

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Área de Concentração: Engenharia de Processos

**HIDROGÉIS E FILMES DE FIBROÍNA DE SEDA PARA
FABRICAÇÃO OU RECOBRIMENTO DE BIOMATERIAIS**

AUTORA: GRÍNIA MICHELLE NOGUEIRA

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARISA MASUMI BEPPU

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos pré-requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas - São Paulo

Janeiro de 2009

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

N689h Nogueira, Grinia Michelle
Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para
fabricação ou recobrimento de biomateriais / Grinia
Michelle Nogueira. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fibroína. 2. Seda. 3. Filmes finos. 4.
Hidrogel. 5. Membranas (Tecnologia). I. Beppu,
Marisa Masumi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Silk fibroin hydrogels and films for biomaterials
production or coating

Palavras-chave em Inglês: Fibroin, Silk, Thin films, Hydrogel,
Membranes technology

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

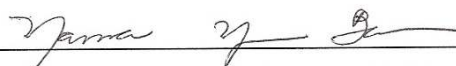
Banca examinadora: Bronislaw Polakiewicz, Celso Aparecido

Bertran, Olga Zazuco Higa, Rubens Maciel Filho

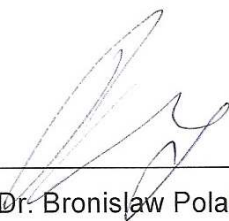
Data da defesa: 15/01/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Grínia Michelle Nogueira e aprovada em 15 de Janeiro de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



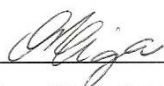
Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (FEQ/UNICAMP)



Prof. Dr. Bronisław Polakiewicz (FCF/USP)



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (IQ/UNICAMP)



Profa. Dra. Olga Zazuco Higa (IPEN)



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (FEQ/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Grínia Michelle Nogueira e aprovada em 15 de Janeiro de 2009.



Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (FEQ/UNICAMP)

**Dedico este trabalho àqueles que acreditam e se dedicam ao
desenvolvimento da ciência com seriedade e ética.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora Marisa Beppu que me orientou e abriu diversas portas para construção do meu futuro profissional. Sua orientação me direcionou e me fez crescer tanto no lado profissional como no pessoal. Agradeço ao Prof. Marcos Barrozo, meu eterno amigo e orientador, que me mostrou o caminho e o amor à ciência.

Um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório, Raquel, Rodrigo, Cassiano, Aline, Wellington, Rafael Tiba, Rafael Gonçalves, Lisa, Leandro, Emerson, Gilberto, Fernando Rosa, Fernando Vasconsellos, Mariana Moraes, Mariana Silva, André, Juliana e Lucielen, que estiveram por perto para dar idéias, discutir sobre os problemas e claro, por compartilhar da minha vida pessoal dividindo não só problemas, mas também bons momentos num café da tarde ou numa conversa de bar.

Obrigada aos amigos, Marcel, Kiara, Raquel, Lene, Chico, Charles, Paulo Henrique, Andrea, Moti, Tiba, Rafael, Rodrigo, Cassiano e Guilherme por estarem presentes nos momentos de dúvida e comemoração me dando força ou brindando minhas conquistas. Obrigada à minha família especialmente à minha mãe, tia Tereza e meu querido avô José de Moura que me apoiaram e dedicaram suas vidas à construção do meu futuro.

Obrigada aos colaboradores do projeto temático, que tornaram viável o desenvolvimento de parte deste trabalho: Dr. Ronaldo Pitombo, Dr. Bronislaw Polakiewicz, Dra. Olga Higa, Dra. Marina Maizato, Dra. Andrea Rodas, Dr. Adolfo Leirner, Cassiano Aimoli, Leandro Nascimento, Raquel Weska, Wellington Vieira Jr. e Andre Baceti.

Obrigada aos Drs. Michael Rubner e Robert Cohen pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório e contribuir de forma significativa no meu desenvolvimento científico. Da mesma forma, agradeço ao seu grupo de pesquisa, em especial a Albert Swiston, Erik Williamson, Adam

Nolte, Gary Chia e Zekeryya Gemici, pelos treinamentos, discussões científicas e apoio durante minha estada no MIT.

Obrigada aos professores Sônia Malmonge, Vanessa Bavaresco, Marcelo Ganzarolli de Oliveira e Maria Helena Santana pelas contribuições nos exames de qualificação I e II referentes a esta tese de doutorado. Aos professores Celso Bertran, Bronislaw Polakiewicz, Olga Higa e Rubens Maciel Filho pela participação e contribuição como componentes da banca de defesa da tese aqui apresentada.

Aos colaboradores Celso Camargo (FEQ/UNICAMP), Kelly Palma (FEQ/UNICAMP) e Claudenente Leal (FEM/UNICAMP) pela ajuda na realização dos testes de TGA, DSC e MEV/EDS.

Aos órgãos de fomento Capes e Fapesp pelo financiamento do doutorado sanduíche no MIT e do projeto temático FAPESP-04/095668 parcialmente desenvolvido neste trabalho, respectivamente.

**“Anyone who has never made a mistake has never tried anything new”
(Albert Einstein)**

RESUMO

Hidrogéis e filmes de fibroína de seda foram preparados e caracterizados com o objetivo de avaliar sua potencial aplicação no campo de biomateriais. Hidrogéis foram obtidos durante a etapa de diálise da solução de fibroína de seda e suas propriedades físicas, químicas, citotoxicidade e potencial de calcificação *in vitro* foram determinados. Esses materiais apresentaram estrutura tridimensional porosa com resistência mecânica à compressão relativamente alta e grande potencial de calcificar *in vitro*, sendo possíveis candidatos à aplicação na área de regeneração óssea. Filmes de fibroína de seda com quitosana foram preparados utilizando-se a técnica “Layer-by-Layer”. Com esta técnica, foi possível depositar filmes anisotrópicos, com fibras alinhadas na superfície de substratos de silício. Como os biopolímeros em estudo são conhecidamente biocompatíveis, o alinhamento de fibras na superfície do substrato poderia ser explorado como um meio de guiar a adesão e proliferação celular ou ainda agregar resistência mecânica a outros filmes poliméricos. Filmes de fibroína de seda foram também empregados para recobrir pericárdio bovino utilizado na fabricação de válvulas cardíacas. Amostras recobertas com fibroína de seda foram avaliadas quanto à sua propensão à calcificação *in vitro* e os filmes foram testados quanto a sua citotoxicidade e potencial de adesão e crescimento de células endoteliais. Os resultados indicaram que filmes de fibroína de seda não apresentam citotoxicidade, são compatíveis com células endoteliais e não induzem a calcificação do pericárdio bovino recoberto durante os testes *in vitro*. Assim, o recobrimento com fibroína de seda pode ser uma alternativa de tratamento do pericárdio bovino para funcionalização da sua superfície. Dos resultados apresentados, concluiu-se que tanto hidrogéis como filmes derivados de fibroína de seda podem ser aplicados no campo de biomateriais, sejam como matrizes para reconstituição óssea, ou filmes para recobrimento e funcionalização da superfície de materiais.

Palavras-chave: Fibroína de seda, Biomaterial, Filme, Hidrogel

ABSTRACT

Silk fibroin hydrogels and films were prepared and characterized in order to investigate their potential application in the biomaterials field. The hydrogels were obtained during the dialysis step and their physical and chemical characteristics, cell toxicity and compatibility and potential to calcify *in vitro* were investigated. Those materials presented a porous tridimensional structure, mechanical strength and ability to deposit calcium phosphate crystals during *in vitro* calcification tests; therefore, silk fibroin hydrogels can probably be used in the bone regeneration field. Silk fibroin films were obtained by using the Layer-by-Layer technique. Bi-directional alignment of silk fibroin fibers was designed by adjusting the substrate position during the dipping process. A potential application to films with alignment of fibers is to guide cell adhesion and proliferation, since the biopolymers used to build the films are known as biocompatible materials. Silk fibroin films were also used to coat bovine pericardium used to fabricate cardiac valves. The coated samples were characterized by *in vitro* calcification tests and biocompatibility of silk fibroin films was evaluated by cytotoxicity tests and their ability to adhere and grow of endothelial cells. The results showed that silk fibroin films are biocompatible and do not induce calcification during *in vitro* calcification tests, being suitable to coat and functionalize bovine pericardium surface. From the presented results, it can be concluded that silk fibroin hydrogels and films are suitable materials to be explored in the biomaterials field, for bone regeneration or biomaterials surface coating.

Key-words: Silk Fibroin, Biomaterial, Hydrogel, Film

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	7
OBJETIVO.....	7
CAPÍTULO 3	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 FIBROÍNA DE SEDA.....	9
3.2 QUITOSANA	13
3.3 BIOMATERIAIS	15
3.4 BIOMINERALIZAÇÃO	16
3.5 CALCIFICAÇÃO EM BIOPRÓTESES DE VÁLVULAS CARDÍACAS	18
3.6 GÉIS E HIDROGÉIS.....	19
3.7 DIÁLISE.....	22
3.8 METAESTABILIDADE	23
3.9 HIDROGÉIS DE FIBROÍNA DE SEDA.....	24
3.10 LAYER-BY-LAYER.....	26
3.11 FILMES LBL DE FIBROÍNA DE SEDA E QUITOSANA	28
CAPÍTULO 4	31
HIDROGÉIS DE FIBROÍNA DE SEDA.....	31
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1.1 MATERIAIS.....	32
4.1.2 REMOÇÃO DE SERICINA.....	32
4.1.3 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA	32

4.1.4	PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS	33
4.1.5	ESTUDO DO PROCESSO DE DIÁLISE	34
4.1.6	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	35
4.1.7	TESTES DE CALCIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	39
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.2.1	ESTUDO DO PROCESSO DE DIÁLISE	41
4.2.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	45
4.2.3	TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	47
4.2.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	49
4.2.5	TESTES DE CALCIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	50
4.2.6	ENSAIOS DE PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	55
4.2.7	CITOTOXICIDADE.....	57
4.3	DISCUSSÃO GERAL	59
4.4	CONCLUSÃO PARCIAL.....	62
CAPÍTULO 4		63
FILMES <i>LBL</i> DE FIBROÍNA DE SEDA E QUITOSANA		63
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1.1	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE QUITOSANA E FIBROÍNA DE SEDA	64
4.1.2	DEPOSIÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E FIBROÍNA DE SEDA	65
4.1.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E FIBROÍNA DE SEDA.....	67
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.2.1	FILMES DE FIBROÍNA DE SEDA E QUITOSANA	69
4.2.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	72
4.2.3	ORIENTAÇÃO DE FIBRAS NA SUPERFÍCIE DOS FILMES	73
4.2.4	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	78
4.2.5	EFEITO DO SOLVENTE NA DEPOSIÇÃO DOS FILMES	81
4.3	DISCUSSÃO GERAL	84

4.4	CONCLUSÃO PARCIAL.....	85
	CAPÍTULO 5	87
	RECOBRIMENTO DE BIOMATERIAIS.....	87
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
5.1.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PERICÁRDIO BOVINO.....	88
5.1.2	SOLUÇÕES DE BIOPOLÍMEROS	88
5.1.3	FILME DE BIOPOLÍMEROS	89
5.1.4	RECOBRIMENTO DE PERICÁRDIO BOVINO	89
5.1.5	ENSAIOS DE CALCIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	89
5.1.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE EM FILMES DE FIBROÍNA DE SEDA E DE QUITOSANA	90
5.1.7	ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM FILMES DE FIBROÍNA DE SEDA E DE QUITOSANA	91
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.2.1	TESTES DE CALCIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	92
5.2.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO CRESCIMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM FILMES DE FIBROÍNA DE SEDA E DE QUITOSANA.....	97
5.3	DISCUSSÃO GERAL	100
5.4	CONCLUSÃO PARCIAL.....	103
	CAPÍTULO 6	105
	DISCUSSÃO FINAL	105
	CAPÍTULO 7	109
	CONCLUSÃO FINAL	109
	CAPÍTULO 8	111
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	111
	REFERÊNCIAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estudos realizados em hidrogéis e filmes de fibroína de seda abordados neste trabalho.....	6
Figura 2- Estrutura folha- β da fibroína de seda e dos principais aminoácidos que compõem sua cadeia. (Figura adaptada de Nelson e Cox, 2000).....	11
Figura 3 – Estrutura química da quitosana.....	14
Figura 4 – Esquema do processo de preparação da solução de fibroína de seda.....	33
Figura 5 – Esquema experimental para produção de hidrogéis de fibroína de seda e determinação da concentração residual de cálcio nos mesmos.	35
Figura 6 – Hidrogel obtido ao final da etapa de diálise a 20 °C de uma solução de fibroína de seda.....	42
Figura 7 – Cinética de liberação de cálcio durante a diálise de solução de fibroína de seda a diferentes temperaturas até gelificação completa da solução de fibroína de seda.....	43
Figura 8 - Difratoograma obtido por difração de raios-X em amostra de hidrogel de fibroína de seda liofilizado.....	46
Figura 9 - Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda liofilizado, onde TGA' representa a derivada primeira da curva de TGA.....	47
Figura 10 - Termograma de hidrogel de fibroína de seda liofilizado obtido por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	48
Figura 11 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para (a) superfície e (b) fratura de hidrogel de fibroína de seda.....	50
Figura 12 – Micrografias de amostras de hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação <i>in vitro</i> : (a) amostra liofilizada 1xSBF, (b) amostra	

liofilizada 1,5xSBF, (c) amostra <i>in natura</i> 1xSBF and (d) amostra <i>in natura</i> 1,5xSBF.....	51
Figura 13- Perfis de EDS para hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação <i>in vitro</i> : (a) amostra liofilizada 1xSBF, (b) amostra liofilizada 1,5xSBF, (c) amostra <i>in natura</i> 1xSBF and (d) <i>in natura</i> 1,5xSBF.....	52
Figura 14 – Micrografia uma amostra de hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação <i>in vitro</i> com aumento de 10000x.	55
Figura 15 – Perfil típico da curva de tensão X deformação para amostras de hidrogéis de fibroína de seda úmidos submetidos a testes de compressão.	57
Figura 16 - Viabilidade celular de hidrogéis de fibroína de seda submetidos a testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	58
Figura 17 – Esquema do processo (a) de deposição de filmes de fibroína de seda e quitosana e (b) de obtenção fibras alinhadas em duas direções na superfície dos substratos.....	66
Figura 18 - Espessura de filmes de fibroína de seda e quitosana determinada por elipsometria para filmes com 20 bicamadas utilizando-se solução de quitosana a pH 6 ((Chi6/SF) ₂₀) ou a pH 4 ((Chi4/SF) ₂₀), aplicando-se ou não a etapa intermediária de secagem entre as deposições dos biopolímeros.....	70
Figura 19 - Curva de crescimento para filmes de fibroína de seda e quitosana (Chi6/SF) utilizando fibroína de seda dissolvida em solvente ternário BrLi-CH ₃ CH ₂ OH-H ₂ O.	71
Figura 20– Espectro de infravermelho para filme de fibroína de seda e quitosana (pH 6) com 20 bicamadas aplicando processo de secagem entre a deposição de cada biopolímero.....	73
Figura 21 – Imagens de microscopia óptica para filmes de fibroína de seda e quitosana, preparados a partir de solução de quitosana a pH 6, com (a) 10, (b) 20, (c) 30 ou (d) 40 bicamadas, evidenciando o alinhamento de fibras na superfície dos mesmos.....	75

Figura 22 – Bi-direcionamento de fibras observado por Transformada Rápida de Fourier, para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição, onde z é a espessura do filme calculada por elipsometria.	76
Figura 23 – Média azimutal da Transformada Rápida de Fourier de imagens obtidas por microscopia óptica para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição.	77
Figura 24 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6) constituídos de 10 ((Chi6/SF) ₁₀) ou 30 ((Chi6/SF) ₃₀) bicamadas, sendo z a escala máxima de altura.	79
Figura 25 – Imagem de AFM tridimensional no modo de altura para uma amostra de filme com 10 bicamadas de fibroína de seda e quitosana a pH 6, (Chi6/SF) ₁₀ .	80
Figura 26 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição, onde z representa a escala máxima de altura.	81
Figura 27 - Curva de crescimento para filmes de fibroína de seda e quitosana, a pH6, (Chi6/SF), utilizando fibroína de seda dissolvida em solvente ternário CaCl ₂ -CH ₃ CH ₂ OH-H ₂ O.	82
Figura 28 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes com 10 bicamadas de fibroína de seda e quitosana (pH 6), utilizando solução de fibroína de seda dissolvida em solvente ternário (a) BrLi-CH ₃ CH ₂ OH-H ₂ O ou (b) CaCl ₂ -CH ₃ CH ₂ OH-H ₂ O.	83
Figura 29 – Micrografias de (a, c) amostras de pericárdio bovino não recoberto com biopolímeros após testes de calcificação <i>in vitro</i> e (b,d) respectivos espectros de EDS.	94

Figura 30 – Micrografia de amostra de pericárdio bovino recoberto com (a) quitosana e (c) com fibroína de seda após testes de calcificação <i>in vitro</i> e (b, d) respectivos espectros de EDS.	95
Figura 31 – Viabilidade celular de filmes de fibroína de seda e de quitosana determinada por testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	98
Figura 32 - Imagens obtidas em microscópio óptico invertido para o crescimento de células endoteliais cultivadas sobre placa de cultura (controle) e sobre filmes de quitosana e de fibroína de seda.	99

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A seda produzida pelo bicho-da-seda é constituída por duas proteínas: fibroína e sericina. Possui a vantagem de ser um recurso natural renovável disponível no Brasil e possuir um custo relativamente baixo (aproximadamente R\$10,00/kg de casulos). Em 2007 a produção brasileira de seda foi de aproximadamente 1300 toneladas e empregou aproximadamente 8000 famílias (dados fornecidos pela Fiação Bratac). Neste trabalho, fibras e casulos de seda provenientes de sobras do processo de fiação foram utilizados com o intuito de reaproveitar um material que seria inadequado para utilização na confecção de tecidos. Ambos são adequados para preparação da solução de fibroína ou dos materiais derivados da mesma.

No campo de biomateriais, a fibroína de seda vem sendo largamente estudada por apresentar compatibilidade com diversos tipos de células, alta resistência mecânica e microbiana e pela possibilidade de ser processada sob diversas formas como pós, filmes ou hidrogéis (LI *et al.*, 2002; ALTMAN *et al.*, 2003; UNGER *et al.*, 2004; FINI *et al.*, 2005; TAMADA, 2005). Apesar de apresentar tais propriedades e alto potencial de aplicação na área médica ou mesmo cosmética, a fibroína de seda ainda é pouco explorada no Brasil para estes fins. Desta forma, buscou-se estudar e explorar tanto métodos de preparação de materiais derivados de fibroína de seda quanto algumas de suas possíveis aplicações como biomaterial.

No processamento de materiais derivados de fibroína de seda, uma etapa muito importante e relativamente complexa está quase sempre presente: a diálise da solução de fibroína de seda. Esta etapa é necessária à remoção de sais presentes em grande parte dos solventes utilizados na preparação da solução desta proteína (CHEN *et al.*, 2001). Uma alternativa ao processo de diálise foi proposta por Nogueira (2005) para preparação de membranas porosas de fibroína

de seda através de um método de separação de fases; entretanto, a preparação de filmes ou hidrogéis ainda requer a inclusão desta etapa intermediária quando solventes contendo sais são utilizados.

A maior complexidade do processo de diálise está no fato de que a solução de fibroína de seda dialisada é meta-estável e está sujeita a gelificação pela ação de fatores externos como temperatura ou agitação mecânica. A concentração de fibroína, a concentração de sais ou o tempo de armazenamento da solução também influenciarão na gelificação da proteína (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005). O entendimento deste processo natural de gelificação, assim como dos parâmetros nele envolvidos é de extrema importância para aqueles que objetivam preparar materiais a base de fibroína de seda, sejam eles filmes, pós ou hidrogéis.

A idéia de se investigar o processo de diálise e a formação de hidrogéis a partir deste surgiu durante os experimentos para preparação de membranas densas de fibroína de seda apresentados na dissertação de mestrado de Nogueira (2005). A diálise da solução de fibroína de seda era realizada com o intuito de remover os sais e obter uma solução de fibroína de seda adequada para formação de membranas. Entretanto, Nogueira observou que durante os experimentos, a solução de fibroína de seda gelificava dentro da membrana de diálise ou mesmo logo após ser vertida em placas Petri. Esta gelificação era irreversível e, portanto, indesejada, já que o objetivo do trabalho era obter membranas de fibroína de seda. Se o gel era formado quando a solução era vertida em placas Petri, a secagem do mesmo levava a formação de um filme com alta fragilidade ao manuseio, que também não era adequado para as aplicações propostas no trabalho.

Desta forma, o processo de diálise em solução de fibroína de seda usando o solvente ternário a base de cloreto de cálcio, etanol e água ($\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$) foi investigado de forma a obter informações sobre o ponto de gelificação da fibroína de seda como função da temperatura de diálise e da concentração

residual de cálcio na solução protéica. Este estudo está descrito no Capítulo 3 do presente trabalho.

Da solução dialisada, pode-se produzir filmes, hidrogéis ou mesmo estruturas tridimensionais compostas por fibroína de seda. Antes do ponto de gelificação, a solução pode ser vertida em placas para formação de filmes ou membranas, pode ser usada para recobrir materiais ou ainda ser congelada em moldes para produção de matrizes porosas (LI *et al.*, 2002; ALTMAN *et al.*, 2003; MEGEED *et al.*, 2004; UNGER *et al.*, 2004, FINI *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2007).

Na literatura, há alguns relatos sobre a preparação e caracterização de hidrogéis de fibroína de seda; entretanto, cada autor utiliza métodos de preparação distintos, geralmente com a adição de agentes que aceleram a gelificação da solução (FINI *et al.*, 2005; TAMADA, 2005; FANG *et al.*, 2006). Para o presente trabalho, hidrogéis formados naturalmente durante o processo de diálise, através da formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas da proteína para obtenção de uma conformação estrutural mais estável, foram estudados. Esses materiais foram caracterizados química e fisicamente e seu potencial de aplicação como biomaterial foi avaliado por testes de citotoxicidade e ensaios de calcificação *in vitro*. Os resultados mostraram que os hidrogéis, produzidos naturalmente pelo processo de diálise de uma solução de fibroína de seda, apresentam um grande potencial de aplicação como material para regeneração ou reconstituição óssea por serem capazes de promover a deposição de cristais de fosfato de cálcio durante testes de calcificação *in vitro* (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Dando continuidade ao estudo de produção de materiais derivados de fibroína de seda, investigou-se a possibilidade de preparar filmes desta proteína através de uma técnica conhecida como *Layer-by-Layer* (LbL). Esta técnica consiste basicamente na deposição sucessiva de polímeros, partículas ou outras substâncias sobre a superfície de um substrato pela ação de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio (DECHER; SCHLENOFF, 2003; SCHONHOFF, 2003). Esta pesquisa foi parte de uma

colaboração com o Professor Michael Rubner do Centro de Engenharia e Ciência de Materiais (CMSE) do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) como parte do doutorado-sanduíche financiado pela agência brasileira CAPES.

Para formação dos filmes LbL, outro polímero natural e conhecidamente como biocompatível foi escolhido para os testes: a quitosana. A escolha da quitosana como componente dos filmes multicamadas baseou-se não só em suas propriedades de biocompatibilidade e antibacteriana, mas também em sua característica polieletrólítica que poderia conferir maior aderência ao substrato e maior interação com as moléculas de fibroína (CAI *et al.*, 2007; PAYNE; RAGHAVAN, 2007).

Durante a deposição dos filmes nos substratos, observou-se a deposição de fibras de fibroína de seda alinhadas numa direção. Esse fenômeno foi investigado e chegou-se a obtenção de filmes com fibras orientadas em até duas direções. A possibilidade de se depositar e orientar fibras em direções pré-definidas é de grande interesse na engenharia de tecidos, onde o alinhamento das fibras poderia controlar e melhorar as propriedades mecânicas dos filmes, além de servir como guia para adesão e proliferação celular (MA *et al.*, 2005; BADAMI *et al.*, 2006; LIANG, HSIAO; CHU, 2007). Desta forma, a metodologia para obtenção da orientação das fibras na superfície dos filmes de fibroína de seda e quitosana foi estudada e está mostrada no Capítulo 4. Os filmes LbL foram caracterizados quanto a sua morfologia, orientação e estrutura molecular.

O Capítulo 5 descreve outro estudo da aplicação de filmes de fibroína de seda no campo de biomateriais. Neste capítulo, foi investigada a possibilidade de recobrir amostras de pericárdio bovino utilizado na confecção de válvulas cardíacas, com solução dialisada de fibroína de seda. Este estudo foi parte de um projeto temático (FAPESP-04/095668) onde se visava estudar a influência de diferentes tratamentos no pericárdio bovino para evitar ou desacelerar o tempo de calcificação de válvulas cardíacas. Neste caso, o recobrimento do material foi feito por única imersão em uma solução dialisada de fibroína de seda. Amostras de pericárdio bovino recobertas com este filme foram caracterizadas quanto ao seu

potencial de calcificação *in vitro*. Os resultados foram comparados com os obtidos para pericárdio bovino recoberto com quitosana (outro biopolímero investigado durante o projeto temático) e para pericárdio bovino sem recobrimento. Apesar da afinidade natural da fibroína de seda com o cálcio, amostras de pericárdio bovino recobertos com esta proteína não apresentaram sinais de calcificação após testes de calcificação *in vitro* durante 7 dias. Além disso, filmes de fibroína de seda foram caracterizados como não citotóxicos e compatíveis com células endoteliais através de testes *in vitro* de citotoxicidade e crescimento celular. O recobrimento do pericárdio bovino com filme de fibroína de seda pode então ser interessante para formar uma camada compatível com células endoteliais, que poderiam aderir à válvula, agindo como uma proteção extra contra calcificação ou aumentando sua resistência física ou vida útil (BENGTSSON *et al.*, 1993; FEUGIER *et al.*, 2004; NINA *et al.*, 2004).

Os estudos realizados neste trabalho estão resumidos no fluxograma apresentado na Figura 1. De forma geral, pode-se afirmar que tanto hidrogéis como filmes de fibroína de seda são materiais interessantes para o estudo e desenvolvimento de biomateriais com potencial de aplicação tanto na área de regeneração óssea como no recobrimento de materiais com intuito de funcionalizar sua superfície, podendo agregar propriedades como biocompatibilidade ou resistência mecânica.

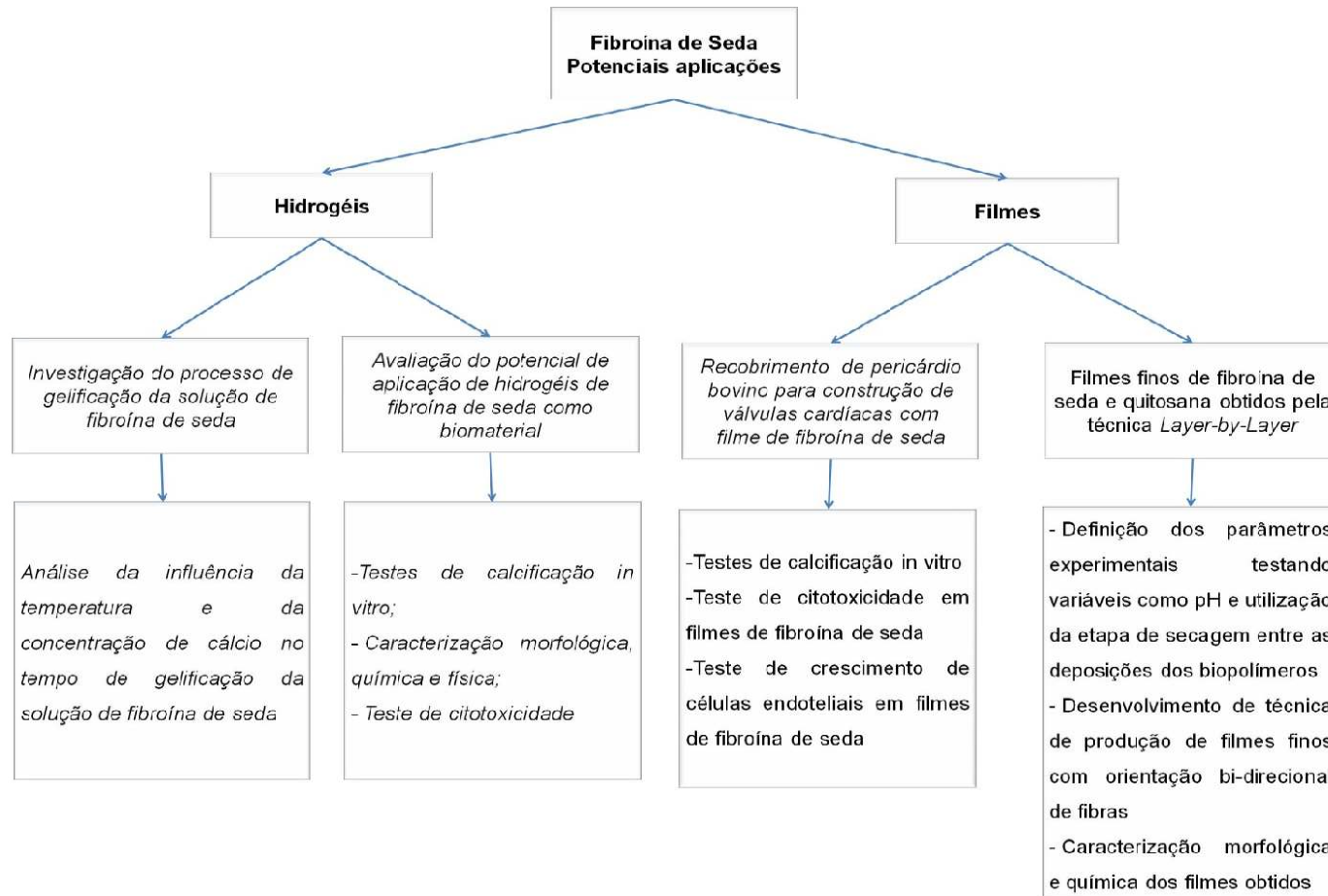


Figura 1 - Estudos realizados em hidrogéis e filmes de fibroína de seda abordados neste trabalho.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo investigar a obtenção e potenciais aplicações de hidrogéis e filmes de fibroína de seda como biomateriais. Dentro deste escopo, três principais tópicos foram abordados:

1) estudo do processo de diálise de fibroína de seda para obtenção de hidrogéis avaliando a influência da temperatura de diálise e da concentração residual de cálcio no tempo de gelificação e caracterização dos hidrogéis formados a uma determinada temperatura quanto às suas propriedades química e física, morfologia, biocompatibilidade e potencial de calcificação *in vitro*;

2) obtenção e caracterização química e morfológica de filmes de fibroína de seda e quitosana com orientação bi-direcional de fibras em sua superfície utilizando-se a técnica de deposição *Layer-by-Layer*;

3) estudar o potencial de aplicação de filmes de fibroína de seda no recobrimento de biomateriais voltados à confecção de válvulas cardíacas através de testes de calcificação *in vitro* em pericárdio bovino recoberto com esta proteína e de testes *in vitro* de citotoxicidade e de crescimento de células endoteliais nos filmes de fibroína de seda.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fibroína de Seda

A seda produzida pelo bicho-da-seda *Bombyx-mori* é composta por dois tipos de proteínas: (1) sericina, envolvendo as fibras e (2) fibroína, o filamento da seda composto de regiões altamente organizadas com cristais folha- β e semicristalinas, responsáveis pela elasticidade da seda (ALTMAN *et al.*, 2003). Proteínas naturais da seda do bicho-da-seda têm sido muito usadas no campo médico como material de sutura há séculos (UNGER *et al.*, 2004). Recentemente, vários pesquisadores têm investigado a fibroína como um recurso promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua compatibilidade com diversos tipos de células, alta permeabilidade para o oxigênio e vapor d'água, biodegradabilidade e mínima reação inflamatória. Outras propriedades importantes, como alta resistência mecânica e microbiana, possibilitam sua utilização como substratos para cultura celular, imobilização enzimática, lentes de contato com alta permeabilidade ao oxigênio, agentes de liberação de drogas e proteção de feridas (SANTIN *et al.*, 1999; UM *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2003; MEINEL *et al.*, 2005; BADAMI *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2007).

Segundo Altman *et al.* (2003), suturas de seda contendo sericina induziam hipersensibilidade em pacientes causando alergia, o que não era verificado quando a sericina era previamente removida das fibras. Alguns pesquisadores (MIM *et al.*, 2004; UNGER *et al.*, 2004; NOGUEIRA 2005) realizaram testes de crescimento celular *in vitro* em membranas ou fibras de fibroína de seda utilizando fibroblastos, queratinócitos ou osteoblastos e verificaram que todas as células aderiram e espalharam nos espaços entre as fibras ou na superfície das membranas. Desta forma, o histórico de compatibilidade celular atribuído à

fibroína induz ao desenvolvimento de novas pesquisas focadas na aplicação destas matrizes no campo de biomateriais.

