precipitação através da adição de cloreto de cálcio ou cloreto de sódio ao filtrado (Haug e Larsen, 1963; Rinaudo, 2008).

O alginato é uma mistura complexa de dois tipos de ácidos, o ácido  $\beta$ -D-manurônico, com conformação linear e flexível, e o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico, de conformação estrutural rígida. Os ácidos  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-gulurônico são estereoquimicamente diferentes devido a uma diferença no C-5 (Figura 4) (Qin, 2008). Dependendo da espécie da qual se extrai o alginato, do local e da época do ano, a proporção destes ácidos na cadeia do alginato é diferente, resultando em propriedades físicas distintas ao mesmo (Avella *et al.*, 2007).



Figura 4: Estrutura química do ácido α-L-gulurônico (G) e do ácido β-D-manurônico (M). Adaptado de: Drury *et al.*, 2004.

Considera-se que o alginato é constituído por três tipos de blocos. Os blocos GG, contendo unidades de ácido gulurônico, os blocos MM, com unidade de ácido manurônico e os blocos GM, com unidades alternadas de ácido gulurônico e manurônico. A Figura 5 apresenta uma representação esquemática da estrutura estereoquímica dos blocos GG, MM e GM.



Figura 5: Estrutura estereoquímica dos blocos GG, MM e GM. Fonte: Chaplin, 2010.

As propriedades físicas do alginato dependem não somente das proporções dos ácidos gulurônico e manurônico em sua cadeia, mas também das proporções relativas dos três tipos de blocos. Por exemplo, a formação de géis de alginato pela adição de íons cálcio envolve os blocos GG, portanto, quanto maior for o conteúdo de blocos GG em sua cadeia, maior será a resistência mecânica deste gel (Qin, 2008).

Os blocos dos ácidos gulurônico e manurônico podem estar arranjados de formas distintas, formando três tipos de configurações: hélice dupla para os blocos manurônicos, hélice tripla para os blocos gulurônicos na presença de sais de sódio e hélice dupla dos blocos gulurônicos na presença de sais de cálcio (Rinaudo, 2008).

O alginato é insolúvel em água à temperatura ambiente, sendo o preparo de sua solução um pouco complicado. Ele deve ser disperso em água, sob alta taxa de cisalhamento (agitação) ou com aquecimento (Oliveira, 2004). Soluções aquosas de alginato apresentam diminuição de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, podendo ser classificadas como fluido não-newtoniano. O alginato pode ser preparado em uma larga variedade de massas moleculares, variando entre 50 a 100.000 kDa (Augst *et al.*, 2006).

A viscosidade da solução de alginato diminui com o aumento de temperatura. Com relação ao pH, em pH abaixo de 5 os grupos -COO<sup>-</sup> começam a ser protonados, diminuindo a

repulsão eletrostática entre eles, o que permite a formação de pontes de hidrogênio, aumento de viscosidade e, consequentemente, possibilita a formação de gel (Qin, 2008).

Devido à sua estrutura linear e elevada massa molecular, o alginato é capaz de formar filmes resistentes e boas fibras no estado sólido (Rinaudo, 2008). O alginato possui facilidade em formar gel, sendo capaz de reter grande quantidade de água. A formação deste gel é independente da temperatura, o que faz com que este biopolímero seja utilizado na maioria das vezes sob esta forma. É um material muito utilizado como agente espessante e estabilizante em alimentos, e também na produção de adesivos, tintas, brinquedos e papéis (Oliveira, 2004).

Na área biomédica o alginato possui algumas características vantajosas como biocompatibilidade, não toxicidade, hidrofilicidade e capacidade de formar gel. A gelificação do alginato permite a encapsulação de várias substâncias, e quando modificado quimicamente, é utilizado na liberação controlada de proteínas que promovem a regeneração do tecido mineralizado e como carregador de células transplantadas. Porém, a sua baixa taxa de degradação constitui uma desvantagem que ainda está sendo estudada (Augst *et al.*, 2006).

O alginato de sódio vem sendo estudado para usos como matriz para suporte de culturas celulares específicas, imobilização de microorganismos, excipiente para medicamentos, material para impressão dental e curativo para ferimentos (Lee *et al.*, 2004a; Augst *et al.*, 2006; Avella *et al.*, 2007; Qin, 2008; Ko *et al.*, 2010).

## 3.3 Blendas poliméricas

As blendas poliméricas constituem-se na mistura (física ou mecânica) de pelo menos dois polímeros, de forma que só exista interação intermolecular secundária entre as cadeias moleculares dos polímeros, sem que haja reação química entre os mesmos (Wiebeck e Harada, 2005).

Existem duas formas tradicionais de se obter blendas poliméricas: sob temperatura suficientemente alta para fundir os polímeros sem causar degradação dos mesmos, ou dissolvendo os polímeros em um solvente comum a ambos, sendo o solvente evaporado posteriormente (Wiebeck e Harada, 2005).

Através da formação de blendas poliméricas é possível obter uma sinergia das propriedades individuais de cada material, além da possibilidade de melhorar ou controlar suas propriedades mecânicas finais devido à interação entre as estruturas químicas.

Um dos principais problemas no desenvolvimento de blendas poliméricas é encontrar sistemas miscíveis. Uma blenda é dita miscível quando as moléculas poliméricas se misturam intimamente, não havendo segregação entre as moléculas, ou seja, separação de fase. O termo miscível está diretamente relacionado com a solubilidade, ou seja, os polímeros são miscíveis quando se dissolvem mutuamente, apresentando uma única fase (Paul e Newman, 1978). Existem diversas técnicas que permitem investigar a miscibilidade entre componentes de uma blenda polimérica, como a microscopia eletrônica de varredura (escala micrométrica), a análise dinâmico-mecânica (escala nanométrica) e a espectroscopia de infravermelho (escala molecular) (Garton, 1992).

Outro termo complementar ao de miscibilidade de blendas refere-se à sua compatibilidade. Blendas são ditas compatíveis quando apresentam propriedades úteis ou satisfatórias. Portanto, blendas imiscíveis podem ser compatíveis, assim como blendas miscíveis podem ser incompatíveis. Um dos principais objetivos no estudo de blendas poliméricas é tornar compatíveis os sistemas incompatíveis, e isto pode ser feito através de modificações químicas ou do uso de aditivos (Paul e Newman, 1978; Akcelrud, 2007).

#### 3.3.1 Blendas com fibroína de seda

A formação de blendas poliméricas permite a obtenção de materiais com novas propriedades, e é especialmente interessante se forem utilizados polímeros naturais (Sashina *et al.*, 2007a). A técnica de formação de blendas poliméricas tem sido usada há alguns anos. Alguns pesquisadores verificaram que as propriedades físicas de membranas de fibroína de seda podem ser melhoradas formando-se blendas de fibroína com outros polímeros sintéticos ou naturais, como o poli(vinil álcool) (PVA<sub>1</sub>) (Sashina *et al.*, 2007b), a celulose (Marsano *et al.*, 2008), a quitosana (Kweon *et al.*, 2001; Sashina *et al.*, 2007a) e o alginato de sódio (Lee *et al.*, 2004a), entre outros.

Membranas de fibroína de seda e queratina foram desenvolvidas por Vasconcelos *et al.* (2008), sendo a queratina dissolvida tanto em solução aquosa como em solução de ácido fórmico.

Foi verificada nas blendas uma modificação nas bandas de amida da fibroína, que caracterizam sua conformação estrutural, provavelmente induzida pela adição da queratina. Isto ocorreu principalmente nas blendas com ácido fórmico, uma vez que este é capaz de induzir a cristalização da fibroína.

Yeo *et al.* (2000) estudaram blendas de PVA<sub>l</sub>/quitosana/fibroína para aplicação na cicatrização de feridas em ratos. Eles verificaram que a cicatrização ocorreu mais rapidamente quando utilizada a blenda contendo os três componentes, seguida da blenda quitosana/fibroína, fibroína pura, blenda PVA<sub>l</sub>/quitosana e quitosana pura. Os autores relataram a necessidade de ajuste de pH para um valor entre 5,0 e 5,5 para a obtenção das blendas estudadas.

Kweon *et al.* (2001) estudaram filmes de blendas poliméricas de fibroína de seda e quitosana, a fim de entender o efeito da relação fibroína:quitosana nas características físicas dos filmes. Eles verificaram que as propriedades mecânicas dos filmes são melhoradas quando formadas blendas de fibroína de seda com 10 a 40% de quitosana e que a permeabilidade ao oxigênio é mais elevada em blendas contendo 40-50% de quitosana. Um estudo semelhante foi conduzido por Park *et al.* (1999), onde foram verificadas melhorias nas propriedades mecânicas e também uma tendência à cristalização, principalmente em um conteúdo de quitosana de até 30%. She *et al.* (2008) verificaram que, quanto maior o conteúdo de quitosana na blenda, maior a formação de uma estrutura mais organizada na fibroína. Isto foi atribuído ao fato de serem formadas pontes de hidrogênio entre a fibroína e a quitosana, estabilizando assim sua conformação.

#### 3.3.1.1 Blendas de fibroína de seda com alginato de sódio

O alginato de sódio parece ser bastante promissor como o segundo componente de blendas com fibroína de seda, pois possui grupos ativos capazes de interagir com as macromoléculas de fibroína, condição necessária para a compatibilidade dos polímeros em soluções e filmes.



Figura 6: Representação esquemática da ligação por pontes de hidrogênio entre a fibroína e o alginato de sódio. Fonte: Liang e Hirabayashi, 1992.

Blendas de fibroína de seda com alginato de sódio foram pouco estudadas na literatura, limitando-se a somente três artigos publicados (Liang e Hirabayashi, 1992; Lee *et al.*, 2004a; Roh *et al.*, 2006). Inicialmente, Liang e Hirabayashi (1992) estudaram a interação por pontes de hidrogênio entre a fibroína e o alginato de sódio (Figura 6), além de verificar o aumento da tensão de ruptura das membranas quando adicionado um conteúdo máximo de 30% de alginato na fibroína, e um aumento no alongamento das membranas quanto maior a quantidade de alginato adicionada.

Lee *et al.* (2004a) estudaram as propriedades físicas e estruturais de blendas esponjosas de fibroína de seda e alginato de sódio. O método de obtenção das blendas por estes autores foi por mistura e liofilização, obtendo assim a estrutura esponjosa. Os autores verificaram que as características estruturais da fibroína de seda nestas blendas não foram afetadas pela incorporação de alginato de sódio, além disso, foi observada separação macroscópica de fases. Entretanto as

propriedades mecânicas das blendas melhoraram, uma vez que o alginato de sódio é um polissacarídeo rígido.

Em um estudo complementar, as blendas esponjosas de fibroína e alginato foram utilizadas para a cicatrização de feridas em ratos (Roh *et al.*, 2006). Foi constatado que a cicatrização utilizando as blendas fibroína/alginato, contendo 50% de cada biopolímero, foi a melhor entre as membranas utilizadas, melhor inclusive que o curativo usado clinicamente, o Nu Gauze<sup>TM</sup> (Johnson & Johnson Co.), usado como controle no estudo. A cicatrização utilizando esta blenda envolve a re-epitelização através da rápida proliferação das células epiteliais e deposição de colágeno pela proliferação de fibroblastos. A blenda de fibroína e alginato tem efeito sinérgico na cicatrização de feridas, acelerando a re-epitelização e surgindo como um material com grande potencial para ser utilizado clinicamente.

## **3.4 Plastificantes**

Plastificante é uma substância que, adicionada a um material polimérico, modifica as propriedades do mesmo, com o intuito de melhorá-las. Essas propriedades modificadas podem ser: processabilidade, flexibilidade, módulo de elasticidade, dureza, viscosidade do material fundido e temperatura de transição vítrea (Rabello, 2000).

A ação dos plastificantes em filmes poliméricos baseia-se na diminuição das forças intermoleculares, provocando a separação entre as macromoléculas do polímero e aumentando assim a mobilidade de suas cadeias, melhorando as propriedades mecânicas, como a flexibilidade (Zactiti, 2004). O plastificante atua como um espaçador molecular, porém algumas vezes ele pode interagir com o polímero por interações do tipo dipolo-dipolo ou do tipo pontes de hidrogênio, sendo que quanto mais forte for esta interação, menor será o espaçamento entre as cadeias do polímero e conseqüentemente, maior a sua dureza e rigidez. Quanto à alteração nas propriedades mecânicas, pode-se dizer que, geralmente, o uso de plastificantes provoca aumento no alongamento e diminuição na resistência tênsil e no módulo elástico (Rabello, 2000).

A utilização de aditivos (plastificantes) em polímeros vem se tornando cada vez maior, a fim de conferir boas características de processabilidade e uso final. O plastificante pode ser considerado como o principal componente de uma determinada composição polimérica, logo após o polímero base (Zaioncz, 2004).

Dai *et al.* (2002) estudaram membranas de fibroína e poli(vinil álcool) (PVA<sub>1</sub>) e verificaram que as membranas das blendas fibroína/PVA<sub>1</sub> sem glicerina apresentaram separação de fases, enquanto que as membranas contendo glicerina mostraram-se bastante homogêneas. Acredita-se que a glicerina ajudou na interação entre a fibroína e o PVA<sub>1</sub> devido à ligações por pontes de hidrogênio dos grupos hidroxila do PVA<sub>1</sub>, hidroxila da glicerina e amida da fibroína. Além disso, a adição da glicerina melhorou o alongamento e a força na ruptura das membranas, pois aumentou o espaçamento entre as moléculas da fibroína e do PVA<sub>1</sub>, tornando seu movimento mais fácil, portanto, mais elástico.

A necessidade da adição de glicerina para atuar como plastificante em membranas também foi verificada por Du *et al.* (2009), em blendas de fibroína e hidroxiapatita. As membranas contendo glicerina ficaram mais flexíveis e transparentes. As blendas também apresentaram estrutura cristalina (folha- $\beta$ ) induzidas pela adição da glicerina e da hidroxiapatita.

Jin *et al.* (2004) testaram a adição de poli(etileno glicol) (PEG), com massa molecular de 3400 g/mol, na solução de fibroína, a fim de formar membranas de blendas fibroína/PEG com melhores propriedades mecânicas. Eles verificaram separação macroscópica de fases em todas as faixas de composições estudadas durante a evaporação do solvente e formação do filme. Além disso, após a imersão das membranas em solução de metanol 90%, para converter a fibroína para sua forma mais estável, esta separação de fases tornou-se ainda mais pronunciada, uma vez que os domínios de PEG tornaram-se opacos e os domínios de fibroína permaneceram transparentes. Indicando claramente a não-compatibilidade destes dois materiais.

Já o PEG-8000 mostrou-se não-compatível com o alginato de sódio. As membranas de alginato confeccionadas com PEG eram opacas, com pontos de separação de fases. Além disso, ocorreu exclusão física do plastificante, indicando claramente a incompatibilidade entre o PEG e o alginato (Olivas e Barbosa-Canovas, 2008).

Desta maneira, a adição de PEG como plastificante nas membranas estudadas neste trabalho foi descartada, dando-se prioridade ao estudo da adição de glicerina como plastificante. Foi comprovado em estudos anteriores que a glicerina possui boa compatibilidade com a fibroína (Lu *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2002) e também com o alginato (Olivas e Barbosa-Canovas, 2008; Avella *et al.*, 2007), além de possibilitar uma maior interação entre os componentes de blendas com fibroína. Porém a glicerina apresenta como desvantagem a sua solubilização em meios aquosos,

sendo extraída da membrana quando a mesma é imersa em soluções utilizadas para sua estabilização ou lavagem (Dallan, 2005).

#### 3.5 Compósitos

Compósitos são constituídos por uma fase contínua denominada matriz (pode ser metálica, cerâmica ou polimérica) e por uma fase descontínua denominada fase dispersa (fibras contínuas, fibras picadas ou partículas). Os biocompósitos, estudados mais recentemente, são definidos como materiais compósitos, compostos por fibras naturais biodegradáveis como reforço e uma matriz polimérica que pode, ou não, ser biodegradável (Lee *et al.*, 2005).

Apesar do estudo de biocompósitos ser bastante recente (o interesse em biocompósitos começou na última década), eles são bastante encontrados na natureza, de forma a se ter estruturas finais com melhores propriedades mecânicas do que seus componentes sozinhos. Exemplos deste tipo de estruturas são o bambu, ossos, pérolas, madeira, entre outros.

As propriedades mecânicas de compósitos reforçados com fibras dependem fortemente das propriedades do reforço e da matriz, da carga de fibra (fração volumétrica), da orientação e comprimento das fibras e das propriedades da interface reforço/matriz. A adesão fibra-matriz em um material compósito é um dos pontos principais. Ela está diretamente relacionada à presença de grupos funcionais na superfície da fibra, orientação, cristalinidade e propriedades químicas da mesma, bem como à conformação molecular e constituição química da matriz (Levy Neto e Pardini, 2006).

As principais vantagens associadas ao uso de fibras naturais estão em sua não-toxicidade, biodegradabilidade, baixo custo e boa resistência por massa de material quando comparadas com fibras sintéticas. As fibras naturais podem ser usadas como reforços biodegradáveis a fim de melhorar suas propriedades mecânicas, controlar a biodegradabilidade do biocompósito e também reduzir o seu peso (Lee *et al.*, 2005).

As fibras naturais são divididas em categorias, de acordo com sua origem: animais e vegetais. Fibras vegetais são compostas por celulose (frutas, sementes, folhas, madeiras), enquanto que fibras animais são compostas por proteínas, como a fibroína e a queratina (John e Thomas, 2008).

Existem diversos estudos na literatura relatando o uso de fibras vegetais em biocompósitos, como fibras de sisal, de bambu, de curauá, de coco, de juta, entre outros (Singha e Thakur, 2008; Alvarez *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Bledzki *et al.*, 2009; Corradini *et al.*, 2009; Silva e Aquino, 2008). Existem inclusive alguns artigos de revisão sobre compósitos reforçados com fibras de celulose (Mishra *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2002; John e Thomas, 2008; John e Anandjiwala, 2008). Porém estudos com fibras animais, como a fibroína, são raros.

As fibras de fibroína exibem algumas vantagens em relação às fibras vegetais, como propriedades das fibras uniformes, tipo de fibra contínua, elevada resistência mecânica, elevada cristalinidade e elevada resistência à umidade e temperatura (Han *et al.*, 2006). Devido a estas propriedades, alguns cientistas e companhias estão tentando produzir fibroína em laboratório com a finalidade de aplicação em tecidos e cordas de alto desempenho.

Além disso, na manufatura da seda, uma grande quantidade de fios de seda são descartados por terem sido quebrados ou não apresentarem o tamanho necessário para a aplicação da seda para fins têxteis. Estes fios de descarte são materiais potenciais para a utilização como reforço em biocompósitos.

