

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**

**ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO E DA CALCIFICAÇÃO *IN VITRO* DE  
MEMBRANAS DE FIBROÍNA DE SEDA PARA APLICAÇÃO COMO  
BIOMATERIAL**

Autora: Raquel Farias Weska

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Masumi Beppu

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

Campinas

2009

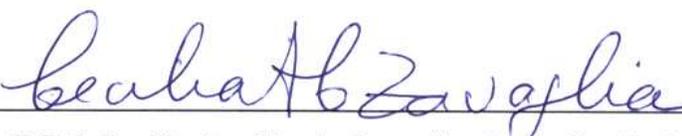


Dissertação de Mestrado defendida por **Raquel Farias Weska** e aprovada em **5 de maio de 2009** pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Masumi Beppu (orientadora)  
Universidade Estadual de Campinas – DTF/FEQ



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia (titular)  
Universidade Estadual de Campinas – FEM

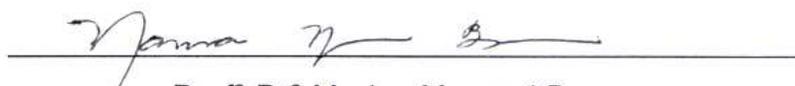


---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Petrilli Bavaresco (titular)  
Universidade Estadual de Campinas – COTUCA

Campinas, 5 de maio de 2009.

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



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Masumi Beppu

Aos meus pais, Carlos e Rosangela.

Ao meu avô, Czeslaw.

## AGRADECIMENTOS

É difícil encontrar as palavras mais bonitas para reconhecer, e agradecer, àqueles que de uma forma ou de outra me ajudaram a concluir a primeira etapa da minha vida profissional. A preparação de uma dissertação é uma tarefa muitas vezes solitária, mas cada dia de dedicação só foi possível graças a outras pessoas, que por meio de conselhos, ensinamentos, apoio, ou a simples torcida, mesmo sem saber ao certo o que é feito num laboratório de pesquisa, foram fundamentais antes e durante a realização deste trabalho.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Rosângela, que mesmo de longe, nos momentos bons e ruins, estiveram sempre presentes com todo o apoio e carinho do mundo, e à minha irmã Tatiana, que estava comigo no dia da defesa. Também agradeço, com saudades, ao meu avô polonês Czeslaw Weska, que sempre torceu muito por mim e, se ainda estivesse aqui, certamente estaria muito orgulhoso de ver a “netinha” se tornar mestre.

Ao Henrique, pelo carinho e paciência, e à sua família, pela ótima companhia. Minha vida em Campinas é mais feliz desde que os conheci.

Ao professor Luiz Antonio de Almeida Pinto, da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, meu orientador durante toda a graduação em Engenharia de Alimentos. Sua dedicação à pesquisa e aos alunos é algo admirável e sem igual, e seus conselhos e lições me acompanharão sempre.

À minha orientadora, professora Marisa Masumi Beppu, pelo voto de confiança, amizade, profissionalismo, e por todas as boas oportunidades que tem me oferecido, e aos demais amigos do LEQUIP, Laboratório de Engenharia e Química de Produtos, em especial à Grínia Nogueira, Wellington Vieira e Mariana Moraes, pelas importantes contribuições.

À Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pela oportunidade de realização deste trabalho, e à FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

À técnica Claudenete Leal, da Faculdade de Engenharia Mecânica, pelas análises de SEM/EDS, e aos técnicos Kelly Palma e Celso Camargo, da

Faculdade de Engenharia Química, pelas análises de SEM e pelo auxílio com o liofilizador, respectivamente.

À Dr<sup>a</sup> Andrea Rodas e à Dr<sup>a</sup> Olga Higa, do IPEN, pela realização dos testes de citotoxicidade e pelos conselhos valiosos da Andrea sobre esterilização.

À Andrea Bierhalz e Mariana Altenhofen, do LEPPBio/DTF/FEQ, coordenado pelo professor Theo Kieckbusch, pelo auxílio na realização dos testes mecânicos, e à Cristina “Kity” Yoshida, do LEB/DPQ/FEQ, coordenado pela professora Telma Teixeira Franco, pelo uso do ultrafreezer.