A fibroína da seda é uma proteína composta quimicamente por glicina, alanina, serina e, em menor quantidade, tirosina e outros aminoácidos residuais. Glicina e alanina somam aproximadamente 75% mol da proteína. A região cristalina contém várias repetições desses aminoácidos em sequência, formando o arranjo conhecido como folha- β . A região amorfa contém a maioria dos resíduos de aminoácidos com uma cadeia lateral volumosa e polar. As propriedades de tensão das fibras da seda dependem principalmente da estrutura cristalina, enquanto outras propriedades como retenção de umidade e resistência química, dependem do estado da região amorfa (MORI e TSUKADA, 2000). As estruturas folha- β da fibroína e dos principais aminoácidos que a compõe estão mostradas na Figura 2.

Uma molécula de fibroína de seda consiste de duas cadeias conectadas por uma ligação dissulfídica (TANAKA *et al.*, 1999). A cadeia com maior massa molecular (~350 kDa) é composta por domínios repetitivos de Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser. Ao lado do grande número de resíduos hidrofóbicos, esta cadeia apresenta resíduos de hidroxila (serina e tirosina) que promovem sua afinidade com a água. Esta cadeia ainda fornece uma característica polieletrólítica à fibroína devido à presença de resíduos de aminoácidos carregados, os ácidos glutâmico e aspártico, distribuídos no final das cadeias. A cadeia mais leve (~25 kDa) não apresenta regiões repetitivas, mas contém grande quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico (HOSSAIN *et al.*, 2003)

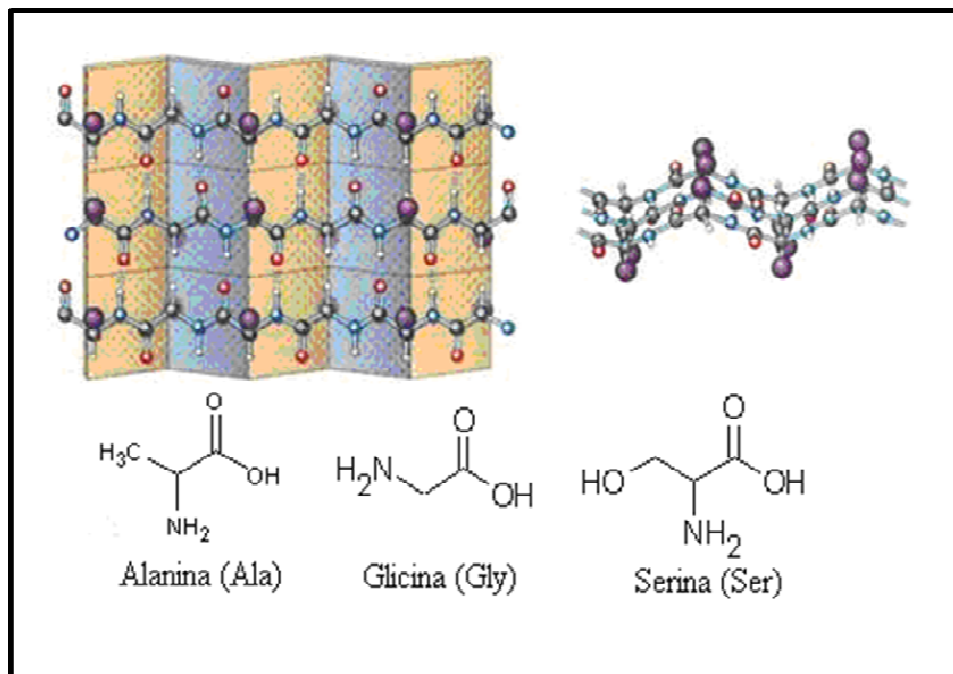


Figura 2- Estrutura folha- β da fibroína de seda e dos principais aminoácidos que compõem sua cadeia. (Figura adaptada de Nelson e Cox, 2000)

A fibroína, 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; COX, 2000). A grande quantidade de pontes de hidrogênio, alta cristalinidade (60-70%) e alto grau de molhabilidade ($\sim 60^\circ$) tornam sua dissolução difícil em diversos solventes aquosos ou orgânicos. Entretanto, soluções concentradas de ácidos (fosfórico, fórmico, sulfúrico e clorídrico), solventes orgânicos (hexafluorisopropanol, hexafluoroacetona) ou sais (contendo ou não solventes orgânicos) podem ser utilizadas para solubilizar a fibroína de seda (SASHIMA *et al.*, 2006).

A dissolução da fibroína de seda em solventes orgânicos compostos de um único componente, como hexafluoroacetona, requer a pré-ativação da fibroína de seda para que a dissolução ocorra. Esta pré-ativação é normalmente feita pela dissolução da proteína em solvente contendo altas concentrações salinas, seguida

de diálise e recuperação do polímero na forma de filme pela secagem da solução (OHGO *et al.*, 2003; SASHIMA *et al.*, 2006). Uma alternativa à diálise para recuperação do polímero pode ser verificada no trabalho de Nogueira (2005) que descreve a recuperação de fibroína de seda através de um processo de separação de fases em soluções salinas diluídas desta proteína.

Em soluções concentradas de ácidos, as moléculas de fibroína de seda são solvatadas por fortes interações iônicas através da protonação dos grupos amino e amida da proteína. Já em soluções salinas, a dissolução se dá pela interação dos íons do solvente com os grupos funcionais das moléculas de fibroína quebrando as pontes de hidrogênio intra e inter molecular (SASHIMA *et al.*, 2006). A capacidade de solvatação depende do pH, da força iônica do solvente e da temperatura. Distante do ponto isoelétrico, a solubilidade aumenta com o aumento da concentração de sal, que eleva a condutividade do meio e a força iônica. O efeito solubilizante do sal denomina-se *salting in*. Sais com íons bivalentes são muito mais eficientes na solubilização por salificação (*salting in*) do que sais de íons monovalentes (LEHNINGER, 1976, FARFÁN, 1990). O efeito *salting in* é observado na dissolução da fibroína de seda em solventes contendo altas concentrações de sais como cloreto de cálcio ou brometo de lítio.

Chen e colaboradores (2001) compararam os efeitos de quatro solventes diferentes na reologia de soluções de fibroína de seda. Os solventes utilizados foram $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-Metanol-H}_2\text{O}$; LiBr-Metanol (com e sem água); e $\text{LiBr-H}_2\text{O}$. Os resultados reológicos mostraram que os solventes ternários $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-Metanol-H}_2\text{O}$ e $\text{LiBr-Metanol-H}_2\text{O}$ têm a solvatação mais forte nas cadeias de fibroína da seda. Em contraste, $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ apresentou a solvatação mais fraca com efeitos nas moléculas de fibroína similares aos da água pura.

Como alternativas aos solventes ternários comumente usados para dissolver a fibroína de seda, líquidos iônicos, soluções de óxidos de amina cíclica, entre outros têm sido investigados por alguns pesquisadores (FREDDI *et al.*, 1999, HA *et al.*, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2004). O solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ foi selecionado para preparação de hidrogéis e filmes para recobrimento de

pericárdio bovino, por apresentar uma boa capacidade de solvatação e não envolver materiais excessivamente tóxicos à saúde, como é o caso do metanol. O solvente ternário contendo CaCl_2 e etanol já vem sendo utilizado em nosso laboratório desde 2004 e tem fornecido resultados satisfatórios quanto à capacidade de solvatação da fibroína de seda e quanto à compatibilidade dos materiais derivados da mesma (NOGUEIRA, 2005). Para fabricação de filmes finos por *Layer-by-Layer*, o solvente ternário $\text{BrLi-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ também foi utilizado e sua influência na deposição dos filmes nos substratos foi estudada.

No ramo de cosméticos, os aminoácidos da seda são muito utilizados devido a suas propriedades hidratantes. A fibroína pode se fixar sobre a queratina da pele proporcionando propriedades protetoras, suavizantes e reparadoras. Alguns fornecedores de cosméticos garantem que as proteínas da seda, quando em contato com a pele, recuperam a hidratação e a textura suavizando rugas. Além da característica hidratante, a seda possui propriedades como efeito antibacteriano e de proteção da pele contra radiação ultravioleta e eletricidade estática. Alguns autores estimaram que 5% de pó de fibroína irradiado com raios gama é suficiente para inibir o crescimento de algumas bactérias (FNCA, 2002). Vale ressaltar, entretanto, que aminoácidos da seda, geralmente usados em produtos de cuidados da pele e dos cabelos, são obtidos pela decomposição da proteína da seda em ácidos, álcalis ou enzimas, então estes não mantêm as propriedades originais da seda (FINE CO Ltda, 2008).

3.2 Quitosana

A quitosana foi utilizada neste trabalho em conjunto com a fibroína de seda para preparação de filmes pela tecnologia *Layer-by-Layer* (LbL) e para o estudo de recobrimento de pericárdio bovino utilizado na fabricação de válvulas cardíacas.

Quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina (componente estrutural do exoesqueleto de crustáceos, como caranguejo ou

camarão). A massa molecular da quitosana pode variar entre 300 kDa ou mais de 1000 kDa com grau de desacetilação variando entre 30 a 95% (VANDE VORD *et al.*, 2002). A quitosana possui como grupos funcionais ativos um grupamento amino e dois grupamentos hidroxila. Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 3.

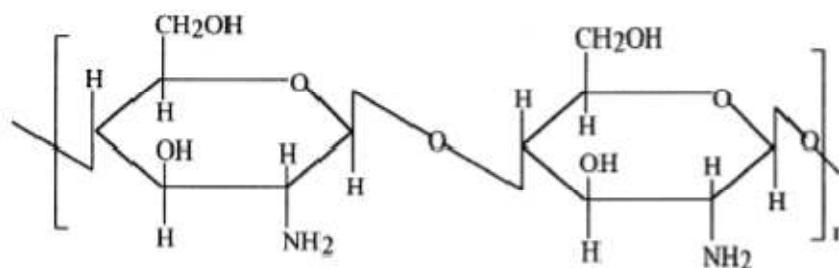


Figura 3 – Estrutura química da quitosana.

A quitosana é um material biodegradável, hidrofílico e compatível com diversos tipos de células, sendo largamente utilizada no campo biomédico, particularmente como biomaterial para recobrimento de feridas e pele artificial devido a sua capacidade de acelerar e promover cicatrização homogênea na superfície da pele (KWEON *et al.*, 2001).

A baixo pH, a quitosana é um polieletrólito carregado positivamente devido à protonação de suas aminas primárias. À medida que o pH aumenta, as aminas primárias são desprotonadas levando à sua precipitação ou agregação (PAYNE; RAGHAVAN, 2007).

Na construção de filmes LbL de fibroína de seda e quitosana, a interação entres esses biopolímeros pode ocorrer por pontes de hidrogênio formadas entre suas moléculas, assim como por interações eletrostáticas (SIONKOWKA *et al.*,

2006; CAI *et al.*, 2007). A grande vantagem em se unir esses dois materiais é a possibilidade de combinar suas propriedades tais como resistência mecânica, biocompatibilidade e interação celular.

Alguns pesquisadores têm investigado a produção de blendas de fibroína de seda e quitosana e até mesmo a produção de filmes multicamadas envolvendo os dois biopolímeros (GOBIN *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2007). Dentre as diversas propriedades obtidas da mistura destes materiais, destacam-se o aumento da compatibilidade celular de superfície de titânio recoberta pelo filme LbL e o aumento da resistência mecânica nas blendas, proporcional à fração de fibroína incorporada.

Desta forma, a escolha da quitosana como componente dos filmes LbL e como material de recobrimento de pericárdio bovino ao lado da fibroína de seda se justifica e os detalhes desta combinação está descrito nos capítulos subseqüentes.

3.3 Biomateriais

Biomaterial é definido como qualquer substância, diferente de uma droga, ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, a qual pode ser usada por qualquer período de tempo, como parte ou todo de um sistema destinado a tratar, interagir ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (WILLIAMS, 1987). Alguns exemplos incluem: placas para fixação de fraturas ósseas, tendões ou ligamentos artificiais, próteses de vasos sanguíneos ou de válvulas cardíacas, coração artificial, lentes intra-oculares, entre outros.

O desenvolvimento de um novo biomaterial envolve conhecimentos multidisciplinares como engenharia e ciência dos materiais, biotecnologia e ciências médicas. Por ser um material que entra em contato com fluidos corpóreos, um biomaterial precisa apresentar funcionalidade para a aplicação a que é destinado e deve ser biocompatível (baixa resposta inflamatória ou

imunológica quando em contato com fluidos corpóreos) e esterilizável (RATNER *et al.*, 1996).

A caracterização de um novo biomaterial deve ser feita de acordo com sua aplicação. Normalmente os testes de resistência mecânica e compatibilidade celular são utilizados para selecionar potenciais biomateriais. Materiais destinados a recuperação óssea também são testados quanto ao seu potencial de induzir ou acelerar a calcificação ou ainda de guiar ou aderir células ósseas (KONG *et al.*, 2004; MEINEL *et al.*, 2005; MEINEL *et al.*, 2006). Materiais destinados à proteção ou tratamento de ferimentos ou queimaduras ou para confecção de pele artificial devem apresentar compatibilidade com as células da pele, adequada resistência mecânica e ainda, dependendo da aplicação, capacidade de liberar fármacos de forma controlada (MIM *et al.*, 2004; SERVOLI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006).

3.4 Biomineralização

A calcificação dos materiais pode ser prejudicial ou patogênica caso estes sejam utilizados como próteses cardíacas ou lentes de contato, entretanto, há casos onde a calcificação é o fenômeno desejado, principalmente em se tratando dos processos de biomineralização. O estudo da biomineralização permite o conhecimento dos processos naturais de formação dos ossos para o desenvolvimento de implantes osteogênicos ou próteses de correção ortopédica (PATHAK *et al.*, 1996).

Os ossos são compostos por colágeno e hidroxiapatita (HA). Assim, o processo de mineralização dos ossos ocorre inicialmente pela deposição de fosfatos de cálcio nos vazios entre as fibras de colágeno e em um segundo momento, há a formação de cristais constituídos por placas nanométricas de fosfato de cálcio (ELLIOTT, 1994; FORSÉN; KORDEL, 1997). A biomineralização aparece então, como um processo de deposição *in situ* de fosfatos de cálcio, apresentando como principal vantagem o fato de que os precipitados inorgânicos

formam-se com total controle da matriz sobre a forma, o tamanho e a orientação dos depósitos, não sendo necessário lidar diretamente com a agregação das partículas nanométricas, dispensando o uso de tensoativos para mantê-las em suspensão (ZHANG; GONSALVES, 1995; CALVERT; RIEKE, 1996).

O potencial de um novo material calcificar após implantação pode ser testado por testes de calcificação *in vitro* ou *in vivo*. A calcificação *in vivo* pode prever mais precisamente a deposição natural de fosfatos de cálcio em materiais implantados; entretanto, é uma técnica cara, demorada e necessita de uma aprovação de um conselho de ética para ser realizada. Com base nessas desvantagens, alguns pesquisadores optam por realizar os experimentos de calcificação *in vitro*, como um método de pré-seleção dos potenciais materiais.

Os experimentos *in vitro* são geralmente realizados usando soluções concentradas em íons fósforo e cálcio. Aimoli e Beppu (2006) propuseram um método rápido para avaliar o potencial de calcificação de materiais poliméricos. O método consistia em mergulhar os materiais em uma solução de cloreto de cálcio e em sequência, numa solução de fosfato de sódio. Os autores concluíram que a precipitação dos compostos de cálcio era influenciada pela superfície dos materiais analisados, portanto a metodologia poderia ser útil para comparar o biomimetismo em diferentes materiais. Entretanto, esta técnica não replicaria o mecanismo da calcificação *in vivo*.

Kokubo *et al.*, (1990) mostraram que estruturas semelhantes aos ossos (apatitas) poderiam ser formadas utilizando uma solução com concentração iônica próxima à encontrada no plasma sanguíneo humano. Esta solução, chamada de fluido corpóreo simulado (*Simulated Body Fluid* – SBF), tem sido empregada por diversos pesquisadores como meio calcificante (BEPPU; SANTANA, 2003; AIMOLI *et al.*, 2006a; SPANOS *et al.*, 2006; AIMOLI *et al.*, 2007) e foi proposta ao Comitê Técnico ISO/TC150 da Organização Internacional de Padronização como uma técnica *in vitro* de medida da capacidade de formação de apatitas em materiais implantados (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A solução SBF é altamente

saturada, portanto, a adição de sais e ácido (para o ajuste do pH) deve seguir um procedimento detalhado para evitar precipitação dos componentes.

Nanocompósitos de HA e colágeno têm sido desenvolvidos para realização de processos biomiméticos. Este tipo de nanocompósito pode ser obtido pela precipitação de nanocristais de HA em colágeno, mimetizando a nanoestrutura dos ossos reais devido à habilidade do colágeno induzir mineralização. Entretanto, a utilização do colágeno tem algumas desvantagens, como alto custo, dificuldade de controlar contaminações e encontrar materiais com padrões definidos a partir das fontes comerciais, tornando difícil o controle do processo. Desta forma, faz-se necessário estudar e caracterizar novos materiais para substituição do colágeno no processo de biomineralização (KONG *et al.*, 2004).

3.5 Calcificação em Biopróteses de Válvulas Cardíacas

Em se tratando de processos de calcificação indesejada, pode-se citar a calcificação de válvulas cardíacas, que é uma das principais causas de falhas ou deterioração estrutural desses materiais. A estrutura do implante, o metabolismo do paciente ou fatores mecânicos influenciam significativamente na calcificação de válvulas implantadas (SHOEN; LEVY, 2005).

Normalmente opta-se pela utilização de materiais biológicos como o pericárdio bovino ou de porcina na construção de válvulas cardíacas, pois válvulas construídas destes materiais apresentam menor propensão à formação de trombos e têm boas propriedades hemodinâmicas (PINTO *et al.*, 1993). Entretanto, o pericárdio bovino natural não é adequado para fabricação de válvulas devido a sua propensão a biodegradação. Os grupos carboxil, hidroxil e amino das fibras de colágeno contribuem ainda, para rejeição deste material devido às suas propriedades antigênicas.

Para utilização na confecção de válvulas cardíacas, o pericárdio é submetido à reticulação química, para manter sua integridade estrutural e

mecânica e mascarar os grupos ativos na superfície, neutralizando assim, suas propriedades antigênicas. O tratamento mais utilizado comercialmente é a reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído (GA). Este tratamento possui como vantagens seu relativo baixo custo, alta estabilidade, resistência à trombose e sua capacidade para reduzir a imunogenecidade. Entretanto, a durabilidade das válvulas fixadas com GA é baixa, principalmente devido à sua tendência à calcificação (ARAVIND *et al.*, 1998).

Para evitar a calcificação patológica em válvulas implantadas, pesquisadores têm estudado alternativas pra substituir ou complementar a reticulação com glutaraldeído em válvulas de pericárdio bovino, como por exemplo: liofilização (MAIZATO *et al.*, 2003), recobrimento com polímeros biocompatíveis (DAHM *et al.*, 2004), decelularização (PASQUINO *et al.*, 1994; OSWAL *et al.*, 2007) ou reticulação com epóxidos (AIMOLI *et al.*, 2007; NOISHIKI *et al.*, 1994). O potencial desses novos materiais para calcificar quando implantados, foi estudado pelos autores por experimentos de calcificação *in vitro* ou *in vivo*. Percebe-se, portanto, a importância do conhecimento do mecanismo de calcificação, seja para evitar ou favorecer o processo de calcificação em dispositivos projetados para implantes.

3.6 Géis e Hidrogéis

Em soluções com moléculas longas, cadeias poliméricas podem reticular química ou fisicamente, ou se entrelaçar formando uma estrutura tridimensional. Se todo solvente se torna mecanicamente imobilizado dentro desta estrutura, o sistema como um todo adquire uma aparência sólida e é denominado como um gel (DUNCAN, 1992). A reticulação química ou física mantém a estrutura tridimensional dos géis e dá origem aos denominados géis químicos ou géis físicos, respectivamente. Nos géis químicos, as cadeias poliméricas estão conectadas por ligações covalentes promovendo maior estabilidade em sua forma.

Por outro lado, as cadeias poliméricas dos géis físicos são conectadas por ligações não covalentes, como interação de van der Waals, interações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (OTTENBRITE *et al.*, 1996).

De forma geral, os géis apresentam propriedades mecânicas características de sistemas sólidos e gás-líquido. O comportamento de um gel, quando submetido à compressão é o de um sistema gás-líquido, entretanto, quando uma tensão cisalhante é aplicada, este apresenta um comportamento de sistema sólido. Estas afirmações estão baseadas no cálculo dos módulos de deformação para compressão e tensão de cisalhamento, respectivamente (DE ROSSI, 1991). Sob condições normais, géis são capazes de armazenar o trabalho empregado na sua deformação e recuperar sua forma original.

Géis podem ser aplicados como espessantes nas indústrias de alimentos, na indústria farmacêutica como veículos para medicamentos, como membranas e peneiras moleculares em eletroforese e cromatografia ou ainda como precursores de vidros e cerâmicas estruturais através de um processo conhecido como sol-gel (LIMA, 1995).

Hidrogéis são uma classe de géis caracterizados por uma estrutura polimérica tridimensional com característica hidrofílica na qual uma grande quantidade de água, em geral maior que 20% do peso total, está presente. Os hidrogéis podem dilatar ou encolher dependendo da presença ou ausência de água. A extensão da dilatação é determinada pela natureza (principalmente hidrofilicidade) da cadeia polimérica e da intensidade da reticulação (OTTENBRITE *et al.*, 1996).

Os hidrogéis podem ser aplicados no campo biomédico como material para lentes de contato por apresentar relativa estabilidade mecânica, índice de refração favorável e alta permeabilidade ao oxigênio e vapor d'água. Outras aplicações incluem materiais para tendões artificiais, adesivos para tratamento de ferimentos, pele artificial, materiais para reconstrução maxilo-facial ou para substituição de cordas vocais (RATNER *et al.*, 1996). Azevedo *et al.* (2002)

relatam ainda que hidrogéis são muito eficientes como condicionadores de solo ou como produtos com capacidade de reter e disponibilizar água para os cultivos agrícolas, além de aumentar a capacidade de armazenamento de água do solo onde eles são adicionados.

No desenvolvimento de músculos artificiais, hidrogéis “inteligentes” (capazes de transformar estímulos eletroquímicos em trabalho mecânico—contração) podem funcionar como o tecido muscular humano. Materiais inteligentes que podem simular as contrações e secreções dos órgãos humanos em resposta às variações das condições do meio ambiente, como temperatura, pH, ou campo elétrico poderão encontrar uma utilização em implantes médicos, próteses musculares ou de determinados órgãos (OTTENBRITE *et al.*, 1996).

Muitos hidrogéis são utilizados para imobilização de enzimas ou células e recentemente, para encapsulação de fármacos e ativos para cosméticos. Segundo informações da Associação Brasileira de Cosmetologia (ABC-Cosmetologia, 1995) os formuladores de produtos cosméticos estão sempre à procura de matérias-primas que lhes permitam gelificar sistemas aquosos com o propósito de utilizá-los como sistemas básicos nos quais fases graxas, fatores que afetam o toque ou ativos possam ser incorporados para obter um produto cosmético aceitável. Os agentes específicos, responsáveis pela ação desejada na formulação de cosméticos, podem reagir com outros componentes da formulação ou causar irritação à pele. Desta forma, a encapsulação é uma estratégia para solubilizar os ativos, aumentando sua estabilidade, separando-os dos componentes da formulação e protegendo-os da oxidação e outras reações. Além disso, com este procedimento, os agentes ativos podem ser liberados de forma controlada realçando sua presença na formulação e melhorando o desempenho do produto cosmético (OLIVEIRA, 2004).

Diante da variedade de aplicações expostas, pode-se ter uma idéia mais clara da importância do estudo e caracterização de géis ou hidrogéis no intuito de contribuir com o desenvolvimento científico e tecnológico desses materiais.

3.7 Diálise

A diálise é um processo de separação por difusão de moléculas através dos poros de uma membrana semipermeável. Essa transferência de moléculas, solventes ou íons, ocorre por diferença de concentração entre as soluções em contato com a membrana e é definida como osmose. A membrana semipermeável deve possuir poros com tamanhos adequados para não permitir a passagem do soluto de interesse.

A tendência de igualar os potenciais químicos, ou concentrações, em cada lado da membrana resulta na difusão das moléculas através da mesma. A contrapressão necessária para balancear a osmose é denominada pressão osmótica. Segundo Duncan (1992), a pressão osmótica (Π) de uma solução pode ser descrita em termos gerais pela equação de Virial (Equação 1).

$$\Pi = cRT \left(\frac{1}{M} + B_2c + B_3c^2 + \dots \right) \quad (1)$$

Onde c é a concentração da solução (massa de soluto por volume de solução), M é a fração molar de soluto, T é a temperatura e B_2 e B_3 são constantes. De acordo com o autor, os desvios da idealidade são relativamente pequenos para macromoléculas compactas como proteínas, mas podem ser maiores para polímeros lineares.

A partir dos conceitos introduzidos, observa-se que o processo de diálise dependerá da pressão osmótica, das propriedades da membrana e da solução de diálise (concentração da solução). Além disso, pode haver mais de um tipo de solvente presente na solução, o que ocasionaria efeitos de interação entre as moléculas de soluto e de cada solvente, dificultando assim, o controle adequado do processo. Neste caso, um estudo experimental rigoroso deve ser realizado a

fim de conhecer as etapas e mecanismos do processo para obtenção do produto final dentro dos padrões desejados.

3.8 Metaestabilidade

Um determinado sistema estará em equilíbrio estável se, após uma perturbação, retorna ao seu estado original de equilíbrio. Entretanto, na maioria dos sistemas reais isto não ocorre. Se uma pequena perturbação é capaz de provocar alterações permanentes em um dado sistema, este é dito em equilíbrio instável. Outro estado de equilíbrio muito comum em situações reais é o metaestável. Neste caso, a volta ao estado de equilíbrio original dependerá da intensidade das perturbações, onde apenas valores pequenos desta possibilitariam a volta ao estado original. Grandes perturbações podem levar o sistema metaestável a patamares de menor energia, tornando o processo irreversível (TESTER; MODELL, 1996; SEDGWICK, 2003).

Termodinamicamente, definem-se barreiras que delimitam o estado de equilíbrio estável, estas barreiras podem ser o potencial químico para uma determinada reação ou mesmo barreiras físicas, como paredes adiabáticas, rígidas ou impermeáveis. Para análises práticas, os sistemas metaestáveis são tratados como estáveis se as barreiras à transição são maiores em relação a mínimas perturbações. Do contrário, são tratados como instáveis (TESTER; MODELL, 1996).

Misturas líquidas supersaturadas são exemplos de sistemas metaestáveis, pois uma perturbação pode levar à formação de outra fase composta pelo soluto em excesso. A região que separa a metaestabilidade da instabilidade é definida como espinodal. O comportamento de não equilíbrio é comum em sistemas coloidais, onde estados de não equilíbrio como a separação da fase metaestável gás-líquido pode preceder ou inibir um novo estado de equilíbrio sólido-líquido, conhecido como gel coloidal (SEDGWICK, 2003).

Estes conceitos podem ser aplicados na formação de hidrogéis de fibroína de seda pelo processo de diálise. Durante a diálise de solução da fibroína de seda, os íons cálcio e o etanol, que inicialmente promoviam a solvatação das fibras são retirados e a solução torna-se metaestável, já que a água não é um bom solvente para fibroína, portanto uma perturbação poderá levar à separação de fases, formando o hidrogel.

3.9 Hidrogéis de Fibroína de Seda

Soluções de fibroína de seda após diálise são metaestáveis, pois dependendo de condições como temperatura, vazão ou tempo de armazenamento, podem sofrer processo de gelificação (WANG *et al.*, 2005). A gelificação da solução dialisada de fibroína de seda é um processo natural que se dá pela combinação de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio inter e intramolecular levando a uma reticulação física pela formação da estrutura folha- β (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

Para aplicações onde a fibroína deve ser utilizada na forma de solução, a mesma deve ser armazenada a baixa temperatura, normalmente por volta de 10 °C (WANG *et al.*, 2005). O aumento da temperatura da solução acelera a gelificação devido à alteração na hidratação hidrofóbica de suas moléculas (MATSUMOTO *et al.*, 2006). O fenômeno da hidratação hidrofóbica se dá em superfícies apolares, onde a estrutura da água é modificada e posteriormente reordenada em volta da superfície do soluto (YAMINSKY; VOGLER, 2001; TÔRRES, 2004; MIKHEEV *et al.*, 2007). O aumento da temperatura fornece uma contribuição positiva à energia livre de hidratação ($\Delta G_{\text{hidratação}}$ é positivo) que leva a uma desidratação local com a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de fibroína de seda. Este fenômeno será reversível apenas nos primeiros estágios da gelificação, quando estruturas folha- β ainda não foram formadas (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O hidrogel de fibroína pode ter diversas aplicações, entre elas liberação controlada de drogas (FANG *et al.*, 2006), ou matéria-prima para indústria de cosméticos. Os hidrogéis podem ainda ser desidratados para obtenção de pó de fibroína de seda (EVERHART, 2002) para serem utilizados em diversos tratamentos cosméticos ou mesmo regeneração de tecidos.

Para obtenção de hidrogéis de fibroína de seda, alguns autores (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005) prepararam soluções de seda com concentrações de até 30% em massa que posteriormente eram dialisadas em água destilada e numa solução de polietileno glicol (PEG). A primeira diálise era para remoção dos sais e a segunda, promovia a remoção da água, por osmose, para a solução de PEG. A transição sol-gel para formação de hidrogéis era feita aumentando a concentração de fibroína, aumentando a temperatura, diminuindo o pH, adicionando um polímero (preferencialmente óxido de polietileno), ou aumentando a concentração de sais (KCl, NaCl, ou CaCl₂).

Megeed *et al.* (2004) produziram e estudaram hidrogéis de fibroína de seda combinados com elastina para aplicação em terapias genéticas *in situ* no tratamento de câncer. Para tal, uma solução de fibroína de seda e elastina, à temperatura ambiente, era injetada no local afetado e a transição sol-gel ocorria *in situ*, à temperatura corporal. A vantagem deste procedimento é o fato de ser minimamente invasivo e possibilitar a liberação de DNA ou partículas virais diretamente no local afetado pela doença.

Hidrogéis de fibroína de seda e quitosana foram produzidos por Chen *et al.* (1997b). Este material era preparado através da reticulação da quitosana com glutaraldeído e interpenetração da fibroína de seda para formar pontes de hidrogênio, principalmente entre os grupos aminos da quitosana e da fibroína. Segundo estes autores, esta blenda mostrou sensibilidade ao pH e à concentração iônica. As variações de pH ou concentração de íons provocavam o intumescimento ou contração dos géis de forma reversível. Esta reversibilidade sugere que o hidrogel pode ser utilizado como músculo artificial, convertendo diretamente energia química em energia mecânica.

A biocompatibilidade de hidrogéis de fibroína de seda foi estudada por Fini *et al.* (2005). Estes pesquisadores estudaram o comportamento *in vitro* e *in vivo* de hidrogéis injetáveis de fibroína de seda através de cultura celular de osteoblastos e implantação em defeitos provocados em fêmures de ratos, respectivamente. O hidrogel era formado diluindo-se a fibroína em uma solução de BrLi e posteriormente dialisando-a por três dias em água destilada. A solução dialisada era filtrada e seu pH era ajustado abaixo do ponto isoelétrico (~3,8) para posteriormente ser exposta à temperatura de 50 °C por uma noite. O hidrogel de fibroína de seda era esterilizado por raios λ antes da cultura celular e do implante ósseo. Dos resultados obtidos, os autores concluíram que o hidrogel de fibroína de seda possui potencial de utilização como material de reposição óssea em cirurgias ortopédicas reconstrutivas, sendo um material injetável viável e capaz de melhorar a cicatrização e maturação do osso.

O estudo da calcificação em hidrogéis de fibroína de seda pode ser um indicativo para potenciais aplicações na área médica. Dentre os diversos materiais utilizados para o estudo da biomineralização, a fibroína de seda vem se destacando por possibilitar a deposição de hidroxiapatita ou apatita durante testes de calcificação *in vitro* em soluções que simulam o fluido corpóreo (ESTROFF *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005, NOGUEIRA *et al.*, 2008). Desta forma, vem-se demonstrando na literatura que materiais derivados de fibroína de seda podem ser utilizados no campo de biomateriais como matrizes de calcificação ou regeneração óssea. A contribuição deste trabalho no estudo da biomineralização é a avaliação do potencial de calcificação *in vitro* de hidrogéis de fibroína de seda, seja em sua forma *in natura* ou liofilizada.

3.10 Layer-by-Layer

A técnica *layer-by-layer* (LbL) é muito utilizada para obtenção de estruturas multicamadas por ser um método simples e de baixo custo operacional. Com esta técnica é possível controlar, de forma relativamente simples, algumas

características como topografia e funcionalidade de filmes. Esta técnica pode ser utilizada para recobrimento de diversos tipos de materiais com praticamente qualquer formato (DECHER; SCHLENOFF, 2003). Assim, a superfície de um determinado material pode adquirir propriedades específicas como: resistência à corrosão, hidrofobicidade (ZHAI *et al.*, 2006) ou hidrofiliabilidade (WU *et al.*, 2007), resistência à proliferação bacteriana (LEE *et al.*, 2005), biocompatibilidade (CAI *et al.*, 2007), etc.