#### 3.5.1 Compósitos com fibroína de seda

As fibras de fibroína têm aproximadamente 10-25  $\mu$ m de diâmetro e de um único casulo pode-se obter até 1000 m de fibras de fibroína através da remoção da sericina por imersão em água fervente ou solução alcalina (Vepari e Kaplan, 2007; Plaza *et al.*, 2008). As fibras de fibroína são biodegradáveis, altamente cristalinas e com estrutura predominantemente folha- $\beta$ . São altamente estáveis à umidade e temperatura, iniciando sua degradação em temperaturas acima de 150 °C (Lee *et al.*, 2005).

A elevada resistência mecânica apresentada pelos fios de fibroína, aliada à sua capacidade de adesão celular, tornam muito interessante sua utilização como fibra de reforço em compósitos poliméricos (Xia e Lu, 2008). Existem poucos estudos na literatura sobre a formação de compósitos com fios de fibroína de seda, especialmente para aplicação na área biomédica.

Existem relatos na literatura de compósitos utilizando diretamente os fios de fibroína de seda fornecidos pela fiação com polímeros sintéticos como matrizes, como a poli(ɛ-caprolactona)

(Li *et al.*, 2008) e o poli(butileno sucinato) (Han *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005), utilizando prensagem a quente para obtenção dos compósitos. Nestes estudos verificou-se a existência de comprimento e conteúdo máximo de fios de fibroína que pode ser adicionado a fim de obter a máxima resistência mecânica. Verificou-se que o comprimento ideal dos fios é de 12,7 a 25,4 mm (1/2 in e 1 in) com um conteúdo máximo de 35 a 50% de fios de fibroína, em massa. Os autores verificaram que em conteúdos mais elevados, a matriz não era suficiente para cobrir estes fios, causando menor transferência de carga da matriz para a fibra, resultando na queda da resistência mecânica.

Um biocompósito para aplicações em engenharia tecidual foi preparado a partir de fibras de fibroína e poli(ácido láctico) (PLA) (Cheung *et al.*, 2008). Os biocompósitos foram obtidos por extrusão e injeção e foram utilizadas fibras curtas, de 3 a 6 mm. O tamanho e conteúdo das fibras foram os principais parâmetros que influenciaram as propriedades mecânicas do biocompósito. O biocompósito com maior resistência mecânica foi obtido quando utilizadas fibras de 5 mm e em um conteúdo mássico de 5%. Os autores consideraram os fios de fibroína ótimos candidatos para atuar como reforço no desenvolvimento de *scaffolds* (matrizes tridimensionais porosas) poliméricos.

Além das fibras, micropartículas de fibroína (5-50 µm) provaram ser eficientes no reforço de *scaffolds* com PLA e melhoraram a proliferação celular (Lv *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007). As micropartículas eram misturadas ao PLA, em proporção de 50% em massa de cada material, e os *scaffolds* foram obtidos por liofilização. As micropartículas foram uniformemente distribuídas no *scaffold* e sua presença melhorou a adesão e crescimento de células HepG2, quando comparado com o material sem a presença das micropartículas de fibroína. Além disso, foi verificado que a presença de fibroína diminuiu a resposta inflamatória do material, melhorando suas características para aplicação na regeneração do tecido hepático.

Não foram encontrados artigos na literatura que relatassem a utilização de biopolímeros como matriz em biocompósitos com fibroína de seda. Acredita-se que esta limitação esteja relacionada ao fato de que polímeros naturais não podem ser processados pelos métodos usuais de processamento de polímeros como a extrusão e injeção. Um dos maiores desafios ligados à biocompósitos contendo fibroína seria justamente o uso de uma matriz biopolimérica, obtendo-se um material completamente natural, biodegradável e ecologicamente correto.

## 3.6 Biomateriais

O termo biomaterial foi definido na Conferência da Sociedade Européia de Biomateriais como "qualquer substância, diferente de uma droga, ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, que pode ser usada por um período de tempo indeterminado, como um todo ou como uma parte de um sistema que trata, melhora ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo" (Williams, 1987). Um conceito complementar ao de biomaterial é a definição de biocompatibilidade, que é a capacidade de um material desempenhar uma resposta apropriada em uma aplicação específica (Remes e Williams, 1992).

O desenvolvimento de um novo biomaterial envolve conhecimentos multidisciplinares como engenharia e ciência dos materiais, biotecnologia e ciências médicas. Um determinado material deve apresentar uma série de características comuns para poder ser aplicado como biomaterial. Ele deve ser biocompatível, ser bioestável, não ser tóxico, inflamatório ou carcinogênico e ter propriedades mecânicas adequadas à sua função (Ratner *et al.*, 2004).

Os biomateriais podem ser classificados como naturais (fibras protéicas, polissacarídeos etc.) ou sintéticos (metais, cerâmicas, polímeros etc.). Também podem ser classificados como bioabsorvíveis ou temporários (alguns tipos de suturas, enxertos etc.) e bioestáveis ou permanentes (válvulas cardíacas, próteses de articulações, próteses ósseas metálicas etc.) (Dallan, 2005).

Os biomateriais têm um papel importante na engenharia tecidual, que é a ciência que estuda ou desenvolve processos para sintetizar ou regenerar tecidos e órgãos. Na engenharia tecidual, as células são semeadas *in vitro* e aderidas em uma matriz sintética, que é implantada no paciente. À medida que a matriz se degrada, uma nova matriz natural é produzida pelo organismo, regenerando o tecido ou órgão (Nogueira, 2005).

Os polímeros biodegradáveis têm ampla aplicação na engenharia tecidual, pois normalmente apresentam um tempo curto de duração e não é necessária sua retirada do organismo, sendo degradados por enzimas ou por hidrólise (Rodas, 2004).

O estudo de polímeros para aplicação em biomateriais vem se desenvolvendo intensamente, sendo o comportamento mecânico do material estudado crucial para determinar o sucesso ou fracasso de sua aplicação. Um dos objetivos principais da ciência dos materiais é controlar as propriedades mecânicas através de modificações na microestrutura cristalina do

material. As propriedades biológicas também podem ser modificadas para realçar a especificidade de tecidos, atividade celular e biocompatibilidade (Maskarinec e Tirrell, 2005).

Além disso, o conhecimento da taxa de degradação de biomateriais utilizados como implantes é fundamental, pois a degradação do biomaterial deve coincidir com as necessidades mecânicas e fisiológicas enquanto o novo tecido biológico é formado. Estudos de degradação *in vitro* da fibroína demonstraram que esta é susceptível à degradação biológica quando exposta à enzimas proteolíticas (Monti *et al.*, 2005). 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. Já o alginato de sódio não sofre degradação enzimática no organismo e, consequentemente, sua taxa de degradação não pode ser controlada, o que constitui uma desvantagem em aplicações onde o controle da degradação é requerido. A degradação *in vivo* do alginato é um dos maiores problemas relacionados à sua aplicação como dispositivo médico, entretanto, métodos de modificação física e/ou química podem ser usados para controlar sua cinética de degradação (Augst *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004b).

A esterilização também é uma etapa fundamental no desenvolvimento de dispositivos médicos, e a funcionalidade de qualquer sistema de esterilização deve ser determinada através de sua eficácia em exterminar microrganismos, além de sua capacidade de não alterar de forma negativa as propriedades funcionais do material (Vangsness *et al.*, 2006).

Weska (2009) realizou um estudo bastante completo sobre a influência de diferentes métodos de esterilização nas características físicas, químicas e biológicas de membranas de fibroína. Os resultados mostraram que, além de serem eficientes na eliminação de microorganismos, nenhum método ocasionou degradação das membranas ou a formação de produtos citotóxicos, provando que a fibroína pode ser esterilizada em condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, o que é pouco comum dentre os biopolímeros. Além disso, quando utilizados etanol 70%, autoclave ou óxido de etileno as membranas tornaram-se mais estáveis e cristalinas, o que pode ser aproveitado quando se deseja uma degradação *in vivo* mais lenta.

Em um estudo sobre métodos de esterilização para soluções de alginato, Leo *et al.* (1990) comparou o efeito da autoclavagem, da radiação gama e da esterilização por óxido de etileno nas propriedades do alginato. Processos térmicos, como a autoclave, acabaram causando a clivagem das cadeias de alginato, deteriorando sua estrutura, uma vez que o alginato é um biopolímero com baixa resistência térmica. A radiação gama causou grande diminuição da viscosidade da solução,

o que indica que houve a quebra de suas moléculas e conseqüente degradação. Dentre os métodos estudados, o mais adequado foi a esterilização por óxido de etileno, no entanto, alguns cuidados devem ser tomados, uma vez que o óxido de etileno pode reagir quimicamente com o material esterilizado, além de ser um gás tóxico e cancerígeno, o que leva à necessidade de um procedimento de areação subseqüente à esterilização a fim de se evitar efeitos tóxicos residuais (Weska, 2009).

Para a regeneração da pele, os biomateriais normalmente se apresentam na forma de filmes, espumas, géis ou compósitos e devem apresentar como características fundamentais leveza, ausência de odor, impermeabilidade a microorganismos, permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, devem ser adequados ao manuseio e resistentes ao rasgo e à tração, além de serem biodegradáveis e não produzirem reações inflamatórias (Rodas, 2004; Dallan, 2005).

Existem relatos do uso de fios de fibroína por cirurgiões no recobrimento de feridas há pelo menos 3000 anos. Esforços têm sido feitos para desenvolver curativos de alto desempenho usando fibroína de seda devido à sua biocompatibilidade e efeitos cicatrizantes. A fibroína apresenta baixa resposta inflamatória quando em contato com o ferimento, enquanto que gases de algodão, comumente utilizadas, podem causar inflamação e inibir a cicatrização. Curativos a base de fibroína podem ser fabricados utilizando uma larga variedade de métodos de processamento e formas do curativo, como filmes ou esponjas (Ki *et al.*, 2009). Além disso, a fibroína possui boa permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, compatibilidade sanguínea e acelera a formação de colágeno e proliferação de fibroblastos (Kweon *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o alginato tem sido utilizado como material para a fabricação de produtos para cicatrização úmida (*moist healing*) na forma géis, espumas e não-tecidos fibrosos que são usados para cobrir os ferimentos. O alginato pode ser usado tanto na forma seca, com o objetivo de absorver fluido da ferida, ou na forma de gel hidratado, fornecendo umidade ao ferimento seco. Em ambos os casos, a interação entre o curativo de alginato e a superfície do ferimento cria um ambiente com umidade ideal para a cicatrização, uma vez que em ambientes úmidos a migração de células epiteliais das extremidades da ferida para o seu centro é mais rápida do que quando os ferimentos são mantidos em um ambiente seco (Qin, 2008). Já existem curativos de alginato comercializado como o AlgiDERM<sup>®</sup> e o Sorbsan<sup>®</sup>, confeccionados a partir de fibras de alginato de cálcio esterilizadas (Rinaudo, 2006).

Apesar do potencial de aplicação na regeneração da pele, membranas de fibroína de seda e alginato juntos foram pouco estudadas na literatura, sendo que estes dois biopolímeros são bastante promissores para aplicações biomédicas.
# **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 4.1 Matérias-primas

Foram utilizados casulos do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* para o preparo da solução de fibroína e obtenção das blendas poliméricas. Para o preparo dos compósitos foram utilizados fios de fibroína tipo Gregia 20/22 6A. Foi utilizada uma meada de fios, sendo que cada fio desta meada era composto por fios de 7 casulos, que são fervidos em água para remoção da sericina e têm suas pontas unidas e alinhadas. Tanto os casulos quanto os fios Gregia foram gentilmente fornecidos pela Fiação de Seda Bratac (Bastos, SP).

O alginato de sódio utilizado na obtenção das blendas foi da marca Vetec e a glicerina, utilizada como plastificante, da marca Synth, com pureza mínima de 99,5%.

# 4.2 Preparo das soluções

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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 g/L, durante 30 min, em banho termostatizado, à temperatura de 85 °C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, os fios de fibroína obtidos foram lavados com água destilada em abundância. Os fios foram secos a temperatura ambiente por 24 a 48 h (Li *et al.*, 2002).

Os fios secos e livres de sericina foram moídos em moinho de 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. Para cada 5 g de fios moídos foram adicionados 100 mL de solução ternária de cloreto de cálcio, etanol e água (CaCl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH:H<sub>2</sub>O 1:2:8 molar) e a suspensão obtida foi mantida a 85 °C em banho termostatizado até dissolução completa dos fios da seda por, no máximo, 1 h e 30 min (Um *et al.*, 2001).

A solução salina de fibroína a 5% foi dialisada em água destilada por 3 dias, a 10 °C, para a remoção do cálcio presente na solução. A água da diálise foi trocada a cada 24 h, na proporção volumétrica solução de fibroína:água de 1:15 (Nogueira, 2005). Ao final da diálise obteve-se uma solução a 2,5% m/v, que foi diluída em água destilada até a concentração final de 2%.

O alginato de sódio foi dissolvido em NaOH 0,1 M a fim de se obter uma solução em concentração de 2% m/v. A solução foi deixada em repouso por 4 dias e agitada no último dia para completa dissolução. A solução obtida era homogênea e sem partes insolúveis (Paiva, 2009).

## 4.3 Preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio

Para o preparo das blendas foi primeiramente adicionada glicerina na solução de alginato a 2%. A mistura foi agitada em agitador magnético por aproximadamente 10 minutos, para permitir a homogeneização da glicerina no alginato. Após, a solução de fibroína a 2% foi lentamente adicionada à mistura de alginato com glicerina, em agitador magnético a 200 rpm, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A solubilização das fases foi instantânea, não havendo dificuldade de homogeneização. Para a obtenção das membranas, 55 mL da blenda foram vertidos em placa de poliestireno (d = 14 cm) e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente.

Foram testadas diferentes proporções alginato:fibroína como 25:75, 50:50 e 75:25, em massa, respectivamente. A membrana da blenda que apresentou melhores propriedades continha 25% de solução de fibroína e 75% de solução de alginato, mais a glicerina adicionada ao alginato, sendo que todas as caracterizações apresentadas neste trabalho se referem a esta blenda.

Também foram feitas membranas dos componentes puros (55 mL de solução 2% em placas de poliestireno de 14 cm de diâmetro) para ser possível uma comparação entre estes e a blenda, sendo que a membrana de alginato sempre continha a mesma quantidade mássica de glicerina que a blenda. Isto foi feito para que as comparações fossem feitas entre: membrana de fibroína, membrana de alginato + glicerina, denominada somente como "alginato" e membrana da blenda contendo 25% de fibroína e 75% de alginato + glicerina, denominada como "blenda".

A quantidade de glicerina presente nas membranas de alginato e da blenda foi fixada em uma relação 1:1 massa seca total de biopolímero:massa de glicerina PA.

## 4.3.1 Tratamento nas membranas

Após um estudo mais detalhado das membranas obtidas verificou-se a necessidade de tratamento para torná-las menos solúveis em água, ressaltando o fato de que a solução utilizada deveria agir igualmente nos dois biopolímeros.

Foram feitos testes utilizando três diferentes soluções, já utilizadas no Laboratório de Engenharia e Química de Produtos. Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

- Etanol 70%, utilizado no tratamento de membranas de fibroína (Nogueira, 2005; Weska, 2009);

- CaCl<sub>2</sub> 5%, muito utilizado como agente reticulante do alginato de sódio (Zactiti, 2004; Phisalaphong *et al.*, 2008);

-  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50%. Esta solução foi adaptada por Paiva (2009) de outros estudos que utilizaram acetona (Moon *et al.*, 1999) e isopropanol (Huang *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1999) ao invés do etanol, para reticular membranas multicamadas de alginato e quitosana.

Pedaços de aproximadamente 2 cm de diâmetro das membranas de fibroína, alginato e da blenda foram imersas em 100 mL das soluções descritas acima por 24 horas e imersas em 100 mL de água ultra pura por mais 24 h. Após este tempo foi observado se a membrana permanecia com sua estrutura íntegra ou se haviam pontos de solubilização.

No tratamento com  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50% observou-se perda de glicerina, sendo desta forma adicionada à solução de tratamento a mesma quantidade de glicerina presente por membrana. Desta maneira ocorreria uma menor transferência de massa de glicerina da membrana para o meio, uma vez que o meio continha moléculas do plastificante.

Para confirmar se estaria ocorrendo perda de glicerina, as massas das membranas de alginato, com ou sem glicerina, foram pesadas antes e após o tratamento, sendo as membranas secas a temperatura ambiente nas duas situações.

### 4.4 Preparo dos compósitos

Foram preparados compósitos utilizando fios de fibroína tipo Gregia 20/22 6A. Estes fios foram cortados manualmente em pedaços de aproximadamente 1 cm e misturados com auxílio de bastão de vidro em solução de alginato de sódio 2% dissolvido em NaOH 0,1 M, contendo glicerina. A mistura foi espalhada em placas de poliestireno de 14 cm de diâmetro e o solvente evaporado à temperatura ambiente. Após seco, o compósito foi tratado por imersão em 150 mL de solução de  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50% por 24 h para estabilizar a camada de alginato presente no compósito. Após o tratamento, o compósito foi lavado com água ultra pura em abundância, até pH 6, e foi seco à temperatura ambiente. Para fins práticos, não foram testados

outros tamanhos de fios. Foi variada somente a proporção destes fios no compósito e avaliada sua influência na interação matriz-fibra e nas propriedades térmicas e mecânicas.

A quantidade de alginato foi fixada em 55 mL de solução 2 %, ou seja, 1,1 g de alginato de sódio em cada membrana de compósito. Nesta solução foram adicionadas 1,1 g de glicerina PA. A massa de fios de fibroína foi variada em 20, 40 e 60 % em relação à massa de alginato em cada membrana. Não foram testadas quantidades acima de 60 % de fios, pois nestas proporções o volume de alginato é insuficiente para cobrir e unir os fios de fibroína.

# 4.5 Caracterizações

A Tabela 1 mostra as caracterizações realizadas nas blendas e nos compósitos. A seguir cada técnica de análise é descrita detalhadamente.

| Análise                            | Blenda | Compósito |
|------------------------------------|--------|-----------|
| МО                                 | Х      | Х         |
| MEV                                | Х      | Х         |
| DRX                                | Х      |           |
| FTIR                               | Х      |           |
| Intumescimento em água             | Х      | Х         |
| Permeabilidade ao vapor d'água     | Х      | Х         |
| Ângulo de contato                  | Х      |           |
| Resistência à tração               | Х      | Х         |
| Resistência ao rasgo               |        | Х         |
| DSC                                | Х      | Х         |
| TGA                                | Х      | Х         |
| DMA                                | Х      |           |
| Citotoxicidade indireta            | Х      | Х         |
| Calcificação quimicamente induzida | Х      | Х         |

Tabela 1: Caracterizações realizadas nas membranas da blenda e dos compósitos.