Ao Dr. Marcos da empresa Acecil, e aos técnicos Elisabeth Somessari e Carlos Silveira, do IPEN, por gentilmente realizarem as esterilizações das membranas de fibroína com óxido de etileno e radiação gama, respectivamente.

“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia de sua vida.”

(Confúcio)

## RESUMO

A fibroína de seda tem sido amplamente explorada para aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e mínima reação inframatória. A esterilização é uma etapa fundamental no processamento de biomateriais, e não deve alterar de forma negativa as propriedades funcionais dos dispositivos médicos. Estudos recentes verificaram que a fibroína pode ser utilizada como suporte para mimetizar a biomineralização, promovendo o crescimento de cristais de hidroxiapatita. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência de diferentes métodos de esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas e porosas de fibroína de seda, e também estudar a possibilidade de aplicação de membranas de fibroína como biomaterial, pelo estudo da calcificação *in vitro*. Membranas densas e porosas de fibroína foram esterilizadas por radiação ultravioleta, etanol 70%, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, e foram analisadas por MEV, FTIR-ATR, DRX, testes mecânicos e de citotoxicidade indireta. Para os ensaios de calcificação *in vitro*, as membranas de fibroína foram imersas em SBF por sete dias, e caracterizadas por MEV e EDX. Os resultados de esterilização mostraram que nenhum método ocasionou degradação das membranas ou a formação de produtos citotóxicos. Os métodos que utilizaram solvente orgânico, e aumento de umidade e/ou temperatura (etanol 70%, autoclave e óxido de etileno) tornaram as membranas densas mais cristalinas, e as membranas porosas mais estáveis, o que pode ser aproveitado quando se deseja que as membranas apresentem uma degradação *in vivo* mais lenta, dependendo da aplicação. Os resultados obtidos de calcificação *in vitro* indicaram que a fibroína pode induzir a calcificação, pela formação de depósitos de fosfato de cálcio com relações de Ca/P similares à da hidroxiapatita e seus precursores. A membrana porosa apresentou maior tendência à calcificação, quando comparada com a membrana densa, devido à sua rugosidade e porosidade, podendo desta forma ser considerada para aplicação em regeneração óssea.

**Palavras-chave:** fibroína, esterilização, calcificação.

## ABSTRACT

Silk fibroin has been widely explored for many biomedical applications, due to its biocompatibility, biodegradability and minimal inflammatory reactions. Sterilization is a fundamental step in biomaterials processing, and it must not alter in a negative way the functionality of medical devices. On the applicability of fibroin as a biomaterial, recent studies verified that fibroin can be used as a scaffold for mimicking biomineralization, promoting the growing of hydroxyapatite crystals. The aim of this study was to analyze the influence of different sterilization methods on physical, mechanical and biological characteristics of dense and porous silk fibroin membranes, and also to study the application of the fibroin membranes as biomaterials, through *in vitro* calcification studies. Dense and porous fibroin membranes were sterilized by ultraviolet radiation, 70% ethanol, autoclave, ethylene oxide and gamma radiation, and were analyzed by SEM, FTIR-ATR, XRD, mechanical and cytotoxicity tests. For *in vitro* calcification experiments, the fibroin membranes were soaked in SBF for seven days, and characterized by SEM and EDS. The results for sterilization indicated that none of the methods caused degradation or formation of cytotoxic substances. The methods that used organic solvent, and increase of humidity and/or temperature (70% ethanol, autoclave and ethylene oxide) increased the crystallinity of the dense membranes, and stabilized the porous membranes, characteristics that may be utilized when a slow *in vivo* degradation is desired, depending on the application. The calcification experiments indicated that silk fibroin may induce calcification, by forming calcium phosphate deposits with a Ca/P ratio similar to that of hydroxyapatite and its precursors. Porous membranes presented higher tendency to calcify, when compared to dense membranes, due to its surface roughness and high porosity, indicating that porous silk fibroin membranes may be considered for application in bone regeneration.