A força motriz para a produção dos filmes multicamadas pode ser interação eletrostática, ponte de hidrogênio, interação hidrofóbica ou ligação covalente. A técnica tradicional consiste em se mergulhar alternadamente um substrato em uma solução composta de uma substância carregada positivamente ou negativamente. Normalmente, uma etapa de lavagem, utilizando-se apenas o solvente, é empregada após se retirar o substrato de cada uma das soluções ionicamente carregadas. Esse passo é utilizado para remoção do material não adsorvido ou fracamente adsorvido na superfície do substrato e pode influenciar nas propriedades das multicamadas. Assim, o filme multicamadas é construído a partir das sucessivas deposições dos compostos presentes nas soluções catiônicas ou aniônicas. Cada ciclo de mergulho produz uma camada com espessura de nanômetros, o que permite trabalhar com camadas organizadas de polímeros, proteínas, vírus, nanopartículas ou mesmo compostos inorgânicos (DECHER; SCHLENOFF, 2003; SCHONHOFF, 2003).

A deposição da primeira camada se dá pela adsorção das cadeias do polieletrólito numa superfície com carga oposta. A segunda camada seria formada pela adsorção do polieletrólito da segunda camada na primeira já depositada, sendo os polieletrólitos dessas camadas carregados com cargas opostas. Outros fenômenos, como a difusão dos polieletrólitos entre as camadas, podem ocorrer e contribuir nas propriedades dos filmes formados. As propriedades das multicamadas serão ainda controladas por vários parâmetros, como temperatura, força iônica, pH ou carga eletrostática dos dois polímeros. Esses parâmetros irão

interferir na organização molecular, na composição, nas propriedades e na química da superfície do filme (DECHER; SCHLENOFF, 2003).

3.11 Filmes LbL de Fibroína de Seda e Quitosana

A técnica LbL pode ser utilizada para obtenção de filmes de fibroína de seda com boas propriedades mecânicas e compatibilidade com diversos tipos de células. O estudo da fibroína como material de recobrimento foi investigado por Wang *et al.* (2005b). Estes pesquisadores produziram filmes nanométricos de fibroína de seda por processos de deposição sucessiva e observaram que os mesmos eram estáveis em condições fisiológicas e permitiam a adesão e proliferação de células ósseas. Dos resultados obtidos, estes pesquisadores sugeriram que a técnica poderia ser explorada para aumentar a funcionalidade da superfície de biomateriais para aplicações em dispositivos médicos ou matrizes na engenharia de tecidos. Cai *et al.* (2007) modificaram a superfície de titânio recobrimo-a com um filme multicamadas de fibroína de seda e quitosana. Os autores concluíram, através de testes de crescimento celular de osteoblastos, que o recobrimento de fibroína de seda e quitosana aumentou significativamente a compatibilidade celular dos substratos de titânio.

Jiang *et al.* (2007) avaliaram a resistência mecânica de filmes finos de fibroína de seda fabricados por uma técnica semelhante ao LbL. O módulo de elasticidade dos filmes foi calculado entre 6-8 GPa e os autores sugerem que tais filmes têm potencial para aplicação em micro escala de biodispositivos, implantes ou recobrimento para pele artificial. O alto valor do módulo de elasticidade dos filmes de fibroína sugere também sua aplicação em meio a outros compostos para reforçar suas propriedades mecânicas.

O presente trabalho descreve o processo de obtenção de filmes de fibroína de seda e quitosana através da técnica LbL objetivando obter filmes finos com potencial de aplicação no recobrimento de biomateriais, visto que ambos os

biopolímeros empregados são biocompatíveis isoladamente ou juntos formando blendas ou filmes multicamadas (CAI *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 1997a). Vale ressaltar que filmes de fibroína de seda e quitosana obtidos por LbL não foram ainda explorados na literatura. O trabalho que mais se aproxima desta proposta é o de Cai *et al.* (2007), entretanto a preparação da solução de fibroína de seda adotada por estes autores foi diferente resultando em filmes com características diferentes.

CAPÍTULO 4

HIDROGÉIS DE FIBROÍNA DE SEDA

Este capítulo descreve a obtenção de hidrogéis através do processo de diálise da solução de fibroína de seda, explorando a influência de parâmetros como temperatura de diálise e concentração residual de cálcio no tempo de formação dos hidrogéis. A curva cinética de liberação de cálcio durante a diálise e os parâmetros experimentais que definiram o tempo de gelificação estão discutidos neste capítulo.

O entendimento do processo de gelificação da solução de fibroína de seda é importante não só para obtenção de hidrogéis desta proteína, mas para preparação de filmes ou membranas, já que nestes casos a gelificação, que é um processo cinético e natural, deve ser evitado. Observações experimentais mostram ainda, que dependendo do estado da solução aquosa de fibroína de seda, a mesma pode formar um hidrogel antes da formação de filmes densos, o que produziria um material extremamente frágil e inadequado para diversas aplicações, principalmente no campo de biomateriais.

Hidrogéis de fibroína de seda obtidos por diálise à temperatura controlada foram caracterizados para averiguar potenciais aplicações tanto na engenharia de materiais como no campo biomédico. O resultado de maior destaque para esses materiais foi seu grande potencial de depositar fosfatos de cálcio durante testes de calcificação *in vitro*, resultantes tanto da morfologia desses materiais quanto da grande afinidade da fibroína de seda com o cálcio.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

A seda utilizada nos experimentos foi fornecida pela Fiação Bratac com sede em São Paulo, Brasil. Para testes de gelificação foram utilizados casulos de seda, entretanto alguns testes preliminares foram realizados com fios provenientes de sobras da fiação e alguns resultados serão comentados no item de discussão deste capítulo.

Todos os reagentes utilizados eram de pureza analítica e não foram purificados antes das análises.

4.1.2 Remoção de Sericina

Para remover a sericina, cada 50 g de seda foram pesados e lavados em 600 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 à concentração de 1 g/L durante 20 min, em banho termostatizado, à temperatura de 85 °C (LI et al., 2002). Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, os fios foram enxaguados com água destilada em abundância. Os fios foram secos à temperatura de aproximadamente 40 °C por 24 h.

4.1.3 Preparação de Solução de Fibroína de Seda

Os fios secos e livres de sericina foram pesados e cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm com o intuito de facilitar sua dissolução. A cada 10 g de seda, foram adicionados 100 mL de solução ternária $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ (1:2:8 molar) e a suspensão obtida mantida a 85 °C em banho termostatizado até dissolução completa (LI et al., 2002). A Figura 4 exibe o esquema de preparação

da solução de fibroína de seda desde o processo de purificação para remoção de sericina dos fios até o processo de obtenção da solução.

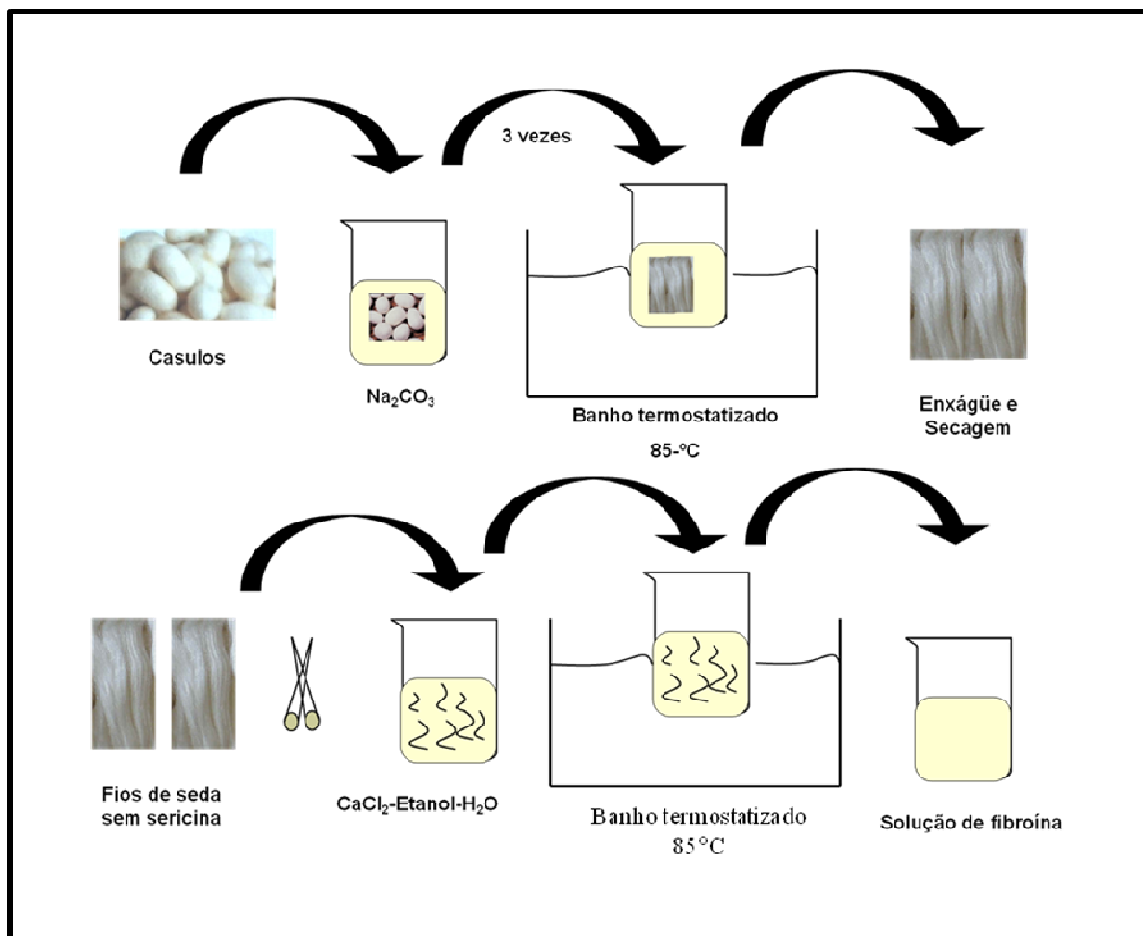


Figura 4 – Esquema do processo de preparação da solução de fibroína de seda.

4.1.4 Preparação dos Hidrogéis

Hidrogéis de fibroína de seda foram preparados por processo de diálise a diferentes temperaturas, com o acompanhamento da concentração residual de

cálcio com o decorrer do tempo de diálise. Para tal, cada 5 mL de solução de fibroína foram colocados em uma membrana de diálise (membrana de celulose Viscosan 22 EU – 20 USA) e a mesma foi imersa em um bquer contendo 75 mL de água ultra pura Milli-Q®. O bquer contendo a membrana de diálise era colocado em um banho termostaticado à temperatura pré-definida. A água de diálise era trocada a cada 24 h e o processo finalizado quando toda a solução dentro da membrana de diálise estava gelificada. Foram avaliadas quatro temperaturas de diálise: 10, 15, 20 e 25 °C. Para cada temperatura avaliada, 5 réplicas foram realizadas.

4.1.5 Estudo do Processo de Diálise

A avaliação do processo de diálise a diferentes temperaturas foi feita acompanhando-se a variação da concentração de cálcio residual na solução de fibroína de seda até a formação do hidrogel. Este ponto de gelificação (formação do hidrogel) é definido como o ponto onde toda a solução de fibroína de seda dentro da membrana de diálise forma um monolito com estrutura tridimensional como a mostrada no item 4.2.1 a seguir.

A cada troca da água de diálise, a água retirada do bquer era analisada quanto a sua concentração de cálcio, utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN ELMER A ANALYST 100 (EUA). Sabendo-se a concentração inicial de cálcio na solução de fibroína, por balanço de massa, obtinha-se o valor do cálcio residual nesta solução após a diálise. A massa de cálcio residual ao final do processo de diálise era calculada como a diferença entre a massa inicial de cálcio na solução de fibroína e o somatório das massas de cálcio transferidas para a água de diálise.

A média dos valores de concentração de cálcio foi calculada considerando-se as 5 réplicas para cada temperatura e um software estatístico (MiniTab®) foi utilizado para avaliar a variabilidade dos dados experimentais e

validá-los estatisticamente através de testes de hipóteses. A Figura 5 exibe o esquema experimental adotado para produção dos hidrogéis e determinação da concentração residual de cálcio nas amostras.

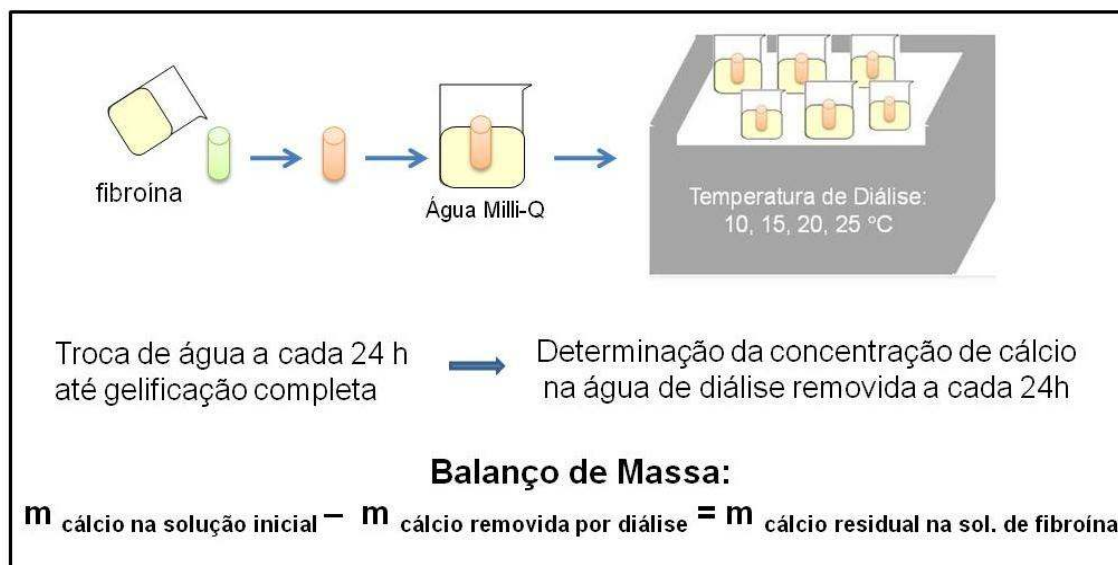


Figura 5 – Esquema experimental para produção de hidrogéis de fibroína de seda e determinação da concentração residual de cálcio nos mesmos.

4.1.6 Caracterização dos Hidrogéis

Caracterizações químicas e físicas e testes de citotoxicidade foram realizados em hidrogéis de fibroína de seda preparados a 20 °C. Depois de formados, os hidrogéis foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados por 24h a -54°C e -760 mmHg no equipamento da marca Liobrás L101 e então submetidos às análises de raios-X, térmicas (DSC e TGA) e morfológicas (MEV). Ensaios mecânicos de compressão foram realizados em amostras recém preparadas, ou seja, ainda úmidas.

a) Difração de Raios-X

A análise da difração de raios-X incididos sobre uma amostra permite determinar sua estrutura cristalina através da medida dos ângulos de difração emergentes da mesma. Com esta técnica observou-se a estrutura cristalina do hidrogel de fibroína de seda liofilizado. O equipamento utilizado para análise foi X'PERT PW3050 PHILIPS (Holanda) e os parâmetros utilizados foram: ângulo (2θ) entre 10 e 60°; passo de 0,02°; tempo/passo de 0,3 s; e velocidade de 0,06°/s.

b) Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica foi empregada para medir a variação da massa em amostras de hidrogel liofilizado em função da temperatura. Com esta medida é possível observar o comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis, assim como os picos relativos à degradação da fibroína. Os testes foram realizados para uma faixa de temperatura de 20 a 500 °C, a taxa de 10 °C/min e vazão de N₂ de 50mL/min no equipamento TGA-50 da marca Shimadzu (Japão).

c) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esta técnica permite medir o fluxo de calor associado com as transições químicas ocorridas nos materiais em função da temperatura. Com esta medida, pode-se obter informações qualitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem os processos endotérmicos, exotérmicos ou mudanças na capacidade calorífica dos hidrogéis de fibroína de seda liofilizados. Os testes foram realizados no equipamento DSC-50 da marca Shimadzu (Japão) para uma faixa de temperatura de 20 a 500 °C, a taxa de 10 °C/min e vazão de N₂ de 50mL/min.

d) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta é uma técnica para exame superficial de sólidos, onde um estreito feixe de elétrons varre a superfície da amostra, ponto a ponto em seqüência de tempos determinados. Os sinais obtidos são captados por detectores que podem produzir imagens tridimensionais com grandes aumentos. Para avaliação da morfologia das amostras, utilizou-se o microscópio de varredura JSM-5800LV-JEOL (Japão). As amostras foram aderidas em porta-amostras com a utilização de uma fita dupla-face condutora, de forma a expor tanto a superfície dos hidrogéis quanto partes fraturadas do mesmo. Antes da análise, as amostras foram liofilizadas e metalizadas com ouro para garantir a condutividade elétrica de sua superfície de observação. Amostras deste hidrogel foram posteriormente submetidas a testes de calcificação *in vitro* que estão descritos adiante.

e) Ensaaios de Propriedades Mecânicas

O conhecimento das propriedades mecânicas dos materiais em geral é de extrema importância quando a aplicação destes requer grandes esforços ou mesmo maleabilidade. Em certos casos, necessita-se de materiais com alta resistência à tração ou compressão, mas que possuam elasticidade adequada para um determinado uso. Conhecendo as propriedades mecânicas dos materiais pode-se buscar aplicações específicas ou mesmo formas de adequá-los aos padrões exigidos.

Para amostras de hidrogéis de fibroína de seda foram realizados ensaios de compressão na direção axial. Depois de formados pelo processo de diálise, os hidrogéis foram cortados com altura de 10 mm. O diâmetro das amostras era de 20 mm, que correspondia ao diâmetro da membrana de diálise. Os ensaios foram realizados com 5 réplicas. Para os testes mecânicos, utilizou-se o equipamento da

marca MTS, modelo TestStar II (EUA), com célula de carga de 100N e velocidade de 1 mm/min.

f) Testes de Citotoxicidade

A importância do estudo da biocompatibilidade das amostras de hidrogéis está relacionada à sua aplicação. Estes materiais têm um grande potencial de aplicação na área biomédica ou mesmo de cosméticos. Em qualquer uma destas áreas é de extrema importância prever possíveis reações indesejadas quando o material entra em contato com fluidos corpóreos ou mesmo com a pele. Testes de citotoxicidade *in vitro* podem fornecer informações preliminares sobre a toxicidade destes materiais, atuando assim, como um método de pré-seleção para identificar sua biocompatibilidade celular ou tecidual.

Testes de citotoxicidade em amostras de hidrogel de fibroína de seda foram realizados por colaboradores do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). Os testes foram realizados seguindo a norma ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – Part 5: *Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. O método empregado foi da avaliação da viabilidade celular por corante vital, MTS/PMS, como recomendado no kit “CellTiter96® AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation”. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 (Gibco 23400-021).

As amostras foram esterilizadas com radiação gama (25kGy) e então os extratos foram preparados na concentração de 0,2 g/mL. Após 48 h a 37 °C, o extrato de meio de cultura foi filtrado em filtro para seringa estéril, com poro 0,45 µm com membrana de acetato de celulose (Corning), e preparadas diluições seriadas de 100% a 6,25% do extrato em meio RPMI estéril. Como controle positivo utilizou-se uma solução fenol a 0,4% e o controle negativo foi um extrato de polietileno de alta densidade (PEAD) a 0,2 g/mL. As amostras foram avaliadas

quanto ao índice de citotoxicidade 50% (IC₅₀), que corresponde à concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis.

4.1.7 Testes de Calcificação *In Vitro*

Para os testes de calcificação, foram utilizadas amostras de hidrogéis de fibroína de seda *in natura* (úmidos e recém preparados) e amostras de hidrogéis liofilizados. Amostras com aproximadamente 10 mm de altura e 20 mm de diâmetro foram colocadas em potes de poliestireno com 40 mL de uma solução de fluido corpóreo simulado (SBF) a temperatura de 36,5 °C, mantida em um banho termostaticado sob agitação leve por 7 dias (BEPPU; SANTANA, 2003). A solução de SBF foi trocada em intervalos de 48 h e o pH foi medido para observar possíveis contaminações. No sétimo dia, as amostras foram retiradas da solução de SBF e enxaguadas em água deionizada para remoção do excesso de sais da superfície. Posteriormente, foram liofilizadas para análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS), técnica acoplada ao equipamento de MEV que permite detectar elementos presentes na amostra pela fluorescência de raios-X.

O fluido corpóreo simulado foi preparado para que apresentasse uma composição muito próxima a dos íons presentes no plasma sangüíneo humano (KOKUBO *et al.*, 1990; REGÍ; CALBERT, 2004), como mostra a Tabela 1. O SBF foi preparado em solução tampão de Tris/HCl adicionando-se NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, K₂HPO₄ e Na₂SO₄ conforme as composições da Tabela 2. A solução de SBF é supersaturada, portanto devem-se observar os procedimentos experimentais para que não haja precipitação dos sais durante sua preparação. Os experimentos de calcificação foram realizados com: 1) SBF convencional (1xSBF) e 2) solução contendo 50% a mais da concentração iônica do SBF convencional (1,5xSBF) para acelerar o processo de calcificação.

Tabela 1: Concentrações dos íons na solução calcificante (1xSBF) e no plasma sangüíneo em mM

	pH	Na	K	Ca	Mg	Cl	HCO ₃	HPO ₄	SO ₄
Plasma	7,4	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	7,4	142,5	5,0	2,5	1,5	178,0	4,5	1,0	0,5

Tabela 2: Composição do 1xSBF usado na realização de testes de calcificação *in vitro*.

Soluções	Concentração das Soluções (M)	Volume das Soluções (mL)
NaCl	2,74	25,00
KCl	0,06	25,00
CaCl₂	0,05	25,00
MgCl₂	0,03	25,00
NaHCO₃	0,09	25,00
K₂HPO₄	0,02	25,00
Na₂SO₄	0,01	25,00
Tris (CH₂OH)₃CNH₂	0,40	62,50
HCl	0,36	60,00
Volume final de SBF		500,00

Os hidrogéis foram analisados no microscópio eletrônico de varredura antes e após os testes de calcificação. Para análise das amostras submetidas a testes de calcificação, optou-se cobri-las com carbono apesar deste fornecer uma cobertura menos homogênea e condutora que o ouro. Esta troca foi baseada no fato de que a cobertura de ouro poderia interferir na análise de EDS confundindo os picos de ouro com os de fósforo.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Estudo do Processo de Diálise

A Figura 6 exibe a imagem de hidrogéis de fibroína de seda obtidos durante a diálise de uma solução desta proteína. Observa-se que os hidrogéis apresentam forma cilíndrica atribuída ao formato da membrana de diálise. Diferentes formas deste hidrogel podem ser obtidas pela indução da gelificação de uma solução dialisada de fibroína de seda em moldes adequados (KIM *et al.*, 2004; MEGEED *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005;) ou ainda cortando-se os hidrogéis obtidos na forma apresentada no formato desejado.

A curva cinética de liberação de cálcio durante a diálise da solução fibroína está mostrada na Figura 7. A diálise era realizada até que a solução de fibroína estivesse completamente gelificada, sendo a concentração de cálcio determinada diariamente a cada troca da água de diálise. A Tabela 3 exibe os valores calculados para a média e o desvio padrão da concentração de cálcio residual no hidrogel, correlacionando o tempo de gelificação e a temperatura de diálise.

A análise estatística dos dados revelou que as médias da concentração de cálcio residual são iguais entre as amostras dialisadas a 10 ou 15 °C e entre as amostras dialisadas a 20 ou 25 °C. Portanto, amostras dialisadas a 10 ou 15 °C

não diferem quanto à concentração final de cálcio no hidrogel, mas diferem quanto ao tempo de gelificação. O mesmo se dá para amostras dialisadas à temperatura de 20 ou 25 °C, onde as médias dos valores de concentração de cálcio residual são iguais, mas as amostras diferem significativamente no tempo de gelificação.

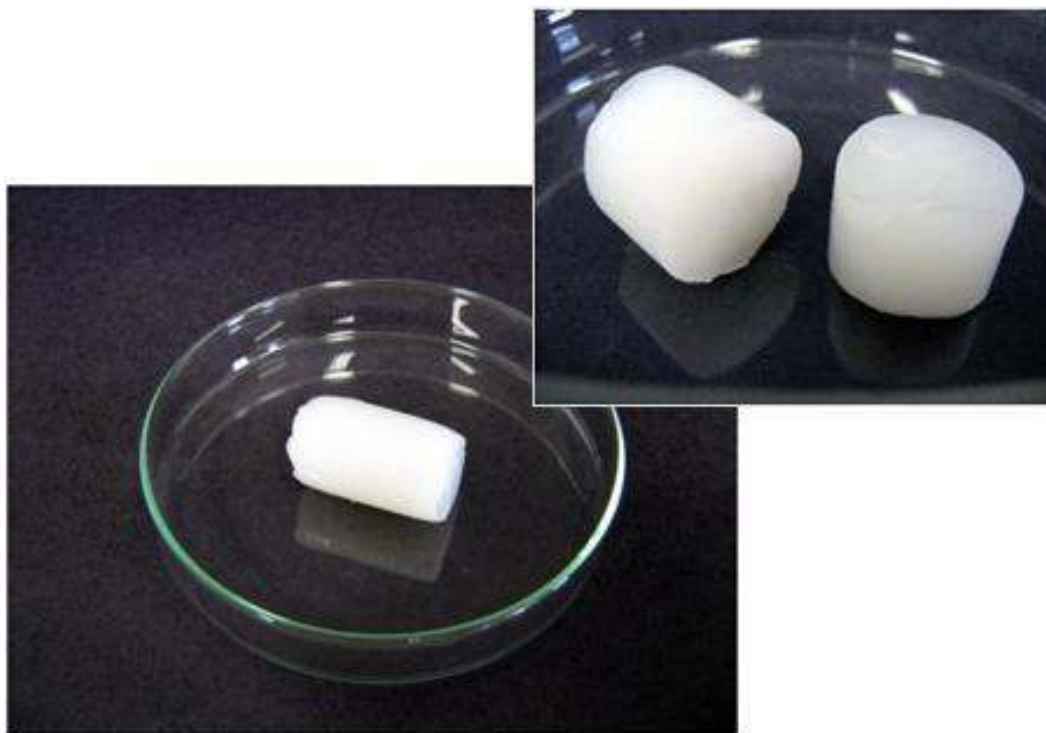


Figura 6 – Hidrogel obtido ao final da etapa de diálise a 20 °C de uma solução de fibroína de seda

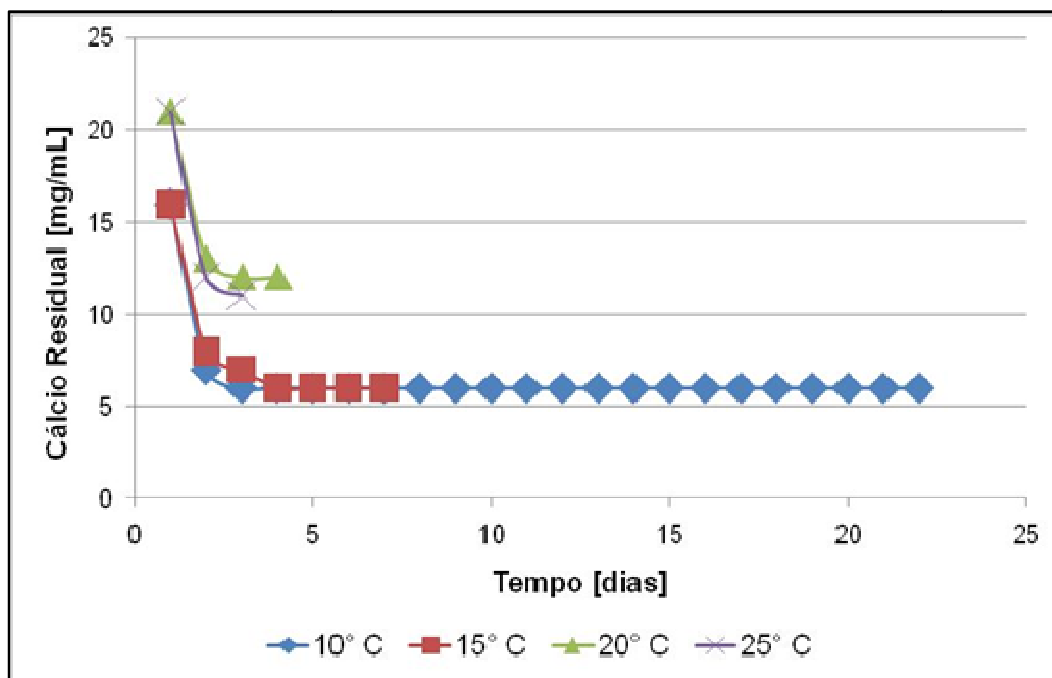


Figura 7 – Cinética de liberação de cálcio durante a diálise de solução de fibroína de seda a diferentes temperaturas até gelificação completa da solução de fibroína de seda.

Tabela 3 – Influência da temperatura de diálise na concentração residual de cálcio no hidrogel e no tempo de gelificação da solução de fibroína de seda.

Temperatura (°C)	Concentração de Cálcio Residual (mg/mL)		Tempo (dias)
	Média	Desvio Padrão	
10	5,70	1,6	22
15	6,39	1,4	7
20	11,75	2,1	4
25	11,18	2,1	3

Estes dados revelam que ao ser atingida uma concentração crítica de cálcio na solução de fibroína, a cinética da gelificação será controlada pela temperatura. Soluções não dialisadas, ou seja, supersaturadas em sais podem ser armazenadas por meses sem que a gelificação ocorra devido à força iônica do solvente que promove a solvatação das fibras da fibroína de seda. Entretanto, a diálise remove por difusão, os sais contidos na solução, diminuindo a força iônica para solvatação e assim, permitindo maior interação entre as moléculas de fibroína de seda para formação do hidrogel.

Observa-se que quanto maior a temperatura de diálise menor o tempo de gelificação da solução de fibroína. Esse fenômeno já foi observado por outros pesquisadores (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006) que descrevem a gelificação como um processo cinético influenciado por diversos parâmetros, como temperatura, pH ou concentração de sais.

Com a remoção dos sais durante a diálise, obtém-se uma solução aquosa de fibroína de seda. Sendo a fibroína uma proteína com característica predominantemente hidrofóbica, a tendência natural de suas moléculas é de se aglomerarem quando em solução aquosa. O aumento da temperatura acelera este processo natural de agregação das moléculas e gelificação da solução porque aumenta as interações hidrofóbicas entre suas cadeias (WANG *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O aumento da temperatura de diálise aumentou a concentração residual de cálcio no hidrogel, ou seja, o aumento da temperatura diminuiu a difusão dos íons cálcio pela membrana semipermeável. Uma hipótese para esse fato seria que durante a diálise da solução de fibroína de seda há uma competição entre a água de diálise e as moléculas de fibroína pelos íons presentes no solvente. Assim, a baixas temperaturas, a interação entre as moléculas de fibroína e os íons do solvente é menor, o que favorece o transporte dos íons por osmose e vice-versa. Ou ainda, a variação da temperatura pode causar modificações na estrutura da membrana de diálise alterando a permeabilidade dos íons através da mesma.

Interações entre os íons do solvente e as moléculas de fibroína podem ainda favorecer a gelificação. A concentração inicial de cálcio na solução de fibroína é de aproximadamente 156 mg/mL. Nesta concentração, a força iônica do solvente é suficiente para manter a solução estável e impedir a gelificação da fibroína mesmo a temperaturas ou tempos de armazenamento mais elevados. Após o primeiro dia de diálise, esta concentração cai bruscamente para 16 ou 21 mg/mL, para temperaturas de diálise de 20 ou 25 °C, e 10 ou 15 °C, respectivamente. Juntamente com essa queda brusca da concentração de cálcio, a solução torna-se metaestável, ou seja, está sujeita a mudança de estado ou separação de fases sob a interferência de fatores externos, tais como temperatura, perturbações mecânicas, entre outros (CHEN *et al.*, 2001; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

4.2.2 Difração de Raios-X

O difratograma obtido pela difração de raios-X de uma amostra de hidrogel liofilizado de fibroína de seda está mostrado na Figura 8. Observa-se a formação de um pico em 2θ igual a 21 graus, indicando que a conformação secundária do hidrogel é folha- β (LI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005). Este resultado condiz com os relatados na literatura, onde se afirma que hidrogéis de fibroína de seda apresentam predominantemente conformação secundária folha- β , mas com alguma quantidade de conformação α -hélice ou helicoidal aleatória (LI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005; FANG *et al.*, 2006). Neste espectro, entretanto, não foi possível visualizar claramente as regiões correspondentes às estruturas α -hélice ou helicoidal, que possuem picos localizados em 12, 19 ou 28 graus.