#### 4.5.1 Microscopia óptica (MO)

Após secas, as membranas da blenda foram analisadas em microscópio óptico E-200 (Nikon), do Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (DTF/FEQ) a fim de verificar a ocorrência de separação de fases macroscópica na superfície das mesmas. Após as membranas terem sido obtidas por evaporação do solvente, as mesmas foram cortadas em pedaços com aproximadamente 1 cm de diâmetro, em regiões que apresentavam separação de fases e então analisadas no microscópio óptico.

A microscopia óptica também foi utilizada na observação da deposição de compostos de cálcio nos testes de calcificação quimicamente induzida. Foi utilizado filtro polarizador Kenko para a verificação da birrefringência dos depósitos.

# 4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica consiste na varredura da superfície da amostra através de um feixe de elétrons e permite verificar a morfologia e superfície das membranas. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura da marca LEO 440i no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com corrente de 50 pA e tensão de 10 kV. Após terem sido secas a temperatura ambiente, as membranas de alginato, fibroína e da blenda foram congeladas com nitrogênio líquido, fraturadas, liofilizadas por 24 h e recobertas com ouro para realização da microscopia.

Também foram analisadas as superfícies dos diferentes compósitos, para observar a incorporação dos fios de fibroína na matriz de alginato. Além disso, foi feito MEV dos compósitos após terem sido fraturados em teste mecânico de tração, com o objetivo de verificar a maneira como a fibra era arrancada da matriz quando tracionada.

## 4.5.3 Difração de raios X (DRX)

A técnica consiste na incidência de um feixe de elétrons sobre a amostra e através da identificação dos raios X emitidos é possível determinar a composição da estrutura cristalina de regiões com até 1 µm de diâmetro. Para a realização das análises de raios X foi utilizado o

equipamento X'PERT PW3050 Philips, do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com radiação Cu-K $\alpha$ , com comprimento de onda de 1,54 Å. A taxa de varredura utilizada foi de 0,6°/min, e 2 $\theta$  variando de 10 a 35°. Esta análise foi realizada somente nas membranas da blenda, que foram analisadas após tratamento para sua estabilização.

Os dados do difratograma podem ser correlacionados para calcular as distâncias interplanares médias entre as cadeias poliméricas, utilizando a Lei de Bragg (Equação 1):

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot sen\theta \tag{1}$$

onde:  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe de raios X, 1,54 Å d é a distância interplanar (Å)

# 4.5.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

Através deste método pode-se 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 equipamento MB 102, da Bomem, do Laboratório de Infravermelho do Instituto de Química (UNICAMP), com acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, na faixa de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Através do uso do acessório ATR buscou-se dados da superfície da membrana, como bandas de absorção que indicassem a interação entre os materiais estudados.

## 4.5.5 Intumescimento em água

As membranas da blenda e dos compósitos foram cortadas em pedaços de 2,5 cm de diâmetro e mantidas em ambiente com umidade relativa de 50% por 48 h, tempo necessário para atingir o equilíbrio. Sua espessura foi medida imediatamente antes da realização do teste em micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo), com precisão de 0,001 mm.

As amostras foram então pesadas (m<sub>i</sub>), imersas em 100 mL de água destilada e pesadas em períodos pré-determinados de tempo até o equilíbrio (m<sub>f</sub>). Foram montadas as curvas cinéticas de intumescimento das amostras e verificado o grau de intumescimento final das membranas. A espessura das membranas após o teste de intumescimento também foi medida.

O grau de intumescimento foi determinado em função da massa inicial e final da amostra pela Equação 2:

$$GI = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \cdot 100\%$$
<sup>(2)</sup>

onde: GI é o grau de intumescimento.

m<sub>f</sub> é a massa final úmida (g)

 $m_i \, \acute{e} \, a \, massa \, inicial \, seca \, (g)$ 

# 4.5.6 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada de acordo com ASTM E 96/E 96M (2005). Foi utilizado aparato disponível no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio) (FEQ/UNICAMP). Este aparato consiste em um recipiente de acrílico de 500 mL (célula 1), hermeticamente fechado, no interior do qual é colocada uma outra célula de acrílico (célula 2), com volume interno de 30 mL e abertura de 15,20 cm<sup>2</sup> (área de permeação), na qual é fixada a membrana a ser permeada. No interior da célula 1 é colocada solução saturada de NaCl, a fim de manter o ambiente com umidade relativa de 75%, e no interior da célula 2 é colocado cloreto de cálcio anidro granulado, material dessecante. A célula 2 foi pesada a cada 12 h por 5 dias, sendo o aparato acondicionado à temperatura ambiente. O aumento de massa da célula 2 com o tempo corresponde à taxa de permeabilidade da membrana ao vapor d'água. Previamente à realização do teste as membranas foram acondicionadas por 48 h em ambiente com 50% de umidade relativa. Ao final do teste foi medida a espessura das membranas em micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo), com precisão de 0,001 mm.

Os dados de ganho de massa com o tempo foram ajustados a uma reta, sendo o coeficiente linear desta reta a taxa de variação de massa do sistema. As Equações 3 e 4 apresentam o cálculo

para a transmissão de vapor d'água e a permeabilidade ao vapor d'água das membranas, respectivamente.

$$TVA = \frac{\left(\frac{G}{t}\right)}{A} \tag{3}$$

$$PVA = \frac{\left(\frac{G}{t}\right) \cdot e}{A \cdot \Delta p} \tag{4}$$

onde: TVA é o coeficiente de transmissão do vapor d'água (g/m².dia)

PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (g.mm/m<sup>2</sup>.dia.kPa)

G/t é a taxa de variação de massa do sistema (g/dia)

e é a espessura da membrana (mm)

A é a área permeada da membrana  $(m^2)$ 

 $\Delta p$  é a diferença de pressão parcial do vapor d'água dos lados da membrana (kPa)

# 4.5.7 Ângulo de contato

Quando um líquido é colocado sobre uma superfície sólida pode ocorrer o seu espalhamento na superfície ou ele irá formar uma gota esférica. O ângulo formado mostra o grau de interação entre os dois materiais, indicando a molhabilidade da superfície. O critério para a molhabilidade implica em que o ângulo de contato ( $\theta$ ) seja menor que 90° (Levy Neto e Pardini, 2006). 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.

As medidas de ângulo de contato foram realizadas em goniômetro da marca Tantec, do Laboratório de Fluidodinâmica e Secagem (LFS) (FEQ/UNICAMP). Foi utilizada água destilada como líquido para formação da gota e as medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C e umidade relativa de 50%. A leitura do ângulo de contato entre a gota d'água e a superfície das membranas foi realizada 15 segundos após a deposição da gota. Foram realizadas, no mínimo,

dez medidas do ângulo de contato para cada membrana, sendo analisadas as membranas de fibroína, blenda e alginato.

# 4.5.8 Ensaios mecânicos

Foram feitos testes mecânicos de resistência à tração (ASTM D882-02) e resistência à propagação do rasgo (ASTM D1938-08) em texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD) com célula de carga de 50 kg, do Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio/FEQ/UNICAMP). Para ambos os testes, as membranas tratadas e secas à temperatura ambiente foram cortadas com dimensões de 7 x 2,5 cm<sup>2</sup> e colocadas por 48 h em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio, a fim de manter o ambiente com 50% de umidade relativa, conforme determinado pelas normas citadas acima.

# 4.5.8.1 Resistência à tração

Para a realização do teste de resistência à tração, a distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de realização do teste de 10 mm/s. O ensaio foi realizado em 8 amostras de cada tipo de membrana e sua média calculada. A espessura das membranas foi medida previamente à realização do teste utilizando micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo).

A tensão de ruptura e o percentual de alongamento das membranas foram calculados de acordo com as Equações 5 e 6:

$$Tensão ruptura = \frac{F}{A} = \frac{F}{e \cdot L} = \frac{F}{e \cdot 25}$$
(5)

$$\% A longamento = \frac{d}{H} \cdot 100 = \frac{d}{50} \cdot 100$$
<sup>(6)</sup>

onde: F é a força na ruptura (N)

e é a espessura média da amostra (mm)

L é a largura da amostra (mm)

d é a distância percorrida pelas garras (mm)

H é a altura da amostra entre as garras (mm)

# 4.5.8.2 Resistência à propagação do rasgo

Para o teste de resistência à propagação do rasgo, as membranas dos compósitos foram cortadas conforme mostrado na Figura 7. Cada ponta do compósito foi fixada em uma garra e quando iniciado o teste a garra superior era levantada, rasgando a membrana por toda sua extensão. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de realização do teste de 4,16 mm/s (250 mm/min).

Para cada tipo de membrana foram feitas 8 replicatas, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados. O resultado é expresso como a média das forças necessárias para rasgar a membrana em toda a sua extensão.



Figura 7: Representação esquemática e fotografias das amostras utilizadas para o teste de propagação do rasgo.

# 4.5.9 Análises térmicas

#### 4.5.9.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O DSC mede a taxa de calor transferido em função da temperatura, e os picos fornecidos podem ser associados com as transições ocorridas na amostra. Com esta técnica pode-se obter informações sobre mudanças físicas, químicas ou de capacidade calorífica. Foi utilizado o equipamento DSC-50 da marca Shimadzu, do Laboratório de Calibração e Planta Piloto (DTF/FEQ/UNICAMP). Inicialmente foi realizado aquecimento da amostra até 150 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A amostra foi mantida a esta temperatura por 10 min e então foi resfriada até atingir a temperatura ambiente. Este primeiro aquecimento foi feito para apagar o histórico térmico da amostra. Foi então realizado o segundo aquecimento, desde a temperatura ambiente até 500 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Somente os dados do segundo aquecimento foram considerados na análise do gráfico.

As amostras analisadas por DSC foram secas por evaporação do solvente à temperatura ambiente (*ca.* 25 °C) e armazenadas em condições ambiente até a realização da análise, sendo previamente realizada a estabilização das membranas.

### 4.5.9.2 Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria permite medir a variação da massa em função da temperatura e, assim, verificar o comportamento e estabilidade das membranas. As membranas analisadas foram secas a temperatura ambiente, após tratamento em  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50%. Foi utilizado o termogravímetro TGA-50 Shimadzu, do Laboratório de Calibração e Planta Piloto (DTF/FEQ/UNICAMP), com faixa de temperatura de 25 a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e vazão de nitrogênio de 50 mL/min.

#### 4.5.9.3 Análise dinâmico-mecânica (DMA)

Foi realizada a análise dinâmico-mecânica das membranas dos componentes puros e da blenda para verificar a miscibilidade entre os biopolímeros, caracterizada pela presença de uma única temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Esta análise permite obter informações sobre separação de fases entre os componentes em escala nanométrica.

Foi utilizado analisador dinâmico-mecânico 2980, da TA Instruments, do Laboratório de Análises Térmicas (DTP/FEQ/UNICAMP). As membranas foram cortadas em pedaços de 10 mm de largura e 30 mm de altura. Foi feita a medida da espessura de cada amostra utilizando micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo).

A análise foi realizada em ambiente controlado com 55% de umidade relativa e a 23°C. Inicialmente, a amostra foi resfriada com nitrogênio liquido até -65 °C e mantida a esta temperatura por 5 minutos, para estabilização do material. A amostra foi então aquecida até 250°C, a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min. Utilizou-se força de 0,5 N, frequência de 1 Hz e amplitude de 5  $\mu$ m.

### 4.5.10 Citotoxicidade indireta

O teste de citotoxicidade é realizado para a pré-seleção de materiais que futuramente poderão ser submetidos a ensaios *in vivo*. Este teste prevê a compatibilidade das amostras com células específicas. O teste foi realizado por colaboradores do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).

Para a avaliação da citotoxicidade das blendas e dos compósitos desenvolvidos neste trabalho foi seguida a norma ISO - 10993-5 (2009). As células utilizadas para realização do teste foram células de ovário de Hamster chinês (CHO-k1), mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100  $\mu$ g/mL e anfotericina 0,025  $\mu$ g/mL, todos da marca Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab) em incubadora úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura (Corning) de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Sigma) em solução tampão fosfato pH 7,4.

As membranas foram esterilizadas por exposição à lâmpada ultra violeta do fluxo laminar, da Germ-Free classe II, por 30 minutos de cada lado da membrana. Em cada membrana foi adicionado meio de cultura RPMI 1640 na proporção de 1 cm<sup>2</sup>/mL, sendo o conjunto mantido a 37 °C por 48 horas em banho termostatizado com agitação constante. Os extratos foram então

diluídos de 100 a 6,25 % (v/v) em meio de cultura RPMI 1640 para realização do teste de viabilidade celular. Como controle negativo foi preparado um extrato de polietileno de alta densidade (PEAD); e como controle positivo, foi preparado uma solução de fenol a 0,5% v/v de meio de cultura.

Para verificar a viabilidade das células, foram colocados 50  $\mu$ L do extrato em suas diluições e 50  $\mu$ L da suspensão de CHO-k1 com 3000 células em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. A placa foi mantida por 72 horas em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20  $\mu$ L de solução de MTS (corante supravital de composto tetrazólico, da marca Promega)/PMS (agente acoplador de elétrons, da Sigma), na proporção de 20:1 e incubação por 2 horas. Após este período, as placas foram analisadas em espectrofotômetro ELISA a 490 nm. A viabilidade celular foi determinada pela

$$VC(\%) = \left(\frac{DOamostra}{DOcontrole}\right) \cdot 100\% \tag{7}$$

onde: VC é a viabilidade celular (%) DOamostra é a densidade óptica da amostra DOcontrole é a densidade óptica do controle

O Índice de Citotoxicidade -  $IC_{50}$ , concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

# 4.5.11 Calcificação quimicamente induzida

Os ensaios de calcificação quimicamente induzida foram realizados de acordo com o método proposto por Aimoli (2007). Foi feita a deposição química de compostos de cálcio sobre as membranas através da utilização de sais que naturalmente depositam cálcio.

Esta análise foi realizada de maneira a verificar a influência da membrana na deposição do cálcio, através de um método simples e rápido, uma vez que ensaios em fluido corpóreo simulado (*simulated body fluid* – SBF) são mais demorados e trabalhosos. O objetivo foi verificar a tendência ou não destas membranas calcificarem.

As membranas de fibroína, alginato e da blenda foram cortadas em pedaços de 2 cm x 2 cm e imersas em 50 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 2 M por 15 minutos, a fim de saturar as membranas com íons cálcio. O excesso de CaCl<sub>2</sub> foi cuidadosamente retirado das membranas por lavagem em 50 mL de água ultra pura e estas foram imediatamente imersas em 50 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 M ou NaHCO<sub>3</sub> 2 M por 20 minutos. As membranas ainda úmidas foram então analisadas em microscópio óptico para verificar a morfologia dos depósitos obtidos.

Além disso, as membranas da blenda e do compósito com 40% de fios foram imersas em solução SBF, por 12 horas, para verificar sua estabilidade nesta solução. A solução continha a concentração de sais 1,5 vezes maior do que o SBF padrão a fim de acelerar o processo de calcificação (Tabela 2) (Kokubo e Takadama, 2006).

O teste de calcificação quimicamente induzida foi realizado em condições ambiente, com temperatura de aproximadamente 25°C.

| Reagente                               | Quantidade |
|--|------------|
| NaCl                                   | 12,0525 g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | 0,5325 g   |
| KCl                                    | 0,3375 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro | 0,264 g    |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O   | 0,466 g    |
| HCl 1M                                 | 39 mL      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O   | 0,579 g    |
| $Na_2SO_4$                             | 0,108 g    |
| TRIS                                   | 6,118 g    |
| HCl 1M                                 | 0-5 mL     |
|  |            |

Tabela 2: Quantidades das soluções salinas, Tris e HCl utilizados no preparo do SBF 1,5x.

#### **5 RESULTADOS**

#### 5.1 Blendas de fibroína e alginato de sódio

Foram testadas diversas formulações para as blendas até serem obtidas membranas adequadas mecanicamente (manuseáveis) e sem separação macroscópica de fases. A Tabela 3 mostra um resumo das membranas de blendas obtidas em testes preliminares e suas características.

Verifica-se através das observações mostradas na Tabela 3 que as blendas confeccionadas com alginato de sódio dissolvido em água apresentaram dificuldade de homogeneização (a fibroína formava uma película sobre a camada de alginato) e formação de fibrilas em todas as proporções testadas. Quando utilizado o alginato de sódio dissolvido em NaOH era visível a boa interação entre os biopolímeros. Isto ocorre porque em valores de pH básicos, as interações fibroína-fibroína são enfraquecidas, havendo predominância de conformação seda I, com sítios ativos mais expostos (Du *et al.*, 2009), o que favorece sua interação com as moléculas do alginato. Quando utilizado o alginato dissolvido em água, a mistura fibroína-alginato apresenta valor de pH que favorece a interação fibroína-fibroína, com isso, a interação fibroína-alginato é prejudicada, fato confirmado pela dificuldade de mistura observada nos experimentos e pela formação de fibrilas de fibroína devido à elevada interação entre suas moléculas.

A influência do pH na interação entre as moléculas de fibroína pode ser confirmada pelo fato de que, baixando o pH de uma solução aquosa de fibroína (pH = 7) a solução começa a ficar gradualmente mais viscosa e turva, até atingir o ponto em que a interação fibroína-fibroína é tão forte que a solução gelifica (pH = 5) (Kim *et al.*, 2004). Neste estágio tem-se uma estrutura sólida, com predominância de conformação estável (seda II).

| Tabela 3: Resumo dos testes preliminares de | e formação da blenda, com proporção | o alginato:fibroína de 25:75, 50:50 e 75:25. |
|---|-------------------------------------|--|
|---|-------------------------------------|--|

| Blendas   | Propriedades observadas  |
|---|--|
| Fibroína com alginato de sódio dissolvido em ${\rm H_2O}$ –       | Gelificação da solução de fibroína devido à alta taxa de cisalhamento  |
| formação da blenda sob agitação de 800 rpm                        | (Matsumoto et al., 2008)   |
| Fibroína com alginato de sódio dissolvido em ${\rm H_2O}$ –       | Dificuldade de homogeneização, membrana quebradiça e formação de       |
| formação da blenda sob agitação de 200 rpm                        | fibrilas em todas as proporções testadas                               |
| Fibroína com alginato de sódio dissolvido em H <sub>2</sub> O com | Dificuldade de homogeneização, aumento da formação de fibrilas (Figura |
| glicerina como plastificante (200 rpm)                            | 8)   |
| Fibroína com alginato de sódio dissolvido em NaOH                 | Membranas muito quebradiças, de difícil manuseio e com formação de     |
| (200 rpm)   | fibrilas   |
| Fibroína com alginato de sódio dissolvido em NaOH                 | Em proporções de fibroína acima de 50% foi observada formação de       |
| com glicerina como plastificante (200 rpm)                        | fibrilas.  |
|   | Membrana com 25% de fibroína apresentou melhores propriedades e foi    |
|   | escolhida para demais análises no decorrer do trabalho                 |



Figura 8: Micrografia óptica de luz transmitida da blenda alginato:fibroína 75:25 com alginato dissolvido em água, obtido em testes preliminares. Ampliação de 40 vezes.