**Keywords:** fibroin, sterilization, calcification.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
3.1 Biomateriais .....	3
3.1.1 <i>Scaffolds</i> ou matrizes tridimensionais porosas .....	4
3.1.2 Biodegradabilidade de materiais poliméricos.....	5
3.2 Fibroína de seda .....	6
3.2.1 Processabilidade e aplicações da fibroína como biomaterial.....	11
3.3 Esterilização de biomateriais.....	12
3.3.1 Métodos de esterilização de biomateriais .....	13
3.3.1.1 Álcool.....	13
3.3.1.2 Radiação ultravioleta .....	14
3.3.1.3 Autoclave.....	14
3.3.1.4 Óxido de etileno.....	15
3.3.1.5 Radiação gama .....	15
3.3.1.6 Outros métodos de esterilização .....	16
3.3.2 Estudo da esterilização da fibroína .....	17
3.4 Biomineralização.....	18
3.5 Histórico do grupo .....	19

4 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Síntese das membranas de fibroína .....	21
4.1.1 Matéria-prima.....	21
4.1.2 Remoção da sericina .....	21
4.1.3 Preparo da solução salina de fibroína.....	21
4.1.4 Preparo da membrana densa de fibroína .....	22
4.1.5 Preparo da membrana porosa de fibroína .....	23
4.2 Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, químicas e biológicas das membranas de fibroína.....	23
4.2.1 Ensaio de caracterização das membranas de fibroína esterilizadas....	25
4.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	25
4.2.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR) .....	26
4.2.1.3 Difração de raios X .....	26
4.2.1.4 Propriedades mecânicas .....	26
4.2.1.5 Citotoxicidade indireta .....	27
4.3 Estudo da calcificação <i>in vitro</i> das membranas de fibroína .....	28
4.3.1 Preparo da solução calcificante (SBF).....	28
4.3.2 Ensaio de calcificação.....	28
4.3.3 Caracterização dos depósitos de calcificação .....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Obtenção das membranas densas e porosas de fibroína.....	33
5.2 Estudo dos efeitos da esterilização nas características físicas, químicas e biológicas das membranas de fibroína.....	33
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura .....	35
5.2.2 Espectroscopia de infravermelho.....	38

5.2.3 Difração de raios X .....	42
5.2.4 Propriedades mecânicas .....	45
5.2.5 Citotoxicidade indireta.....	48
5.3 Estudo da calcificação <i>in vitro</i> das membranas de fibroína .....	50
6 DISCUSSÃO FINAL .....	58
7 CONCLUSÕES .....	62
8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
APÊNDICE .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Bicho-da-seda da espécie <i>Bombyx mori</i> e (b) aranha da espécie <i>Nephila clavipes</i> . .....	6
Figura 2: Estrutura primária da fibroína. ....	8
Figura 3: Conformações (a) hélice- $\alpha$ e (b) folha- $\beta$ da fibroína. ....	9
Figura 4: Estrutura do fio da seda do <i>Bombyx mori</i> . ....	10
Figura 5: Formação de dímeros de timina no DNA de bactérias não esporulantes irradiadas. ....	14
Figura 6: Diálise da solução de fibroína (a) e espalhamento da solução dialisada em placa de Petri para a obtenção da membrana densa (b). ....	22
Figura 7: Ensaio de calcificação <i>in vitro</i> . ....	31
Figura 8: Membrana densa (a) e membrana porosa de fibroína úmida (b) e liofilizada (c). ....	33
Figura 9: Fotografias das membranas densas de fibroína não esterilizada (a) e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). ....	34
Figura 10: Fotografias das membranas porosas de fibroína não esterilizada (a) e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). ....	35
Figura 11: Micrografias da superfície (a) e fratura (b) das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (1), e esterilizadas por etanol 70% (2), radiação UV (3), autoclave (4), óxido de etileno (5) e radiação gama (6). ....	36
Figura 12: Micrografias da superfície (a) e fratura (b) das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (1), e esterilizadas por etanol 70% (2), radiação UV (3), autoclave (4), óxido de etileno (5) e radiação gama (6). ....	37