A configuração folha- β é formada durante o processo de gelificação pela desidratação das cadeias moleculares da fibroína de seda e formação de pontes de hidrogênio inter e intra moleculares. Em solução, as moléculas de fibroína de seda encontram-se predominantemente organizadas na forma de estruturas α -

hélice, mas esta estrutura tende a converter-se a folha- β por esta última ser energeticamente favorável e conseqüentemente, mais estável. A proporção de folhas- β na estrutura molecular do hidrogel de fibroína de seda será proporcional ao grau de gelificação, que por sua vez será uma função do tempo, da temperatura, da concentração e do pH da solução de fibroína de seda. A proporção de folhas- β na estrutura molecular de fibroína de seda determinará sua estabilidade, sua solubilidade em água e sua degradabilidade *in vivo* e *in vitro* (LI et al., 2002; KIM et al., 2004; WANG et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006).

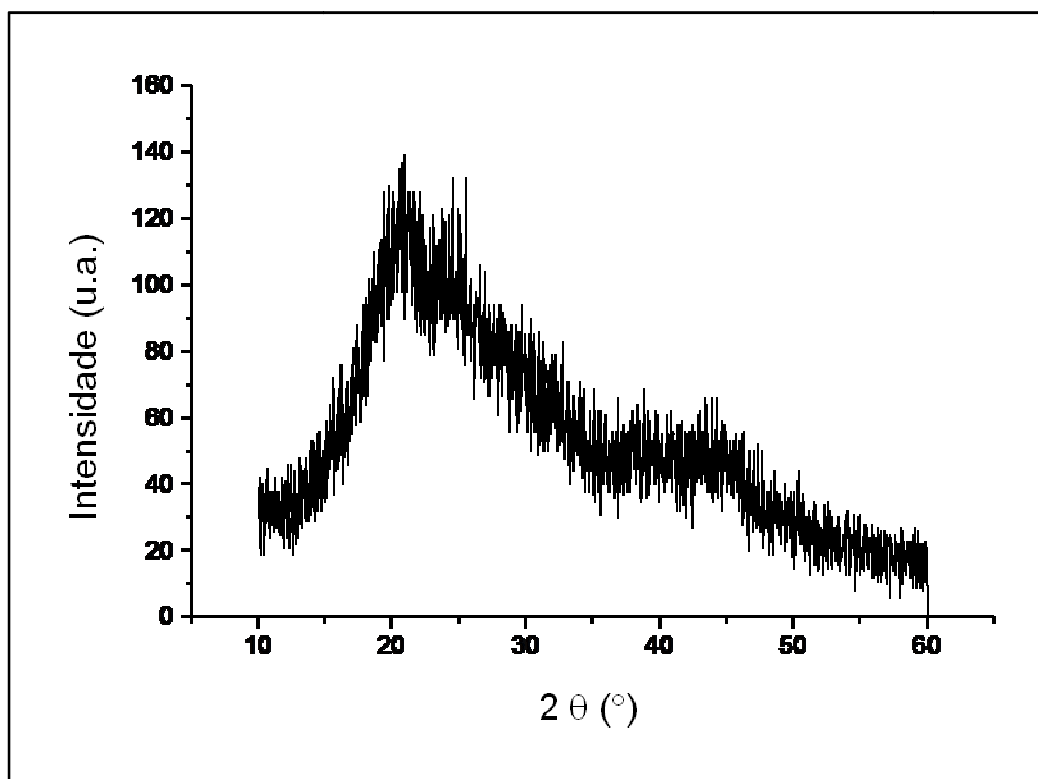


Figura 8 - Difratoograma obtido por difração de raios-X em amostra de hidrogel de fibroína de seda liofilizado.

4.2.3 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As propriedades térmicas dos hidrogéis foram investigadas por análises de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial. As Figuras 9 e 10 exibem os termogramas de TGA e DSC, respectivamente, para hidrogéis de fibroína de seda liofilizados. Na análise de TGA observam-se dois picos de perda massa. O primeiro pico com valor de TGA' (derivada primeira de TGA) próximo a 50 °C pode ser relativo à presença de álcool residual no hidrogel e o segundo pico de TGA' próximo a 300 °C é relativo à quebra das ligações peptídicas e das cadeias laterais dos aminoácidos residuais (UM *et al.*, 2001). A degradação das moléculas de fibroína de seda inicia-se por volta de 270 °C, de acordo com os resultados apresentados, o que indica uma alta resistência térmica deste material.

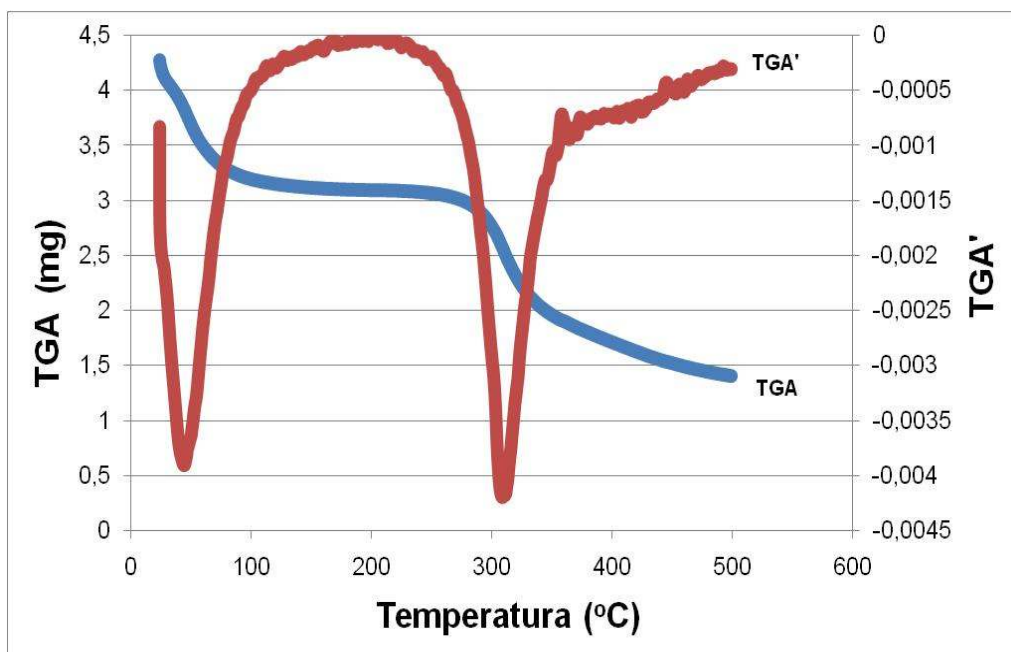


Figura 9 - Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda liofilizado, onde TGA' representa a derivada primeira da curva de TGA.

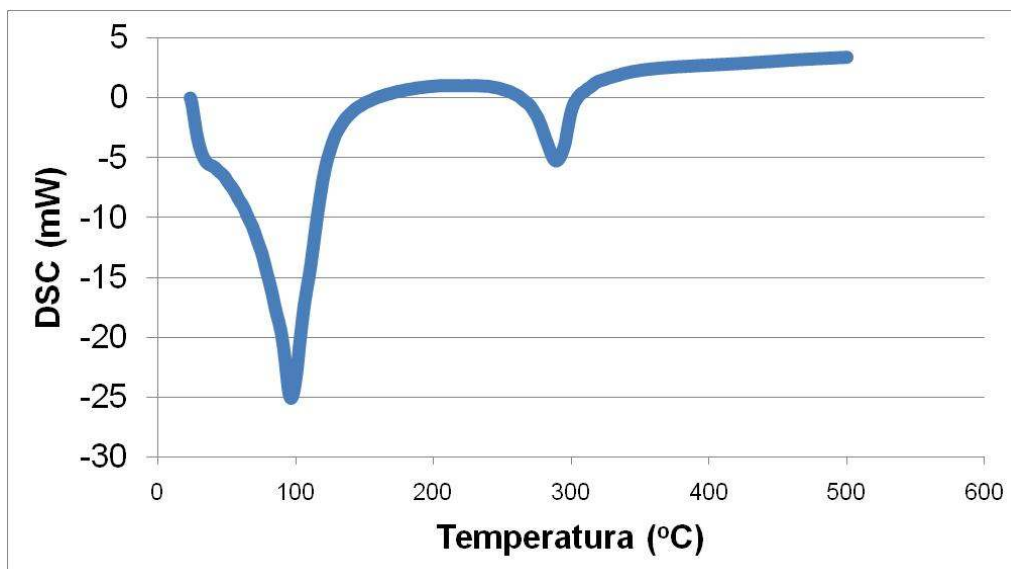


Figura 10 - Termograma de hidrogel de fibroína de seda liofilizado obtido por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise da curva de DSC mostra um pico em aproximadamente 100 °C relativo à perda de água durante o aquecimento e um segundo pico em aproximadamente 290 °C relativo à decomposição térmica da proteína. Este pico de degradação em 290 °C é característico para materiais derivados de fibroína de seda com configuração secundária folha- β (FREDDI *et al.*, 1999).

A decomposição térmica da fibroína de seda é influenciada principalmente pelo grau de orientação molecular da proteína (TSUKADA, 1996). Fibras bem orientadas normalmente apresentam pico de decomposição localizados acima de 300 °C, enquanto que materiais de fibroína de seda com configuração folha- β não orientada apresentam picos de decomposição entre 290 e 295 °C. Em contraste, materiais amorfos de fibroína de seda apresentariam picos de decomposição abaixo de 290 °C (FREDDI, 1999). Desta forma, o resultado obtido por DSC condiz com o apresentado para difração de raios-X, onde se determinou a estrutura secundária do hidrogel de fibroína de seda como folha- β . Em ambas as análises, não foi possível verificar a presença de configuração α -hélice ou helicoidal, entretanto não se pode afirmar através destas análises que tais

configurações não estejam presentes, mas devem estar em menor proporção quando comparadas à estrutura folha- β . Vale ressaltar ainda, que os hidrogéis analisados foram anteriormente liofilizados, o que pode ter ocasionado formação de mais estruturas folha- β no hidrogel através da desidratação das cadeias moleculares da fibroína de seda.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das amostras de hidrogel estão exibidas na Figura 11. A superfície das amostras (formada em contato com a membrana de diálise) é irregular com a presença de pequenos poros com até 5 μm de largura. A fratura (seção transversal) das amostras de hidrogel, por outro lado, apresenta poros mais largos, com tamanhos diversos que podem chegar a mais de 20 μm de largura. O intuito deste trabalho era preparar e caracterizar os hidrogéis formados naturalmente durante o processo de diálise, portanto nenhum tratamento ou técnica para controlar a porosidade das amostras foram aplicados.

O tamanho e o formato dos poros observados por MEV podem não corresponder exatamente ao que seria observado nos hidrogéis úmidos, uma vez que o processo de liofilização pode induzir a formação de poros ou mesmo modificar a estrutura dos já existentes. Entretanto, dentre os métodos conhecidos e atualmente empregados, o congelamento com nitrogênio líquido e posterior liofilização foram tidos como os mais adequados para preparação das amostras a serem caracterizadas por MEV.

O tamanho dos poros apresentado após liofilização dos hidrogéis de fibroína de seda obtidos naturalmente pelo processo de diálise seria inadequado para utilização destes materiais como matrizes para crescimento celular, onde o recomendado é se utilizar matrizes com poros interconectados com tamanhos maiores ou iguais a 100 μm (FREYMAN *et al.*, 2001; NAZAROV *et al.*, 2004).

Entretanto, a porosidade destas amostras pode ser controlada alterando parâmetros de congelamento ou liofilização ou ainda pela adição de sais seguindo procedimentos descritos na literatura (NAZAROV *et al.*, 2004; TAMADA, 2005).

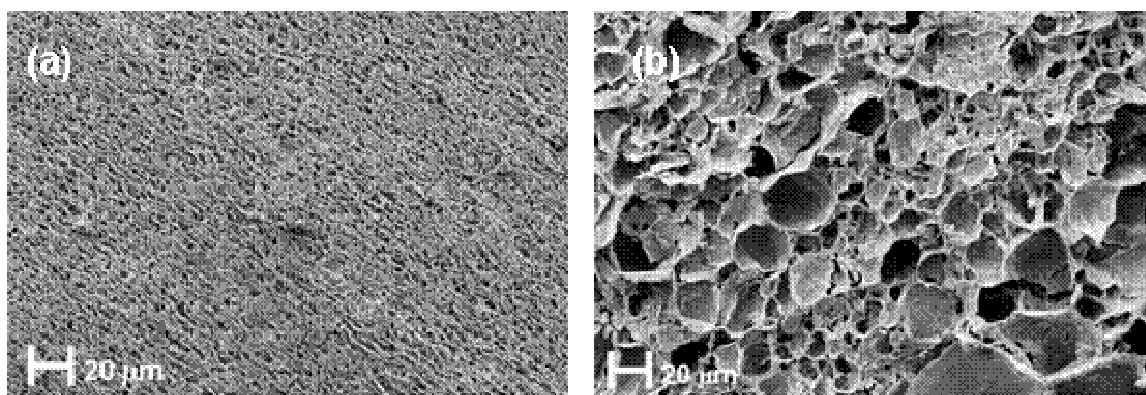


Figura 11 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para (a) superfície e (b) fratura de hidrogel de fibroína de seda.

4.2.5 Testes de Calcificação *In Vitro*

A Figura 12 mostra as micrografias obtidas para hidrogéis de fibroína de seda após ensaios de calcificação *in vitro* em soluções 1xSBF e 1,5xSBF. Os espectros de EDS correspondentes a essas amostras podem ser observados na Figura 13. Hidrogéis de fibroína de seda apresentaram depósitos de fosfato de cálcio em regiões isoladas de sua superfície após 7 dias em solução 1xSBF. Entretanto, as amostras apresentaram intensa calcificação quando os experimentos foram realizados com solução 1,5xSBF. A composição dos depósitos formados na superfície das amostras foi confirmada pelos espectros de EDS. A característica de a fibroína de seda induzir ou favorecer a deposição de fosfato de cálcio pode estar relacionada à afinidade natural entre moléculas de

fibroína de seda com o cálcio (ZHOU *et al.*, 2004) ou ainda à rugosidade das amostras (HSU *et al.*, 2007).

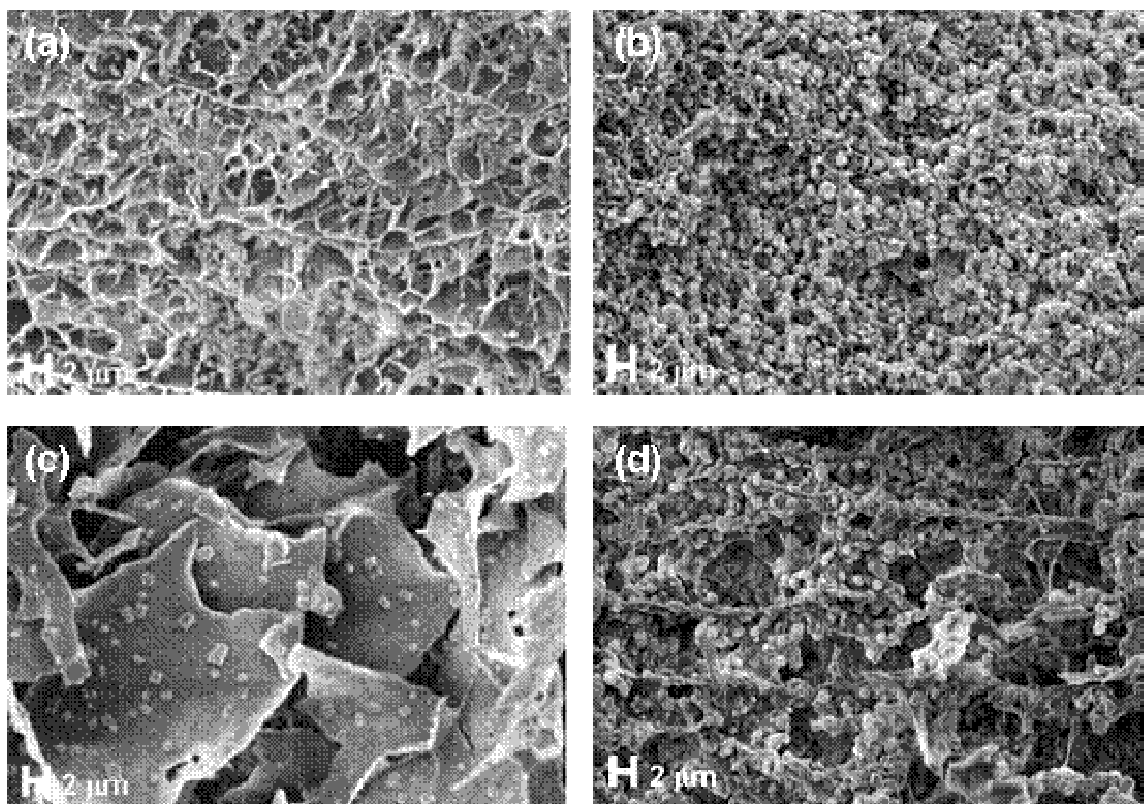


Figura 12 – Micrografias de amostras de hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação *in vitro*: (a) amostra liofilizada 1xSBF, (b) amostra liofilizada 1,5xSBF, (c) amostra *in natura* 1xSBF and (d) amostra *in natura* 1,5xSBF.

O crescimento do cristal na biomineralização é convencionalmente dividido em dois estágios: nucleação e crescimento. A superfície do material pode ter um papel importante na deposição de fosfatos de cálcio: adsorção física de íons e partículas pequenas, orientação da rede cristalina, deposição preferencial ou nucleação heterogênea. A deposição orientada dos cristais de fosfatos de cálcio na superfície pode estar relacionada à nucleação heterogênea ou a forças

de adsorção física de partículas coloidais, que podem ser suficientes para causar a estabilização da fase mineral e a orientação dos cristais (BEPPU *et al.*, 2005).

Além da influência da superfície, a termodinâmica da nucleação pode ser favorecida pela utilização de uma solução supersaturada, ou seja, com maior concentração iônica. Esta hipótese foi confirmada para hidrogéis de fibroína de seda submetidos a experimentos de calcificação utilizando a solução 1,5xSBF.

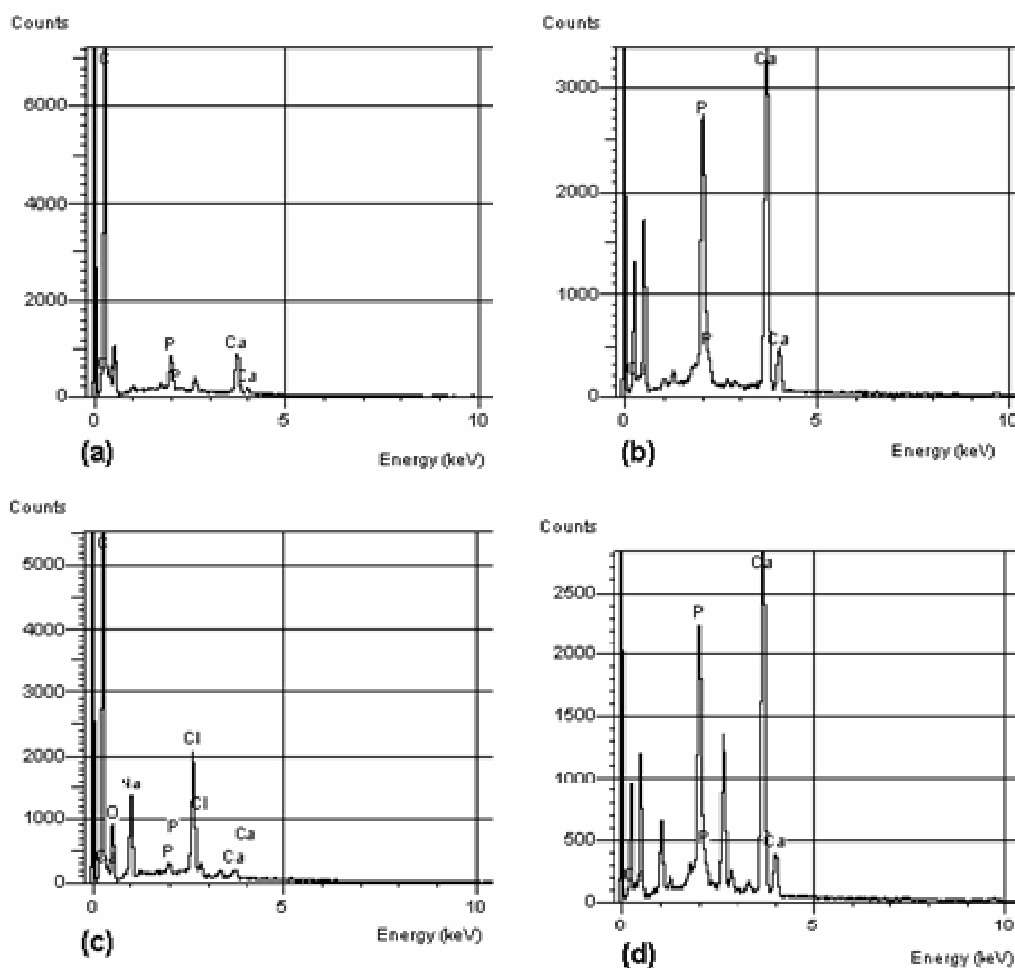


Figura 13- Perfis de EDS para hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação *in vitro*: (a) amostra liofilizada 1xSBF, (b) amostra liofilizada 1,5xSBF, (c) amostra *in natura* 1xSBF and (d) *in natura* 1,5xSBF.

O tamanho crítico do núcleo é um parâmetro importante para o crescimento do cristal. Partículas menores que este tamanho tenderão a redissolver enquanto que partículas maiores tenderão a crescer. Portanto, o crescimento do cristal requer menor saturação do meio do que a formação do núcleo (AIMOLI; BEPPU, 2006). A utilização de uma solução calcificante mais concentrada (1,5xSBF) seria, desta forma, útil no início do processo de calcificação, ou seja, durante a nucleação dos cristais de fosfato de cálcio.

Os depósitos de fosfato de cálcio visualizados nas amostras de hidrogel possuem um formato esférico, que pode ser visualizado num tamanho maior na Figura 14, onde é possível notar a presença de nanocristais de fosfato de cálcio aglomerados formando as esferas. O formato dos cristais geralmente depende de sua composição química, idade e grau de maturação. Entretanto, a microarquitetura e o estado de agregação da matriz orgânica onde os cristais são formados também podem moldar sua forma (BONUCCI, 2007). Esse formato esférico dos depósitos de fosfatos de cálcio é comumente observado em amostras biológicas submetidas a experimentos de calcificação *in vitro* ou *in vivo* (AIMOLI *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2009, WESKA *et al.*, 2009).

Uma observação importante, realizada durante os experimentos de calcificação, foi a degradação de parte das amostras de hidrogéis *in natura* testados. Diferentemente das amostras liofilizadas, os hidrogéis não previamente liofilizados sofreram alteração em sua estrutura física no decorrer dos experimentos. Ao final dos sete dias em contato com a solução calcificante, a estrutura das amostras estava quase toda comprometida e os pedaços que restaram apresentaram muita fragilidade ao manuseio. Grande parte dessas amostras, ao serem liofilizadas após o experimento de calcificação não mantiveram a estrutura e se desfizeram em pó. As micrografias apresentadas na Figura 12 (c) e (d), foram obtidas por pedaços menos danificados das amostras de hidrogéis após a calcificação. Entretanto, os pós das amostras de hidrogel *in natura* após a calcificação, também foram observados por MEV e avaliados por EDS confirmando a presença de fosfato de cálcio nos mesmos. É provável que

esteja ocorrendo uma degradação hidrolítica das amostras de hidrogéis, já que não foram observados sinais de contaminação por microorganismos na solução calcificante ou nas amostras no decorrer dos experimentos.

O fato de hidrogéis *in natura* degradarem rapidamente quando em contato com a solução calcificante é um fator interessante que poderá ser investigado futuramente. Normalmente, deseja-se que os biomateriais degradem à medida que o novo tecido vai se formando. Assim, o controle da biodegradabilidade é de extrema importância, já que o material não deve degradar antes da recuperação da região do implante, mas deve ser substituído gradativamente à medida que esta recuperação é feita (FREYMAN *et al.*, 2001). Desta forma, os hidrogéis *in natura*, poderiam ser utilizados quando uma degradação rápida é necessária, enquanto que hidrogéis liofilizados poderiam ser aplicados em situações onde a recuperação do tecido é mais lenta e exija um material que mantenha sua estrutura e propriedades mecânicas estáveis por um tempo maior. Essas hipóteses são baseadas nos experimentos *in vitro* por sete dias, entretanto, um material implantado sofrerá a ação de vários outros fatores, como interações celulares ou enzimáticas que provavelmente gerarão resultados diferenciados *in vivo*. A importância dos resultados aqui apresentados está na avaliação do potencial de aplicação dos hidrogéis de fibroína de seda como matrizes de recuperação ou regeneração óssea, mas como qualquer novo material, deve ser minuciosamente estudado e assim, aperfeiçoado para as aplicações específicas.

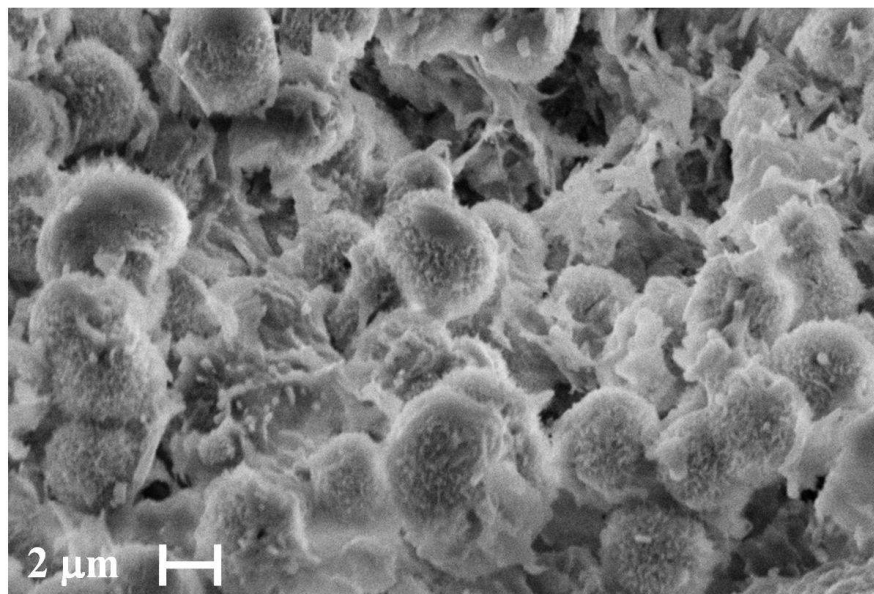


Figura 14 – Micrografia uma amostra de hidrogel de fibroína de seda após experimento de calcificação *in vitro* com aumento de 10000x.

4.2.6 Ensaios de Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas por testes de compressão axial. Os hidrogéis úmidos foram deformados até 50% de sua altura, pois os mesmos são materiais dúcteis, não apresentando fratura mesmo após a compressão total da sua altura. A Figura 15 apresenta a curva característica tensão X deformação apresentada pelas amostras de hidrogéis de fibroína de seda submetidas aos ensaios de compressão axial.

A deformação provocada nos hidrogéis após os testes era permanente, visto que o trabalho mecânico efetuado sobre as amostras forçava a saída de água de sua estrutura e moldava uma nova forma compactada. A resistência média à compressão de 50% da altura das amostras analisadas foi de 50,13 kPa com desvio padrão de 17,90 kPa. A média do módulo de compressão foi calculada em 76,4 kPa com desvio padrão de 10 kPa. O módulo de compressão foi

calculado como a razão entre a tensão de compressão e a deformação correspondente na região linear da curva tensão X deformação de cada amostra.

Os valores calculados tanto para resistência à compressão como para o módulo de compressão apresentaram grande variabilidade provavelmente devido à perda de água dos hidrogéis durante a realização dos ensaios. Estes valores, entretanto, podem servir de referência para futuros trabalhos voltados à preparação e caracterização de amostras de hidrogéis de fibroína de seda em sua forma natural (úmida).

Tamada (2005) preparou e caracterizou estruturas tridimensionais de fibroína de seda muito semelhantes às obtidas neste trabalho, entretanto o método de preparação empregado consistia em congelar e descongelar uma mistura de solução de fibroína dialisada com solventes orgânicos. Tamada determinou módulos de compressão da ordem de 10 kPa para amostras com 2% em massa de fibroína de seda e da ordem de 50 kPa para concentração de fibroína de 6%. Esses valores variavam de acordo com a concentração do solvente adicionado para induzir a gelificação da proteína.

Observa-se que os hidrogéis produzidos diretamente da diálise de fibroína de seda apresentam maior resistência mecânica à compressão quando comparados com os produzidos por Tamada. Este fato pode estar associado à maior porosidade ou ao efeito do congelamento e descongelamento das amostras analisadas pelo autor.

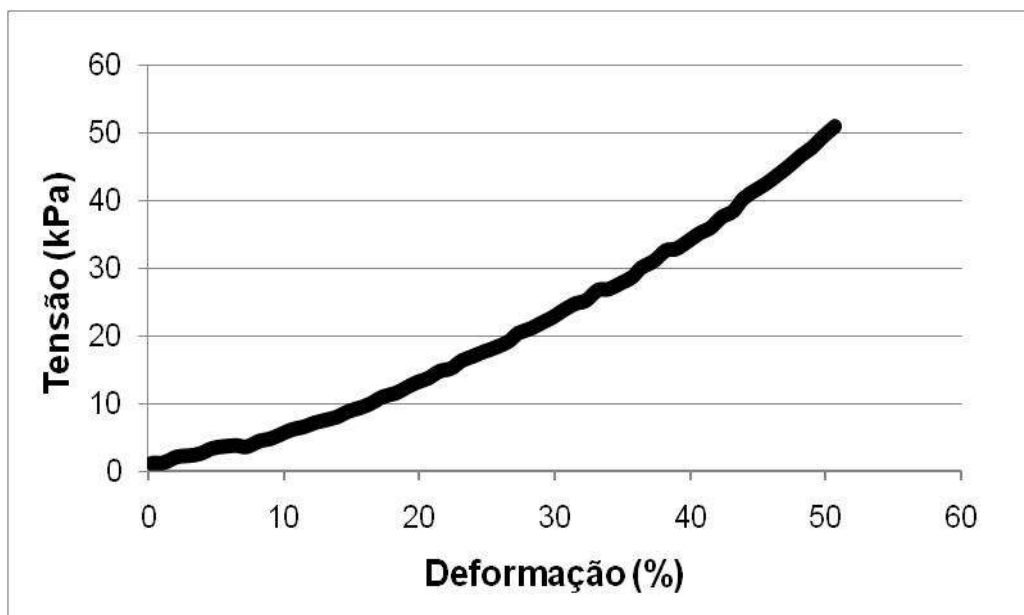


Figura 15 – Perfil típico da curva de tensão X deformação para amostras de hidrogéis de fibroína de seda úmidos submetidos a testes de compressão.

4.2.7 Citotoxicidade

Hidrogéis de fibroína de seda são não citotóxicos de acordo com a avaliação do gráfico exposto na Figura 16. A viabilidade celular das amostras de hidrogel de fibroína de seda manteve-se entre 90-100%, comparável ao controle negativo, para todas as concentrações de extrato analisadas. A toxicidade celular de hidrogéis de fibroína de seda preparados por diversos métodos tem sido relatada na literatura através de testes de citotoxicidade e crescimento celular *in vitro* e *in vivo* (FINI *et al.*, 2005; MEINEL *et al.*, 2005; TAMADA 2005; ACHARYA *et al.*, 2008).

Este estudo de citotoxicidade foi realizado em amostras de hidrogéis formados durante a etapa de diálise da solução de fibroína de seda a 20 °C, sem adição de reticulantes. A biocompatibilidade destes materiais agregada às suas

demais características, como estrutura tridimensional porosa, potencial de calcificar *in vitro* e resistência térmica e mecânica relativamente alta, tornam a sua aplicação promissora no campo de biomateriais.

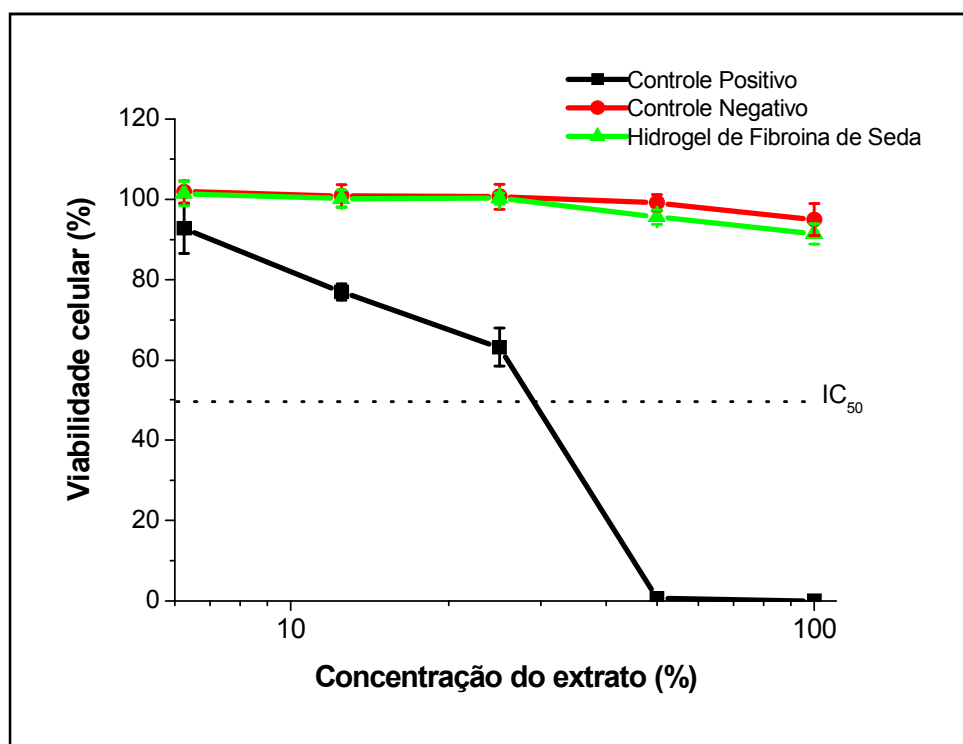


Figura 16 - Viabilidade celular de hidrogéis de fibroína de seda submetidos a testes de citotoxicidade *in vitro*.