As membranas confeccionadas com o alginato dissolvido em NaOH, mostraram-se bastante quebradiças, com baixa resistência mecânica, rompendo até mesmo no manuseio. Além disso, quando utilizada quantidade de fibroína acima de 50% era observada a formação de fibrilas devido à separação de fases, muito semelhante às obtidas nas membranas das blendas com alginato dissolvido em água destilada.

Desta maneira, a adição de glicerina nas membranas é fundamental para a obtenção de membranas possíveis de serem manuseadas. Porém, em conteúdo de fibroína acima de 50% também foi observada separação macroscópica de fases nas membranas da blenda, semelhante ao observado na Figura 8.

A membrana alginato:fibroína 75:25 com glicerina era homogênea, sem indícios de separação de fases e maleável (Figura 9). Portanto, esta blenda foi escolhida para o estudo e realização de todas as análises apresentadas neste trabalho.



Figura 9: Fotografia da membrana da blenda alginato:fibroína 75:25, com glicerina, estudada neste trabalho.

É importante ressaltar que não há na literatura qualquer relato a respeito de blendas semelhantes a esta. As blendas de alginato e fibroína relatadas na literatura utilizam alginato dissolvido em água e em todas as proporções observa-se separação macroscópica de fases (Lee *et al.*, 2004a). Esta blenda é, portanto, inédita na literatura.

# 5.1.1 Tratamento nas membranas

Verificou-se que as membranas de alginato, de fibroína e da blenda eram solubilizadas quando imersas em água. A fim de tornar estas membranas mais estáveis foi feito um estudo para verificar qual o melhor tratamento a ser utilizado, sendo que o tratamento deveria estabilizar tanto a fibroína quanto o alginato.

A Tabela 4 apresenta os resultados do teste de estabilização das membranas, após 24 horas de imersão em água ultra pura.

|          |                      | Solução de tratamento                              |                      |
|----------|----------------------|--|----------------------|
| Membrana | Etanol 70%           | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M em etanol 50% | CaCl <sub>2</sub> 5% |
| Fibroína | Íntegra              | Íntegra  | Íntegra              |
| Alginato | Solúvel              | Íntegra  | Íntegra              |
| Blenda   | Parcialmente solúvel | Íntegra  | Parcialmente solúvel |

Tabela 4: Resultados dos testes de estabilização das membranas.

Portanto, após os testes realizados, verificou-se que o  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50% foi o melhor tratamento, estabilizando todas as membranas testadas. Este tratamento foi escolhido como padrão para as membranas utilizadas no decorrer deste trabalho.

A solução de etanol 70% mostrou-se adequada para o tratamento das membranas de fibroína e da blenda, porém não foi capaz de estabilizar a membrana de alginato, que necessita da presença de íons para sua reticulação. Já a solução de cloreto de cálcio estabilizou tanto a membrana de fibroína quanto a membrana de alginato, porém a membrana da blenda mostrou-se solúvel. Isto deve ter ocorrido devido a alguma competição dos íons cálcio para reticular o alginato e desta maneira, as possíveis ligações da blenda entre a fibroína e o alginato foram enfraquecidas, desestabilizando sua estrutura e permitindo a solubilização da membrana.

Não se sabe ao certo qual o mecanismo de atuação do  $H_2SO_4$  na presença de solventes orgânicos na estabilização de membranas de alginato, entretanto sabe-se que na presença de ácido sulfúrico o alginato é convertido em ácido algínico livre, insolúvel em água (Moon *et al.*, 1999). A presença de solventes orgânicos, como o etanol, o isopropanol e a acetona, é fundamental para que a reação ocorra apesar de sua atuação ser desconhecida. Sabe-se que não ocorre reação de reticulação entre a membrana de alginato de sódio e a solução de ácido sulfúrico, apesar da membrana de alginato ser insolubilizada e sua estabilidade mecânica ser melhorada (Huang *et al.*, 1999). A reticulação das membranas de alginato ocorre quando o mesmo entra em contato com íons multivalentes, como o Ca<sup>2+</sup>, sendo esta reticulação iônica.

Como não existe na literatura um mecanismo que explique a redução da solubilidade do alginato devido ao tratamento com ácido sulfúrico, são propostos neste trabalho alguns possíveis mecanismos de atuação do ácido sulfúrico nas membranas de alginato.

Um possível mecanismo de redução de solubilidade do alginato ocorreria pela formação de ligações iônicas devido à interação entre os elétrons livres do sódio presente na carboxila do alginato com os elétrons livres do enxofre presente no ácido sulfúrico.

Um outro mecanismo de diminuição de solubilidade do alginato poderia ocorrer devido à saturação do meio com íons H<sup>+</sup>, decorrentes do ácido sulfúrico. Devido ao excesso de H<sub>3</sub><sup>+</sup>O não há suficientes moléculas de H<sub>2</sub>O capazes de funcionarem como receptoras em pontes de H com o alginato, deixando de haver a solvatação e consequente solubilização do alginato (Farfán, 1994). Em outras palavras, ocorre competição entre o ácido sulfúrico e as carboxilas do alginato pela água, diminuindo a solubilidade do alginato.

Já a fibroína pode ter sua estrutura estabilizada na presença de solventes orgânicos, sendo os mais comumente utilizados o metanol e o etanol. Na presença destes solventes, a fibroína, que está em uma conformação aleatória do tipo seda I, é induzida para uma conformação estável, tipo seda II, devido à desidratação de suas cadeias (Nam e Park, 2001). Portanto, o etanol age de maneira a mudar a conformação estrutural da fibroína para uma forma mais estável, sem mudar a sua configuração molecular. Acredita-se que para o caso da blenda de fibroína e alginato obtida neste trabalho, o ácido sulfúrico não tenha influência sobre a molécula de fibroína, sendo sua estabilização causada apenas pela atuação do etanol presente na solução de tratamento.

Inicialmente foi utilizado um tempo de tratamento das membranas de 2 h, sendo este tempo suficiente para estabilizar a membrana da blenda. Porém, verificou-se que, as membranas

de alginato puro, quando imersas em água por períodos mais elevados começavam a dissolver em algumas partes, mostrando que o tratamento não havia sido suficiente (Figura 10).



Figura 10: Fotografia da membrana de alginato tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em etanol 50%, por 2 h, após imersão em água.

O interessante é que isto acontece somente com a membrana de alginato puro. A membrana da blenda mostra-se bem mais estável quando imersa em água, não sendo dissolvida. Acredita-se, portanto, que haja uma interação entre a fibroína e o alginato na blenda, sendo esta interação capaz de dar uma maior estabilidade ao alginato, fazendo com que sua solubilização seja menor.

A fim de que fosse estabelecido o equilíbrio na estabilização das membranas, sem que fatores cinéticos pudessem interferir nos resultados, optou-se por tratar todas as membranas por 24 h, tempo suficiente para total estabilização do alginato.

Verificou-se uma mudança muito grande nas propriedades mecânicas das membranas secas antes e após o tratamento em  $H_2SO_4$  0,1 M em etanol 50%. As membranas antes do tratamento mostraram-se muito flexíveis e elásticas, podendo ser bastante esticadas sem romper. Após o tratamento, as mesmas membranas mostraram-se mais rígidas e menos elásticas, era necessário aplicar uma força muito grande para romper a amostra e ela não sofria qualquer deformação visível antes deste rompimento.

Este comportamento diferente entre as membranas antes e após o tratamento foi atribuído, além da formação de uma membrana mais cristalina, à migração da glicerina da matriz da

membrana para a solução de tratamento, uma vez que a glicerina é a responsável pelas propriedades de elasticidade apresentadas pelas membranas.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise de perda de massa das membranas de alginato antes e após tratamento em ácido sulfúrico. Na membrana de alginato puro foi feito tratamento em  $H_2SO_4$  0,1M em etanol 50%, por 24 h, já para a membrana de alginato com glicerina, foi adicionado à solução de tratamento, 2 g de glicerina, a fim de minimizar as perdas de glicerina para a solução.

|                      | Massa perdida, g       | Perda %          |
|----------------------|------------------------|------------------|
|                      | (média ± desvio médio) |                  |
| Alginato             | $0,77 \pm 0,01$        | 48,77 ± 1,86     |
| Alginato + glicerina | $2,16 \pm 0,04$        | $71,82 \pm 1,08$ |

Tabela 5: Perda de massa das membranas de alginato após tratamento e lavagem.

Verifica-se que houve uma elevada perda em massa nas membranas de alginato após tratamento em  $H_2SO_4$ . Tem-se um aumento de mais de 20% de perda quando utilizada glicerina na composição da membrana. Com isto, pode ser afirmado que praticamente toda a glicerina adicionada na membrana é perdida para a solução de tratamento, o que influencia diretamente as propriedades mecânicas das membranas após sua estabilização. Porém, a adição de glicerina é fundamental para que haja a formação de uma membrana manuseável. As membranas confeccionadas sem a adição de glicerina acabam rachando durante a evaporação do solvente, são extremamente quebradiças e difíceis de manusear.

# 5.1.2 Caracterizações das blendas

# 5.1.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 11 apresenta as micrografias obtidas por MEV para as membranas de fibroína, blenda e alginato.



Figura 11: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (a) e da superfície de fratura (b) das membranas da blenda (1), fibroína pura (2) e alginato puro (3).

As membranas dos componentes puros (fibroína e alginato) apresentaram morfologia típica de membranas densas poliméricas, com fratura densa e homogênea. As irregularidades apresentadas na superfície da membrana de alginato devem-se à remoção dos cristais formados na superfície da membrana devido ao NaOH utilizado na solução de alginato.

Foi observado que a blenda apresentou a formação de estruturas globulares em toda sua superfície e também no interior da membrana. Estas estruturas apresentaram formato esférico bastante regular, com tamanho variando de 10 a 1  $\mu$ m de diâmetro, aproximadamente.

Este tipo de formação é bastante peculiar e teve-se o interesse em verificar se estes glóbulos caracterizavam uma separação de fases. A maneira encontrada para solucionar esta questão foi imergir a membrana da blenda em uma solução que solubilizasse apenas uma das fases, ou o alginato, ou a fibroína. Como a fibroína está presente na blenda em menor quantidade (25%) optou-se por fazer a imersão da blenda na solução ternária (CaCl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH:H<sub>2</sub>O) utilizada para dissolver os fios de fibroína, nas mesmas condições experimentais. Após o período de 1 h e 30 minutos (tempo utilizado na dissolução dos fios de fibroína), a membrana foi retirada da solução ternária íntegra, porém um pouco esbranquiçada. A membrana foi cuidadosamente lavada em água destilada, congelada com N<sub>2</sub> líquido, liofilizada e sua morfologia foi novamente verificada pelo MEV, conforme Figura 12.



Figura 12: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (a) e da superfície de fratura (b) da membrana da blenda após extração da fibroína.

Verifica-se que os glóbulos presentes na blenda foram removidos da membrana em toda sua extensão indicando, portanto, que estes seriam constituídos predominantemente de fibroína. A solução ternária foi capaz de penetrar na membrana, dissolvendo inclusive os glóbulos em seu interior, verificados pela micrografia da fratura. Porém na micrografia da fratura (Figura 12b) foi verificada a presença de um resíduo de formato bastante peculiar no interior dos glóbulos. Foram utilizadas para a remoção dos glóbulos de fibroína exatamente as mesmas condições utilizadas na dissolução dos fios de fibroína, que após 1 h e 30 minutos mostram-se completamente solúveis. Acredita-se, assim, que a maior parte da fibroína presente na membrana da blenda tenha sido removida neste processo, portanto o resíduo apresentado no interior dos glóbulos poderia ser majoritariamente de alginato. Isto indicaria que os dois domínios observados são provenientes de separação de fases e, desta maneira, haveria uma fase rica em alginato e uma fase rica em fibroína.

O mesmo procedimento de extração dos glóbulos foi realizado na membrana da blenda sem glicerina, para verificar se as pequenas irregularidades apresentadas na membrana da blenda após a extração da fibroína teriam sido ocasionadas pela lixiviação da glicerina presente na membrana. A micrografia obtida é mostrada na Figura 13.



Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura da superfície da membrana da blenda sem glicerina, após extração da fibroína.

A partir da Figura 13 podemos concluir que os glóbulos de fibroína também foram removidos da membrana da blenda sem glicerina, porém observa-se a presença de uma superfície lisa. Isto nos indica que na membrana da blenda com glicerina ocorre a lixiviação da glicerina, caracterizada pela presença de irregularidades na superfície da membrana.

A Figura 14 mostra uma representação esquemática do processo de obtenção da blenda e extração dos glóbulos.



Figura 14: Representação esquemática do processo de obtenção da blenda e extração dos glóbulos de fibroína.

Os glóbulos auto-organizados de fibroína apresentados na blenda são estruturas muito interessantes e podem ser utilizadas quando se deseja a formação de uma estrutura sofisticada, com microdomínios de outro material. Além disso, acredita-se que variando-se as proporções de fibroína e alginato pode-se controlar a formação dos glóbulos, que podem ser usados na criação de padrões para deposição controlada de células e também em biomateriais quimicamente funcionalizados. Alguns autores encontraram estruturas de glóbulos de fibroína semelhantes às observadas neste trabalho em blendas com óxido de polietileno (Jin *et al.*, 2004) e com carboximetilquitina (Wongpanit *et al.*, 2007), porém a fibroína era o principal constituinte de tais blendas. Com isso, os autores solubilizaram o segundo componente da blenda (PEO ou carboximetilquitina), ambos solúveis em água e facilmente extraídos da blenda. Como resultado os autores obtinham somente dos glóbulos de fibroína, constituídos por micelas, com tamanhos variando de 15 a 0,8 µm (Figura 15).



Figura 15: Modelo para o dobramento da cadeia de fibroína, formação das micelas e formação dos glóbulos de fibroína. Adaptado de: Jin e Kaplan, 2003.

A organização das micelas estaria baseada na estrutura hidrofílica-hidrofóbica da fibroína, com pequenos blocos hidrofílicos presentes no interior da micela para promover sua solubilidade em água e grandes terminais hidrofílicos em contato com o meio aquoso. Os blocos hidrofílicos localizados entre os blocos hidrofóbicos são fundamentais para que não haja a formação prematura de estrutura  $\beta$  (formação de gel), mantendo desta maneira a solubilidade da fibroína em solução aquosa (Chen *et al.*, 2008).

Em um outro estudo bastante complexo, Jin e Kaplan (2003) estudaram a formação das micelas de fibroína e verificaram que este tipo de formação ocorre devido às interações entre os

blocos hidrofílicos e hidrofóbicos da fibroína. A adição de um polímero hidrofílico, como é o caso do PEO e também da sericina, relatados no estudo, causa alterações nos estágios finais do processo de formação dos glóbulos, acelerando sua organização em estrutura seda I (amorfo). A formação dos glóbulos se daria pelo aumento da concentração de fibroína e diminuição do conteúdo de água, seguido pela interação entre os domínios hidrofóbicos das micelas e nos estágios finais da formação dos glóbulos a presença de um componente hidrofílico (sericina ou PEO) seria fundamental para que estes glóbulos fossem formados com predominância de conformação seda I, amorfa. Os autores afirmaram que esta estrutura globular está presente naturalmente no fio da seda e sua formação se deve à presença da sericina. De maneira a mimetizar a formação do fio da seda, os autores adicionaram à fibroína solução de PEO, também hidrofílico, e conseguiram obter um material com estrutura morfológica semelhante às fibras de seda nativas, além de desvendar o mecanismo pelo qual ocorre a formação destes glóbulos de fibroína.

De maneira similar, o alginato age nos estágios finais da formação dos glóbulos de fibroína induzindo a formação destes glóbulos com predominância de seda I, o que indicaria também uma interação entre os domínios hidrofílicos do alginato e da fibroína, fato confirmado a seguir na discussão da difração de raios X.

Os glóbulos obtidos neste trabalho apresentaram-se mais uniformes e com forma mais esférica do que os glóbulos apresentados nas blendas com PEO e com carboximetilquitina. Além disso, não existe qualquer relato na literatura de estudos que tenham feito a extração destes glóbulos da membrana e, consequentemente, a estrutura residual apresentada no interior dos glóbulos é inédita, o que abre diversas possibilidades no estudo de materiais estruturados e auto-organizados.

### 5.1.2.2 Difração de raios X (DRX)

A Figura 16 apresenta o difratograma das membranas de fibroína, blenda e alginato, após tratamento por 24 horas em solução de ácido sulfúrico e etanol.



Figura 16: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 24 h de tratamento.

Verifica-se na Figura 16 que tanto a membrana de fibroína como a membrana de alginato apresentaram halos de cristalinidade típicos. A fibroína apresentou halos em  $2\theta = 14^{\circ}$ , 16,8°, 18,5° e 20°, sendo os dois últimos de menor intensidade. Estes halos estão associados à estrutura seda II, mais organizada e cristalina, e correspondem às distâncias interplanares de 6,32, 5,27, 4,79 e 4,43 Å, respectivamente (Li *et al.*, 2002; Freddi *et al.*, 1997). Já o alginato apresentou halos característicos de sua estrutura em  $2\theta = 13,7^{\circ}$ , 16,7° e 20,7°, correspondendo à 6,45, 5,30 e 4,28 Å, respectivamente (Lee *et al.*, 2004a; Xiao *et al.*, 2001).

A membrana da blenda apresentou difratograma completamente amorfo. Isto indica que a formação da blenda e de suas estruturas globulares se dá de maneira amorfa, ou seja, as estruturas cristalinas dos dois biopolímeros não interagem uma com a outra e as interações intermoleculares ocorrem somente na região amorfa. Mesmo após tratamento em  $H_2SO_4$  e etanol, que serviriam para aumentar o nível organizacional e, consequentemente, a cristalinidade dos biopolímeros, a estrutura amorfa da blenda permanece inalterada. Este perfil confirma o fato de que a formação dos glóbulos na blenda ocorre com conformação estrutural seda I e para que isto ocorra é

fundamental a presença de um componente hidrofílico, como é o caso do alginato (Jin e Kaplan, 2003).

Também foram feitos os difratogramas das membranas sem tratamento para estabilização, a fim de verificar se suas estruturas previamente ao tratamento realmente estavam amorfas e após 2 horas de tratamento, para verificar possíveis alterações na membrana de alginato, já que a mesma apresentou-se solúvel neste tempo de tratamento (Figuras 17 e 18).



Figura 17: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), sem tratamento.