Figura 13: Espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). .....	40
Figura 14: Espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). .....	41
Figura 15: Difrátogramas de raios X das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). .....	43
Figura 16: Difrátogramas de raios X das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f). .....	44
Figura 17: Viabilidade celular de amostras de membrana densa de fibroína de seda esterilizadas por etanol 70%, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, submetidas ao teste de citotoxicidade indireta. ....	49
Figura 18: Viabilidade celular de amostras de membrana porosa de fibroína de seda esterilizadas por etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, submetidas a testes de citotoxicidade indireta. ....	50
Figura 19: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 1 a 4, durante sete dias. ....	52
Figura 20: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 5 a 8, durante sete dias. ....	53
Figura 21: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 9 a 12, durante sete dias. ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações das soluções salinas e volumes utilizados para o preparo do SBF. ....	29
Tabela 2: Condições dos ensaios de calcificação <i>in vitro</i> realizados. ....	30
Tabela 3: Resultados do teste de resistência à tração das membranas densas de fibroína não esterilizada, e após esterilização com etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama. ....	45
Tabela 4: Resultados do teste de resistência à tração das membranas porosas de fibroína não esterilizada, e após esterilização com etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama. ....	47
Tabela 5: Resultados dos ensaios de calcificação <i>in vitro</i> das membranas densas e porosas de fibroína. ....	51

# 1 INTRODUÇÃO

O surgimento da engenharia tecidual tem aumentado a demanda por diversos tipos de biomateriais para auxiliar no desenvolvimento de tecidos *in vitro*, para posterior implantação *in vivo*. A matriz, um biomaterial, deve proporcionar suporte à adesão, multiplicação, crescimento e diferenciação de células (ALTMAN *et al.*, 2003).

Dentre os biomateriais, alguns materiais poliméricos são amplamente utilizados como matrizes para regeneração de tecidos devido a características como resistência mecânica, biocompatibilidade e adesão celular. Entre os polímeros sintéticos comumente utilizados pode-se citar o poli(ácido-glicólico), poli(ácido-láctico), poli-anidrido, entre outros. Os polímeros de origem natural, como colágeno, quitosana, alginato e fibroína também são sistemas interessantes para estudo e utilização como biomateriais e podem oferecer matrizes para diversas aplicações (NOGUEIRA, 2005).

A fibroína de seda tem sido amplamente explorada para muitas aplicações biomédicas, incluindo matriz de suporte celular para a regeneração de ossos e ligamentos artificiais, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, reação inflamatória mínima e propriedades mecânicas adequadas (LU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007).

Tanto para a fibroína, quanto para outros biomateriais, a esterilização é uma etapa fundamental no desenvolvimento de dispositivos médicos, e a funcionalidade de qualquer sistema de esterilização deve ser determinada através de sua eficácia em exterminar microrganismos, além de sua capacidade de não alterar de forma negativa as propriedades funcionais dos dispositivos médicos (VANGSNESS *et al.*, 2006).

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

**Objetivo geral:** estudo da aplicação de membranas de fibroína de seda, nas formas densa e porosa, como biomaterial.

### **Objetivos específicos:**

- Análise da influência de diferentes métodos de esterilização nas características físicas, químicas e biológicas de membranas de fibroína;
- Estudo da calcificação *in vitro* em membranas de fibroína para aplicação em regeneração óssea.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Biomateriais**

Um biomaterial é “qualquer substância, diferente de uma droga, ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou como uma parte de um sistema que trata, melhora ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (WILLIAMS, 1987).

A seleção de um biomaterial é baseada na combinação de suas propriedades mecânicas, físicas e biológicas e depende da aplicação para a qual é destinado (BENSON, 2002). Biomateriais devem ser biocompatíveis, não-tóxicos, esterilizáveis e capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos que eles substituem (WISE, 1996). A biocompatibilidade está relacionada à intensidade dos processos inflamatórios ou imunológicos desencadeados pelo organismo quando um material estranho entra em contato com fluidos biológicos (NOGUEIRA, 2005).