4.3 DISCUSSÃO GERAL

O entendimento do processo de gelificação da solução de fibroína de seda é de grande importância para aqueles que pretendem desenvolver materiais derivados desta proteína. Os solventes mais utilizados para dissolver a fibroína de seda contêm, em geral, grande quantidade de sais (SASHINA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2001). Esses sais mantêm a estabilidade da solução impedindo a precipitação da proteína. Entretanto, para obtenção de filmes, membranas ou hidrogéis de fibroína de seda, ao menos parte desses sais precisa ser removida. O método mais utilizado para remoção desses sais é a diálise da solução de fibroína utilizando uma membrana semipermeável que permite a difusão dos íons por osmose. Dependendo das condições de diálise, do tipo e da concentração da fibroína, do solvente e do pH da solução, a gelificação da solução será mais ou menos favorecida (ZHOU *et al.*, 2006; KAPLAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2004). Assim, caso não seja de interesse a gelificação da solução de fibroína, esses parâmetros devem ser cuidadosamente controlados.

O tempo e a temperatura de diálise são parâmetros muito importantes que definirão as propriedades dos materiais derivados de fibroína de seda, sejam eles filmes, membranas ou hidrogéis. Soluções dialisadas de fibroína de seda podem ser vertidas em placas de Petri para formação de membranas. A formação dessa membrana pode seguir dois caminhos distintos: 1) o solvente (água) é evaporado e há a formação de um filme na superfície da placa, ou 2) a solução de fibroína está instável e ao ser vertida na placa de Petri a mesma gelifica. O gel formado na placa perde água com o tempo e pode se tornar um filme de fibroína. Entretanto, observações experimentais demonstraram que filmes derivados da secagem do gel de fibroína de seda são extremamente frágeis e não resistem sequer ao manuseio, enquanto que os filmes obtidos pela secagem da solução de fibroína de seda são rígidos, mas menos frágeis. Assim, deve-se tomar o cuidado de interromper o processo de diálise antes que a solução de fibroína torne-se

instável. Esse ponto é relativamente difícil de ser visualizado, mas a experiência mostra que ele é muito próximo ao da formação do hidrogel durante a diálise.

A partir dos resultados experimentais descritos neste trabalho, observou-se que a partir do quarto dia de diálise a concentração de cálcio residual no hidrogel permaneceu constante para diálise a temperatura de 10 ou 15 °C. Caso a diálise tenha como objetivo final a obtenção de filmes, a mesma pode ser interrompida no terceiro ou no quarto dia sem que haja assim, a gelificação da solução durante a formação do filme. Para a concentração de fibroína analisada, a diálise a 20 ou 25 °C deverá ser interrompida antes do quarto dia, para evitar a formação do gel.

O procedimento de preparação da solução de fibroína e seu tempo de armazenamento (idade da solução) influenciarão no tempo de gelificação durante a diálise. Observou-se que o tempo para gelificação aumentou quando a dissolução de fibroína no solvente ternário demorou mais que duas horas ou quando a solução de fibroína era estocada por mais de um mês. Assim, em todos os testes realizados neste trabalho, tomou-se a precaução de dissolver a fibroína por tempo controlado (1,5 h) não superior a 2 h e utilizar sempre soluções recém-preparadas para garantir a reprodutibilidade dos resultados. O aumento do tempo para gelificação da fibroína nos casos mencionados pode estar relacionado ao fato de que com o passar do tempo em contato com o solvente ternário as pontes de hidrogênio das moléculas de fibroína continuam a ser quebradas levando a uma maior degradação da estrutura protéica e assim, um tempo maior para que esta estrutura se reorganize na ausência do sal.

A utilização dos casulos de seda ao invés das fibras pré-processadas (sobras do processo de fiação) foi também determinada para se evitar variações nos resultados durante a construção da curva cinética de liberação de cálcio e formação do hidrogel. Em diversos experimentos observou-se que alterando a procedência dos fios de seda, o tempo de gelificação alterava significativamente. Vários testes foram realizados com amostras de seda da Fiação Bratac e observou-se que para as diferentes amostras os tempos de gelificação eram

diferentes. Algumas amostras gelificaram em poucos minutos de diálise e outras demoraram dias à mesma temperatura de diálise. Assim, após um longo período de testes, selecionou-se o tipo de seda BR08B (lote definido pela Fiação Bratac) como sendo o mais promissor para a preparação de materiais derivados de fibroína de seda. Entretanto, como o objetivo deste trabalho foi estudar e controlar alguns parâmetros do processo de diálise optou-se utilizar os casulos de seda que ainda não passaram por nenhuma etapa do processo de fiação e conseqüentemente apresentariam menor variação nos resultados.

Os hidrogéis produzidos durante o processo de diálise têm a forma cilíndrica moldada pela própria membrana de diálise. Essas amostras poderiam ser cortadas em formas mais adequadas a alguma aplicação específica, ou mesmo secadas e moídas para obtenção de pós. Entretanto, sabe-se que esses hidrogéis podem ser formados diretamente em um molde, se a solução de fibroína é vertida no seu estado instável ou se um agente capaz de acelerar ou induzir a formação do gel é misturado à solução dialisada (KIM *et al.*, 2004; NAZAROV, JIN; KAPLAN, 2004; TAMADA 2005). Hidrogéis moldáveis ou soluções que gelificam *in situ* podem ser de grande interesse na área médica, seja na reconstituição óssea ou no tratamento de feridas ou queimaduras da pele (RATNER, 1996; ESTROFF *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2004; MEGEED *et al.*, 2004; OLIVEIRA 2004; WANG, NEMOTO; SENNA, 2004; FINI *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2008).

A ausência de citotoxicidade e a deposição de fosfatos de cálcio nos hidrogéis durante testes de calcificação *in vitro* são resultados bastante promissores, indicando a possibilidade de sua utilização como biomateriais na regeneração ou reconstituição óssea (ESTROFF *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005, NOGUEIRA *et al.*, 2008). Assim, a possibilidade de moldar um hidrogel incorporado com fatores de crescimento ou indutores da calcificação teria um grande potencial para correção de defeitos ósseos causados por fraturas ou doenças como a osteoporose.

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL

O aumento da temperatura de diálise diminui o tempo de gelificação da solução de fibroína, mas aumenta a concentração residual de cálcio nos hidrogéis formados.

Hidrogéis de fibroína de seda apresentam grande potencial de aplicação como biomaterial por não apresentar toxicidade atestada por testes de citotoxicidade *in vitro* e propensão a calcificar *in vitro* através da deposição de fosfatos de cálcio precursores de hidroxiapatita.

CAPÍTULO 4

FILMES LbL DE FIBROÍNA DE SEDA E QUITOSANA

Este capítulo descreve a obtenção de filmes de fibroína de seda e quitosana por deposição em substratos utilizando a técnica *Layer-by-Layer (LbL)*. Esta técnica permite produzir filmes com funcionalidade e propriedades específicas, não só através dos compostos ou substâncias utilizadas nas soluções de imersão, mas também pelo ajuste de parâmetros operacionais, como temperatura, número de bicamadas, pH, tempo de deposição ou enxágüe, etc.

Através da técnica empregada, obteve-se a deposição de fibras de fibroína de seda na superfície dos filmes que puderam ser orientadas em duas direções alternando a posição dos substratos na imersão em soluções poliméricas. Esse resultado é inédito na literatura e vislumbra um grande potencial de aplicação na ciência de biomateriais, já que os polímeros que constituem os filmes aqui apresentados são compatíveis com diversos tipos de células e poderiam ser utilizados para adesão ou proliferação celular ou ainda para aumentar a biocompatibilidade da superfície de materiais utilizados em cirurgias ou implantes.

Este trabalho foi todo desenvolvido Centro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CMSE) no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) sob supervisão do Prof. Dr. Michael Rubner e fez parte de um programa de doutorado sanduíche financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de Julho/07 a Janeiro/08.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os equipamentos de deposição para produção dos filmes (*dippers*) eram automáticos e controlados por um computador central, o que facilitava a operação principalmente quando filmes com várias bicamadas eram requeridos. Os equipamentos eram ainda acoplados com sistema de secagem com ar quente ou à temperatura ambiente.

4.1.1 Preparação de Soluções de Quitosana e Fibroína de Seda

Quitosana de baixa massa molecular (Sigma Aldrich) foi dissolvida em solução 0,25 M de ácido acético e acetato de sódio para a concentração de 1 g/L. A solução foi filtrada e seu pH foi ajustado para 6,0 ou 4,0 com adição de solução de NaOH 1M.

Fios de seda do tipo BR08B da Fiação Bratac (São Paulo/Brasil) foram tratados em solução de NaCO₃ 1 g/L durante 20 min. a 80 °C para remoção de sericina. Esse processo foi repetido 3 vezes e posteriormente os fios foram enxaguados com água em abundância e secados em estufa a 40 °C. Após secos, os fios foram cortados em pequenas frações e dissolvidos em solvente ternário de BrLi-CH₃CH₂OH-H₂O (45:44:11, massa) à temperatura de 90 °C para concentração de 20 g/L (CHEN *et al.*, 2001). A solução de fibroína de seda era então dialisada por 3 dias a aproximadamente 10 °C e sua concentração era ajustada para 0,1 g/L por diluição em água ultra pura. Alguns testes com fibroína de seda dissolvida em solvente ternário CaCl₂-CH₃CH₂OH-H₂O (1:2:8, molar) foram realizados para observar a influência do solvente na preparação dos filmes. A solução de fibroína de seda obtida a partir do solvente ternário CaCl₂-CH₃CH₂OH-H₂O foi preparada nas mesmas condições e concentrações que a obtida pelo solvente ternário BrLi-CH₃CH₂OH-H₂O.

A concentração de quitosana foi a concentração padrão já adotada no laboratório para preparação de filmes finos e a concentração de fibroína de seda foi determinada de forma a produzir filmes com qualidade adequada às aplicações propostas.

4.1.2 Deposição de Filmes de Quitosana e Fibroína de Seda

Para deposição de filmes de quitosana (Chi) e fibroína de seda (SF), substratos de silício (Si) foram utilizados. O processo de deposição consistiu em mergulhar os substratos nas soluções de quitosana e fibroína alternadamente. Entre as deposições dos biopolímeros, dois passos de lavagem em água ultra pura Milli-Q[®] e um passo opcional de secagem eram empregados. O tempo de exposição dos substratos nas soluções de quitosana e fibroína de seda era de 10 min cada, enquanto que os passos de lavagem eram de 2 e 1 min, respectivamente (DECHER; SCHLENOFF, 2003; WANG *et al.*, 2005b). Nas soluções de biopolímeros os substratos permaneciam inertes durante todo o tempo, enquanto que durante a lavagem em água os mesmos eram levemente agitados com movimentos verticais. O passo opcional de secagem era empregado à temperatura ambiente por 5 min após a última lavagem de cada biopolímero (WANG *et al.*, 2005b). Cada bicamada de filme era composta de uma camada de quitosana e uma camada de fibroína. O processo de deposição sempre se iniciava com quitosana na primeira camada e finalizava com fibroína de seda na última camada.

Durante o processo de deposição dos filmes, observou-se em alguns casos a presença e aparente alinhamento de fibras na direção da deposição. Para estudar a possibilidade de obtenção de uma rede de fibras, tentou-se alinhá-las em duas direções perpendiculares. Para tal, um primeiro processo de deposição era realizado como descrito previamente e então o substrato era girado 90° e um segundo processo de deposição era iniciado. A Figura 17 mostra a representação do processo de deposição utilizado para preparação dos filmes.

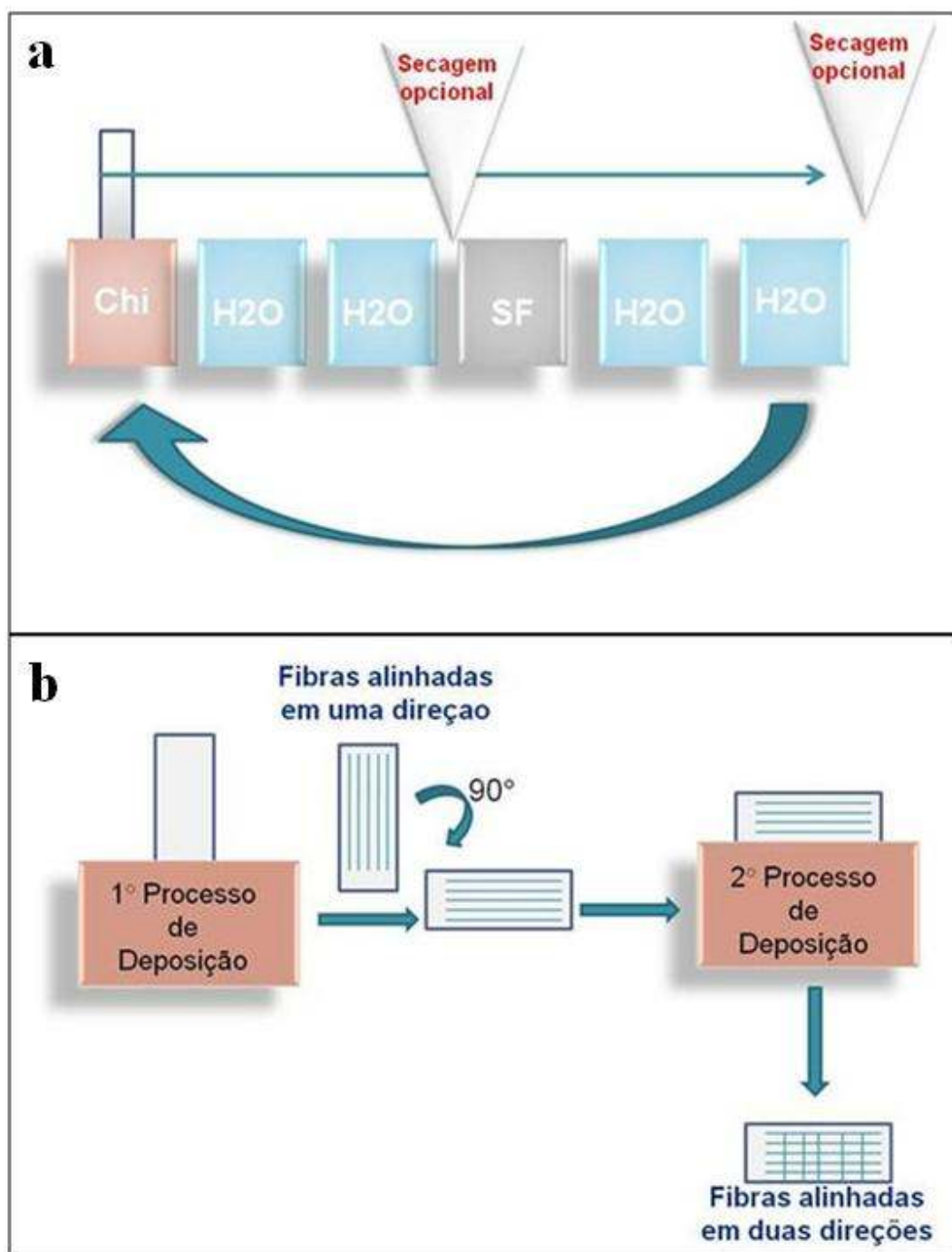


Figura 17 – Esquema do processo (a) de deposição de filmes de fibroína de seda e quitosana e (b) de obtenção fibras alinhadas em duas direções na superfície dos substratos.

A nomenclatura adotada para as amostras era $(\text{Chia}/\text{SF})_{\text{bxc}}$, onde **a** é o pH da solução de quitosana, **b** é a número de bicamadas no primeiro processo de deposição e **c** é o número de bicamadas no segundo processo de deposição, quando aplicado.

4.1.3 Caracterização dos Filmes de Quitosana e Fibroína de Seda

Os filmes foram caracterizados quanto sua morfologia por microscopia óptica e microscopia de força atômica (AFM- tapping mode). A orientação de fibras observada em algumas amostras foi avaliada aplicando-se média azimutal na Transformada Rápida de Fourier (FFT) das imagens obtidas por microscopia óptica. Para tal, o software *Image J*[®] foi utilizado. A espessura dos filmes para diferentes números de bicamadas foi obtida por elipsometria.

a) Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica permite realizar medidas diretas de altura e rugosidade das amostras e possui a vantagem de dispensar a utilização de vácuo ou de recobrimento das mesmas. O equipamento possui um *cantilever* com uma ponta da ordem de micrômetros em sua parte inferior utilizada para percorrer a amostra. A técnica consiste na medida de forças atrativas ou repulsivas entre a amostra e a ponta do *cantilever*. Dependendo da natureza das forças envolvidas têm-se diferentes tipos de AFM, como AFM de modo de contato, modo de não contato ou contato intermitente. Para a caracterização dos filmes, utilizou-se o modo de contato intermitente (*tapping mode*) com o objetivo de verificar a rugosidade das amostras assim como a orientação do biopolímero na superfície.

O equipamento utilizado para obtenção das micrografias de força atômica foi um NanoScope IIIA (Digital Instruments Dimension 3000) localizado no CMSE/MIT.

b) Elipsometria

Elipsometria é uma técnica óptica não destrutiva utilizada para caracterização de filmes finos em uma superfície. A técnica baseia-se na detecção da mudança de estado de polarização da luz causada pela reflexão na superfície de uma amostra e fornece valores de espessura e índice de refração com alta precisão. Um elipsômetro de ângulo variado (M-2000D, J. A. Woollan, USA) localizado no *Institute for Soldier Nanotechnologies* (ISN) do MIT foi utilizado para análises.

c) Infravermelho (FTIR)

Para caracterização dos filmes de fibroína de seda e quitosana por infravermelho, utilizou-se como substrato um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). A análise foi realizada para amostras (Chi6/SF)₂₀, ou seja, filmes de quitosana (pH 6) e fibroína de seda com 20 bicamadas aplicando-se secagem intermediária entre as deposições dos biopolímeros. Utilizou-se um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da marca Nicolet Magna 860 (USA) no CMSE/MIT.

d) Transformada Rápida de Fourier e Média Azimutal

Para avaliar a orientação das fibras na superfície dos filmes depositados em substratos de Si, aplicou-se a uma ferramenta de processamento de imagens conhecida como Transformada Rápida de Fourier (FFT). Com esta técnica é possível decompor a imagem em seus senos e cossenos e, além disso, verificar a frequência de um padrão na imagem original. Assim, cada ponto na imagem da FFT representa uma frequência particular contida no domínio espacial da imagem original. A média azimutal da imagem da FFT foi calculada. Esta ferramenta

fornece um gráfico da posição angular de cada ponto da FFT pela sua intensidade através do cálculo da integral de uma área circular concêntrica à imagem da FFT. As imagens da FFT e o cálculo da média azimutal foram obtidos utilizando-se o software *Image J*[®]. As imagens originais foram obtidas por um microscópio óptico (Zeiss, Axioplan 2 imaging) no modo de reflexão.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Filmes de Fibroína de Seda e Quitosana

Testes preliminares foram realizados para avaliação da melhor metodologia para obtenção dos filmes. Avaliou-se filmes formados a partir de solução de quitosana a pH 6,0 ou 4,0 e solução de fibroína como preparada (pH neutro) ou a pH 4,0. O efeito da etapa de secagem entre as deposições dos biopolímeros também foi investigado. Todos os filmes avaliados nestes testes continham 20 bicamadas e a solução ternária utilizada para dissolver a fibroína foi BrLi-CH₃CH₂OH-H₂O.

Avaliando a espessura de filmes de quitosana e fibroína de seda obtidos a partir de quitosana a diferentes pHs (6,0 ou 4,0), observou-se que o passo de secagem, realizado entre a deposição dos biopolímeros, possui grande influência na deposição dos filmes. Os valores de espessura, obtidos por elipsometria, estão mostrados na Figura 18. A alteração do pH da quitosana de 6,0 para 4,0 não levou a grandes diferenças na espessura dos filmes submetidos ao passo de secagem, entretanto, filmes obtidos com quitosana a pH 6,0 apresentaram superfície mais homogênea.

No caso de filmes obtidos com quitosana a pH 4,0, a superfície era bastante irregular, apresentando pequenos aglomerados de fibroína. Esse

fenômeno pode estar atribuído ao fato de que a baixos pHs, a fibroína tende a gelificar mais rápido (KIM *et al.*, 2004). Esta é uma das razões de não se utilizar solução de fibroína de seda a baixo pH. Testes realizados com fibroína de seda a pH 4,0 não se mostraram promissores porque a solução era instável e gelificava durante o processo de deposição levando à formação de aglomerados de fibroína em toda superfície do substrato.

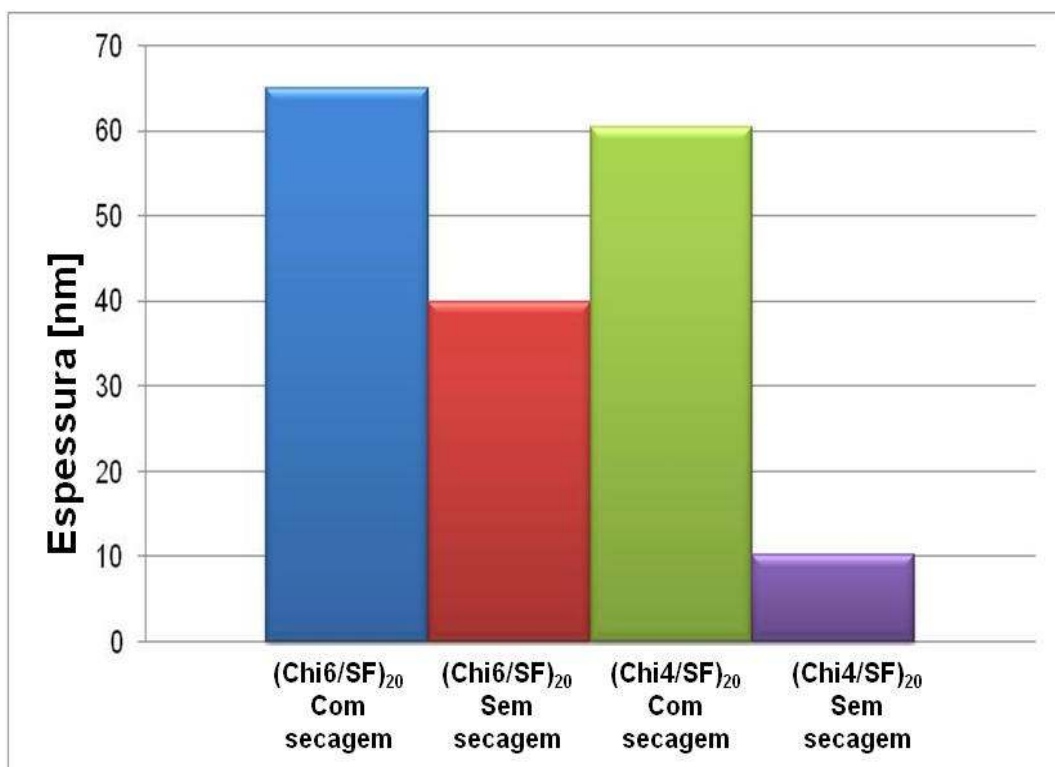


Figura 18 - Espessura de filmes de fibroína de seda e quitosana determinada por elipsometria para filmes com 20 bicamadas utilizando-se solução de quitosana a pH 6 ((Chi6/SF)₂₀) ou a pH 4 ((Chi4/SF)₂₀), aplicando-se ou não a etapa intermediária de secagem entre as deposições dos biopolímeros.

Com base nos resultados previamente descritos, optou-se por adotar o procedimento de deposição com etapa de secagem e solução de quitosana a pH 6,0. A curva de crescimento do filme (Chi6/SF), obtido por elipsometria, está mostrada na Figura 19 onde é possível observar um perfil linear para os números de bicamadas analisados. Vale ressaltar, entretanto, que normalmente nas primeiras bicamadas o crescimento do filme pode não ser linear, já que a superfície do substrato pode ainda não estar completamente recoberta ou as primeiras camadas serem tão finas que permitam grande interpenetração das cadeias poliméricas entre as bicamadas (DECHER; SCHLENOFF, 2003). Com o aumento do número das bicamadas, e conseqüentemente da espessura do filme, esses efeitos tendem a diminuir e o filme começa a crescer mais homogeneamente.

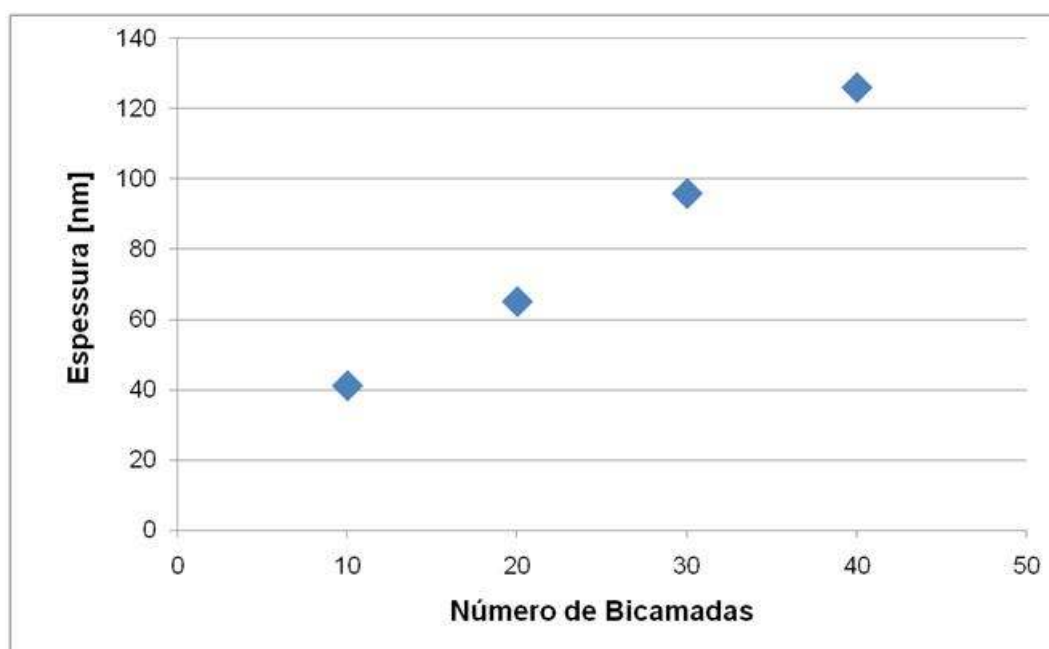


Figura 19 - Curva de crescimento para filmes de fibroína de seda e quitosana (Chi6/SF) utilizando fibroína de seda dissolvida em solvente ternário BrLi-CH₃CH₂OH-H₂O.

4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho

A configuração secundária da fibroína de seda foi verificada por espectroscopia de infravermelho para amostras de (Chi6/SF)₂₀. O espectro de infravermelho, mostrado na Figura 20, apresenta um pico referente a aminas alifáticas que pode ser associado à quitosana presente no filme e dois picos referentes à configuração α -hélice ou helicoidal aleatória (*silk I*) e folha- β (*silk II*) da fibroína de seda. Geralmente, filmes de fibroína de seda apresentam configuração secundária α -hélice ou helicoidal aleatória e precisam ser estabilizados através da transição para configuração folha- β (TAKETANI *et al.*, 2005). Neste caso, entretanto, obteve-se filmes estáveis com a presença de configuração α -hélice e folha- β sem a necessidade de tratamentos adicionais. Este fenômeno foi observado por Wang *et al.* (2005b) e atribuído ao processo de secagem em N₂, que desidratava a fibroína levando à formação de folhas- β . Chen *et al.* (1997a) descreveram a formação de pontes de hidrogênio e folhas- β em blendas de fibroína de seda e quitosana. No caso do presente trabalho pode-se atribuir a configuração folha- β à formação de pontes de hidrogênio entre duas moléculas de fibroína, pela desidratação do filme durante o processo de secagem, ou entre uma molécula de fibroína e uma de quitosana após a deposição de cada bicamada. A presença de folhas- β no filme depositado conferiu estabilidade ao material, impedindo sua dissolução em água e ainda eliminou uma etapa do processo de obtenção de filmes.

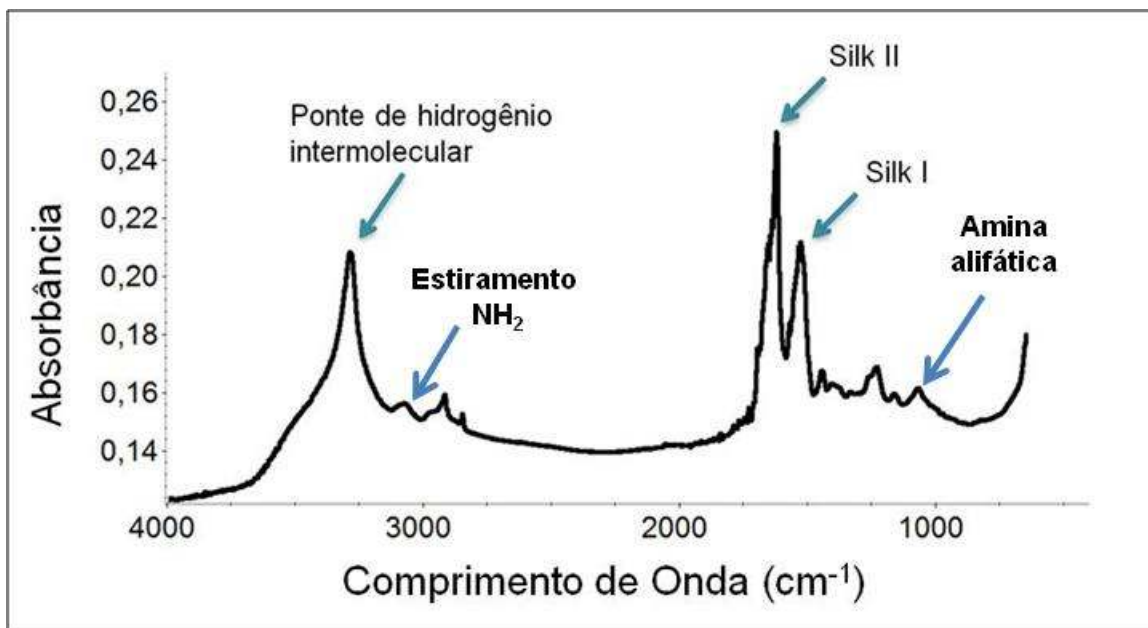


Figura 20– Espectro de infravermelho para filme de fibroína de seda e quitosana (pH 6) com 20 bicamadas aplicando processo de secagem entre a deposição de cada biopolímero.

4.2.3 Orientação de Fibras na Superfície dos filmes

Analisando-se a superfície dos filmes, observou-se a presença de fibras aparentemente orientadas na direção que o substrato era mergulhado. Imagens obtidas por microscopia óptica estão mostradas na Figura 21. A deposição de fibras foi observada desde filmes com 10 bicamadas até 40 bicamadas. O aumento do número de bicamadas levou ao aumento da densidade de fibras na superfície dos filmes. Este fenômeno pode ser notado na Figura 21 onde no filme com 10 bicamadas é possível notar que as fibras parecem não cobrir toda superfície do filme, mas à medida que se aumenta o número de bicamadas, a superfície parece ser completamente recoberta pelas fibras.

A orientação destas fibras foi confirmada pela obtenção da média azimutal da Transformada Rápida de Fourier das imagens obtidas por microscopia óptica. A análise da FFT e da média azimutal confirmou a presença de orientação nas imagens observadas. A partir desta observação, tentou-se obter orientação bidirecional alternando-se a orientação do substrato. Os resultados estão mostrados nas Figuras 22 e 23. Após o primeiro processo de deposição com 20 bicamadas em uma direção, girou-se a amostra 90° e iniciou-se o segundo processo de deposição. Neste caso, pode-se observar a presença de orientação na segunda direção apenas após 20 bicamadas no segundo processo de deposição.

No primeiro processo de deposição, o filme de fibroína de seda e quitosana depositava no substrato de silício e era possível observar a orientação de fibras a partir de 10 bicamadas. Entretanto, para o segundo processo de deposição, apenas após 20 bicamadas foi possível comprovar a orientação das fibras no sentido da segunda deposição. Este fato pode estar atrelado a limitações do equipamento de microscopia óptica que talvez não tenha fornecido uma imagem com resolução apropriada para análise. Possivelmente, após 10 bicamadas no segundo processo de deposição, algumas fibras de fibroína de seda já estejam depositadas e orientadas, mas a maior densidade de fibras no primeiro processo de deposição era dominante. Esse fato foi também observado para amostras com 30 bicamadas no primeiro processo de deposição, onde apenas se verificou orientação no segundo processo de deposição após 30 bicamadas.