Conforme apresentado na Figura 17 verifica-se que a fibroína apresentou-se completamente amorfa, sem a presença de halos de cristalinidade, conforme esperado, uma vez que não foi realizado tratamento para tornar esta membrana mais cristalina. Os difratogramas do alginato e da blenda apresentaram halo pouco pronunciado em  $2\theta = 21^{\circ}$ , com perfil típico de substâncias amorfas.



Figura 18: Difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 2 h de tratamento.

Nas membranas tratadas com  $H_2SO_4$  0,1M em etanol 50% por 2 horas (Figura 18) o alginato apresenta difratograma de material bastante amorfo, principalmente se compararmos com o difratograma do alginato tratado por 24 horas (Figura 16). Isto confirma o fato de que em 2 horas de tratamento as cadeias do alginato ainda não estão organizadas de maneira a ter-se um material estável e insolúvel em água. Acredita-se que este tempo de estabilização mais elevado do alginato não aconteça devido a barreiras difusionais, mas sim ao tempo necessário para que ocorra o rearranjo estrutural das cadeias do alginato de forma mais estável e cristalina.

# 5.1.2.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho fornece informações a respeito da conformação molecular da fibroína de seda, com bandas de absorção específicas associadas aos grupamentos amida das proteínas. 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 (Weska, 2009). A Tabela 6 apresenta

os comprimentos de onda das bandas de amida I, II e III que podem ser associados às conformações seda I (enovelamento aleatório ou hélice- $\alpha$ ) ou seda II (folha- $\beta$ ).

|           | Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) |         |
|-----------|------------------------------------|---------|
|           | Seda I                             | Seda II |
| Amida I   | 1660                               | 1630    |
| Amida II  | 1540                               | 1515    |
| Amida III | 1230                               | 1260    |

Tabela 6: Bandas de amida e comprimentos de onda das conformações seda I e seda II da fibroína.

A Figura 19 apresenta o espectro de infravermelho obtido para as membranas de fibroína, blenda e alginato.



Figura 19: Espectros de infravermelho para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c).

| Fibroína | Blenda | Alginato | Atribuição   |
|----------|--------|----------|--|
| -        | 1731,9 | 1731,9   | Estiramento C=O                                      |
| 1616,2   | 1622,0 | 1635,5   | Sobreposição Amida I e estiramento -COO- assimétrico |
| 1508,2   | 1521,7 | -        | Amida II   |
| 1228,5   | 1236,2 | 1238,2   | Sobreposição Amida III e estiramento C-O             |
| -        | 1080,0 | 1076,2   | Estiramento O-H                                      |
| -        | 1029,9 | 1027,9   | Estiramento O-H                                      |
| -        | 927,7  | 927,7    | Vibração C-O   |

Tabela 7: Principais picos obtidos nas membranas de fibroína, blenda e alginato.

Analisando a Tabela 7, verifica-se que a membrana de fibroína pura apresentou espectro com predominância de estrutura folha- $\beta$  (seda II), com picos das bandas de amida I e II localizados em 1616,2 e 1508,2 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Já a banda de amida III apresentou pico em 1228,5 cm<sup>-1</sup>, atribuído à conformação seda I.

A membrana da blenda apresentou espectro semelhante ao espectro da membrana de alginato. Ainda assim foi possível detectar a presença dos picos das bandas de amida I, II e III, que foram deslocados para valores de número de onda ligeiramente superiores aos da membrana de fibroína pura. A membrana da blenda também apresentou predominância de conformação seda II, porém o deslocamento dos picos seria um indicativo de uma estrutura mais amorfa, seda I.

Nos números de onda referentes às bandas de amida I e III ocorre a sobreposição dos picos com estiramentos característicos do alginato, o que pode ocasionar erros na avaliação do espectro da blenda. Porém, a banda de amida II é claramente visualizada no espectro da blenda em 1521,7 cm<sup>-1</sup>, região onde não há qualquer pico de absorção da membrana de alginato.

A membrana de alginato apresentou pico na região de 1710-1740 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento da ligação C=O, em 1238,2 cm<sup>-1</sup> ao estiramento C-O e em 1027,9 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento da ligação O-H (Paiva, 2009), sendo que este pico é bastante pronunciado principalmente devido à presença da glicerina, que fornece um aumento na quantidade de ligações O-H presentes. A membrana de alginato apresentou espectro de acordo com a literatura (Caykara *et al.*, 2005), onde os autores estudaram a interação de blendas de alginato de sódio e poli(óxido de etileno).

A presença de dois picos na região de 1100 a 1000 cm<sup>-1</sup> é atribuída à deformação OH e está diretamente associada com a presença de ácido algínico livre na membrana. Esta banda pode ser associada às ligações por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares do alginato, sendo mais pronunciada com o aumento da concentração de ácido sulfúrico, utilizado para transformar o alginato em ácido algínico livre, insolúvel em água (Huang *et al.*, 2000).

## 5.1.2.4 Intumescimento em água

A Tabela 8 apresenta os resultados do grau de intumescimento para as membranas de fibroína, alginato e da blenda.

Tabela 8: Grau de intumescimento das membranas de fibroína, blenda e alginato.

|          | Grau de Intumescimento (%)* |
|----------|-----------------------------|
| Fibroína | $59,53 \pm 5,34$            |
| Blenda   | $220,94 \pm 13,21$          |
| Alginato | $310,61 \pm 6,34$           |

\* Média ± desvio médio (n=3).

Verifica-se que a membrana de fibroína apresenta intumescimento bastante baixo quando comparada com a membrana de alginato, e que a membrana da blenda apresentou comportamento intermediário entre as duas. O valor do grau de intumescimento apresentado pela membrana de alginato está bastante superior ao encontrado na literatura (em torno de 80%), porém neste estudo os autores fazem a reticulação do alginato com solução de CaCl<sub>2</sub> (Remunanlopez e Bodmeier, 1997). Este resultado indica que o tratamento do alginato em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M em etanol 50 % é capaz de estabilizar suas cadeias, porém não exerce influência sobre a força coesiva das moléculas do alginato, permitindo um intumescimento do alginato de sódio é influenciado pela extensão da reticulação. O grau de intumescimento do alginato de sódio é influenciado pela extensão da reticulação. Menor intumescimento está associado a maior grau de reticulação, pois a reticulação diminui a quantidade de sítios hidrofílicos disponíveis. Variando fatores como tipo de reticulante, concentração do reticulante e tempo de reticulação

tem-se diferentes valores de intumescimento e também de permeabilidade ao vapor d'água (Remunanlopez e Bodmeier, 1997; Furuyama Lima *et al.*, 2007).

O grau de intumescimento está diretamente ligado à mobilidade das cadeias poliméricas. As moléculas do polímero retêm água, afastando suas cadeias e, consequentemente, aumentando sua mobilidade. Sabe-se também que a água é um ótimo plastificante para alguns polímeros, e isto está relacionado à capacidade de retenção de água. Quanto mais água o polímero é capaz de reter (maior grau de intumescimento), maior será o afastamento molecular e maior o efeito plastificante da água (Rabello, 2000; Olivas e Barbosa-Canovas, 2008).

O alginato de sódio é um polissacarídeo altamente hidrofílico devido aos grupos carboxila e hidroxila presentes em sua estrutura, que conferem um intumescimento significativo quando a membrana de alginato é imersa em água (Kalyani *et al.*, 2008).

Já a fibroína possui em sua estrutura aminoácidos hidrofóbicos e, após o tratamento realizado com o  $H_2SO_4$ , se encontra em uma forma altamente estável e organizada. A estrutura folha- $\beta$  não permite o intumescimento e afastamento molecular, fato confirmado pela baixa plastificação pela água das membranas de fibroína quando comparadas com as membranas de alginato.

Uma propriedade das membranas que está diretamente relacionada com o grau de intumescimento é a espessura. Com a retenção de água pela membrana, a mesma acaba inchando e isto pode ser quantificado através da relação entre a espessura inicial e final da membrana. A Tabela 9 apresenta os valores de espessura das membranas de fibroína, da blenda e de alginato.

|          | Espessura Inicial* | Espessura Final*  | Relação (e <sub>f</sub> /e <sub>i</sub> )** |
|----------|--------------------|-------------------|---|
|          | $(e_i) (mm)$       | $(e_f) (mm)$      |   |
| Fibroína | $0,024 \pm 0,002$  | $0,032 \pm 0,005$ | $1,336 \pm 0,193$                           |
| Blenda   | $0,033 \pm 0,001$  | $0,105 \pm 0,005$ | $3,180 \pm 0,019$                           |
| Alginato | $0,031 \pm 0,004$  | $0,145 \pm 0,016$ | $4,674 \pm 0,144$                           |

Tabela 9: Relação de espessura das membranas da blenda em teste de intumescimento em água.

\* Média ± desvio médio (n=5).

\*\* Média ± desvio médio (n=3).

Verifica-se que a blenda teve comportamento intermediário na relação de espessura, mais voltada para o alginato, uma vez que este biopolímero possui maior proporção na blenda. O aumento de espessura da membrana de alginato foi aproximadamente 4 vezes maior que o da membrana de fibroína, o que confirma os resultados obtidos em relação ao grau de intumescimento das mesmas.

#### 5.1.2.5 Permeabilidade ao vapor d'água

A Tabela 10 apresenta os valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água apresentados pelas membrana de fibroína, da blenda e de alginato.

Tabela 10: Valores de transmissão de vapor d'água, espessura e permeabilidade ao vapor d'água das membranas da blenda.

|          | TVA*               | Espessura**       | PVA*              |
|----------|--------------------|-------------------|-------------------|
|          | (g/m².dia)         | (mm)              | (g.mm/m².dia.kPa) |
| Fibroína | $158,95 \pm 23,51$ | $0,041 \pm 0,002$ | $2,70 \pm 0,27$   |
| Blenda   | 307,89 ± 17,89     | $0,038 \pm 0,003$ | $4,89 \pm 0,15$   |
| Alginato | $366,31 \pm 5,26$  | $0,034 \pm 0,004$ | $5,20 \pm 0,46$   |
|          |                    |                   |                   |

\*Média ± desvio médio (n=3).

\*\*Média ± desvio padrão (n=10).

A transmissão de vapor d'água é um fator importante a ser observado em membranas para uso como curativos. Os curativos devem evitar a evaporação elevada dos fluidos corpóreos e ao mesmo devem manter o ambiente da ferida com umidade adequada (Dallan, 2005). Os valores de transmissão de vapor d'água apresentados pela membranas estudadas ficaram dentro da faixa de curativos utilizados comercialmente (de 76 a 9360 g/m<sup>2</sup>.dia) (Wu *et al.*, 1995), o que indicaria uma possível utilização destas membranas como curativos.

O alginato apresentou os maiores valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água, sendo que estes valores encontram-se de acordo com a literatura (Remunanlopez e Bodmeier, 1997). A transmissão e a permeabilidade ao vapor d'água podem ser controladas alterando-se o processo de reticulação do alginato. Membranas mais reticuladas implicam em menores valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água. Também sabe-se que a adição de plastificantes nas membranas diminui a força das ligações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros, aumentando a permeabilidade ao vapor d'água (Olivas e Barbosa-Canovas, 2008). É importante lembrar que a membrana de alginato e a membrana da blenda possuem glicerina adicionada à sua estrutura, que pode ter ocasionado um aumento nos valores de TVA e PVA obtidos.

# 5.1.2.6 Ângulo de contato

A medida do ângulo de contato fornece informações a respeito da hidrofilicidade do material. Superfícies mais hidrofílicas apresentam menores valores do ângulo de contato (Cai *et al.*, 2002). A hidrofilicidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e o crescimento das células são diretamente influenciados pela molhabilidade das superfícies, uma vez que a maior parte das células prefere ancorar em superfícies hidrofílicas (Esposito *et al.*, 2007).

|          | Ângulo de contato* ( $\theta$ ) |
|----------|---------------------------------|
| Fibroína | 81° ± 3°                        |
| Blenda   | $72^{\circ} \pm 2^{\circ}$      |
| Alginato | $59^{\circ} \pm 3^{\circ}$      |

Tabela 11: Valores médios de ângulo de contato para as diferentes membranas.

\* Média ± desvio padrão (n=10).

Verifica-se pela Tabela 11 que a membrana de fibroína apresenta maior valor para o ângulo de contato quando comparada com as demais membranas. O alginato apresenta ângulo de contato menor, indicando maior hidrofilicidade quando comparado com a fibroína. Se compararmos as proporções de cada um dos componentes na blenda verifica-se que, para o ângulo de contato, ela foi mais fortemente influenciada pela fibroína, contrariamente ao esperado.

O valor do ângulo de contato da membrana de fibroína está de acordo com o encontrado na literatura para membranas de fibroína tratadas por imersão em metanol, onde o valor encontrado foi de  $81^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (Jin *et al.*, 2004). Para as membranas de alginato o valor do ângulo de
contato também ficou próximo da literatura, que apresentou ângulo de contato de  $66^{\circ} \pm 1^{\circ}$  (Xie *et al.*, 2010). Porém, não é possível comparar diretamente os valores de ângulo de contato das membranas obtidas neste trabalho com as existentes na literatura, uma vez que o tratamento para estabilização das membranas aqui proposto é diferente dos métodos usuais, que utilizam íons multivalentes para reticular o alginato.

## 5.1.2.7 Ensaios mecânicos

A Tabela 12 apresenta os resultados do teste mecânico de tração realizado nas membranas obtidas.

|                        | Tensão de Ruptura* | Alongamento*    |
|------------------------|--------------------|-----------------|
|                        | (MPa)              | (%)             |
| Após 2 h de tratamento |                    |                 |
| Fibroína               | $52,02 \pm 12,90$  | 1,89 ±0,41      |
| Blenda                 | $66,70 \pm 1,37$   | $4,29 \pm 1,08$ |
| Alginato               | $75,01 \pm 1,45$   | $4,83 \pm 1,94$ |
| Após 24 de tratamento  |                    |                 |
| Fibroína               | $52,62 \pm 10,79$  | 1,81 ±0,61      |
| Blenda                 | $73,00 \pm 11,70$  | $3,46 \pm 0,92$ |
| Alginato               | $95,70 \pm 6,14$   | $7,73 \pm 2,23$ |
|                        |                    |                 |

Tabela 12: Resultados do teste de resistência à tração das membranas de fibroína, blenda e alginato, após 2e 24 h de tratamento.

\* Média ± desvio padrão (n=8).

Pelos resultados do teste mecânico verifica-se que a incorporação de alginato na fibroína melhorou sua resistência à tração devido ao alginato ser um biopolímero resistente. Além disso, o alongamento das membranas teve um aumento bastante significativo, quando comparado com a membrana de fibroína pura.

O aumento do tempo de tratamento não teve influência significativa na membrana de fibroína, isto pode ser justificado se considerarmos que a membrana de fibroína já tem sua

estrutura totalmente estabilizada em 2 h de tratamento em solução de  $H_2SO_4$  0,1M em etanol 50%. Com o aumento do tempo de tratamento das membranas verificou-se um aumento elevado da tensão de ruptura das membranas da blenda e, principalmente, da membrana de alginato. Isto confirma a hipótese de que 2 h de tratamento não é o suficiente para cristalizar a estrutura molecular do alginato de sódio. Quanto maior a tensão de ruptura da membrana, mais cristalina ela está e, portanto, mais estáveis e organizadas estão suas cadeias.

A Figura 20 apresenta o perfil típico de tensão *versus* deformação da membrana da blenda e de seus componentes. Esta figura não se refere à média dos valores de tensão e deformação apresentados por todas as amostras analisadas, e sim ao perfil apresentado por uma amostra específica, que representasse bem o conjunto de amostras.



Figura 20: Perfil típico de tensão em ensaio de tração em membranas de blenda de fibroína de seda e alginato de sódio.

A membrana de fibroína, além de não apresentar escoamento, apresenta tensão na ruptura bastante inferior às demais membranas, mostrando o seu comportamento frágil. A membrana de fibroína não apresenta indício de deformação plástica quando submetida ao teste de tração, rompendo sem que haja diminuição da largura da amostra. Já a membrana de alginato apresentou

comportamento plástico, com escoamento moderado. Os valores de deformação e tensão na ruptura da membrana de alginato foram bastante superiores aos da membrana de fibroína. Para a membrana da blenda tem-se comportamento semelhante à membrana de alginato, porém com alongamento inferior.

Verificou-se que é possível melhorar as propriedades mecânicas das membranas de fibroína através da incorporação de alginato de sódio e glicerina e formação de blendas poliméricas. A adição de glicerina tem um papel importante nos resultados dos ensaios mecânicos, pois ela tornou a membrana da blenda mais flexível, facilitando seu manuseio.

Sabe-se que as propriedades mecânicas das membranas quando úmidas são diferentes de quando as membranas estão secas, devido à plastificação causada pela água. A água é incorporada na estrutura do polímero, aumentando sua flexibilidade e consequentemente, diminuindo sua tensão de ruptura (Hu *et al.*, 2008).

Desta maneira, teve-se a curiosidade de saber como a água poderia afetar as propriedades mecânicas das membranas estudadas. Foi feita a tentativa de realizar o teste de tração com as membranas úmidas. Para isto, as membranas foram imersas por 72 h em água MilliQ e, imediatamente antes da realização do teste, o excesso de água na superfície da membrana foi retirado com auxílio de papel filtro. Visualmente observou-se que as membranas úmidas eram mais flexíveis e maleáveis e possuíam um alongamento muito maior do que as membranas secas, porém a força necessária para romper a membrana era menor.

Quando o teste foi realizado, as membranas de alginato e da blenda eram bastante alongadas, porém, ao invés de romper de uma única vez, elas começavam a rasgar na borda da membrana e este rasgo era propagado lentamente ao longo da amostra, conforme as garras eram afastadas. Esta força aplicada no rasgo da membrana era extremamente baixa e muitas vezes não era detectada pelo equipamento, que mesmo após toda a membrana ter sido rasgada, continuava afastando as garras, sem ser possível detectar qual o valor de alongamento máximo e tensão na ruptura apresentados. Por isto, não será possível avaliar de forma quantitativa o alongamento e tensão de ruptura das membranas quando plastificadas pela água, porém, sabe-se que estas eram bastante maleáveis, flexíveis e apresentavam alongamento elevado.

## 5.1.2.8 Análises térmicas

#### 5.1.2.8.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 21 apresenta os termogramas de DSC obtidos para as membranas da blenda e seus componentes. São mostradas somente as curvas referentes ao segundo aquecimento realizado em cada amostra (temperatura ambiente a 500 °C). Também vale ressaltar que os valores de DSC (mW) foram normalizados dividindo-os pela massa inicial em cada análise. Isto é feito para que se tenha uma dimensão mais real da intensidade dos picos apresentados.



Figura 21: Termogramas de DSC para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c).