Os biomateriais são amplamente utilizados na medicina, odontologia e biotecnologia, e seu estudo envolve áreas da química, engenharia química, engenharia de materiais, engenharia mecânica, medicina, dentre outras (RATNER; BRYANT, 2004). Registros de 600 a.C. já indicavam a necessidade que os indivíduos tinham de suprir a perda de funções anatômicas e fisiológicas por meio do uso de implantes, mas o termo “biomaterial” só passou a ser utilizado há pouco mais de 50 anos. Até então não havia fabricantes de dispositivos médicos (exceto de próteses externas), processos regulatórios de aprovação formalizados, ou entendimento acerca da biocompatibilidade (RATNER, 2004).

A medicina regenerativa, ou engenharia tecidual é o principal foco da pesquisa em biomateriais, justificada pela necessidade clínica de terapias alternativas para o tratamento da perda tecidual ou falhas de último estágio em órgãos, uma vez que o transplante de tecidos ou órgãos é normalmente limitado

pela escassez de doadores e altamente associado ao risco de rejeição e transmissão de doenças (GOMES; REIS, 2004).

### **3.1.1 *Scaffolds* ou matrizes tridimensionais porosas**

Na engenharia tecidual, uma abordagem comum é o isolamento de células específicas de um paciente, que são semeadas em um *scaffold* sob condições de cultura controladas. O *scaffold* é então implantado no paciente com o objetivo de ocorrer uma nova formação tecidual, e o *scaffold* pode ser degradado com o passar do tempo. Uma abordagem alternativa é o implante do *scaffold* para promover o crescimento tecidual diretamente *in vivo*, com o propósito de estimular e guiar a formação tecidual *in situ*. A vantagem desta abordagem é o reduzido número de operações necessárias, resultado na diminuição do período de recuperação do paciente (REZWAN *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007).

Um *scaffold* é, portanto, um substrato tridimensional que serve como uma matriz para a regeneração tecidual. O *scaffold* ideal deve ter química de superfície e microestrutura apropriadas, e poros interconectados, para facilitar a adesão, proliferação e diferenciação de células. Além disso, deve ser biocompatível, e apresentar resistência mecânica e taxa de biodegradação adequados, sem a formação de subprodutos indesejáveis (LIU *et al.*, 2007).

Materiais biocompatíveis e biodegradáveis, como os polímeros, são especialmente favoráveis para serem utilizados como *scaffolds* para a reconstrução tecidual. Dentre as técnicas de produção de *scaffolds* a partir de polímeros, podem citadas a lixiviação de sais, utilizados como agentes porogênicos, formação de gás, liofilização, segregação química, formação de redes fibrosas por *electrospinning*, e prototipagem rápida (GROSS; RODRÍGUEZ-LORENZO, 2004; LIU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009).

### 3.1.2 Biodegradabilidade de materiais poliméricos

Materiais poliméricos biodegradáveis, sintéticos e naturais, têm sido utilizados no desenvolvimento de dispositivos, tais como próteses temporárias, *scaffolds*, para a engenharia tecidual, e para aplicações farmacêuticas, na liberação controlada de medicamentos. Algumas das aplicações biomédicas dos materiais poliméricos biodegradáveis incluem implantes ósseos, suturas, veículos de liberação de medicamentos, membranas planas para a regeneração tecidual guiada, e redes multifilamentadas ou estruturas porosas para a engenharia tecidual. Devido à versatilidade dos materiais poliméricos, estes estão substituindo rapidamente outras classes de materiais, como os metais, ligas, e cerâmicas para uso como biomaterial (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Algumas das propriedades importantes que um biomaterial biodegradável deve apresentar são: não desencadear resposta inflamatória ou tóxica depois de implantado; apresentar vida útil adequada; o período de degradação deve ser compatível com o processo de regeneração do tecido; o material deve apresentar propriedades mecânicas adequadas para a aplicação indicada, e a variação destas propriedades deve ser compatível com o processo de regeneração; os produtos de degradação não devem ser tóxicos, e devem ser passíveis de metabolização e eliminação do organismo; o material deve apresentar permeabilidade e processabilidade para a aplicação pretendida (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Polímeros sintéticos, como o poli(ácido-láctico), poli(ácido-glicólico), poli-anidrido e poli-caprolactona, geralmente apresentam propriedades mecânicas inadequadas e degradam rapidamente *in vivo*, gerando produtos de degradação ácidos. Materiais naturais como colágenos, alginatos e quitosana têm sido investigados para uso como *scaffolds* na engenharia de tecidos, mas estes materiais também apresentam propriedades mecânicas inadequadas *in vivo*, e existem preocupações práticas sobre a transmissão de doenças e variações da matéria-prima. Materiais alternativos estão, portanto, sendo procurados para