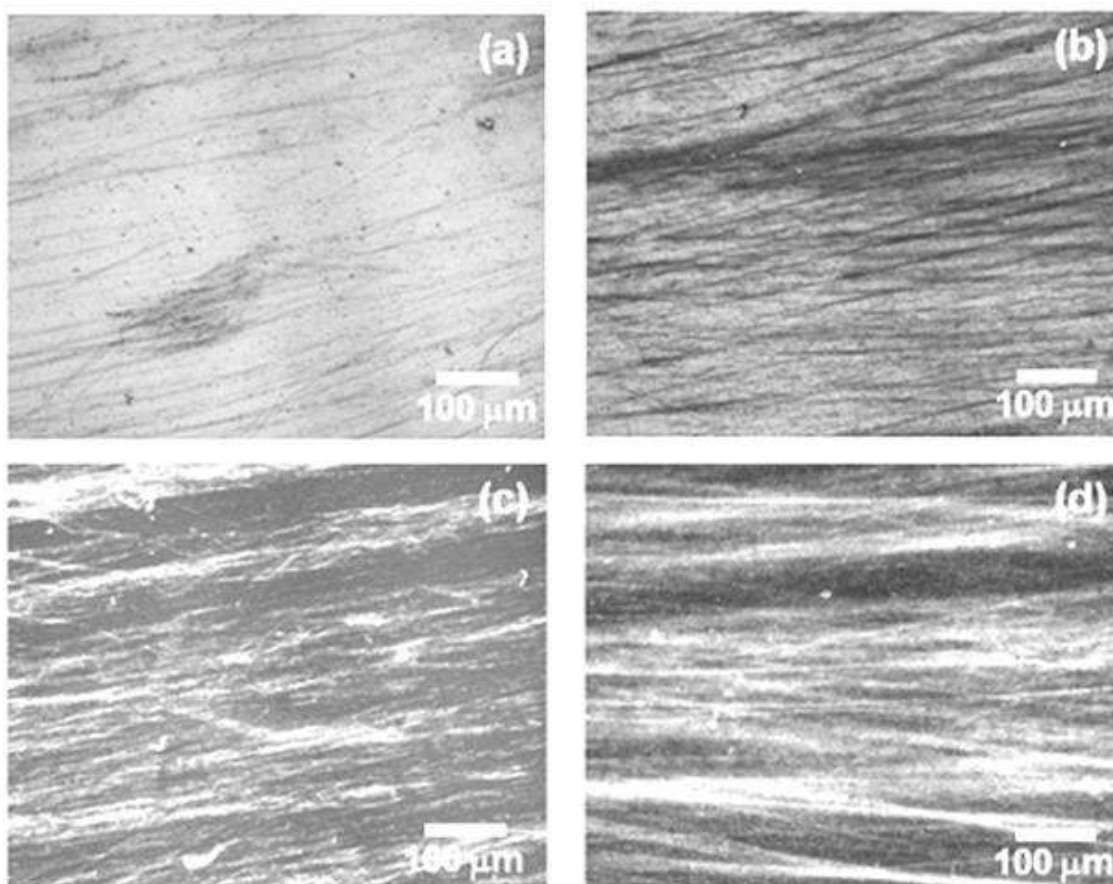


Figura 21 – Imagens de microscopia óptica para filmes de fibroína de seda e quitosana, preparados a partir de solução de quitosana a pH 6, com (a) 10, (b) 20, (c) 30 ou (d) 40 bicamadas, evidenciando o alinhamento de fibras na superfície dos mesmos.

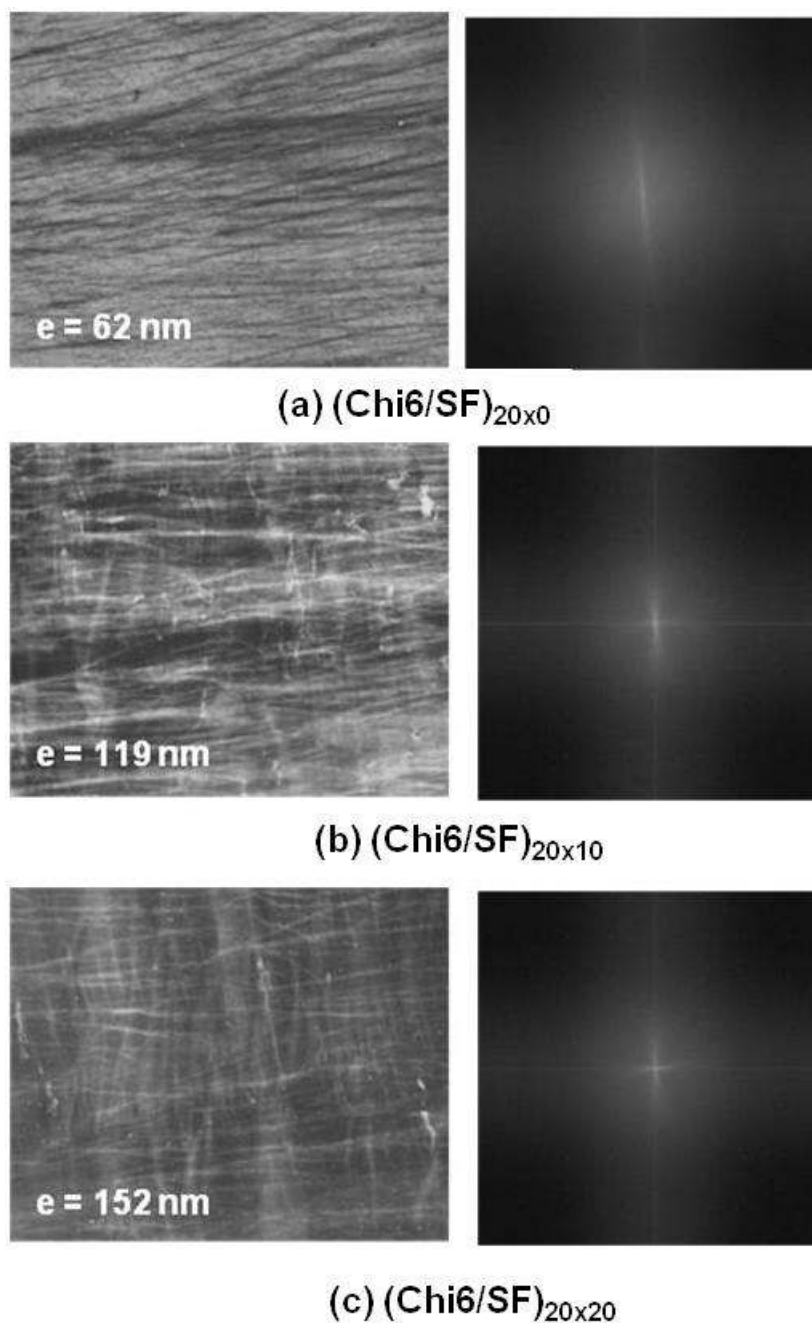


Figura 22 – Bi-direcionamento de fibras observado por Transformada Rápida de Fourier, para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição, onde **e** é a espessura do filme calculada por elipsometria.

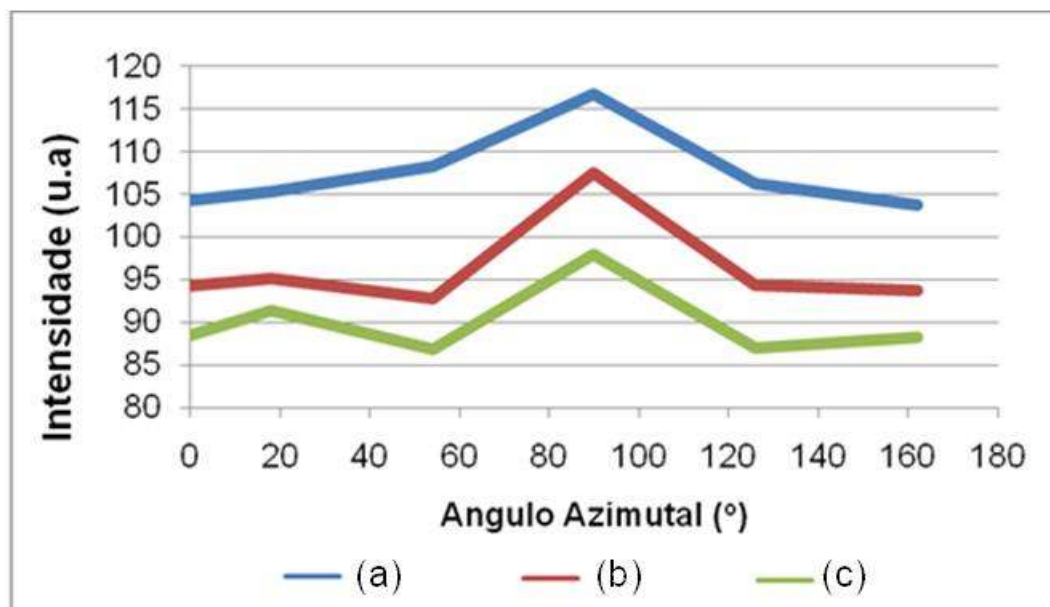


Figura 23 – Média azimutal da Transformada Rápida de Fourier de imagens obtidas por microscopia óptica para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição.

A deposição e orientação de fibras observadas neste trabalho estão intimamente ligadas ao escoamento da solução durante o processo de deposição. Após a diálise, a solução de fibroína de seda torna-se metaestável e tende a gelificar ou aglomerar com o passar do tempo ou sob qualquer perturbação externa como aumento de temperatura ou agitação mecânica (CHEN *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Para o solvente utilizado (BrLi-CH₃CH₂OH-H₂O), nota-se que a fibroína parece não ser completamente dissolvida, apresentando uma suspensão de fibrilas. Essas fibrilas, após diálise tendem a aglomerar em pequenas fibras e depositam no substrato quando este é imerso na solução. Durante o movimento vertical para remoção do substrato, essas fibras tendem a orientar-se no sentido do escoamento da solução. Os dois passos de enxágüe removem o excesso de solução da superfície

deixando apenas o material aderido à mesma e o processo de secagem ajuda a estabilizar o filme impedindo sua dissolução nas próximas etapas (DECHER; SCHLENOFF, 2003; WANG *et al.*, 2005b).

4.2.4 Microscopia de Força Atômica

A morfologia dos filmes observada por microscopia de força atômica está mostrada nas Figuras 24, 25 e 26. Na Figura 24 é possível comparar as características da superfície de filmes de fibroína de seda e quitosana com 10 e 30 bicamadas. Em ambos os casos, as imagens de AFM mostram uma superfície granular e irregular para seções de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ e $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. A Figura 25 exibe o perfil tridimensional para uma amostra de filme de $(\text{Chi6/SF})_{10}$ onde é possível verificar mais claramente a formação granular na superfície do filme.

Imagens de AFM para seções de $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ são exibidas na Figura 26 para filmes de fibroína de seda e quitosana submetidos a um ou dois processos de deposição a fim de se verificar o alinhamento e orientação das fibras na superfície dos substratos. As amostras analisadas foram: filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6) com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0 bicamadas no segundo processo de deposição $(\text{Chi6/SF})_{20 \times 0}$; (b) 10 bicamadas no segundo processo de deposição $(\text{Chi6/SF})_{20 \times 10}$; e (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição $(\text{Chi6/SF})_{20 \times 20}$. A presença de fibras depositadas e orientadas em uma direção pode ser notada na Figura 26(a) para $(\text{Chi6/SF})_{20 \times 0}$, onde os grânulos seguem orientados em linhas em uma única direção. A largura de uma dessas linhas foi medida em aproximadamente 190 nm o que corresponde aproximadamente à largura de uma fibrila de fibroína (PUTTHARANAT *et al.*, 2000). Além da formação bi-direcional de fibrilas na superfície dos filmes pode-se observar também a presença de grânulos com tamanhos consideráveis. Tais formações são possivelmente constituídas de aglomerados de biopolímeros.

Dessas observações pode-se inferir que as fibrilas de fibroína de seda, presentes na solução, depositam na superfície do filme e vão se aglomerando e orientando no sentido em que o substrato é mergulhado pela ação do escoamento. Quando o segundo processo de deposição, no sentido perpendicular ao primeiro foi aplicado com 10 bicamadas, é possível observar por AFM o bi-direcionamento das fibras na superfície dos filmes, como mostra a Figura 26(b). Essa informação é de grande importância visto que por microscopia óptica não se pôde notar o segundo alinhamento das fibras. Para 20 bicamadas no segundo processo de deposição, Figura 26(c), as características da primeira camada estão quase que completamente sobrepostas pela segunda camada, sendo visíveis poucas fibras orientadas na primeira direção de deposição.

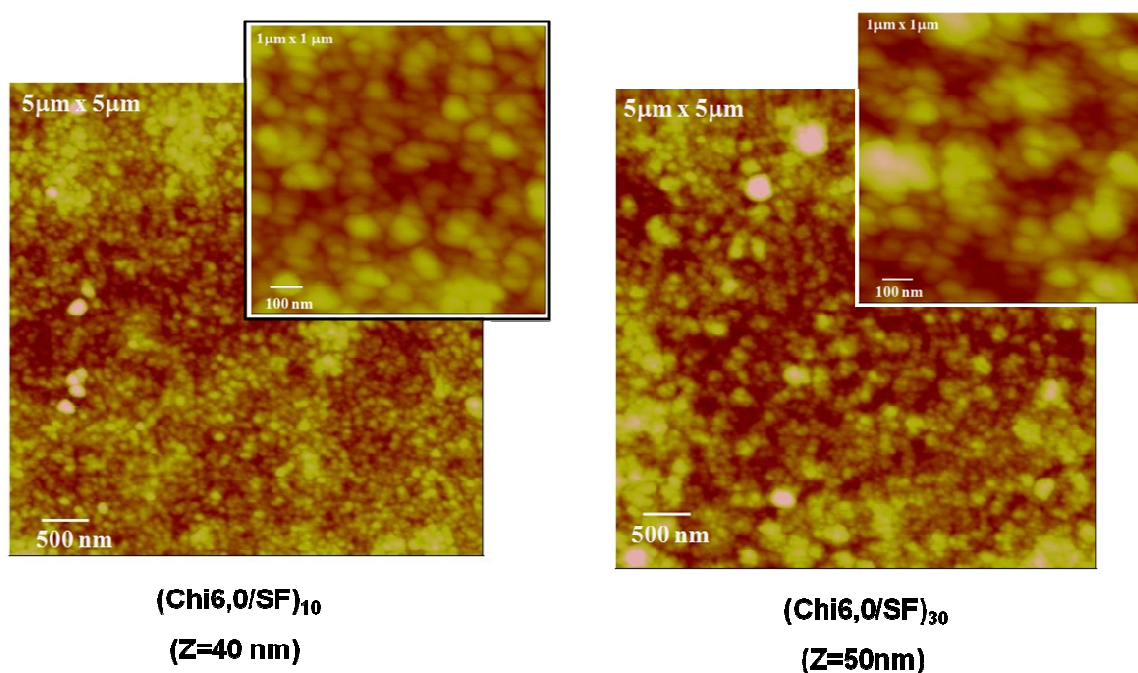


Figura 24 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH 6) constituídos de 10 $((\text{Chi6}/\text{SF})_{10})$ ou 30 $((\text{Chi6}/\text{SF})_{30})$ bicamadas, sendo **z** a escala máxima de altura.

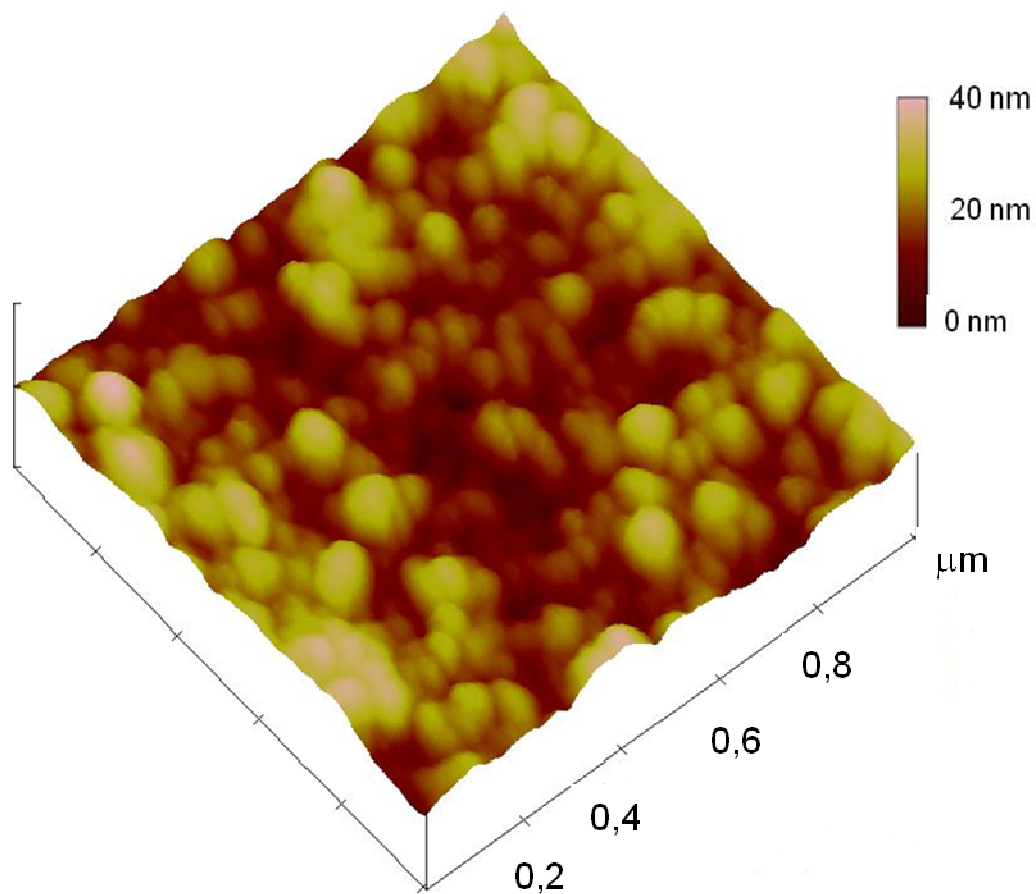


Figura 25 – Imagem de AFM tridimensional no modo de altura para uma amostra de filme com 10 bicamadas de fibroína de seda e quitosana a pH 6, $(\text{Chi6/SF})_{10}$.

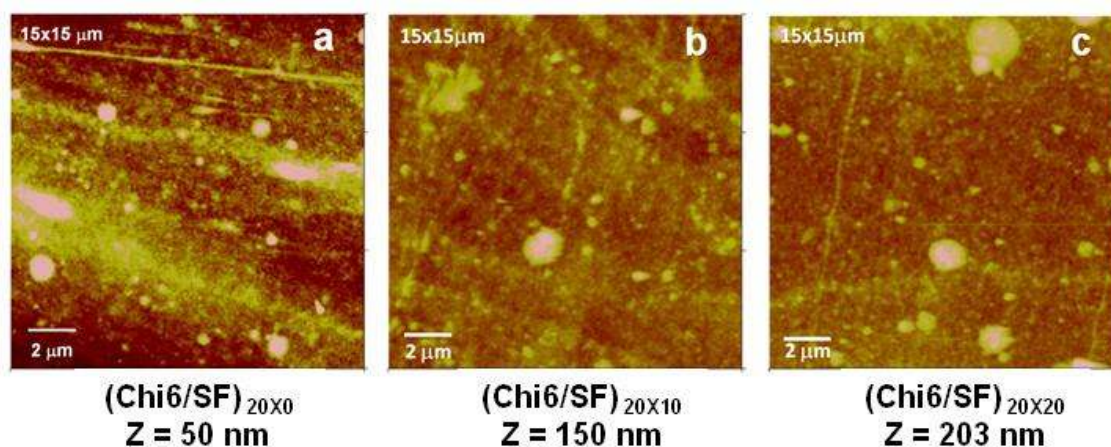


Figura 26 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes de fibroína de seda e quitosana (pH6), com 20 bicamadas no primeiro processo de deposição e (a) 0, (b) 10 ou (c) 20 bicamadas no segundo processo de deposição, onde z representa a escala máxima de altura.

4.2.5 Efeito do Solvente na Deposição dos Filmes

Solução de fibroína de seda dissolvida no solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ foi utilizada após diálise para deposição de filmes de fibroína de seda e quitosana, com o intuito de avaliar o efeito do solvente nesse processo. A curva de crescimento para filmes de fibroína de seda e quitosana a pH 6 com etapa secagem, (Chi6/SF), está mostrada na Figura 27. Observa-se crescimento linear nas faixas analisadas. Fibroína de seda dissolvida no solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ promoveu maior deposição dos biopolímeros no substrato, levando à filmes mais espessos e com morfologia irregular. A presença de alguns aglomerados de fibroína nesses filmes mostra que o processo utilizando o solvente em questão pode não ser adequado, ou os parâmetros do processo devem ser ajustados para obtenção de um recobrimento mais regular.

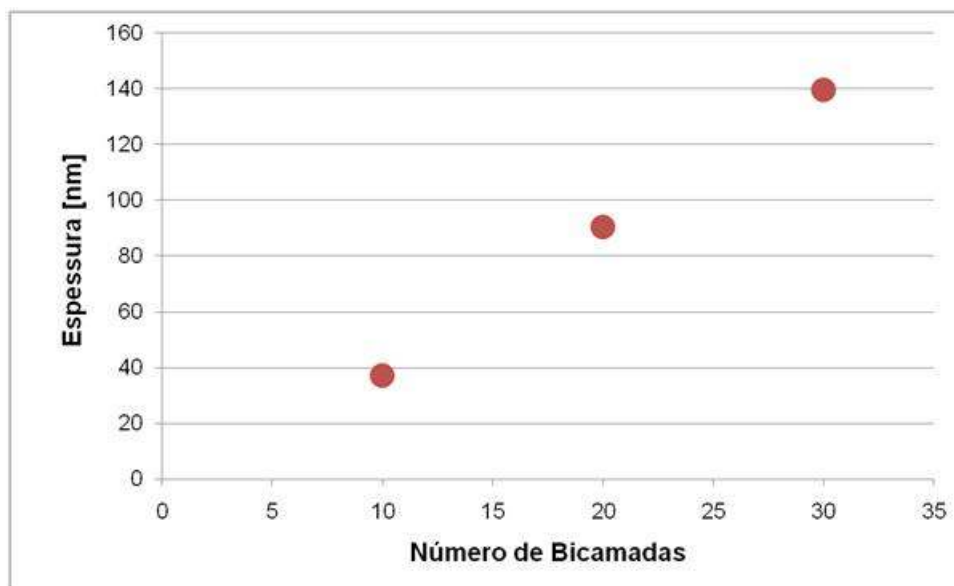


Figura 27 - Curva de crescimento para filmes de fibroína de seda e quitosana, a pH6, (Chi6/SF), utilizando fibroína de seda dissolvida em solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$.

A morfologia das amostras obtidas por diferentes solventes pode ainda ser comparada pelas imagens de AFM exibidas na Figura 28. Observa-se distribuição mais homogênea dos grânulos na imagem de filmes com fibroína de seda dissolvida no solvente ternário $\text{BrLi-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$. No segundo caso, fibroína de seda dissolvida no solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$, nota-se que os grânulos estão mais agregados e há grande diferença das alturas dos mesmos, o que indica que a superfície está irregularmente recoberta.

Deposição ou orientação de fibras não foram observadas nesses filmes. Este fato pode estar relacionado ao poder de solvatação dos solventes analisados e ainda indicar que o processo de deposição e orientação das fibras está realmente relacionado à deposição de fibras presentes na solução e não à formação de fibras na superfície do filme, pois não se observou fibrilas nas soluções provenientes do solvente ternário $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$.

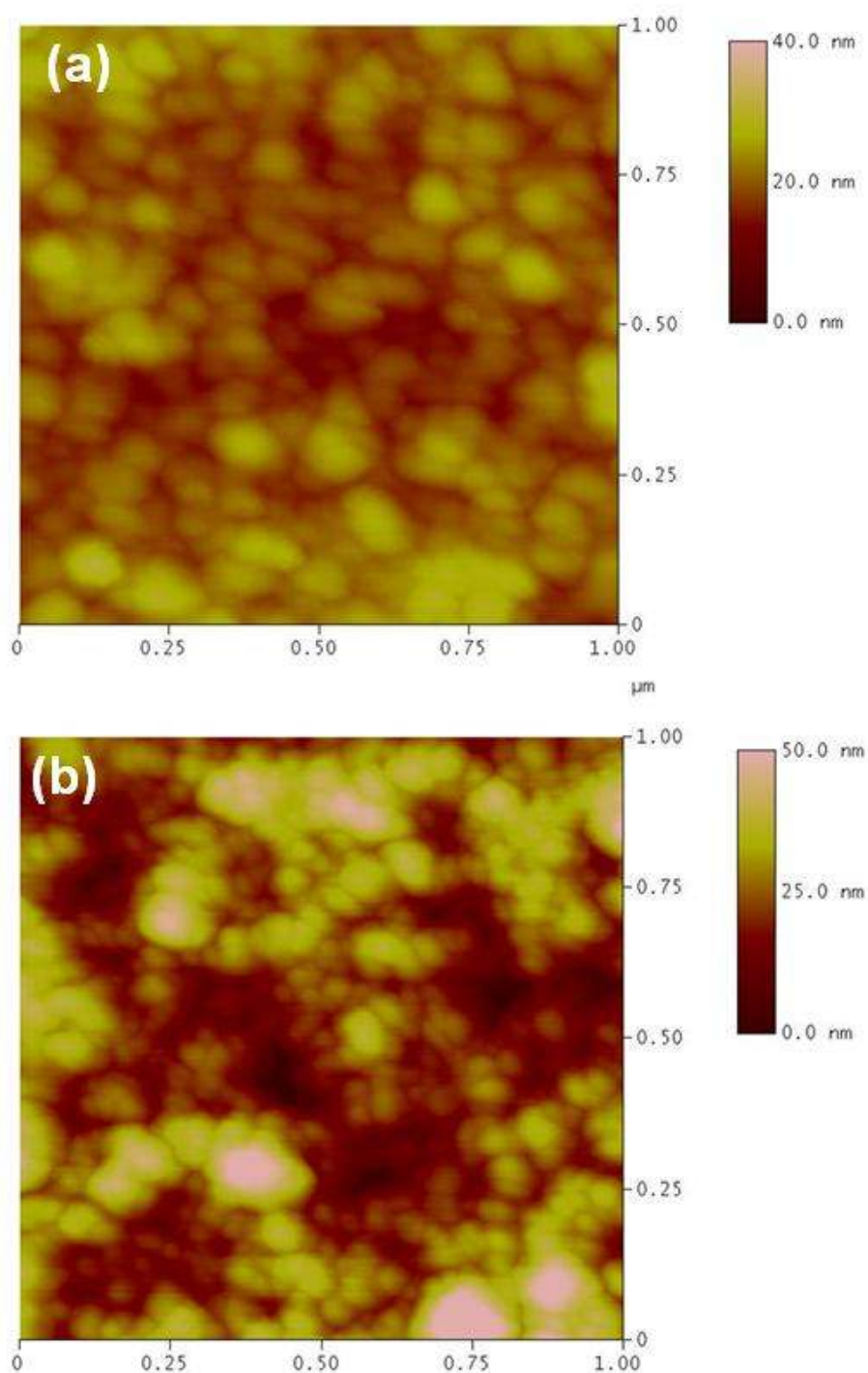


Figura 28 – Imagem de AFM no modo de altura para filmes com 10 bicamadas de fibroína de seda e quitosana (pH 6), utilizando solução de fibroína de seda dissolvida em solvente ternário (a) $\text{BrLi-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$ ou (b) $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$.

4.3 DISCUSSÃO GERAL

Normalmente, nano ou micro fibras de fibroína de seda são obtidas por um processo relativamente complexo, conhecido com eletro-fiação (JIN *et al.* 2002; AYUTSEDE, 2005; AYUTSEDE *et al.*, 2005). A deposição e alinhamento de fibras em filmes multicamadas de fibroína de seda e quitosana pelo método de LbL ainda não foi reportada na literatura e é um resultado interessante que confere a possibilidade de utilização destes filmes em um amplo campo de aplicações. Cai *et al.* (2007) estudaram filmes de fibroína de seda e quitosana para recobrir titânio e observaram um aumento na biocompatibilidade do material para cultura de osteoblastos. O processo de deposição adotado por estes pesquisadores era diferente do utilizado neste trabalho e nenhuma referência à orientação de fibras foi mencionada.

Muitos tecidos encontrados na natureza apresentam excelentes propriedades mecânicas e funcionalidade devido às diferentes fases presentes em sua estrutura resultando em formações anisotrópicas. Alguns exemplos desses materiais seriam os ossos ou o bambu, onde os componentes isoladamente apresentam baixa resistência mecânica, mas juntos, produzem compósitos extremamente resistentes (HOLANDA *et al.*, 1999; MURAD, 2007). Assim, a possibilidade de reproduzir, em laboratório, a orientação e organização natural desses materiais é um desafio a ser superado.

Alguns testes de resistência mecânica foram realizados em amostras de filmes multicamadas de fibroína de seda e quitosana utilizando-se uma técnica conhecida como *buckling*. Os resultados preliminares indicaram que os filmes possuem ótima resistência mecânica, com módulo de elasticidade da ordem de 6 GPa. A técnica ainda está sendo aperfeiçoada pelo grupo de pesquisa do Prof. Michael Rubner, já que houve grande variação nas réplicas analisadas, chegando a valores maiores que 10 GPa. Essa grande variação pode estar relacionada tanto ao método quanto às características dos filmes. Para realização dos testes mecânicos por *buckling* são utilizados substratos de poli(dimetil)siloxano (PDMS).

Este substrato é um polímero elástico onde o filme é depositado. O sistema PDMS e filme multicamadas é comprimido numa direção e quando a força é liberada, há a formação de um padrão sinuoso na superfície do filme. As propriedades mecânicas do filme depositado sobre o substrato dependerá da amplitude e do comprimento de onda do padrão formado na superfície do filme (STAFFORD *et al.*, 2004). Assim, dependendo da direção que a compressão é realizada nos filmes de fibroína de seda e quitosana, o módulo de elasticidade poderá variar de acordo com a direção das fibras depositadas, como é de se esperar em materiais anisotrópicos.

A possibilidade de criar um material com uma rede de fibras alternando a direção da deposição na amostra pode permitir a obtenção de um material com excelentes propriedades mecânicas associadas à já conhecida biocompatibilidade dos polímeros em estudo (CHEN *et al.*, 1997a; CAI *et al.*, 2007). Além de poder melhorar as propriedades dos filmes, a deposição e orientação das fibras podem ser exploradas no campo biomédico como matrizes para crescimento celular onde a interação entre as células e fibras poderia ser explorada para guiar a adesão e proliferação celular no substrato (MA *et al.*, 2005; BADAMI *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2007).

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Filmes multicamadas de quitosana e fibroína de seda podem ser obtidos pela deposição dos biopolímeros através da técnica *Layer-by-Layer*. Esta técnica permite ainda a deposição e orientação de fibras de fibroína de seda que podem ser controladas pela direção do substrato durante o mergulho nas soluções poliméricas.

CAPÍTULO 5

RECOBRIMENTO DE BIOMATERIAIS

Com o intuito de aprimorar os conhecimentos e tecnologia de aplicação de novos biomateriais na área cardiovascular, este trabalho apresenta a proposta de avaliar o potencial de utilização de fibroína de seda no recobrimento de biomateriais, mais especificamente, no recobrimento de pericárdio bovino destinado à confecção de válvulas cardíacas.

O presente trabalho é parte de um projeto temático FAPESP (04/09566-8), coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, que visava o desenvolvimento de novas tecnologias ou novos materiais para modificar o pericárdio bovino, comumente usado para confecção de válvulas cardíacas, a fim de diminuir sua propensão à calcificação quando implantados. Assim, o potencial de calcificação de pericárdio bovino recoberto com fibroína de seda foi investigado por testes de calcificação *in vitro* em solução de fluido corpóreo simulado. Os resultados foram comparados com os obtidos para testes de calcificação *in vitro* em pericárdio bovino recoberto com quitosana ou pericárdio bovino sem recobrimento de biopolímeros. Para complementar o estudo, a compatibilidade dos filmes de fibroína de seda e de quitosana foi avaliada por testes citotoxicidade e de crescimento de células endoteliais *in vitro*.

O projeto temático envolveu pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (Faculdade de Engenharia Química), da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto do Coração) e do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Cada grupo desempenhou uma parte do projeto, sendo os testes de calcificação *in vitro* coordenados pela professora Marisa Beppu e executados em nosso laboratório (Laboratório de Engenharia e Química de Produtos – LEQUIP/FEQ/UNICAMP). Os testes de citotoxicidade e de crescimento de células endoteliais foram realizados pelos colaboradores do IPEN (IPEN/CNEN-SP).