A membrana de alginato apresentou um pico endotérmico de fusão em 185,1 °C. Este pico também é apresentado na blenda, porém em temperatura mais elevada (191,2 °C), possivelmente devido à incorporação da fibroína, que é termicamente mais estável. A membrana de fibroína apresentou pico endotérmico em 286,9 °C devido à sua degradação térmica (Freddi *et al.*, 1999), fato confirmado pela curva termogravimétrica da fibroína (Figura 22), sendo que este pico também está presente na membrana da blenda, porém em uma temperatura 2 °C menor.

## 5.1.2.8.2 Termogravimetria (TGA)

A Figura 22 apresenta as curvas termogravimétricas de perda de massa das membranas em função da temperatura.



Figura 22: Curvas termogravimétricas das membranas de fibroína, blenda e alginato.

A partir da análise termogravimétrica verifica-se que a fibroína apresenta a maior estabilidade térmica. A blenda iniciou degradação em um valor intermediário entre a fibroína e o alginato, porém mais próxima ao alginato, tendo em vista que a quantidade deste na blenda é de 75% em massa. A perda de massa no alginato na região de 190-290 °C é atribuída ao rompimento das ligações da matriz polimérica e à formação de resíduos carbonáceos (Siddaramaiah *et al.*, 2008).

Para visualização dos picos de degradação das membranas, foram feitos gráficos da derivada da curva termogravimétrica, conforme mostrado na Figura 23. Os valores foram normalizados com os valores das massas iniciais, para poder ser feita a comparação entre as intensidades dos picos de perda de massa.



Figura 23: Curvas de massa residual diferencial para as membranas de fibroína, blenda e alginato.

A membrana da blenda apresentou perfil semelhante ao alginato, porém observa-se a presença de um pico de degradação em 305,5 °C devido à contribuição da fibroína. A membrana de fibroína pura apresenta maior estabilidade térmica, iniciando sua degradação térmica em 313,7 °C, enquanto que o alginato tem perda de massa em 222,1 °C.

A membrana da blenda apresentou picos de degradação térmica dos dois componentes, porém a temperatura destes picos foi deslocada para valores intermediários, o que indica a semimiscibilidade destes componentes.

#### 5.1.2.8.3 Análise dinâmico-mecânica (DMA)

O DMA utiliza, assim como o DSC, a observação da  $T_g$  para a verificação da miscibilidade entre fases. Porém, além de ser uma técnica mais precisa e que possibilita uma melhor identificação da  $T_g$ , o DMA permite a identificação de transições secundárias relacionadas à relaxação de grupos ou parte de grupos laterais da cadeia polimérica e também da temperatura de fusão cristalina de polímeros semi-cristalinos ( $T_m$ ). Estas temperaturas de

transição são definidas através de picos nas curvas de tan $\delta$  em função da temperatura (Lucas *et al.*, 2001; Canevarolo Jr, 2003).

Os resultados de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e amortecimento (tan  $\delta$ ) são mostrados nas Figuras 24, 25 e 26, para as membranas de fibroína, blenda e alginato, respectivamente.



Figura 24: Curvas termodinamicomecânicas da membrana de fibroína.



Figura 25: Curvas termodinamicomecânicas da membrana da blenda.



Figura 26: Curvas termodinamicomecânicas da membrana de alginato.

A membrana de fibroína apresentou comportamento parecido com curvas de DMA encontradas na literatura (Tsukada *et al.*, 1998), porém os autores analisaram os gráficos apenas em temperaturas acima de 100 °C. A temperatura de transição vítrea obtida para a membrana de fibroína foi de 221,30 °C.

As membranas da blenda e de alginato puro não permitiram a realização da análise em temperaturas acima de 170 °C. Isto acontece devido à degradação das moléculas de alginato, o que impede a continuação da análise em temperaturas mais elevadas. Isto já era esperado, uma vez que o alginato inicia sua perda de massa em temperaturas próximas a 200 °C, conforme observado na análise de TGA (Figuras 22 e 23).

Devido à degradação do alginato não foi possível verificar a  $T_g$  da fibroína presente na blenda, pois o alginato iniciou sua degradação em temperatura inferior à temperatura de transição vítrea da fibroína. Entretanto, pode ser observado que o pico referente à  $T_g$  do alginato da membrana da blenda ( $T_g = 19,66$  °C) foi deslocado para valores ligeiramente superiores quando comparado com a  $T_g$  da membrana de alginato puro ( $T_g = 15,30$  °C). Isto indicaria uma semi-miscibilidade entre os componentes da blenda, fato este, já indicado pelo processo de separação de fases observado pelo MEV.

Os valores de  $T_g$  apresentados pelas membranas de fibroína e de alginato estão de acordo com a literatura (Zactiti, 2004; Tsukada *et al.*, 1998), porém nestes casos o tratamento para estabilização das membranas foi feito com metanol e cloreto de cálcio, respectivamente.

## 5.1.2.9 Citotoxicidade indireta

As Figuras 27 e 28 apresentam os resultados do teste de citotoxicidade para as membranas de fibroína, blenda e alginato em todas as diluições analisadas e o histograma de viabilidade celular para o extrato não diluído, respectivamente.



Figura 27: Viabilidade celular das membranas de fibroína, blenda e alginato.



Figura 28: Histograma de viabilidade celular das membranas da blenda para o extrato não diluído.

Nenhuma das membranas causou redução da viabilidade celular para valores inferiores ao  $IC_{50}$ . A viabilidade celular manteve-se entre 90% e 100% pelo uso de todos os extratos das membranas analisadas, e de acordo com norma ISO 10993-5 (2009), elas podem ser consideradas não citotóxicas. A membrana de alginato, em concentração de extrato igual a 100%, apresentou uma pequena queda na viabilidade celular, ficando em torno de 90%. A membrana de fibroína apresentou viabilidade celular comparável ao controle negativo em todas as concentrações de extrato analisadas. Já a membrana da blenda teve comportamento intermediário entre a fibroína e o alginato.

## 5.2 Compósitos de fios de fibroína de seda e alginato de sódio

Na seqüência deste trabalho, foram realizados testes incorporando fios de fibroína na solução de alginato de sódio, com o objetivo de aumentar a resistência mecânica do material.

Em testes preliminares foram utilizados os fios de fibroína obtidos após a remoção da sericina do casulo do bicho-da-seda. Estes fios formam uma espécie de novelo, que era desembaraçado manualmente, colocado em placa de petri e então era vertida a solução de alginato contendo glicerina sobre estes fios.

O resultado obtido foi um compósito com boa interação matriz-fibra, porém com baixa uniformidade (Figura 29). Foram obtidas regiões com acúmulo de fios e outras regiões com escassez ou ausência dos mesmos devido aos compósitos terem sido confeccionados manualmente. Tentou-se dispersar os fios de diversas formas, utilizando agitadores magnéticos e mecânicos, entretanto os fios acabavam enrolando nos agitadores, não sendo dispersos na solução de alginato. Mesmo utilizando uma quantidade bastante elevada de fios, a forma irregular do compósito refletiu diretamente nos testes mecânicos realizados, apresentando resultados inferiores ao esperado (Tabela 13).



Figura 29: Fotografia e micrografia eletrônica de varredura do compósito com 20% (massa) de fios de fibroína obtido em testes preliminares.

| Tabela 13: Resultados do teste mecânico par | ra os compósitos analisados nos testes p | reliminares. |
|---|--|--------------|
|---|--|--------------|

|                           | Tensão de Ruptura (MPa) |
|---------------------------|-------------------------|
| Alginato                  | 84,64 ± 6,65            |
| Compósito com 45% de fios | $13,10 \pm 2,03$        |
| Compósito com 62% de fios | $6,65 \pm 1,70$         |

Desta maneira, foi estudada a obtenção dos compósitos de forma mais uniforme, sem falhas que pudessem causar baixa confiabilidade nos resultados obtidos. Portanto, optou-se por cortar os fios de fibroína em tamanhos iguais, para obter uma melhor dispersão destes no alginato. Somente com os fios cortados é que foi conseguida uma maior uniformidade dos compósitos obtidos.

Após a remoção da sericina do casulo do bicho da seda, obtém-se um emaranhado de fios de fibroína, difíceis de serem separados, o que torna inviável cortar estes fios manualmente. Isto somente seria possível utilizando alguma máquina específica de fiação. Desta maneira, para facilitar a obtenção do compósito, foram utilizados fios de fibroína cedidos pela fiação Bratac (Gregia 20/22 6A), descritos na seção de Materiais e Métodos deste trabalho.

Estes fios foram cortados manualmente em pedaços de aproximadamente 1 cm e misturados com auxílio de bastão de vidro no alginato de sódio. Esta maneira de preparo dos compósitos possibilitou a obtenção de membranas de compósitos bastante uniformes.

A Figura 30 apresenta a fotografia dos compósitos obtidos. Pode ser verificado que os mesmos apresentaram distribuição bastante uniforme dos fios na matriz de alginato, diferentemente de quando utilizado o emaranhado de fios, sem cortá-los.



Figura 30: Fotografias das membranas de alginato (a), compósito com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

O interessante destas membranas de compósitos é que elas apresentam uma elevada resistência ao rasgo, devido aos fios que estão dispersos em sua matriz. Elas também são bastante maleáveis, principalmente se comparadas com as membranas densas de seus componentes puros, que quando flexionadas ou dobradas acabam sendo fraturadas.

#### 5.2.1 Caracterizações dos compósitos

#### 5.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 31 apresenta as micrografias de superfície das membranas dos compósitos.



Figura 31: Micrografias da superfície dos compósitos contendo 20% (a), 40% (b) e 60% de fios de fibroína (c).

O compósito contendo 20% de fios (Figura 31a) apresentou matriz de alginato contínua, sendo todos os fios cobertos pelo alginato, estando bem dispersos no mesmo. Nos compósitos com 40% de fios (Figura 31b), observa-se maior quantidade de fios na matriz. O alginato continuou apresentando matriz contínua, unindo os fios, porém verifica-se que alguns fios estavam soltos sobre a matriz, não estando totalmente cobertos pelo alginato. Já nos compósitos com 60% de fios (Figura 31c), verifica-se a presença de diversas camadas alginato/fios de fibroína. O alginato não conseguiu cobrir totalmente os fios, havendo espaços vazios, como se fossem poros no compósito. Ainda assim os fios se mantiveram bem unidos no compósito, não havendo descolamento quando observados a olho nu. A presença de poros na membrana contendo 60% de fios seria adequada para o cultivo de células e utilização como *scaffold*, uma vez que possui tamanho de poros adequado para as células e estes poros são interconectados.

## 5.2.1.2 Intumescimento em água

A Tabela 14 apresenta o grau de intumescimento dos diferentes compósitos. O intumescimento ocorreu principalmente no primeiro minuto em que a membrana entrou em contato com a água, sendo praticamente estabilizado nos primeiros 15 minutos de imersão para todas as membranas.

|                           | Grau de Intumescimento (%)* |
|---------------------------|-----------------------------|
| Fios de fibroína          | $58,74 \pm 11,73$           |
| Alginato                  | $310,61 \pm 6,34$           |
| Compósito com 20% de fios | $218,42 \pm 7,33$           |
| Compósito com 40% de fios | $167,80 \pm 5,92$           |
| Compósito com 60% de fios | $153,76 \pm 4,50$           |

Tabela 14: Grau de intumescimento da membrana de alginato e dos diferentes compósitos.

\* Média ± desvio médio (n=3).

Pode ser observado que a membrana de alginato sem incorporação de fios de fibroína apresentou maior intumescimento, com aumento de 310% de sua massa quando em contato com a água. Observa-se também que a presença dos fios de fibroína no compósito praticamente não exerce influência positiva no grau de intumescimento. Os fios de fibroína são altamente cristalinos e hidrofóbicos, portanto não absorvem água como a matriz de alginato, que é hidrofílica. Desta maneira, o intumescimento ocorre predominantemente na matriz de alginato. A presença de fios altamente cristalinos acaba, de fato, diminuindo o intumescimento, pois inibe a absorção de água pelas moléculas de alginato na interface com os fios.

É importante observar que os fios de fibroína utilizados na fabricação dos compósitos apresentaram intumescimento semelhante ao da membrana de fibroína após tratamento para estabilização. Além disso, verifica-se que o grau de intumescimento de cada um dos compósitos é proporcional às frações mássicas de alginato e fibroína nos mesmos.

Outra propriedade das membranas que está diretamente relacionada com o grau de intumescimento é a espessura. Com a retenção de água pela membrana, a mesma acaba inchando e isto pode ser quantificado através da relação entre a espessura inicial e final da membrana. A

Tabela 15 apresenta os valores de espessura dos compósitos. Não foi possível medir a espessura antes e após o intumescimento dos fios de fibroína por estes serem muito pequenos, impossibilitando a medida.

|                    | Espessura Inicial* | Espessura Final*  | Relação (e <sub>f</sub> /e <sub>i</sub> )** |
|--------------------|--------------------|-------------------|---|
|                    | $(e_i) (mm)$       | $(e_f) (mm)$      |   |
| Alginato           | $0,031 \pm 0,004$  | $0,145 \pm 0,016$ | $4,674 \pm 0,144$                           |
| Compósito 20% fios | $0,127 \pm 0,005$  | $0,176 \pm 0,014$ | $1,385 \pm 0,078$                           |
| Compósito 40% fios | $0,221 \pm 0,016$  | $0,317 \pm 0,010$ | $1,440 \pm 0,070$                           |
| Compósito 60% fios | $0,419 \pm 0,054$  | $0,427 \pm 0,038$ | $1,024 \pm 0,045$                           |

Tabela 15: Relação de espessura das membranas de compósitos em teste de intumescimento em água.

\* Média ± desvio médio (n=5).

\*\* Média ± desvio médio (n=3).

A medida da espessura para os compósitos com fios de fibroína acaba sendo uma medida subjetiva. A espessura medida realmente é a espessura dos fios que estão inseridos no compósito e não da matriz de alginato. Este fato é confirmado ainda ao compararmos os valores de espessura inicial e final dos compósitos com os do alginato puro. O alginato apresenta um aumento de espessura de aproximadamente 4,5 vezes, enquanto que para os compósitos, independente da quantidade de fios, este valor fica em torno de 1. Não se tem um aumento significativo na espessura medida no compósito, pois a espessura medida é a do fio, e o inchamento ocorre na matriz de alginato, que está unindo estes fios em seus interstícios.

## 5.2.1.3 Permeabilidade ao vapor d'água

Os valores obtidos para a transmissão e a permeabilidade ao vapor d'água dos compósitos são mostrados na Tabela 16. Como a espessura é levada em consideração no cálculo da permeabilidade, e é diretamente proporcional à mesma, quanto maior a espessura, maior a PVA. Isto justifica os elevados valores de PVA encontrados quando é considerada a espessura do compósito no cálculo. Conforme mencionado na discussão da análise de intumescimento em

água, a espessura medida nos compósitos é a espessura dos fios de fibroína, e não da matriz de alginato propriamente dita, o que pode ocasionar erros ao analisarmos a PVA.

Por isso, os valores aqui discutidos dirão respeito à TVA, que não considera a espessura do filme em seu cálculo e sim apenas o ganho de massa em função do tempo e a área de permeação da membrana.

|               | TVA*              | Espessura**       | PVA*               |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|               | (g/m².dia)        | (mm)              | (g.mm/m².dia.kPa)  |
| Alginato      | $366,31 \pm 5,26$ | $0,034 \pm 0,004$ | $5,20 \pm 0,46$    |
| Compósito 20% | 323,16 ± 22,12    | $0,147 \pm 0,015$ | $20,07 \pm 1,58$   |
| Compósito 40% | 358,95 ± 36,33    | $0,268 \pm 0,028$ | $40,98 \pm 10,13$  |
| Compósito 60% | 643,68 ± 28,65    | $0,464 \pm 0,078$ | $125,70 \pm 11,77$ |

Tabela 16: Valores de transmissão e de permeabilidade ao vapor d'água das membranas dos compósitos.

\*Média ± desvio médio (n=3).

\*\*Média ± desvio padrão (n=10).

No compósito contendo 20% de fios de fibroína verifica-se uma diminuição da TVA. Isto acontece justamente devido à presença dos fios, que possuem baixa permeabilidade. Neste compósito praticamente todos os fios estão incorporados na matriz, não havendo espaços sem matriz (fato confirmado pelas micrografias de MEV). Com isso, a presença de fios diminui a área em que ocorre a permeação, o que justifica a diminuição no valor da TVA. Nos compósitos com 40% de fios o comportamento é semelhante, porém, ao mesmo tempo em que aumenta a quantidade de fios, diminuindo a área para permeação, ocorre a presença de alguns pequenos poros em pontos onde a camada de alginato não foi suficiente para unir os fios presentes. Já nos compósitos com 60% de fios, a alta transmissão de vapor d'água é justificada pela presença de poros maiores que permitem a passagem do vapor d'água. Estes poros são bem visualizados pelo MEV (Figura 31c), onde pode ser observado que a quantidade de alginato não é suficiente para unir todos os fios de fibroína.

Estes valores de transmissão de vapor d'água estão de acordo com a faixa de valores de curativos comerciais (76-9360 g/m<sup>2</sup>.dia), encontrados na literatura (Wu *et al.*, 1995). Além disso, como veremos a seguir, as propriedades mecânicas destas membranas de compósitos são bastante

adequadas para aplicação em curativos, principalmente devido à sua maleabilidade e resistência ao rasgo.

### 5.2.1.4 Testes mecânicos

#### 5.2.1.4.1 Tensão de ruptura

Os resultados de relação de espessura também podem ser usados para relacionar as medidas de espessura com as baixas tensões de ruptura nos compósitos. A ruptura ocorre na matriz de alginato, que está unindo os fios, e a espessura medida (que entra no cálculo da tensão de ruptura) é a espessura das camadas de fios. Desta maneira, serão mostrados aqui os valores de força na ruptura, bem como a espessura média medida em cada tipo de membrana de compósito e a sua tensão de ruptura, para que estes valores possam ser correlacionados e melhor compreendidos.

A Tabela 17 apresenta os resultados do teste mecânico de tração realizado nos compósitos.

|                    | Força na ruptura*  | Espessura*            | Tensão na ruptura*  |
|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
|                    | (N)                | (mm)                  | (MPa)               |
| Alginato           | $73,043 \pm 9,830$ | $0,032 \pm 0,005$     | $94,262 \pm 12,143$ |
| Compósito 20% fios | $53,278 \pm 2,023$ | $0,138 \pm 0,007$     | $15,085 \pm 0,753$  |
| Compósito 40% fios | 118,289 ± 16,469   | $0,233 \pm 0,012$     | $19,831 \pm 2,334$  |
| Compósito 60% fios | 179,936 ± 36,723   | $0,\!488 \pm 0,\!018$ | $14,549 \pm 2,728$  |

Tabela 17: Valores de força na ruptura, espessura e tensão na ruptura dos compósitos analisados.

\* Média ± desvio padrão (n=8).