aplicação como *scaffolds*, e a seda tem sido proposta como uma candidata em potencial (LIU *et al.*, 2007; MACINTOSH *et al.*, 2008).

### 3.2 Fibroína de seda

As sedas são polímeros protéicos, produzidos na forma de fibras por alguns artrópodes, como bicho-da-seda, aranha, escorpião e pulga, que as utilizam para diversas funções, como estrutura de suporte, reprodução e captura de alimentos (ALTMAN *et al.*, 2003; HAKIMI *et al.*, 2007). As sedas diferem amplamente na composição, estrutura e propriedades, dependendo da fonte específica, e as mais estudadas são as produzidas pelo bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*) e por aranhas do gênero *Nephila*, como a *Nephila clavipes*, representados nas Figuras 1a e 1b respectivamente (MACINTOSH *et al.*, 2008).



Figura 1: (a) Bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* (DOLTPOMS, 2009) e (b) aranha da espécie *Nephila clavipes* (CLEEK, 2009).

As sedas produzidas pelo bicho-da-seda e por aranhas têm sido estudadas para o entendimento do mecanismo de processamento e para explorar as propriedades destas proteínas para uso como biomaterial, uma vez que apresentam propriedades mecânicas surpreendentes, além de serem biocompatíveis, modificáveis quimicamente, e possuírem degradabilidade

proteolítica controlável e flexibilidade morfogênica (HAKIMI *et al.*, 2007; VEPARI; KAPLAN, 2007).

A produção de seda a partir dos casulos do bicho-da-seda, atividade denominada sericultura, resulta em grandes safras, uma vez que as larvas podem ser mantidas em altas densidades (ALTMAN *et al.*, 2003). A produção mundial de seda apresentou um aumento de cerca de 100.000 toneladas em 2000 para 150.000 toneladas em 2006, principalmente devido à China, que produz cerca de 70% da seda mundial, seguida pelo Brasil, Índia, Tailândia e Vietnã (INTERNATIONAL YEAR OF NATURAL FIBRES, 2009). No Brasil, o Estado do Paraná é o maior produtor de seda, seguido por São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2007).

As proteínas da seda são produzidas no interior de glândulas especializadas após a biossíntese em células epiteliais, seguido da secreção para o interior do lúmen destas glândulas, onde as proteínas são armazenadas previamente à fiação na forma de fibras (ALTMAN *et al.*, 2003). O fio de seda é produzido a partir de uma solução aquosa, em condições de temperatura ambiente e baixa pressão. As mudanças na interação e orientação molecular que transformam a seda, solúvel em água, em fibra insolúvel ainda não são totalmente compreendidas. Acredita-se que uma combinação de forças induzidas pelo fluxo, desidratação ativa, acidificação gradual, e íons de cobre e potássio estejam envolvidos neste processo (HAKIMI *et al.*, 2007).

O principal componente do fio da seda é a proteína denominada fibroína, na seda do bicho-da-seda, e spidroína, na seda da aranha. A seda da aranha, apesar de bastante estudada, não é comercializada para aplicações têxteis ou biomédicas, devido à natureza predatória das aranhas, o que previne sua cultura em condições de confinamento. Além disso, aranhas produzem quantidades relativamente pequenas de seda, e a coleta é trabalhosa (MACINTOSH *et al.*, 2008). Já a seda do bicho-da-seda tem sido utilizada comercialmente para suturas biomédicas há décadas, e na produção têxtil há séculos (ALTMAN *et al.*, 2003).