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Preparação das Amostras de Pericárdio Bovino

Substratos de pericárdio bovino foram extraídos de um *patch* comercial (SN: 201731 - Braile Biomédica, Brasil), com 0,33 mm de espessura, pré-tratado com solução de glutaraldeído 0,5% e armazenado em tubo de vidro estéril contendo solução de formaldeído 4%. O patch foi lavado exaustivamente com solução de NaCl 0,9% em massa (soro fisiológico), para a completa retirada dos resíduos de formaldeído provenientes do recipiente de armazenamento, foi então cortado em pedaços de aproximadamente 4 cm² e posteriormente congelados em nitrogênio líquido e liofilizados por 24 h a -50 °C e -760 mmHg em um equipamento da marca Liobrás L101.

5.1.2 Soluções de Biopolímeros

Fios de seda, fornecidos pela Fiação Bratac – Brasil (BR08B) foram lavados por três vezes em solução de Na₂CO₃ 0,5% (m/v) à temperatura de 85 °C e então em água destilada em abundância para remoção da sericina. Os fios purificados e secos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm e então dissolvidos em solução ternária CaCl₂-CH₃CH₂OH-H₂O (1:2:8 molar) para concentração de 10% (m/v) à temperatura de 85 °C (LI *et al.*, 2002). Esta solução foi dialisada em membrana de celulose (Viscofan, 22 EU – 20 USA) em água ultra pura por 3 dias à aproximadamente 10 °C para remoção dos sais e posteriormente diluída para a concentração de 1% (m/v).

Quitosana (Sigma Aldrich) foi dissolvida em uma solução de ácido acético 3% (v/v) para concentração de 1% (m/v).

5.1.3 Filme de Biopolímeros

Vinte mililitros (20mL) de solução de fibroína de seda ou quitosana foram derramados sobre uma placa de Petri de poliestireno com 9 cm de diâmetro e os filmes de biopolímeros formaram-se por evaporação do solvente à 30 °C. Filmes de fibroína de seda foram tratados com etanol 70% e filmes de quitosana foram tratados em solução NaOH 1M por 1 h para promover a estabilidade dos filmes em água, impedindo sua dissolução.

5.1.4 Recobrimento de Pericárdio Bovino

O pericárdio bovino liofilizado foi imerso numa solução de fibroína de seda ou de quitosana por 20 min. As amostras foram secas à temperatura ambiente e posteriormente tratadas para insolubilizá-las em água. Amostras de pericárdio bovino recoberto com fibroína de seda ou quitosana foram tratadas com solução de etanol 70% ou NaOH 1M, respectivamente, durante 1 h e então submetidas aos testes de calcificação *in vitro*.

5.1.5 Ensaios de Calcificação *In Vitro*

Os testes de calcificação *in vitro* foram realizados com uma solução modificada do fluido corpóreo simulado (1,5xSBF). Esta solução contém 50% a mais da concentração iônica da solução SBF original e foi utilizada com o propósito de acelerar o processo de calcificação. A preparação da solução SBF, assim como a descrição dos íons presentes na mesma está descrita no Capítulo 3 no item 3.2.7.

Amostras de pericárdio bovino com ou sem recobrimento de biopolímeros foram colocadas em potes de poliestireno com 50 mL de uma solução de fluido

corpóreo simulado (1,5xSBF) a temperatura de 36,5 °C, mantida em um banho termostatzado sob agitação leve por 7 dias. A solução 1,5xSBF foi trocada em intervalos de 48 h e o pH foi medido para observar possíveis contaminações. No sétimo dia, as amostras foram retiradas da solução calcificante e enxaguadas em água deionizada para remoção do excesso de sais da superfície. Posteriormente, foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas a -50 °C e -760 mmHg no equipamento da marca Liobrás L101 para análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS). Os testes foram realizados em duplicata.

5.1.6 Teste de Citotoxicidade em Filmes de Fibroína de Seda e de Quitosana

A citotoxicidade *in vitro* de filmes de fibroína de seda e de quitosana foi avaliada. O teste foi realizado seguindo a norma ISO 10993-5: *Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 (Gibco) e o método empregado foi da avaliação da viabilidade celular por corante vital, MTS/PMS, como recomendado no kit “CellTiter96® AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation”.

As amostras foram esterilizadas com radiação gama (25 kGy) e recortadas para preparação do extrato na concentração de 1 cm²/mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco 23400-021). Após 72 h a 37 °C, o extrato de meio de cultura foi filtrado em filtro para seringa estéril, com poro 0,45 µm com membrana de acetato de celulose (Corning), e preparadas diluições seriadas de 100% a 6,25% do extrato em meio RPMI estéril. Como controle positivo utilizou-se uma solução fenol a 0,4% e o controle negativo foi um extrato de polietileno de alta densidade (PEAD). As amostras foram avaliadas quanto ao índice de citotoxicidade 50% (IC₅₀), que corresponde à concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis.

5.1.7 Adesão de Células Endoteliais em Filmes de Fibroína de Seda e de Quitosana

As células endoteliais utilizadas para avaliação da biofuncionalidade dos materiais são de linhagem estabelecida e foram adquiridas de repositório internacional. As células CRL1730 da ATCC são células endoteliais provenientes do cordão umbilical humano (HUVEC).

As células foram cultivadas segundo protocolo da ATCC: meio de cultura Ham's F12K com 2 mM de L-glutamina, ajustado com bicarbonato de sódio para concentração de 1,5g/L; e suplementado com 0,1 mg/mL de heparina e 0,05 mg/mL ECGS (endothelial cell growth supplement – suplemento de crescimento celular endotelial), 10% de soro fetal bovino. Temperatura de incubação de 37°C com 5% de CO₂.

O ECGS foi preparado no laboratório por meio de maceração do cérebro de camundongos BL 10/PL com 10 semanas de vida, não utilizados em experimentos e que seriam descartados por excesso de indivíduos. Foi realizada uma mistura com o mesmo número de camundongos macho e fêmea. Os cérebros foram macerados na proporção de 3 mL/unidade total (cérebro e cerebelo). Este ECGS mostrou-se eficiente para o cultivo, pois as células cultivadas sem o ECGS tem um crescimento lento. As células cultivadas com o ECGS apresentavam morfologia idêntica às células cultivadas pela ATCC, comparado com uma foto no site (www.atcc.org). As células cultivadas sem ECGS apresentavam morfologia disforme.

Quando as células ocupavam aproximadamente 80% da área de cultivo no frasco de cultura, foram descoladas pela ação enzimática de solução de tripsina 0,05% /EDTA 0,02% e amplificadas na proporção de 1:5.

Cultivo das células endoteliais sobre os filmes de biopolímeros

Os filmes de fibroína de seda e de quitosana foram esterilizados por radiação gama a 25kGy, acomodados em uma placa de cultura e sobre eles, foi

colocado um anel de aço inoxidável de 16 mm de diâmetro interno para delimitação da área de cultivo. As membranas foram deixadas com meio de cultura Ham's F12 na incubadora a 37° C por uma noite, para ambientação.

As células endoteliais na 9ª passagem, quando atingiram a confluência, foram retiradas do frasco de cultura por ação da solução tripsina/EDTA e semeadas 12000 células na área interna de cada anel acomodado sobre as membranas. Após 24 horas os anéis foram retirados e a primeira troca do meio de cultura foi realizada. Os filmes com as células foram mantidos na incubadora por 14 dias com troca de meio de cultura a cada 3 dias. O crescimento das células nas membranas foi acompanhado no microscópio óptico invertido.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Testes de Calcificação *In Vitro*

Amostras de pericárdio bovino com ou sem recobrimento de biopolímeros foram investigadas quanto ao seu potencial de calcificação *in vitro*. Micrografias das amostras de pericárdio bovino não recoberto com biopolímeros estão mostradas na Figura 29. Uma das réplicas apresentou depósitos de fosfato de cálcio na sua superfície, como pode ser observado na Figura 29 (a). Os depósitos apresentaram-se em formato esférico, espalhados em alguns pontos da amostra. Na segunda réplica, Figura 29 (c), não foram observados depósitos de fosfatos de cálcio ou sinais de calcificação. Os espectros de EDS confirmaram as observações feitas pela análise das micrografias para ambas as amostras.

Amostras de pericárdio bovino recobertas com quitosana ou fibroína de seda não apresentaram depósitos de fosfatos de cálcio após os testes de calcificação *in vitro*. As micrografias e os espectros de EDS de uma réplica de cada uma das amostras estão representados na Figura 30. A deposição da quitosana na superfície do pericárdio bovino pode ser notada na Figura 30 (a).

Observa-se que a superfície não está recoberta regularmente, mas parece que a quitosana aglomera-se em algumas regiões preenchendo os espaços vazios entre as fibras de colágeno. O mesmo não foi observado no recobrimento com fibroína de seda. No aumento maior da Figura 30 (c) não se percebe aglomerados do biopolímero na superfície do pericárdio. Uma hipótese para este fato seria que a fibroína recobre as fibras do pericárdio bovino com uma camada regular e fina de filme.

As soluções de quitosana e fibroína de seda, à mesma concentração, possuem viscosidades diferentes. A solução de quitosana era mais viscosa e talvez por essa razão mais difícil de espalhar homogeneamente na superfície do material, enquanto que a baixa viscosidade da solução de fibroína pode ter permitido maior difusão para dentro do tecido e uma deposição mais homogênea nas fibras. Poder-se-ia esperar a presença de um filme fino de fibroína de seda entre as fibras de colágeno, já que este biopolímero estaria recobrindo todo o material. Entretanto, o pericárdio após o recobrimento foi submetido ao tratamento com etanol e posteriormente à liofilização, um processo à alto vácuo, que pode ter colaborado com o rompimento de uma possível camada de filme nos espaços entre as fibras. A hipótese de não haver deposição de filme de fibroína de seda na superfície do pericárdio existe, mas é pouco provável devido à alta capacidade filmogênica da fibroína e seu potencial de interação com o colágeno, principalmente através de pontes de hidrogênio (LV *et al.*, 2007).

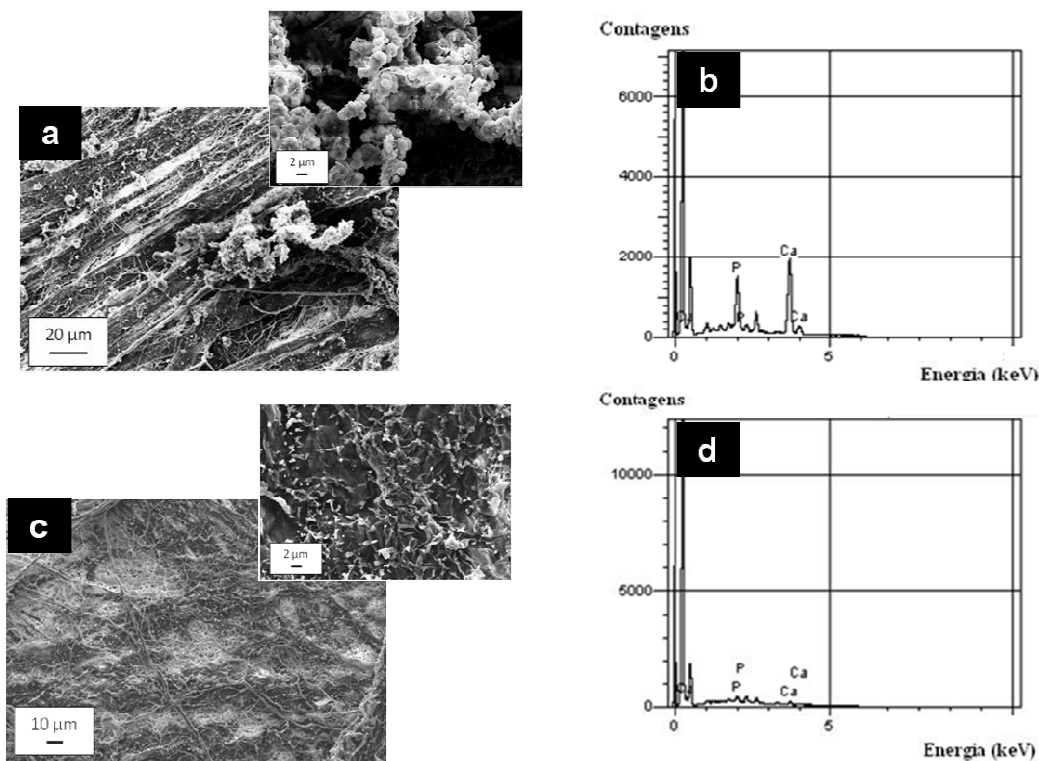


Figura 29 – Micrografias de (a, c) amostras de pericárdio bovino não recoberto com biopolímeros após testes de calcificação *in vitro* e (b,d) respectivos espectros de EDS.

A calcificação no pericárdio bovino pode envolver diversos parâmetros, como a quantidade de células residuais no tecido, a extensão do tratamento com glutaraldeído ou mesmo fatores físicos, como a irregularidade da superfície (PASQUINO *et al.*, 1994; ARAVIND *et al.*, 1998; DAHM *et al.*, 2004; SHOEN; LEVY, 2005; OSWAL *et al.*, 2007). Assim, não é de se surpreender que apenas uma das amostras não recobertas com biopolímero apresentasse depósitos de fosfato de cálcio. Por ser um material biológico, o controle de todos os parâmetros que possam influenciar sua calcificação é complexo e muitas vezes inviável. Entretanto, o estudo da calcificação *in vitro* é útil para testar novos materiais ou modificação de materiais já existentes, como foi o caso dos testes com o pericárdio recoberto com os biopolímeros.

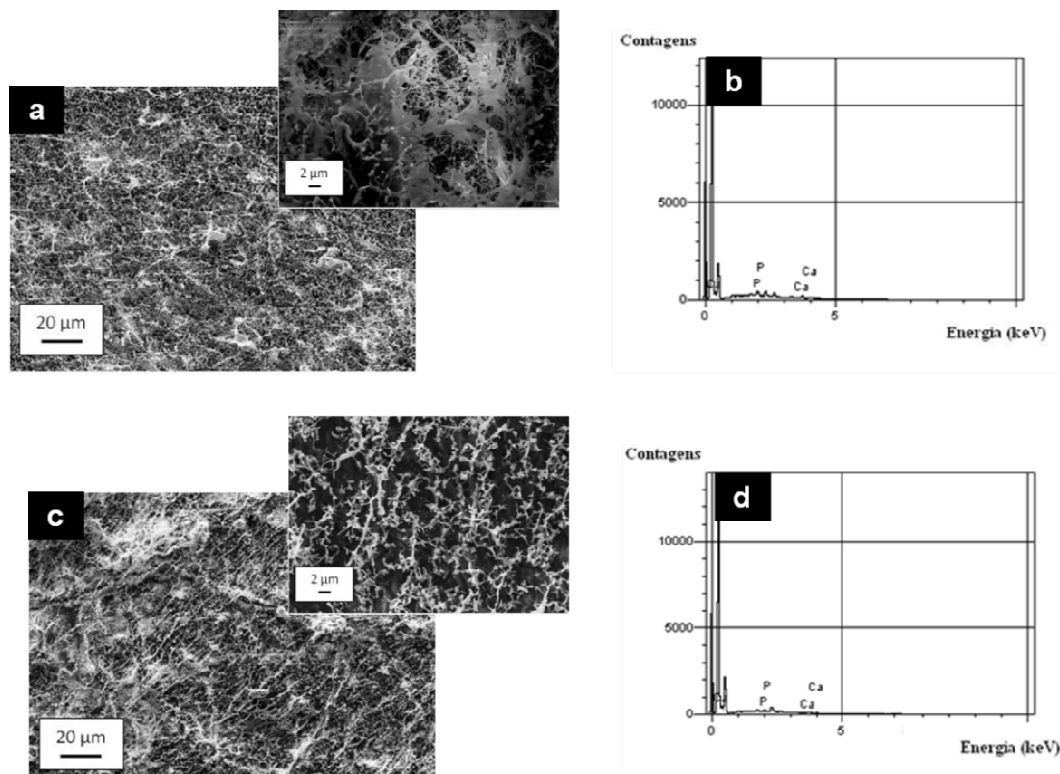


Figura 30 – Micrografia de amostra de pericárdio bovino recoberto com (a) quitosana e (c) com fibroína de seda após testes de calcificação *in vitro* e (b, d) respectivos espectros de EDS.

Aimoli *et al.* (2007) mostraram que amostras de pericárdio não liofilizadas e submetidas aos ensaios de calcificação *in vitro* apresentaram depósitos de fosfato de cálcio, enquanto que as amostras após liofilização e recobrimento com quitosana ou fibroína de seda, avaliadas neste trabalho, não apresentaram sinais de calcificação sob as mesmas condições de teste.

O fato de não se observar calcificação em nenhuma das réplicas de pericárdio bovino recoberto com quitosana ou fibroína de seda indica um potencial de utilização desses materiais no recobrimento do pericárdio para construção de válvulas cardíacas. O recobrimento do pericárdio bovino com filmes desses biopolímeros poderia ainda ter como vantagem, a possibilidade de incorporação

de fármacos, como por exemplo, anticoagulantes ou inibidores de calcificação, que seriam liberados gradativamente após o implante, aumentando assim, a vida útil da válvula e sua compatibilidade com o sangue.

Sabe-se que a fibroína de seda possui grande afinidade com cálcio. Esta característica pode tornar os materiais derivados desta proteína propensos a calcificar *in vitro* ou *in vivo* (ESTROFF *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005, NOGUEIRA *et al.*, 2008, WESKA *et al.*, 2009.) o que seria indesejável no caso de válvulas cardíacas. Entretanto, muitos pesquisadores têm mostrado que não só a química da superfície de um material pode ser determinante num processo de calcificação, mas também a morfologia da mesma (ZHOU *et al.*, 2004; AIMOLI; BEPPU, 2006; HSU *et al.*, 2007). Assim, materiais com morfologia irregular apresentariam maior tendência à calcificação quando comparados com materiais com superfície relativamente mais homogênea.

Mesmo após o recobrimento com fibroína de seda, o pericárdio bovino apresenta grande irregularidade em sua superfície, que poderia agir como ponto de ancoragem de íons. Estas observações indicam que o recobrimento do pericárdio com fibroína de seda modifica a química de sua superfície impedindo a calcificação após sete dias de ensaios em SBF apesar da afinidade química da fibroína de seda com íons cálcio. A interação entre moléculas de fibroína de seda e o colágeno podem levar à reticulação de suas cadeias inibindo a interação das moléculas na superfície do material com o cálcio ou ainda modificando a hidrofiliabilidade do material alterando assim, sua molhabilidade no meio calcificante.

Isso explicaria o fato de hidrogéis de fibroína de seda, descritos no Capítulo 4, apresentarem grande potencial de calcificação e os filmes de fibroína de seda depositados sobre o pericárdio bovino não calcificarem após sete dias de ensaio em SBF. A influência da morfologia de materiais derivados de fibroína de seda no potencial de calcificação *in vitro* dos mesmos vem sendo estudada em projetos paralelos no laboratório da professora Marisa Beppu e os testes preliminares têm confirmado o grande potencial de estruturas porosas de fibroína de seda calcificar durante experimentos de calcificação *in vitro* em contraste com

filmes desta proteína com morfologia regular (AIMOLI *et al.*, 2006; WESKA *et al.*, 2009).

5.2.2 Avaliação da Citotoxicidade e do Crescimento de Células Endoteliais em Filmes de Fibroína de Seda e de Quitosana

Além do potencial de calcificação *in vitro* de pericárdio bovino recoberto com quitosana ou fibroína de seda, é importante avaliar a compatibilidade do filme desses biopolímeros formado sobre a sua superfície. Assim, a citotoxicidade de filmes de quitosana e de fibroína de seda foi avaliada e o resultado obtido está representado graficamente na Figura 31. As amostras de filmes de quitosana e de fibroína de seda não apresentaram citotoxicidade para nenhuma das concentrações de extrato avaliadas.

O crescimento de células endoteliais sobre filmes de fibroína de seda e de quitosana foi avaliado por experimentos *in vitro* e os resultados estão mostrados na Figura 32. As células endoteliais aderiram e proliferaram na superfície dos filmes de fibroína de seda na mesma relação do controle positivo dos testes. Entretanto, o mesmo não foi observado para filmes de quitosana, onde não se verificou a adesão ou proliferação dessas células. Desta forma, pode-se inferir que os filmes de fibroína de seda possuem maior afinidade com células endoteliais quando comparados com os de quitosana (RODAS *et al.*, 2008). Este resultado ressalta o grande potencial de utilização de filmes de fibroína de seda para o recobrimento de biomateriais.

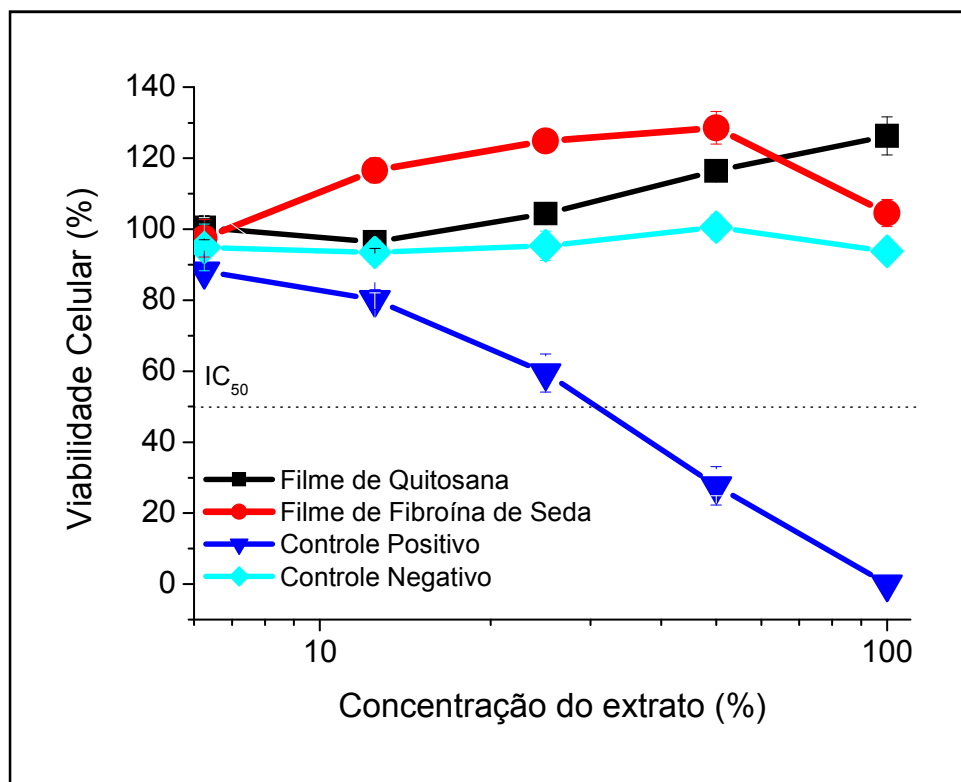


Figura 31 – Viabilidade celular de filmes de fibroína de seda e de quitosana determinada por testes de citotoxicidade *in vitro*.

A compatibilidade da fibroína de seda e da quitosana com diversos tipos de células já foi relatada na literatura (MIM *et al.*, 2004; FREIER *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006). Essa característica é de grande interesse na área de biomateriais, inclusive no campo cardiovascular. A afinidade da fibroína de seda com células endoteliais, por exemplo, pode favorecer o processo de endotelização da válvula de pericárdio bovino *in vitro* ou quando implantada. Essa camada de células endoteliais na superfície da válvula poderia ajudar a manter sua integridade e até mesmo melhorar suas propriedades mecânicas ou ainda evitar o processo de calcificação (BENGTTSSON *et al.*, 1993; FEUGIER *et al.*, 2004; NINA *et al.*, 2004).

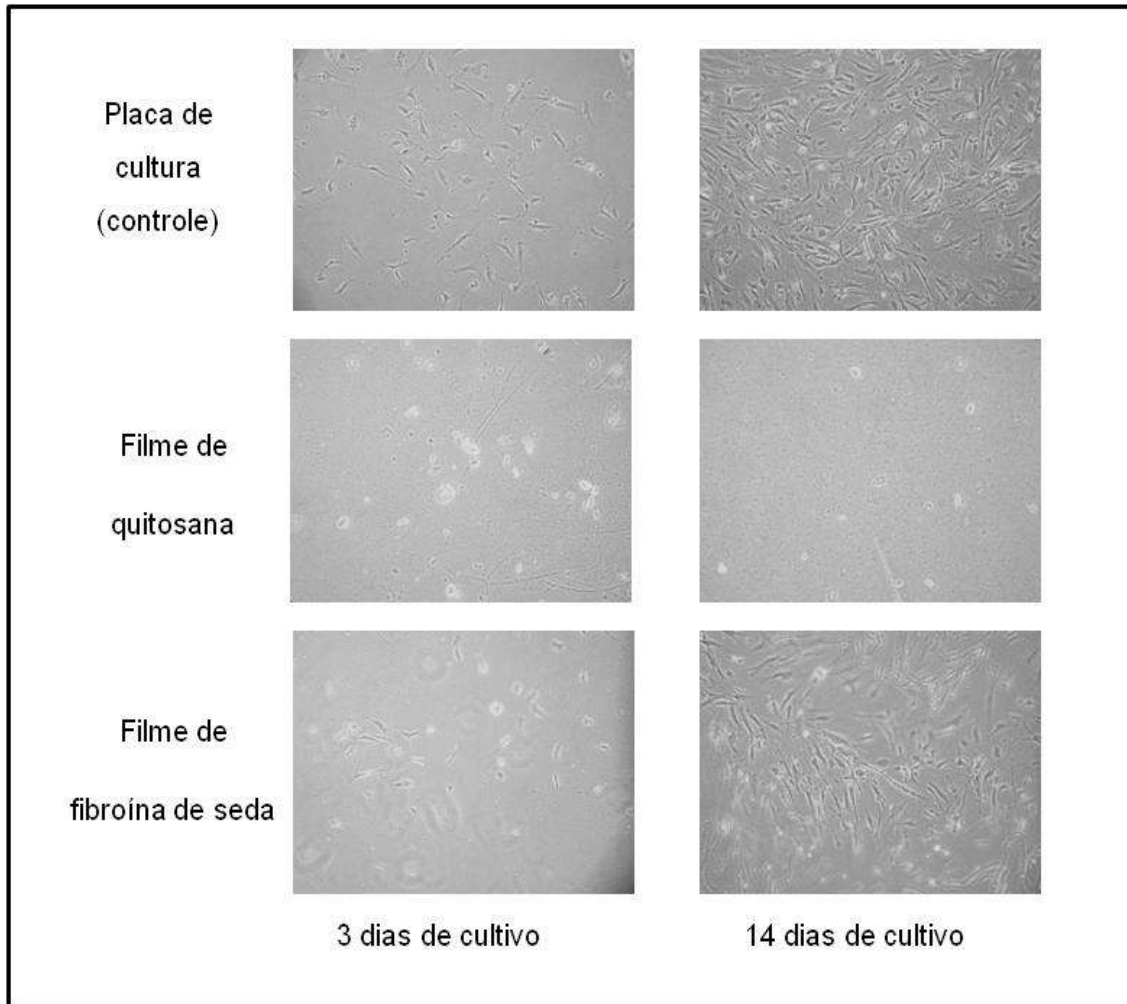


Figura 32 - Imagens obtidas em microscópio óptico invertido para o crescimento de células endoteliais cultivadas sobre placa de cultura (controle) e sobre filmes de quitosana e de fibroína de seda.

5.3 DISCUSSÃO GERAL

A calcificação patológica ainda é um dos grandes problemas associados às biopróteses valvulares. Muitos pesquisadores têm investigado diferentes alternativas para evitar ou mesmo diminuir o tempo de calcificação das válvulas implantadas. O grande desafio, entretanto, é controlar a variabilidade de parâmetros que podem interferir no processo de calcificação das próteses, como a idade ou o metabolismo do paciente que recebe o implante ou características químicas e físicas do material que constitui a válvula (SCHOEN; LEVY, 2005). Assim, entender o mecanismo de calcificação natural dos processos biológicos e a interação entre materiais protéticos com células ou fluidos corpóreos torna-se extremamente importante para o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de aumentar a vida útil e a qualidade de próteses valvulares.

O estudo do potencial de calcificação *in vitro* de materiais desenvolvidos para próteses valvulares é um método utilizado para pré-selecionar potenciais candidatos à substituição dos modelos já existentes. O método não classifica um material como adequado à confecção de válvulas, mas elimina materiais com alta propensão à calcificação (AIMOLI *et al.*, 2006a; KOKUBO e TAKADAMA, 2006; SPANOS *et al.*, 2006; AIMOLI *et al.*, 2007). Os testes de calcificação *in vitro* com fluido corpóreo simulado (SBF), simulam a interação do material com os íons presentes no plasma humano, mas não simulam as interações celulares, enzimáticas ou qualquer outro processo biológico que possa ocorrer num organismo após o implante. Se um material calcificar nos ensaios de calcificação *in vitro*, no caso de válvulas cardíacas ou qualquer material onde a calcificação é um fenômeno indesejado, o mesmo será inadequado para a utilização proposta.

Materiais que não apresentam potencial de calcificação nos primeiros testes *in vitro*, podem ser então submetidos a outros testes mais complexos como ensaios dinâmicos de calcificação *in vitro* usando SBF ou outros componentes do plasma sanguíneo, ou ainda, testes de calcificação *in vivo* (LEE *et al.*, 2000; PETTENAZZO *et al.*, 2001). Os ensaios *in vivo* seriam uma das últimas etapas na

seleção de um material, sendo útil não só na avaliação da calcificação, mas também da biocompatibilidade ou da biodegradabilidade do material no local do implante sob condições similares à que seriam encontradas no corpo humano.

Em se tratando das características do material, a superfície do implante terá uma grande contribuição no processo de calcificação, seja por sua composição química (THOMA; PHILLIPS, 1995) ou mesmo por aspectos físicos como a rugosidade (HSU *et al.*, 2007). Muitas vezes, a química da superfície desempenhará um papel importante no processo de calcificação pela interação ou complexação dos grupos químicos da superfície com os íons cálcio ou fósforo levando à nucleação de cristais de fosfato de cálcio, que dependendo das condições do meio, crescem e se espalham pela superfície do material. Materiais que não apresentam grupos reativos na superfície podem promover a calcificação pela ancoragem dos íons nas suas irregularidades ou poros e assim, iniciar o processo de deposição para formação da fase mineral (AIMOLI *et al.*, 2006a; SPANOS *et al.*, 2006; AIMOLI *et al.*, 2007).

No caso do pericárdio bovino, podem estar envolvidos tanto fatores químicos quanto físicos na deposição dos fosfatos de cálcio. O tratamento com glutaraldeído, necessário para estabilizar a estrutura do pericárdio e diminuir sua imunogenecidade, induz a calcificação do tecido por meios químicos, enquanto que a grande irregularidade da superfície do pericárdio pode promover a ancoragem de cálcio ou mesmo de células, que com o passar do tempo atuam como sítios de nucleação para a formação dos depósitos minerais (ARAVIND *et al.*, 1998; PASQUINO *et al.*, 1994; OSWAL *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a viabilidade de se tratar a superfície do pericárdio bovino através da liofilização e o recobrimento com biopolímeros. A liofilização remove por sublimação todo o líquido contido no interior e na superfície do material sem alterar sua estrutura física. Assim, o material seco apresenta uma maior área superficial e menor resistência à difusão para tratamentos posteriores, como o recobrimento com biopolímeros descrito

nesse trabalho ou tratamentos químicos para evitar a calcificação (AIMOLI *et al.*, 2007, WESKA *et al.*, 2008).

No que diz respeito ao recobrimento do pericárdio bovino com fibroína de seda, observa-se um grande potencial de aplicação desta técnica para retardar a calcificação nas válvulas feitas com pericárdio bovino. Pelos testes de calcificação *in vitro*, observou-se que as amostras de pericárdio bovino não apresentaram deposição de cristais de fosfatos de cálcio após sete dias de ensaio.

Sabe-se, que a fibroína tem uma tendência a mineralização devido à sua afinidade natural com o cálcio (ESTROFF *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005, NOGUEIRA *et al.*, 2008). Assim, poder-se-ia pensar que a longo prazo o pericárdio recoberto com esta proteína poderia sofrer um processo de mineralização acarretando na deterioração da válvula. Além disso, a fibroína é um material biodegradável, e após algum tempo implantada poderia iniciar um processo de degradação e exporia novamente a superfície do pericárdio aos fluidos calcificantes do organismo. Entretanto, a partir dos testes de crescimento celular, uma nova frente de investigação se abre para a aplicação da fibroína de seda no recobrimento de pericárdio bovino para fabricação de válvulas cardíacas. A afinidade da fibroína com células endoteliais poderia favorecer o processo de endotelização da válvula de pericárdio bovino, o que ajudaria a manter sua integridade, melhorando suas propriedades mecânicas ou mesmo evitando o processo de calcificação (BENGTSSON *et al.*, 1993; FEUGIER *et al.*, 2004; NINA *et al.*, 2004). Então, se for possível fazer com que as células cresçam e se espalhem sobre a superfície do pericárdio recoberto com fibroína antes que esta proteína se degrade ou sofra qualquer processo de calcificação, ter-se-ia uma válvula com a superfície endotelizada e provavelmente mais resistente à calcificação e a fadiga.