Pelos valores apresentados na Tabela 17 pode-se verificar que a força necessária para romper a camada de alginato nos compósitos aumenta com o aumento da quantidade de fios nos mesmos, caracterizando o efeito de reforço dos fios na matriz. Com exceção do compósito contendo 20% de fios de fibroína, os demais apresentaram valores de força na ruptura bastante superior à força necessária para romper a membrana de alginato sem fios de reforço.

A Figura 32 apresenta o comportamento típico de compósitos de alginato com fios de fibroína e também da membrana de alginato puro. A figura apresentada não se refere à média dos diversos ensaios de tração realizados, pois a quantidade de dados é muito elevada, inviabilizando os cálculos de média em cada ponto, mesmo com o uso de ferramenta computacional. Portanto, foram escolhidos testes de amostras que representassem bem cada um dos tipos de membranas analisadas.



Figura 32: Perfil típico de força em ensaio de tração em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda.

A membrana de alginato apresentou pequeno escoamento e alongamento moderado. Este perfil é diminuído com a adição de fibras de fibroína como reforço no alginato. Porém, quando adicionados 40 e 60% de fios de fibroína no compósito a força na ruptura da matriz é aumentada significativamente. Após a ruptura da matriz das membranas de compósitos, observa-se a presença de diversos picos, referentes ao descolamento das fibras da matriz.

Todos os compósitos reforçados com fios de fibroína apresentaram o fenômeno denominado *fiber bridging*, onde a fibra não rompe durante o ensaio e forma uma ponte entre as partes fraturadas da matriz. Quando a camada de alginato é rompida, ela continua sendo unida

pelos fios de fibroína. Estes fios são tracionados e arrancados da matriz pouco a pouco, o que justifica o perfil apresentado pelos compósitos após a ruptura da matriz. Ainda assim, ao final do teste pôde-se observar diversos pontos onde a fibra continua a formar a ponte entre as partes fraturadas.

Após a realização do teste de tração foi feita microscopia eletrônica de varredura dos compósitos exatamente na parte que foi rompida durante o ensaio, a fim de verificar a maneira como as fibras eram arrancadas da matriz de alginato (Figura 33).



Figura 33: Micrografia da superfície de fratura após a realização do teste de tração das membranas de alginato (a), compósito com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

Verificou-se que as fibras estavam bem aderidas à matriz. As fibras, ao invés de serem arrancadas da matriz (fenômeno conhecido como *pull out*) eram fraturadas na mesma. Isto indica uma forte adesão fibra/matriz. Se esta adesão fosse baixa, as fibras seriam arrancadas da matriz e não fraturadas junto com a mesma.

Foi observado *pull out* apenas no compósito contendo 20% de fios, tanto após o teste de tração (Figura 34) quanto após o teste de rasgamento do compósito (figura não mostrada). Este

fenômeno ocorre quando a fibra é liberada da matriz, o que indica uma menor adesão interfacial fibra-matriz neste compósito.

Um fator que pode justificar a boa adesão fibra-matriz dos compósitos com 40 e 60 % de fios é o próprio entrelaçamento entre os fios de fibroína. Os fios quando entrelaçados tem maior efeito de reforço e, além da interação fibra-matriz, existe também a interação fibra-fibra. Já no compósito com 20 % de fios, a quantidade de fios não é suficiente para que estes se entrelacem o que justificaria a ocorrência de *pull out*.



Figura 34: Pull out do compósito contendo 20% de fios de fibroína.

## 5.2.1.4.2 Propagação do rasgo

Observou-se que as membranas de compósitos com fios de fibroína apresentavam boa flexibilidade e elevada resistência ao rasgo. Desta maneira procurou-se realizar testes que demonstrassem adequadamente estas propriedades do compósito. O teste mais adequado é o de propagação do rasgo, conforme ASTM D1938-08, melhor descrito na seção de Materiais e Métodos.

Para o cálculo da força de resistência à propagação do rasgo dos compósitos, apresentada na Tabela 18, foi inicialmente calculada a média de todas as forças registradas pelo equipamento para cada amostra, desconsiderando as porções inicial e final da curva. Após foi calculada a média das 8 repetições realizadas.

|                    | Força* (N)        |
|--------------------|-------------------|
| Compósito 20% fios | $1,542 \pm 0,322$ |
| Compósito 40% fios | $3,354 \pm 0,601$ |
| Compósito 60% fios | $7,629 \pm 1,077$ |
|                    |                   |

Tabela 18: Valores de força de resistência à propagação do rasgo dos compósitos.

\* Média ± desvio padrão (n=8).

Não está mostrado na Tabela 18 o valor de força de resistência à propagação do rasgo da membrana de alginato, pois a força necessária para rasgar membranas densas, em geral, é mínima. O teste foi realizado com membranas densas de alginato e também de fibroína, porém a força necessária para rasgar estas membranas é tão pequena que sequer é detectada pelo equipamento, ficando sempre em torno do zero. Isto confirma que a incorporação de fios de fibroína em membranas de biopolímeros atua não só como carga, mas também como reforço, uma vez que as propriedades mecânicas como a tensão de ruptura e resistência à propagação do rasgo são aumentadas consideravelmente.

A Figura 35 apresenta o perfil típico apresentado pelas amostras no ensaio de propagação do rasgo.



Figura 35: Perfil típico de força em ensaio de propagação do rasgo em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda.

Foi observado que quanto maior a quantidade de fios de fibroína presente no compósito, maior era a força necessária para rasgar o mesmo.

## 5.2.1.5 Análises térmicas

#### 5.2.1.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 36 apresenta os gráficos de DSC para as membranas de alginato e dos compósitos. São mostradas somente as curvas referentes ao segundo aquecimento realizado em cada amostra. Os valores foram normalizados em função da massa inicial em cada análise.



Figura 36: Termogramas de DSC para as membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

Verifica-se na Figura 36 que o alginato apresentou pico endotérmico em 185 °C. Este pico está associado à degradação térmica do alginato, confirmado pela análise termogravimétrica, e

deslocou-se para valores ligeiramente superiores com a incorporação dos fios de fibroína, devido à maior estabilidade térmica dos mesmos.

Observa-se nas membranas dos compósitos a presença de picos endotérmicos em temperaturas na faixa de 315 a 320 °C, que correspondem à degradação térmica de fios de fibroína com orientação bem definida (Freddi *et al.*, 1999). A intensidade destes picos é aumentada com o aumento da quantidade de fios de fibroína no compósito.

## 5.2.1.5.2 Termogravimetria (TGA)

As Figuras 37 e 38 apresentam as curvas de massa residual e massa residual diferencial para as membranas dos compósitos, respectivamente.



Figura 37: Curvas termogravimétricas das membranas de alginato e compósitos.



Figura 38: Curvas de massa residual diferencial para as membranas de alginato e compósitos.

Verifica-se a presença de duas inflexões na curva termogravimétrica para as membranas dos compósitos. Estas inflexões são mais bem visualizadas analisando o gráfico da derivada da curva, sendo que este foi normalizado com os valores das massas iniciais, para poder ser feita a comparação entre as intensidades dos picos de perda de massa.

A membrana de alginato apresentou apenas um pico de perda de massa em 226 °C, atribuído à degradação térmica do alginato e à formação de resíduos carbonáceos (Siddaramaiah *et al.*, 2008).

A decomposição térmica da fibroína é influenciada pelas propriedades morfológicas e físicas da amostra, sendo o grau de orientação molecular um dos parâmetros mais importantes (Freddi *et al.*, 1999). Fibras bem orientadas decompõem em temperaturas acima de 300 °C, materiais com estrutura cristalina folha-β decompõem-se na faixa de 290-295 °C, enquanto que a decomposição da fibroína de seda com estrutura amorfa ocorre em temperaturas menores que 290°C (Nogueira, 2005).

Com a incorporação dos fios de fibroína nos compósitos, surge um novo pico, em 338 °C, referente à degradação térmica dos fios de fibroína. Este pico mostra-se de acordo com a

literatura, uma vez que a degradação dos fios de fibroína, de conformação folha- $\beta$ , ocorre em temperaturas acima de 300 °C.

Com o aumento da quantidade de fios de fibroína nos compósitos, a intensidade do pico relacionado à degradação da fibroína aumenta e o pico relacionado à matriz de alginato tem sua intensidade reduzida gradualmente. Isto ocorre, pois a quantidade mássica de alginato nos compósitos é diminuída, portanto sua influência é menos pronunciada do que na membrana de alginato puro.

#### 5.2.1.6 Citotoxicidade indireta

As Figuras 39 e 40 apresentam os resultados do teste de citotoxicidade realizado para as membranas dos compósitos desenvolvidos neste trabalho em todas as diluições do extrato estudadas e histograma de viabilidade celular para o extrato não diluído, respectivamente.



Figura 39: Viabilidade celular das membranas de alginato e dos diferentes tipos de compósitos.



Figura 40: Histograma de viabilidade celular das membranas do compósito para o extrato não diluído.

Pode ser observado que nenhuma das amostras analisadas resultou em redução de 50% da população de células. Porém, quando utilizada concentração do extrato de 100% houve uma queda na viabilidade celular para valores entre 70% (compósito com 20% fios), sendo considerado citotóxico, pois está no limite do recomendado na ISO 10993-5 (2009), e 90% (alginato puro).

Um fator que pode influenciar a citotoxicidade dos compósitos é a sericina presente nos fios de fibroína utilizados. Como estes fios não passaram pelo processo de remoção da sericina habitualmente realizado no laboratório pode-se esperar que eles tenham um conteúdo residual de sericina maior, o que teria ocasionado a queda da viabilidade celular.

Outro fator seria o tratamento utilizado nas membranas utilizando  $H_2SO_4$ . Caso haja algum traço residual de ácido nas membranas, este causa uma diminuição no pH do extrato e pode ocasionar a morte das células. A fim de evitar que isto acontecesse, após o tratamento por 24 h em  $H_2SO_4$  0,1M em etanol 50%, os compósitos e a membrana de alginato puro foram exaustivamente lavados com água destilada e imersos em água ultrapura por diversos dias, antes

da realização do teste de citotoxicidade. Esta água foi trocada 2 vezes por dia e considerou-se satisfatório quando o pH da água atingiu um valor de aproximadamente 6.

Além disso, deve-se considerar que o alginato resulta em menor viabilidade celular que a fibroína e, no compósito com 20% de fios de fibroína, por exemplo, sua quantidade mássica é elevada (80%). Com o aumento da quantidade mássica de fios de fibroína e conseqüente diminuição de alginato, ocorre o aumento da viabilidade celular justamente pela presença do alginato ser menos pronunciada.

#### 5.2.1.7 Calcificação quimicamente induzida

O ensaio de calcificação quimicamente induzida foi feito nas membranas para verificar a sua tendência de induzir a formação de depósitos de calcificação.

Foi verificado no decorrer do ensaio que as membranas de alginato (inicialmente imersas em CaCl<sub>2</sub>) não mantiveram sua estrutura, dissolvendo após a imersão na solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e na suspensão de NaHCO<sub>3</sub>. Isto ocorre porque o alginato dissolve em carbonato e bicarbonato, sendo inclusive utilizada solução de carbonato de sódio na extração do alginato das algas marinhas marrons (Rinaudo, 2008).

Quando imersa na solução de  $K_2HPO_4$  a membrana de alginato estava aparentemente íntegra, porém ao retirá-la da solução com auxilio de pinça a membrana se rompeu, demonstrando que sua estrutura também não estava estável nesta solução. Ainda assim foi possível fotografar e realizar microscopia óptica com luz polarizada dos fragmentos da membrana de alginato após imersão em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Figura 41). A membrana de alginato após imersão em NaHCO<sub>3</sub> dissolveu completamente.

Como a membrana de alginato apresentou maior estabilidade frente à solução de  $K_2HPO_4$ , as membranas da blenda e de fibroína foram imersas somente nesta solução após a imersão em CaCl<sub>2</sub>. A membrana de fibroína manteve-se íntegra após a imersão na solução de  $K_2HPO_4$ , porém a membrana da blenda se rompeu, o que já era esperado, uma vez que apresenta em sua constituição 75% de alginato. A Figura 42 apresenta as fotografias e micrografias ópticas com luz polarizada das membranas de fibroína e da blenda após imersão em  $K_2HPO_4$ .



Figura 41: Fotografia (a) e micrografia óptica de luz polarizada (b) das membranas de alginato após imersão em solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2). Aumento de 10 vezes.



Figura 42: Fotografia (a) e micrografia óptica de luz polarizada (b) das membranas da blenda (1) e de fibroína (2) após imersão em solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Aumento de 10 vezes.

O teste de calcificação quimicamente induzida não pôde ser realizado adequadamente devido à alta solubilidade do alginato no carbonato e no bicarbonato. Porém, mesmo com a

membrana tendo sua estrutura desestabilizada, foi possível observar a deposição de alguns cristais de maneira anisotrópica nas membranas de alginato após deposição de carbonato e na membrana de fibroína, após a deposição de fosfato, devido à birrefringência observada ao utilizar o filtro polarizador. Portanto, estas membranas podem induzir a deposição de precipitados inorgânicos, porém a solubilização da membrana no meio inviabiliza estudos mais detalhados.

Para verificar se as membranas dissolveriam em meio de fluido corpóreo simulado (SBF) foi feito um teste rápido, adicionando a membrana da blenda e a membrana do compósito com 40% de fios de fibroína em SBF 1,5x por 12 horas. Caso as membranas não dissolvessem no SBF poderiam ser realizados testes de calcificação *in vitro* em SBF por 7 dias, para verificar de maneira mais adequada a formação de depósitos de calcificação.

Conforme já era esperado, verificou-se que as membranas não se mantiveram estáveis no SBF, rompendo-se. A membrana do compósito apresentou maior estabilidade devido aos fios de fibroína, porém a matriz de alginato foi afetada e os fios pareciam estar soltos, podendo ser retirados facilmente da matriz. A Figura 43 apresenta as fotografias, micrografias ópticas com luz polarizada e micrografias eletrônicas das membranas da blenda e do compósito com 40% de fios após imersão em SBF.



Figura 43: Fotografia (a), micrografia óptica de luz polarizada, aumento 10 vezes (b) e micrografia eletrônica de varredura (c) das membranas da blenda (1) e do compósito com 40% de fios (2).

Não foi verificada a presença de depósitos cristalinos na superfície das membranas. A membrana do compósito apresentou certa birrefringência devido à cristalinidade dos fios de fibroína. Pela micrografia de MEV verificou-se que tanto a membrana da blenda quanto a do compósito tiveram sua integridade afetada devido ao SBF. A membrana do compósito apresentou rachaduras na matriz de alginato por toda a sua extensão.

Desta maneira, não foi possível prosseguir com os ensaios de calcificação em SBF por 7 dias devido à baixa estabilidade do alginato frente à esta solução. Os tipos de membranas preparadas e estudadas neste trabalho não são adequados para utilização em locais onde seja necessária a ocorrência de calcificação, como por exemplo, na regeneração óssea. Além disso, acredita-se que o alginato não seja adequado para aplicações em contato com o plasma sanguíneo, degradando-se rapidamente. Por outro lado, estes resultados reforçam a possibilidade da utilização destas membranas como curativos, estando em contato direto com a pele, onde a calcificação não é desejada.

# 6 DISCUSSÃO FINAL

A miscibilidade é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de blendas poliméricas. Blendas podem ser imiscíveis (separação macroscópica de fases), miscíveis ou parcialmente miscíveis. Blendas imiscíveis normalmente apresentam propriedades mecânicas insatisfatórias. As blendas obtidas em testes preliminares utilizando alginato dissolvido em água destilada apresentaram comportamento típico de blendas imiscíveis, com separação macroscópica de fases na forma de fibrilas e baixa resistência mecânica. Isto ocorreu devido às interações fibroína-fibroína serem favorecidas no meio aquoso. Já o alginato dissolvido em NaOH, devido ao valor de pH básico que apresenta, diminui a interação fibroína-fibroína, possibilitando uma melhor interação fibroína-alginato, quando utilizadas grandes proporções de alginato.

A blenda desenvolvida neste trabalho apresentou semi-miscibilidade entre seus componentes, com separação microscópica de fases em forma globular. A morfologia apresentada pela blenda foi muito interessante, mostrando fase contínua de alginato, contendo glóbulos regulares, auto-organizados, constituídos principalmente de fibroína. Estes resultados são inéditos, tanto na obtenção da blenda, na dissolução de seus componentes, no tratamento utilizado na estabilização das membranas e, principalmente, na verificação de que a estrutura globular formada era constituída de fibroína, e esta estrutura era formada de forma amorfa, mesmo após tratamento para estabilização da membrana.

A incorporação do alginato na fibroína melhorou algumas de suas propriedades como grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor d'água e hidrofilicidade. Estas melhorias devem-se principalmente ao fato do alginato ser um polímero hidrofílico e com isto é capaz de reter maior quantidade de água. As propriedades mecânicas da blenda também apresentaram aumento significativo quando comparadas com a membrana de fibroína pura, tanto para a tensão na ruptura como para o alongamento das membranas da blenda.

As propriedades térmicas da blenda foram melhoradas devido à presença de fibroína em sua estrutura, sendo os valores dos picos de degradação dos dois componentes deslocados para valores intermediários, o que indica semi-miscibilidade entre a fibroína e o alginato. Além disso, a presença de fibroína na blenda aumentou a viabilidade celular, tornando estas membranas mais adequadas para usos biomédicos.

A partir da formação de blendas de fibroína e alginato foi possível obter uma sinergia de propriedades, sendo que o alginato agiu de maneira a melhorar as propriedades físicas e mecânicas da membrana, enquanto que a fibroína agiu melhorando as propriedades térmicas e a citocompatibilidade.

Os compósitos obtidos com a adição de fios de fibroína no alginato resultaram em um material bastante uniforme, com alta maleabilidade e elevada resistência ao rasgo. Além disso, nos compósitos com 60% de fios de fibroína verificou-se a presença de sítios adequados para o crescimento de células, e com permeabilidade ao vapor d'água adequada para uso em curativos, além da possibilidade de serem feitos *scaffolds* com este material.

Todos os compósitos desenvolvidos neste trabalho, com exceção do compósito com 20% de fios, apresentaram uma boa interface fibra-matriz, claramente visualizada pelas micrografias de MEV e resultados do teste mecânico. É importante ressaltar que não foi feito qualquer tratamento de superfície dos fios previamente à sua utilização neste trabalho. Normalmente na fabricação de compósitos, é feita uma série de tratamentos de superfície e também a adição de agente de acoplagem para aumentar a adesão entre as fibras e a matriz, obtendo-se assim melhores propriedades mecânicas.

Isto indica o potencial de aplicação dos fios de fibroína na obtenção de materiais compósitos para as mais diversas finalidades. Além disso, a utilização de fios de fibroína na formação de compósitos poliméricos pode resultar em um material com características adequadas para aplicação como biomaterial, principalmente devido à obtenção de um material maleável e resistente, com fibras que podem orientar a aderência e crescimento celular.