A fibroína do *Bombyx mori* é composta por duas cadeias polipeptídias, uma curta e outra longa, de aproximadamente 26 e 390 kDa, respectivamente,

presentes em uma relação 1:1 e unidas por uma ligação dissulfídica (SEHNAL; ZUROVEC, 2004; ZHOU *et al.*, 2000). A composição de aminoácidos da fibroína de seda do *Bombyx mori* é constituída principalmente por glicina (Gly) (43%), alanina (Ala) (30%) e serina (Ser) (12%) (VEPARI; KAPLAN, 2007), conforme representado na Figura 2.

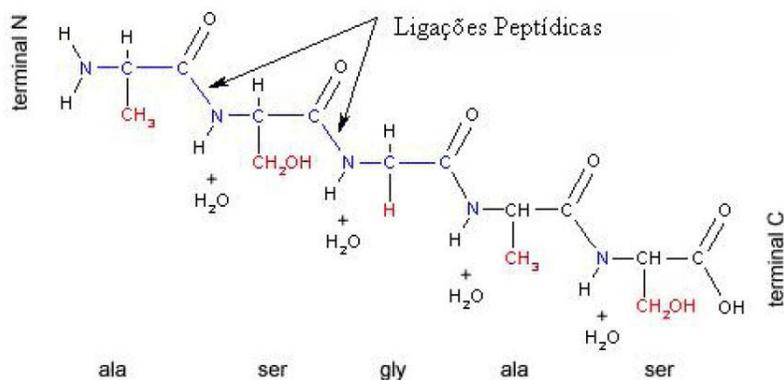


Figura 2: Estrutura primária da fibroína (NOGUEIRA, 2005).

A fibroína pode existir em estados de conformação moleculares denominados seda I e seda II. A seda I é a forma meta-estável, solúvel em água, armazenada nas glândulas de seda. Sua conformação ainda não foi totalmente compreendida, mas é geralmente descrita como um conjunto de conformações, como enovelamento aleatório e hélice- $\alpha$  (Figura 3a), que apresentam desde a falta de estrutura secundária, até cristais parcialmente ordenados (HAKIMI *et al.*, 2007; VEPARI; KAPLAN, 2007; KUNDU *et al.*, 2008).

A conformação seda II, que é a fibroína sólida que pode ser encontrada no fio da seda, consiste da estrutura secundária folha- $\beta$  (Figura 3b). Esta estrutura é hidrofóbica e insolúvel em diversos solventes incluindo ácidos e álcalis diluídos. As estruturas folha- $\beta$  são assimétricas com um lado ocupado com cadeias laterais hidrogenadas da glicina e o outro ocupado com cadeias laterais metiladas das alaninas que povoam os domínios hidrofóbicos. As folhas- $\beta$  são arranjadas para que os grupos metílicos e grupos hidrogenados de folhas opostas interajam para formar o empilhamento inter-folha nos cristais. Fortes ligações de hidrogênio e

forças de van der Waals geram uma estrutura que é termodinamicamente estável (HAKIMI *et al.*, 2007; VEPARI; KAPLAN, 2007; KUNDU *et al.*, 2008).