5.4 CONCLUSÃO PARCIAL

A liofilização de pericárdio bovino e posterior recobrimento com fibroína de seda pode ser uma alternativa aos métodos atuais para diminuir a calcificação nesses materiais quando implantados, pois amostras recobertas com fibroína não apresentaram sinais de deposição de fosfato de cálcio após testes de calcificação *in vitro* e filmes desta proteína suportam a adesão e proliferação de células endoteliais que poderiam atuar como uma proteção à válvula aumentando sua resistência mecânica e diminuindo sua propensão à calcificação.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO FINAL

Foram apresentadas neste trabalho três frentes de estudo da aplicação de materiais derivados de fibroína de seda no campo de biomateriais. A preparação e a caracterização de hidrogéis de fibroína de seda, filmes LbL e filmes monocamada para recobrimento de superfícies foram estudadas e estão descritas nos capítulos precedentes.

A fibroína de seda se mostrou como matéria-prima promissora para produção de biomateriais tanto na forma de hidrogéis como na forma de filmes. O potencial de calcificação *in vitro* desta proteína é influenciado pela sua forma de processamento, mais especificamente pelas características da superfície dos materiais derivados da mesma. Assumindo-se que a química da superfície de filmes e hidrogéis de fibroína de seda seja similar, o potencial de calcificação destes materiais seria determinado pela estrutura física de sua superfície (THOMA; PHILLIPS, 1995; HSU *et al.*, 2007; WESKA *et al.*, 2009). Hidrogéis de fibroína de seda apresentaram grande potencial de calcificação *in vitro* enquanto que pericárdio bovino recoberto com filme desta proteína não apresentou sinais de calcificação após sete dias em contato com a solução calcificante.

O hidrogel de fibroína de seda e o filme desta proteína que recobre o pericárdio bovino são derivados de solução dialisada de fibroína de seda dissolvida em solvente ternário contendo CaCl_2 , etanol e água e a configuração molecular da proteína nestas duas formas é a princípio semelhante. Partindo deste pressuposto e avaliando os diferentes resultados para os experimentos de calcificação *in vitro*, assume-se que a deposição de fosfatos de cálcio é então determinada pela estrutura física da superfície destes materiais. A presença de poros e irregularidades na superfície dos hidrogéis de fibroína de seda pode servir como pontos de ancoragem e difusão de íons que iniciariam o processo de mineralização (AIMOLI *et al.*, 2006a; SPANOS *et al.*, 2006; AIMOLI *et al.*, 2007).

No caso de filmes de fibroína de seda a calcificação será controlada pela química da superfície, já que não haveria poros ou irregularidades que pudessem atuar como pontos de ancoragem de íons (AIMOLI *et al.*, 2006).

Vale ressaltar, que o pericárdio bovino apresenta uma estrutura altamente irregular e porosa que se mantém mesmo após o recobrimento com biopolímeros. Entretanto tais amostras não calcificaram durante os experimentos de calcificação, indicando que a cobertura com uma fina camada de filme possa atuar como proteção à ancoragem de íons, visto que esta camada poderia diminuir a rugosidade da superfície destes materiais. Outra hipótese seria a interação das moléculas de fibroína de seda e colágeno que modificaria a química da superfície destes materiais inibindo grupos que poderiam interagir com íons da solução calcificante.

A compatibilidade celular da fibroína de seda foi atestada para esta proteína na forma de hidrogel e na forma de filme por testes de citotoxicidade *in vitro*. O que indica que a fibroína de seda pode ser citocompatível independente da forma em que é processada. Além disso, filmes de fibroína de seda apresentaram grande afinidade com células endoteliais, pois promoveram a adesão e a proliferação destas células durante experimentos *in vitro*. Esta característica evidencia a possibilidade de aplicação de filmes de fibroína de seda como substratos para crescimento celular, onde uma matriz biodegradável é desejada. Assim, para o caso de recobrimento de biomateriais como a válvula cardíaca de pericárdio bovino, estes filmes poderiam induzir a endotelização do material protegendo a válvula contra calcificação e melhorando suas propriedades mecânicas, o que poderia levar ao aumento da sua vida útil (BENGTTSSON *et al.*, 1993; FEUGIER *et al.*, 2004; NINA *et al.*, 2004).

Na forma de filmes LbL ou multicamadas, a fibroína de seda pode ser aplicada sozinha (WANG *et al.*, 2005b) ou em combinação com outros biopolímeros (CAI *et al.*, 2007) com o intuito de funcionalizar a superfície de materiais. No estudo desenvolvido neste trabalho, filmes LbL de fibroína de seda e quitosana foram preparados e caracterizados. A tecnologia utilizada para

preparação destes filmes permitiu controlar o alinhamento e a orientação de fibras de fibroína de seda em duas direções na superfície dos filmes. Dado que os biopolímeros utilizados na construção dos filmes LbL são compatíveis com diversos tipos de células e não tóxicos, o alinhamento das fibras em sua superfície poderia agir como um guia para a deposição e proliferação celular. Além disso, os filmes compostos de fibroína de seda e quitosana poderiam agregar propriedades destes dois biopolímeros em um só material, como por exemplo, a alta afinidade da fibroína de seda com diversos tipos de células e sua alta resistência mecânica combinadas com as propriedades antibacterianas e hemostáticas da quitosana (KWEON *et al.*, 2001; FEUGIER *et al.*, 2004; GOBIN *et al.*, 2005; MEINEL *et al.*, 2005; BADAMI *et al.*, 2006; BURKATOVSKAYA *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2007).

Observa-se, pelos resultados apresentados, que a fibroína de seda exhibe seu potencial em aplicações variadas dentro do campo de biomateriais, dependendo da forma e das condições experimentais que a mesma é processada. Assim, o objetivo deste trabalho foi alcançado, evidenciando a importância do estudo de materiais derivados desta proteína para aplicações na área de regeneração óssea, funcionalização de superfície de materiais e como substratos de crescimento celular.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO FINAL

A fibroína de seda é uma matéria-prima promissora para produção de biomateriais tanto na forma de hidrogéis como na forma de filmes para recobrimento de biomateriais ou funcionalização de superfícies.

Hidrogéis de fibroína de seda podem ser obtidos diretamente do processo de diálise de uma solução de fibroína de seda. Com este método é possível obter uma estrutura tridimensional porosa capaz de depositar cristais de fosfatos de cálcio precursores de hidroxiapatita em testes de calcificação *in vitro*, o que torna estes materiais potenciais candidatos como matrizes para regeneração óssea.

Soluções dialisadas de fibroína de seda podem ser empregadas para recobrir superfície de materiais. Utilizando-se um método de deposições sucessivas de filmes de fibroína de seda e quitosana é possível produzir filmes com alinhamento bi-direcional de fibras que podem ser estudadas para orientar a adesão e proliferação celular ou ainda ser adicionados na fabricação de outros filmes poliméricos com o intuito de aumentar sua resistência mecânica ou biocompatibilidade.

Solução dialisada de fibroína de seda pode ser empregada para recobrir pericárdio bovino utilizado na fabricação de válvulas cardíacas. Amostras recobertas com esta proteína não apresentaram sinais de calcificação em testes de calcificação *in vitro*. A afinidade da fibroína com células endoteliais poderia ser explorada com o intuito de induzir a endotelização da válvula de pericárdio bovino com o objetivo de aumentar sua resistência mecânica ou à calcificação, aumentando assim, a sua vida útil.

CAPÍTULO 8

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho descreveu o potencial de aplicação de fibroína de seda como biomaterial englobando três possíveis formas de processamento: hidrogel, filme LbL ou multicamadas e filme monocamada para funcionalização de superfícies. Sugestões para a continuidade deste estudo nas três diferentes vertentes são descritos a seguir:

- Hidrogéis de fibroína de seda
 - Investigar as propriedades dos hidrogéis preparados a diferentes temperaturas, já que as caracterizações químicas e físicas aqui apresentadas tratam de amostras produzidas a 20 °C;
 - Investigar a degradação dos hidrogéis observada durante os testes de calcificação *in vitro* verificando se a mesma está correlacionada à estrutura molecular da proteína, ou seja, à formação de folhas- β ;
 - Estudar e caracterizar hidrogéis de fibroína de seda produzidos em moldes para preenchimento ósseo.
 - Investigar a gelificação da solução de fibroína de seda *in situ* por aumento da temperatura local ou outros métodos como radiação da solução ou adição de agentes capazes de acelerar a gelificação.
 - Estudar os parâmetros termodinâmicos e cinéticos envolvidos no processo de gelificação da solução de fibroína de seda para determinar o mecanismo de gelificação da solução desta proteína.

- Filmes LbL de fibroína de seda e quitosana
 - Investigar as propriedades mecânicas de filmes de fibroína de seda e quitosana por buckling, nanoidentação ou outra técnica adequada para tal;
 - Avaliar a adesão e crescimento celular em filmes de fibroína de seda e quitosana com fibras orientadas em sua superfície para verificar o potencial

desses filmes de guiar a adesão e proliferação das células na direção das fibras;

- Avaliar as propriedades de filmes LbL de fibroína de seda com outros polímeros naturais ou sintéticos.
- Investigar o efeito dos solventes na dissolução da fibroína de seda e a formação de fibrilas nas soluções desta proteína.

➤ Filmes de fibroína de seda para recobrimento de biomateriais

- Avaliar a adesão e o crescimento de células endoteliais no pericárdio bovino recoberto com fibroína de seda, assim como a biodegradabilidade dos filmes;
- Avaliar o potencial de calcificação de pericárdio bovino recoberto com fibroína de seda através de experimentos dinâmicos de calcificação *in vitro*;
- Estudar a possibilidade de incorporação de fármacos, como anticoagulantes ou medicamentos para inibir calcificação, nos filmes de fibroína de seda recobrindo o pericárdio bovino.

REFERÊNCIAS

- ACHARIA, C., GHOSH, S.K., KUNDU, S.C. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, p. 2827-2836, 2008.
- AIMOLI, C.G., BEPPU, M.M. Precipitation of calcium phosphate and calcium carbonate induced over chitosan membranes: A quick method to evaluate the influence of polymeric matrices in heterogeneous calcification. *Colloids and Surface B*, v. 53, p. 15-22, 2006.
- AIMOLI, C.G., TORRES, M.A., BEPPU, M.M. Investigations into the early stages of “in vitro” calcification on chitosan films. *Materials Science and Engineering C*, v. 26, n. 1, p. 78-86, 2006a.
- AIMOLI, C.G., NOGUEIRA, G.M, NASCIMENTO, L.S., BEPPU, M.M., BACETI, A., POLAKIEWICZ, B. Teste de calcificação in vitro de pericárdio bovino modificado e membranas de fibroína de seda. *In IV COLAOB*, 2006, Caxambu.
- AIMOLI, C.G., NOGUEIRA, G.M, NASCIMENTO, L.S., BACETI, A., LEIRNER, A.A., MAIZATO, M.J.S., HIGA, O.Z., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R.N.M., BEPPU, M.M. Lyophilized Bovine Pericardium Treated With a Phenethylamine-Diepoxy as an Alternative to Preventing Calcification of Cardiovascular Bioprosthesis: Preliminary Calcification Results. *Artificial Organs*, v. 31, n. 4, p. 278-283, 2007.
- ALTMAN, G.H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R.L., CHEN, J., LU, H., RICHMOND, J., KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, v.24, p. 401-416, 2003.
- ARAVIND, S.K., PAUL, W., VASUDEV, S.C., SHARMA, C.P. Polyethylene Glycol (PEG) Modified Bovine Pericardium as a Biomaterial: A Comparative Study on Immunogenicity. *Journal of Biomaterials Applications*, v.13, p. 158-165, 1998.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA (ABC-COSMETOLOGIA),
Cosméticos no século XXI, In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de
Químicos Cosméticos 2, 1995.
- AYUTSEDE, J., Regeneration of Bombyx Mori Silk Nanofibers and Nanocomposite
Fibrils by the Electrospinning Process. PhD thesis, Drexel University,
Philadelphia, PA, USA, 2005.
- AYUTSEDE, J., GANDHI, M., SUKIGARA, S., MICKLUS, M., CHEN, H., KO, F.
Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: characterization of
electrospun nonwoven mat. Polymer, v.46, p. 1625–1634, 2005.
- AZEVEDO, T.L.F, BERTONHA, A., GONÇALVES, A.C.A. Uso de hidrogel na
agricultura. Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais v.1, n.1, p. 23-31,
2002.
- BADAMI, A.S., KREKE, M.R., THOMPSON, M.S., RIFFLE, J.S., GOLDSTEIN,
A.S. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of
osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. Biomaterials, v.27,
p. 596-606, 2006.
- BENGTSSON, L., RADEGRAN, K., HAEGERSTRAND, A. In vitro
endothelialization of commercially available heart valve bioprotheses with
cultured adult human cells. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, v.7, p.
393-398, 1993.
- BEPPU, M.M., SANTANA, C.C. PAA influence on chitosan membrane calcification.
Materials Science and Engineering C, v.23, p. 651-658, 2003.
- BEPPU, M.M., TORRES, M.A., AIMOLI, C.G., GOULART, G.A.S., SANTANA, C.C.
In vitro mineralization on chitosan using solutions with excess of calcium and
phosphate ions. Journal of Materials Science Research, v.20, n.12, p.3303-3311,
2005.
- BONUCCI, E. Biological Calcification: Normal and Pathological Process in the
Early Stages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.

- BURKATOVSKAYA, M., TEGOS, G.P., SWIETLIK, E., DEMIDOVA, T.N., CASTANO, A.P., HAMBLIN M.R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*, v. 27, p. 4157-4164, 2006.
- CAI, K., HU, Y., JANDT, D. Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* , v.82, p. 927-935, 2007.
- CALVERT, P., RIEKE, P. Biomimetic mineralization in and on polymers. *Chemical Materials* 8, p. 1715-1727, 1996.
- CHEN, X., LI, W., YU, T. Conformation transition of silk fibroin induced by blending chitosan. *Journal of Polymer Science B*, v.35, n.14, p. 2293-2296, 1997a.
- CHEN, X., LI, W., ZHONG, W., LU, Y., YU, T. pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network. *Journal of Applied Polymer Science* v.65, p. 2257-2262, 1997b.
- CHEN, X., KNIGHT, D.P., SHAO, Z., VOLLRATH, F. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. *Polymer*, v.42, p. 9969-9974, 2001.
- DAHM, M., RUHE, J., BERCHTHOLD, B., PRUFER, D., PRUCKER, O., CHANG, B.J., WALLRATH, A., OELERT, H. Ultrathin polymer monolayers for promotion of cell growth on bioprosthetic materials - Evolution of a new concept to improve long term performance of biologic heart valves. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v.14, n.4, p. 419-425, 2004.
- DECHER, G., SCHLENOFF, J.B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Wiley-VCH: New York, 2003.
- DE ROSSI, D., KAJIWARA, K., OSADA, Y., YAMAUCHI, A. *Polymer Gels – Fundamentals and Biomedical Applications*. Plenum Press, 1991.
- DUNCAN, J.S. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 4th edition Butterworth Heinemann, 1992.

- ELLIOTT, J.C. Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Holanda: Elsevier Science, 1994.
- ESTROFF, L., ADDADI, L., WEINER, S., HAMILTON, A.D. An organic hydrogel as a matrix for the growth of calcite crystals. *Journal of Organic Biomolecular Chemistry*, v.2, p. 137-141, 2004.
- EVERHART, D.S., DI LUCCIO, R.C., YAHIAGUI, A.M., WADE, B., TYRREL, D.J., GADSHY, E.D., GILLBERG-LAFORCE, G.E. Silk protein treatment composition and treated substrate for transfer to skin. United States Patent 6497893, 2002.
- FANG, J.Y., CHEN, J.P., LEU, Y.L., WANG, H.Y. Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.54, n.2 156-162, 2006.
- FARFÁN, J.A. Química de proteínas aplicado a ciência e tecnologia de alimentos. Campinas, 1990.
- FEUGIER, P., BLACK, R.A., HUNT, J.A., HOW, T.V. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*, v.26, p. 1457-1466, 2005.
- FINE CO LTDA: http://finecoltd.en.ec21.com/GC00527918/Silk_Science.html (último acesso: 12/08/2008).
- FINI, M., MOTTA, A., TORRICELLI, P., GIAVARESI, G., ALDINI, N.N., TSCHON, M., GIARDINO, R., MIGLIARESI, C. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials*, v.26, p. 3527–3536, 2005.
- FNCA 2002 – WORKSHOP ON APPLICATION OF ELECTRON ACCELERATOR. Radiation processing of silk protein bilateral research cooperation OAEP AND JAERI, Takasaki-Japan.
- FORSÉN, S., KORDEL, J. Calcium in biological systems. John Wiley & Sons, New York: 1997.

- FREDDI, G., PESINA, G., TSUKADA, M., 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.
- FREIER, T., KOH, H.S., KAZAZIAN, K., SHOICHET, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials*, v.26, n.29, p. 5872-5878, 2005.
- FREYMAN, T.M., YANNAS, I.V., GIBSON, L.J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science*, v.46, p. 273-282, 2001.
- GOBIN, A.S., FROUDE, V.E., MATHUR, A.B., Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research: A*, v. 74A, p. 465-473, 2005.
- HOLANDA, A.J., VOLPON, J.B., SHIMANO, A.C. Efeitos da orientação de fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e impacto de ossos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.34, n.11-12, p. 579-584, 1999.
- HOSSAIN, K.S., OHYAMA, E., OCHI, A., MAGOSHI, J., NEMOTO, N. Dilute-solution properties of regenerated silk fibroin. *Journal of Physical Chemistry B*, v.107, p. 8066-8073, 2003.
- HSU, S.H., LIU, B.S., LIN, W.H., CHIANG, H.C., HUANG, S.C., CHENG, S.S. Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v.17, p. 53–68, 2007.
- JIANG, C., WANG, X., GUNAWIDJAJA, R., LIN, Y.H., GUPTA, M.K., KAPLAN, D.L., NAIK, R.R., TSUKRUK, V.V. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. *Advanced Functional Materials*, v.17, p. 2229-2237, 2007.
- JIN, H., FRIDRIKH, S.V., RUTLEDGE, G.C., KAPLAN, D.L. Electrospinning Bombyx mori Silk with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*, v.3, p. 1233-1239, 2002.

- KAPLAN, D.L., KIM, U., PARK, J., JIN H. Aqueous silk fibroin solution having a specific concentration is useful for producing fiber, foam, fil, silk hydrogel, scaffolds and drug delivery meshes. Derwent Innovations, Patent number: W02005012606-A2, 2005.
- KIM, U, PARK, J., LI, C., JIN, H.J., VALLUZI, R., KAPLAN, D.L. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, v.5, p. 786-792, 2004.
- KOKUBO, T., KUSHITANI, H., SAKKA, S., KITSUGI, T., YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.24, n.6, p. 721-734, 1990.
- KOKUBO, T., TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?. *Biomaterials*, v.27, n.15, p. 2907-2915, 2006.
- KONG, X.D, CUI, F.Z., WANG, X.M., ZHANG, M., ZHANG, W. Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. *Journal of Crystal Growth*, v.270, p. 197-202, 2004.
- KRINGS, M., KANELLOPOULOU, D., MAVRILAS, B., GLASMACHER, B. *In vitro* pH-controlled calcification of biological heart valve prostheses. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, v.37, n.6, p. 432-435, 2006.
- KWEON, H.Y., UM, I.C., PARK, Y.H. Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin/chitosan blend film. *Polymer*, v.42, p. 6651-6656, 2001.
- LEE, W.K., PARK, K.D., HAN, D.K., SUH, H., PARK, J.C., KIM, Y.H. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. *Biomaterials*, v.21, n.22, p. 2323-2330, 2000.
- LEE, D., COHEN, R.E., RUBNER M.F., Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles. *Langmuir*, v. 21, p. 9651-9659, 2005.

- LEHNINGER, A.L. Bioquímica 1 – Componentes moleculares das células, 2º ed., 1976.
- LI, M., LU, S., WU, Z., TAN, K., MINOURA, N., KUGA, S. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.30, p. 89-94, 2002.
- LI, M., OGISO, M., MINOURA, M., Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials*, v. 24, p.357-365, 2003.
- LI, C.M., JIN, H.J., BOTSARIS, G.D., KAPLAN, D.L. Silk apatite composites from electrospun fibers. *Journal of Materials Research* v.20, n.12, p.3374-3384, 2005.
- LIANG, D., HSIAO, B.S., CHU, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p. 1392-1412, 2007.
- LIMA, E. C.O. Gelificação termosensível em soluções aquosas de polifosfato de alumínio. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas 1995.
- LV, Q., HU, K., FENG, Q.L., CUI, F. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: Preparation, properties, and cytocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v.84, n.1, p. 198-207, 2007.
- MA, Z., KOTAKI, M., INAI, R., RAMKRISHNA, S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering*, v.11, p. 101-109, 2005.
- MAIZATO, M.J.S., HIGA, O.Z., MATHOR, M.B., CAMILLO, M.A.P., SPENCER, P.J., PITOMBO, R.N., ZAVAGLIA, C.A.C., LEIRNER, A.A. Glutaraldehyde-treated Bovine Pericardium: Effects of Lyophilization on Cytotoxicity and Residual Aldehydes. *Artificial Organs*, v.27, n.8, p. 692-694, 2003.
- MATSUMOTO, A., CHEN, J., COLLETTE, A.L., KIM, U-J., ALTMAN, G.H., CEBE P., KAPLAN D.L. Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, p.21630-21638, 2006.
- MEGEED, Z., HAIDER, M., LI, D., O'MALLEY Jr, B.W., CAPPELLO, J., GHANDEHARI, H. In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike

- hydrogels for cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* v.94, p. 433-445, 2004.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., KARAGEORGIO, V., KIRKER-HEADE, C., MC COOLE, J., GRONOWICZF, G., ZICHNERB, L., LANGERA, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*, v.26, p. 147-155, 2005.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., BETZ, O., FAJARDO, F., MERKLE, H.P., LANGER, R., EVANS C.H., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN D.L. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: Comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, v. 27, p.4993-5002, 2006.
- MIKHEEV, Y.A., GUSEVA, L.N., DAVYDOV, E.Y., ERSHOV, A. The hydration of hydrophobic substances. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, v. 81, p. 1897-1913, 2007.
- MIN, B.M., JEONG, L., NAM, Y.S., KIM, J.M., KIM, J.Y., PARK, W.H. Formation of silk fibroin matrices with different texture an its cellular response to normal human keratinocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.34, p. 281-288, 2004.
- MORI, H., TSUKADA, M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *Molecular Biotechnology*, v.74, p.95-103, 2000.
- MURAD, J.R.L. As propriedades físicas, mecânicas e meso-estrutural do bambu *Guadua weberbaueri* do Acre. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, Rio de Janeiro 2007.
- NAZAROV, R., JIN, H.J., KAPLAN, D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, v.5, p. 718-726, 2004.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3td edition, 2000.

- NINA, V.J.S., POMERANTZEFF, P.M.A., CASAGRANDE, I.S.J., CHUNG, D., BRANDÃO, C.M.A., NASCIMENTO, S.A.B., BENVENUTI, L.A., OLIVEIRA, S.A. Endotelização in vivo das biopróteses cardíacas: preservação convencional versus não-aldeídica. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v.19, n.2, p.144-151, 2004.
- NOGUEIRA, G.M. Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas 2005.
- NOGUEIRA, G.M., AIMOLI, C.G., WESKA, R.F., NASCIMENTO, L.S., BEPPU, M.M. In vitro calcification of silk fibroin hydrogel. *Key Engineering Materials*, v.361-363, p. 503-506, 2008.
- NOGUEIRA, G.M., AIMOLI, C.G., WESKA, R.F., LEIRNER, A.A., MAIZATO, M.J.S., HIGA, O.Z., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R.N.M., BEPPU, M.M. Study of Morphology of Cardiac Valves (Human and Bovine Pericardium) after *In Vivo* Calcification. *Key Engineering Materials*, v. 396-398, p. 191-194, 2009 (artigo aceito para publicação).
- OHGO, K., ZHAO C., KOBAYASHI M., ASAKURA T. Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer*, v.44, p. 841-846, 2003
- OLIVEIRA, A.P.C. Produção e Caracterização de Partículas de Hidrogéis para Aplicações em Cosméticos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas 2004.
- OTTENBRITE, R.M., HUANG, S.J., PARK, K. Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications. *American Chemical Society Symposium Series* v.627, 1996.
- OSWAL, D., KOROSSIS, S., MIRSADRAEE, S., WILCOX, H., WATTERSON, K., FISHER, J., INGHAM, E. Biomechanical Characterization of Decellularized and Cross-Linked Bovine Pericardium. *The Journal of Heart Valve Disease*, v.16, n.2, p. 165-174, 2007.

- PASQUINO, E., PASCALE, S., ANDREON, M., RINALDI, S., LABORDE, F., GALLONI, M. Bovine pericardium for heart valve bioprostheses: *in vitro* and *in vivo* characterization of new chemical treatments. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v.5, n.12, p. 850-854, 1994.
- PAYNE, G.F., RAGHAVAN, S.R. Chitosan: a soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components. *Soft Matter*, v.3, n.5, p. 521-527, 2007.
- PETTENAZZO, E., DEIWICK, M., THIENE, G., MOLIN, G., GLASMACHER, F., MARTIGNAGO, BOTTIO, T., REUL H., VALENTE, M. Dynamic *in vitro* calcification of bioprosthetic porcine valves: Evidence of apatite crystallization. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery*, v.121, n.3, p. 500-509, 2001.
- PHILLIPS D.M., DRUMMY L.F., CONRADY D.G., FOX D.M., NAIK R.R., STONE M.O., TRULOVE P.C., DE LONG H.C., MANTZ R.A. Dissolution and regeneration of *Bombyx mori* silk fibroin using ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, p. 14350-14351, 2004.
- PUTTHANARAT, S., STRIBECK, N., FOSSEY, S.A., EBY, R.K., ADAMS, W.W. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*, v.41, p. 7735–7747, 2000.
- PATHAK, Y., SCHOEN, F.J., LEVY, R.J. Pathologic calcification of biomaterials. In: Ratner, B.D. e Hoffman, A.S., Schoen, F.J. e Lemons J.E., eds. *Biomaterials science - an introduction to materials in medicine*. California: Academic Press, p. 272-81, 1996.
- PINTO, T.J.A., SAITO, T., GLEREAN, A. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio bovino e Dacron(R). *Revista Saúde Pública*, v.27, n.3, p. 185-189, 1993.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. *Biomaterials Science-An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 1996.
- REGÍ, V.M., CALBERT, J.M.G. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* v.32, p. 1-31, 2004.

- RODAS, A.C.D., NOGUEIRA, G.M., BEPPU, M.M., POLAKIEWICZ, B., MAIZATO, M.J.S., LEINER, A.A., PITOMBO, R.N.M., HIGA, O.Z. Adherence and growth of endothelial cells on silk fibroin dense membranes. *In: 8th World Biomaterials Congress*, 2008, Amsterdam.
- SANTIN, M., MOTTA, A., FREDDI, G., CANNAS, M., *In vitro* evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.46, p.382-389, 1999.
- SASHINA, E.S., BOCHEK, A.M., NOVOSELOV, N.P., KIRICHENKO, D.A. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russian Journal of Applied Chemistry* v.79, n.6, p. 869-876, 2006.
- SEDGWICK, H. Colloidal metastability. PhD these, School of Physics, University of Edinburgh, 2003.
- SCHONHOFF, M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* v.8, p. 86-95, 2003.
- SCHOEN, F.J., LEVY, R.J. Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *The Annals of Thoracic Surgery*, v.79, p. 1072-1080, 2005.
- SERVOLI, E., MANIGLIO, D., MOTTA, A., PEDRAZZER, R., MIGLIARESI, C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. *Macromolecular Bioscience*, v. 5, p. 1175-1183, 2005.
- SIONKOWSKA, A., WISNIEWSKI, M., SKOPINSKA, J., POGGI, G.F., MARSANO, E., MAXWELL, C.A., WESS, T.J. Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, v.91, p. 3026-3032, 2006.
- SPANOS, N., MISIRLIS, D. Y., KANELLOPOULOU, D. G., KOUTSOUKOS, P. G. Seeded growth of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Journal of Materials Science*. V.41, n.6, p. 1805-1812, 2006.

- STAFFORD, C.M., HARRISON, C., BEERS, K.L., KARIM, A., AMIS, E.J., VAN LANDINGHAN, M.R., KIM, H.C., VOLKSEN, W., MILLER, R.D., SIMONY E. A buckling-based metrology for measuring the elastic moduli of polymeric thin films. *Nature Materials* v.3, p. 545-550, 2004.
- TAKETANI, I, NAKAYAMA, S, NAGARE, S, SENNA, M. The secondary structure control of silk fibroin thin films by post treatment. *Applied Surface Science*, v.244, p. 623–626, 2005.
- TAMADA, Y. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromolecules*, v.6, p. 3100-3106, 2005.
- TANAKA, K., KAJIYAMA, N., ISHIKURA, K., WAGA, S., KIKUCHI, A., OHTOMO, K., TAKAGI, T., MIZUNAO, S. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1432, p. 92-103, 1999.
- TESTER, J.W., MODELL, M. *Thermodynamics and its applications*, 3rd Edition, 1996.
- THOMA, R.J., PHILLIPS, R.E. The role of material surface chemistry in implant device calcification: a hypothesis. *Journal of Heart Valve Disease*, v.4, n.3, p. 214-221, 1995.
- TÔRRES, R.B. Efeito da hidratação hidrofóbica e da interação hidrofóbica sobre o volume molar em excesso de soluções líquidas binárias de água-álcool a diferentes temperaturas e à pressão atmosférica: Estudo experimental e modelagem. Tese de doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2004.
- TSUKADA, M., OBO, M., KATO, M., FREDDI, G., ZANETTI, F.J. Structure and Dyeability of Bombyx-Mori Silk Fibers with Different Filament Sizes. *Applied Polymer Science*, v. 60, p.1619-1627, 1996.

- UNGER, R.E., WOLF, M., PETERS, K., MOTTA, A., MIGLIARESI, C., KIRKPATRICK, J. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, p. 1069-1075, 2004.
- UM, I.C., KWEON, J.Y., PARK, Y.H., HUDSON, S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.29, p.91-97, 2001.
- VANDE VORD, P.J., MATTHEW, H.W., DE SILVA, S.P., MAYTON, L., WU, B., WOOLEY, P.H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.59, p.58, 2002.
- WANG, L., NEMOTO, R., SENNA, M. Changes in microstructure and physico-chemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content. *Journal of the European Ceramic Society* v.24, p.2707-2715, 2004.
- WANG, H., ZHANG, Y., SHAO, H., HU, X. A study on the flow stability of regenerated silk fibroin aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.36, p. 66-70, 2005a.
- WANG, X., KIM, H.J., XU, P., MATSUMOTO, A., KAPLAN, D.L. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir*, v.21, p. 11335-11341, 2005b.
- WANG, Y., KIM, H.J., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, v.27, p. 6084-6082, 2006.
- WESKA, R.F., NOGUEIRA, G.M., AIMOLI, C.G., NASCIMENTO, L.S., MAIZATO, M.J.S., LEIRNER, A.A., BEPPU, M.M. Recobrimento de pericárdio bovino liofilizado com soluções de quitosana e fibroína de seda para a prevenção da calcificação de próteses cardiovasculares: resultados preliminares. *In: V COLAOB*, 2008, Ouro Preto.

- WESKA, R.F., NOGUEIRA, G.M., VIEIRA, JR. W., BEPPU, M.M. Porous silk fibroin membrane as a potential scaffold for bone regeneration. *Key Engineering Materials*, v.396-398, p. 187-190, 2009 (artigo aceito para publicação).
- WILLIAMS, D.F., *Progress in Biomedical Engineering: Definitions in Biomaterials*. Proceedings of a conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier 1987, p.9.
- WU, Z., LEE D., RUBNER M.F., COHEN R.E., Structural Color in Porous, Superhydrophilic, and Self-Cleaning SiO₂/TiO₂ Bragg Stacks. *Small*, v.3, p. 1445-1451, 2007.
- YAMINSKY, V. V., VOGLER, E. A. Hydrophobic hydration. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 6, p. 342-349, 2001.
- ZHAI, L., BERG, M.C., CEBECI, F.C., KIM, Y., MILWID, J.M., RUBNER, M.F., COHEN, R.E. Patterned superhydrophobic surfaces: Toward a synthetic mimic of the namib desert beetle. *Nano Letters*, v. 6, p. 1213-1217, 2006.
- ZHANG, S., GONSALVES, K.E. Synthesis of calcium carbonate-chitosan composites via biomimetic processing. *Journal of Applied Polymer Science* v.56, p. 687-695, 1995.
- ZHOU, P., XIE, X., KNIGHT, D.P., ZONG, X.H., DENG, F., YAO, W.H. Effects of pH and calcium ions on the conformational transitions in silk fibroin using 2D Raman correlation spectroscopy and ¹³C solid-state NMR. *Biochemistry*, v.43, p. 11302-11311, 2004.