A fibroína foi muito pouco explorada até o presente momento em materiais compósitos e o seu potencial de aplicação é claramente visualizado neste trabalho.

# 7 CONCLUSÕES

Blendas de fibroína de seda e alginato de sódio foram obtidas neste trabalho, sendo o método de obtenção e as características apresentadas por esta blenda, inéditos na literatura. A blenda apresentou separação microscópica de fases na forma de estruturas globulares compostas por fibroína em sua maior proporção. O comportamento físico e químico da blenda foi intermediário entre os seus componentes puros, porém mais voltado para o alginato na maioria dos casos. Foi possível obter sinergia entre os componentes da blenda em relação a propriedades físicas, térmicas e de citocompatibilidade.

Os compósitos de alginato com fios de fibroína puderam ser obtidos com dispersão uniforme dos fios na matriz de alginato. Observou-se boa interação fibra/matriz para todas as composições testadas, com exceção do compósito com 20% de fios. Os compósitos apresentam propriedades interessantes, como alta maleabilidade e resistência ao rasgo.

Tanto as membranas da blenda como as membranas dos compósitos apresentaram boa viabilidade celular, não sendo tóxicas às células. A boa viabilidade celular destas membranas aliada à sua maleabilidade e aos bons resultados de aplicação de membranas de fibroína e alginato puras como curativo para ferimentos, ressaltam o potencial de aplicação das blendas e compósitos obtidos neste trabalho como curativos de ferimentos e queimaduras devido à sinergia entre seus componentes. Além disso, o compósito com 60 % de fios de fibroína pode ser utilizado para a obtenção de *scaffolds* biopoliméricos por possuir poros com tamanho adequado para o crescimento de células.

# 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar tempos maiores de extração dos glóbulos de fibroína da blenda, a fim de verificar se a estrutura residual observada no interior dos glóbulos é composta por alginato ou por fibroína;

- Estudar a termodinâmica de separação de fases que ocorre entre a fibroína e o alginato, buscando definir o ponto em que esta separação passa da estrutura globular para a formação de fibrilas;

- Obter um compósito de fibras de fibroína e matriz de fibroína, com o objetivo de formar um *scaffold* para regeneração óssea com melhores propriedades mecânicas;

- Testar a adição de agente cicatrizante nas membranas da blenda e dos compósitos de maneira a formar um curativo com liberação controlada do medicamento;

- Fazer testes de adesão e crescimento celular, tanto nas membranas das blendas, quanto nas membranas dos compósitos.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABRAMSON, S. *et al.* Classes of materials used in medicine. In: RATNER, B. D. et al (Ed.). Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 67-233.

AIMOLI, C. G. Investigação da adequação de membranas de quitosana quimicamente modificadas para uso como biomaterial: estudo da calcificação in vitro. (2007). 135 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

AKCELRUD, L. C. Fundamentos da ciência dos polímeros. São Paulo: Manole, 2007. 288p.

ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. Biomaterials, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.

ALVAREZ, V. A. *et al.* Effects of the moisture and fiber content on the mechanical properties of biodegradable polymer-sisal fiber biocomposites. Journal of Applied Polymer Science, v. 91, n. 6, p. 4007-4016, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: ASTM, 2002. (ASTM D 882-02).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for water vapor transmission of materials. Philadelphia: ASTM, 2005. (ASTM E 96/E 96M-05).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tearpropagation resistance (trouser tear) of plastic film and thin sheeting by a single-tear method. Philadelphia: ASTM, 2008. (ASTM D 1938-08).

AUGST, A. D. *et al.* Alginate hydrogels as biomaterials. Macromolecular Bioscience, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.

AVELLA, M. *et al.* Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties. Carbohydrate Polymers, v. 69, n. 3, p. 503-511, 2007.

BLEDZKI, A. K. *et al.* Mechanical properties of PLA composites with man-made cellulose and abaca fibres. Composites Part A-Applied Science and Manufacturing, v. 40, n. 4, p. 404-412, 2009.

CAI, K. Y. *et al.* Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. Biomaterials, v. 23, n. 7, p. 1603-1611, 2002.

CANEVAROLO JR, S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber Editora, 2003.
CANEVAROLO JR., S. V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2 ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006. 277 p.

CAYKARA, T. *et al.* Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate. Polymer, v. 46, n. 24, p. 10750-10757, 2005.

CHAPLIN, M. Alginate. Department of Applied Sciences, London South Bank University. Disponível em: <a href="http://www1.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html">http://www1.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html</a>. Acesso em: 16 de março de 2010.

CHASIN, L.; MOWSHOWITZ, D. Introduction to cellular and molecular biology: biochemistry and genetics. Department of Biology Sciences, Columbia University. Disponível em: <a href="http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/images/3levelpro.4.p.jpg">http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/images/3levelpro.4.p.jpg</a>>. Acesso em: 18 de maio de 2009.

CHEN, 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 potential material for tissue engineering: Silkworm silk/PLA biocomposite. Composites Part B-Engineering, v. 39, n. 6, p. 1026-1033, 2008.

CORRADINI, E. *et al.* Effect of coconut, sisal and jute fibers on the properties of starch/gluten/glycerol matrix. Journal of Polymers and the Environment, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2009.

COZZONE, A. L. Proteins: Fundamental chemical properties. Encyclopedia of life sciences: Macmillan Publishers Ltd, 2002. p. 1-10.

DAI, L. X. *et al.* Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends. Journal of Applied Polymer Science, v. 86, n. 9, p. 2342-2347, 2002.

DAIGLE, D. J.; COTTY, P. J. The effect of sterilization, pH, filler and spore inoculum concentration on the preparation of alginate pellets. Biocontrol Science and Technology, v. 7. p. 3-10, 1997.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. (2005). 212 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DEVI, D. A. *et al.* Novel crosslinked chitosan/poly(vinylpyrrolidone) blend membranes for dehydrating tetrahydrofuran by the pervaporation technique. Journal of Membrane Science, v. 280, p. 45-53, 2006.

DRURY, J. L. *et al.* The tensile properties of alginate hydrogels. Biomaterials, v. 25, n. 16, p. 3187-3199, 2004.

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.

ESPOSITO, A. R. *et al.* Estudo da interação células Vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. Revista Matéria, v. 12, n. 1, p. 164-172, 2007.

FARFÁN, J. A. Química de proteínas aplicado a ciência e tecnologia de alimentos. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994. 134 p.

FREDDI, G. *et al.* Structure and molecular conformation of tussah silk fibroin films: Effect of heat treatment. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, v. 35, n. 5, p. 841-847, 1997.

FREDDI, G. *et al.* Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide. International Journal of Biological Macromolecules, v. 24, p. 251-263, 1999.

FURUYAMA LIMA, A. M. *et al.* Influence of plasticizer addition and crosslinking process on morphology, water absorption and mechanical properties of sodium alginate films. Quimica Nova, v. 30, n. 4, p. 832-837, 2007.

GARTON, A. Infrared spectroscopy of polymer blends, composites and surfaces. Munich: Hanser Publishers, 1992. 279 p.

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

HAN, S. O. *et al.* Mechanical and thermal properties of waste silk fiber-reinforced poly(butylene succinate) biocomposites. Journal of Applied Polymer Science, v. 100, n. 6, p. 4972-4980, 2006.

HAN, Y. H. *et al.* Kenaf/polypropylene biocomposites: Effects of electron beam irradiation and alkali treatment on kenaf natural fibers. Composite Interfaces, v. 14, n. 5-6, p. 559-578, 2007.

HAUG, A.; LARSEN, B. Solubility of alginate at low pH. Acta Chemica Scandinavica, v. 17, n. 6, p. 1653-1662, 1963.

HU, K. *et al.* A novel poly(L-lactide) (PLLA)/fibroin hybrid scaffold to promote hepatocyte viability and decrease macrophage responses. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, v. 22, p. 395-410, 2007.

HU, X. *et al.* Dynamic protein-water relationships during beta-sheet formation. Macromolecules, v. 41, n. 11, p. 3939-3948, 2008.

HUANG, R. Y. M. *et al.* Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. Journal of Membrane Science, v. 160, n. 1, p. 101-113, 1999.

HUANG, R. Y. M. *et al.* Pervaporation dehydration of aqueous ethanol and isopropanol mixtures through alginate/chitosan two ply composite membranes supported by poly(vinylidene fluoride) porous membrane. Journal of Membrane Science, v. 167, n. 2, p. 275-289, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of medical devices – part 5 tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland: ISO, 2009. (ISO 10993-5).

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, May-Jun 2004.

JOHN, M. J.; ANANDJIWALA, R. D. Recent developments in chemical modification and characterization of natural fiber-reinforced composites. Polymer Composites, v. 29, n. 2, p. 187-207, 2008.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. Carbohydrate Polymers, v. 71, n. 3, p. 343-364, 2008.

KALYANI, S. *et al.* Pervaporation separation of ethanol-water mixtures through sodium alginate membranes. Desalination, v. 229, n. 1-3, p. 68-81, 2008.

KAWAHARA, Y. *et al.* Self-expansion behavior of silk fibroin film. Macromolecular Materials and Engineering, v. 291, n. 5, p. 458-462, 2006.

KI, C. S. *et al.* Silk protein as a fascinating biomedical polymer: Structural fundamentals and applications. Macromolecular Research, v. 17, n. 12, p. 935-942, 2009.

KIM, B.-S. *et al.* Biomaterials for tissue engineering. World Journal of Urology, v. 18, p. 2-9, 2000.

KIM, U. J. *et al.* Structure and properties of silk hydrogels. Biomacromolecules, v. 5, n. 3, p. 786-792, 2004.

KO, H.-F. *et al.* Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. Philosophical Transactions of the Royal Society A, v. 368, p. 1981-1997, 2010.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? Biomaterials, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

KWEON, H. *et al.* Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. Journal of Applied Polymer Science, v. 80, n. 7, p. 928-934, 2001.

KWEON, H. *et al.* Semi-interpenetrating polymer networks composed of silk fibroin and poly(ethylene glycol) for wound dressing. Biomedical Materials, v. 3, n. 3, p. 1-5, 2008.

LAWRENCE, B. D. *et al.* Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. Journal of Materials Science, v. 43, n. 21, p. 6967-6985, 2008.

LEE, K. G. *et al.* Structural and physical properties of silk fibroin/alginate blend sponges. Journal of Applied Polymer Science, v. 93, n. 5, p. 2174-2179, 2004a.

LEE, K. Y. *et al.* Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. Biomaterials, v. 25, n. 13, p. 2461-2466, 2004b.

LEE, S. M. *et al.* Novel silk/poly(butylene succinate) biocomposites: the effect of short fibre content on their mechanical and thermal properties. Composites Science and Technology, v. 65, n. 3-4, p. 647-657, 2005.

LEO, W. J. *et al.* Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. Biotechnology Progress, v. 6, p. 51-53, 1990.

LEVY NETO, F.; PARDINI, L. C. Compósitos estruturais: Ciência e tecnologia. São Paulo: Editora Blucher, 2006. 313 p.

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.

LI, W. *et al.* Mechanical and viscoelastic properties of novel silk fibroin fiber/poly(epsilon-caprolactone) biocomposites. Journal of Applied Polymer Science, v. 110, n. 1, p. 134-139, 2008.

LIANG, C. X.; HIRABAYASHI, K. Improvements of the physical-properties of fibroin membranes with sodium alginate. Journal of Applied Polymer Science, v. 45, n. 11, p. 1937-1943, 1992.

LU, S. Z. *et al.* Insoluble and flexible silk films containing glycerol. Biomacromolecules, v. 11, n. 1, p. 143-150, 2010.

LUCAS, E. F. *et al.* Caracterização de polímeros - Determinação do peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.

LV, Q. *et al.* Preparation and characterization of PLA/fibroin composite and culture of HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells. Composites Science and Technology, v. 67, p. 3023-3030, 2007.

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.

MARSANO, E. *et al.* Regenerated cellulose-silk fibroin blends fibers. International Journal of Biological Macromolecules, v. 43, n. 2, p. 106-114, 2008.

MASKARINEC, S. A.; TIRRELL, D. A. Protein engineering approaches to biomaterials design. Current Opinion in Biotechnology, v. 16, n. 4, p. 422-426, 2005.

MATSUMOTO, A. *et al.* Silk fibroin solution properties related to assembly and structure. Macromolecular Bioscience, v. 8, n. 11, p. 1006-1018, 2008.

MISHRA, S. *et al.* A review on pineapple leaf fibers, sisal fibers and their biocomposites. Macromolecular Materials and Engineering, v. 289, n. 11, p. 955-974, 2004.

MOHANTY, A. K. *et al.* Sustainable bio-composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the green materials world. Journal of Polymers and the Environment, v. 10, n. 1-2, p. 19-26, 2002.

MOHANTY, A. K. *et al.* Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. Macromolecular Materials and Engineering, v. 276, n. 3-4, p. 1-24, 2000.

MONTI, P. *et al.* Structure modifications induced in silk fibroin by enzymatic treatments. A Raman study. Journal of Molecular Structure, v. 744-747 (special issue), p. 685-690, 2005.

MOON, G. Y. *et al.* Novel two-ply composite membranes of chitosan and sodium alginate for the pervaporation dehydration of isopropanol and ethanol. Journal of Membrane Science, v. 156, n. 1, p. 17-27, 1999.

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.

NAM, J.; PARK, Y. H. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. Journal of Applied Polymer Science, v. 81, n. 12, p. 3008-3021, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Structure and catalysis. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). Lehninger principles of biochemistry. New York: W. H. Freeman and Company, 2000. p. 41-484.

NOGUEIRA, G. M. Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. (2005). 78 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. Lwt-Food Science and Technology, v. 41, n. 2, p. 359-366, 2008.

OLIVEIRA, A. P. C. Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos. (2004). 158 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PAIVA, R. G. D. Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre. (2009). 95 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PAUL, D. R.; NEWMAN, S. Polymer blends. London: Academic Press, 1978. 414 p.

PARK, S. J. *et al.* Structural changes and their effect on mechanical properties of silk fibroin/chitosan blends. Journal of Applied Polymer Science, v. 74, n. 11, p. 2571-2575, 1999.

PHISALAPHONG, M. *et al.* Synthesis and characterization of bacterial cellulose/alginate blend membranes. Journal of Applied Polymer Science, v. 107, n. 5, p. 3419-3424, 2008.

PLAZA, G. R. *et al.* Effect of water on *Bombyx mori* regenerated silk fibers and its application in modifying their mechanical properties. Journal of Applied Polymer Science, v. 109, n. 3, p. 1793-1801, 2008.

PUTTHANARAT, S. *et al.* Effect of processing temperature on the morphology of silk membranes. Polymer, v. 43, n. 12, p. 3405-3413, 2002.

QIN, Y. M. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. Polymer International, v. 57, n. 2, p. 171-180, 2008.

RABELLO, M. Aditivação de polímeros. São Paulo: Artliber, 2000. 242 p.

RATNER, B. D. *et al.* Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor. In: RATNER, B. D. et al (Ed.). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 1-9.

REMES, A.; WILLIAMS, D. F. Immune-response in biocompatibility. Biomaterials, v. 13, n. 11, p. 731-743, 1992.

REMUNANLOPEZ, C.; BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. Journal of Controlled Release, v. 44, n. 2-3, p. 215-225, 1997.

RINAUDO, M. Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials. Macromolecules Symposia, v. 245-246, p. 549-557, 2006.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. Polymer International, v. 57, n. 3, p. 397-430, 2008.

RODAS, A. C. D. Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos. (2004). 149 f. (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROH, D. H. *et al.* Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, v. 17, n. 6, p. 547-552, 2006.

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.

SASHINA, E. S. *et al.* Compatibility of fibroin/chitosan and fibroin/cellulose blends studied by thermal analysis. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 89, p. 887-891, 2007a.

SASHINA, E. S. *et al.* Preparation and properties of films of fibroin-polyvinyl alcohol blends from solutions in hexafluoroisopropanol. Russian Journal of Applied Chemistry, v. 80, n. 3, p. 466-471, 2007b.

SHE, Z. D. *et al.* Preparation and *in vitro* degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold. Polymer Degradation and Stability, v. 93, n. 7, p. 1316-1322, 2008.

SIDDARAMAIAH *et al.* Sodium alginate and its blends with starch: Thermal and morphological properties. Journal of Applied Polymer Science, v. 109, n. 6, p. 4075-4081, 2008.

SILVA, R. V.; AQUINO, E. M. F. Curaua fiber: A new alternative to polymeric composites. Journal of Reinforced Plastics and Composites, v. 27, n. 1, p. 103-112, 2008.

SINGHA, A.; THAKUR, V. Mechanical properties of natural fibre reinforced polymer composites. Bulletin of Materials Science, v. 31, n. 5, p. 791-799, 2008.

TSUKADA, M. *et al.* Structure and molecular conformation of tussah silk fibroin films treated with water-methanol solutions: Dynamic mechanical and thermomechanical behavior. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, v. 36, n. 15, p. 2717-2724, 1998.

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.

VANGSNESS, C. T. *et al.* Overview of safety issues concerning the preparation and processing of soft-tissue allografts. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, v. 22, n. 12, p. 1351-1358, 2006.

VASCONCELOS, A. *et al.* Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. Biomacromolecules, v. 9, n. 4, p. 1299-1305, 2008.

VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. Progress in Polymer Science, v. 32, n. 8-9, p. 991-1007, 2007.

WESKA, R. F. Estudo da esterilização e da calcificação *in vitro* de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. (2009). 88 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

WIEBECK, H.; HARADA, J. Plasticos de engenharia. São Paulo: Artliber, 2005. 349p.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterial. In: Proceedings of a consensus conference of the European Society for biomaterials, Chester. Elsevier, 1987. p.5.

WONGPANIT, P. *et al.* Miscibility and biodegradability of silk fibroin/carboxymethyl chitin blend films. Macromolecular Bioscience, v. 7, n. 12, p. 1258-1271, 2007.

WU, P. *et al. In vitro* assessment of water-vapor transmission of synthetic wound dressings. Biomaterials, v. 16, n. 3, p. 171-175, 1995.

XIA, Y. Y.; LU, Y. Fabrication and properties of conductive conjugated polymers/silk fibroin composite fibers. Composites Science and Technology, v. 68, n. 6, p. 1471-1479, 2008.

XIAO, C. B. *et al.* Blend films from sodium alginate and gelatin solutions. Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry, v. 38, n. 3, p. 317-328, 2001.

XIE, H. G. *et al.* Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 92A, n. 4, p. 1357-1365, 2010.

YEO, J. H. *et al.* The effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 23, n. 10, p. 1220-1223, 2000.

ZACTITI, E. M. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato de potássio. (2004). 152 f. (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ZAIONCZ, S. Estudo do efeito da plastificação interna do PVC quimicamente modificado. (2004). 73 f. (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.