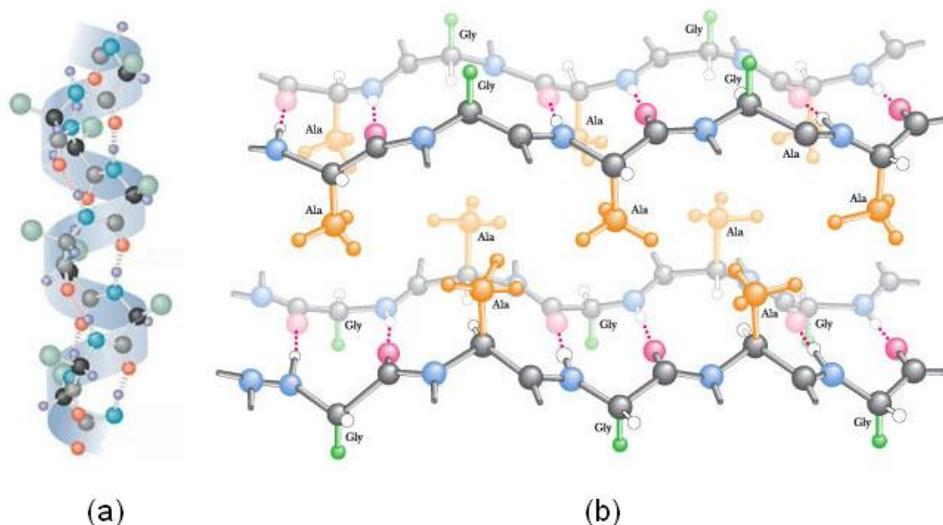


Figura 3: Conformações (a) hélice- $\alpha$  (WIKIMEDIA COMMONS, 2009) e (b) folha- $\beta$  da fibroína (GARRETT; GRISHAM, 2009).

A conformação molecular da fibroína pode ser alterada pelas condições de processamento. As estruturas enovelamento aleatório, hélice- $\alpha$  e folha- $\beta$  podem coexistir na mesma amostra, mas o tratamento específico seleciona a estrutura predominante. Parâmetros como temperatura, umidade e concentração da proteína são cruciais no controle da conformação da fibroína; forças mecânicas e solventes orgânicos, como metanol e etanol, são geralmente empregados para estabilizar os materiais produzidos a partir da fibroína, por meio do aumento da cristalinidade (LAWRENCE *et al.*, 2008).

O fio da seda do *Bombyx mori* é composto por dois monofilamentos protéicos, denominados brins, embebidos em uma cobertura de sericina (POZA *et al.*, 2002; ALTMAN *et al.*, 2003). Os brins são filamentos de fibroína compostos por maços de nanofibrilas, que são orientadas paralelamente ao eixo da fibra, e acredita-se que interajam fortemente umas com as outras (POZA *et al.*, 2002;

HAKIMI *et al.*, 2007). Uma representação esquemática do fio da seda do *Bombyx mori* é apresentada na Figura 4.

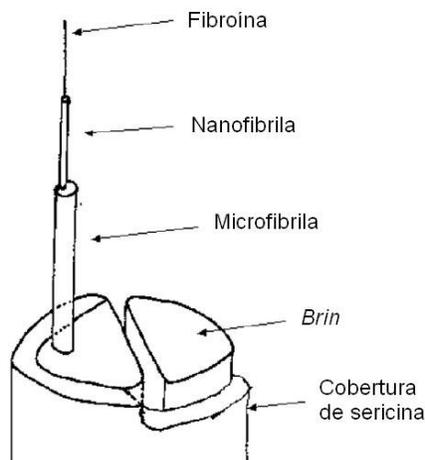


Figura 4: Estrutura do fio da seda do *Bombyx mori* (HAKIMI *et al.*, 2007).

A cobertura de sericina é composta por proteínas hidrofílicas ricas no aminoácido serina, com massa molar que varia entre 10 e 300 kDa. A sericina atua como uma cola, mantendo as fibras unidas na formação do casulo do *Bombyx mori* (ZHANG, 2002; VEPARI; KAPLAN, 2007).

Apesar de possuir propriedades interessantes como resistência à radiação ultravioleta e à oxidação e capacidade antibacteriana (ZHANG, 2002), a sericina foi identificada como a fonte de reações imunogênicas causadas pelos fios de seda utilizados em suturas, embora estudos tenham demonstrado que tais reações ocorrem apenas quando a sericina está associada à fibroína (PANILAITIS *et al.*, 2003). A sericina representa entre 25 e 30% da massa do casulo da seda, e é removida pelo processo de degomagem, por aquecimento em solução alcalina (VEPARI; KAPLAN, 2007).

### 3.2.1 Processabilidade e aplicações da fibroína como biomaterial

A fibroína pode se apresentar em três diferentes estados de solução durante seu processamento, com propriedades bastante diferentes. O primeiro é a solução salina de fibroína, formada pela dissolução da fibra de seda degomada em soluções salinas concentradas. O segundo é a solução aquosa de fibroína após o processo de diálise para a remoção do sal da solução salina de fibroína (HA *et al.*, 2005). A solução aquosa de fibroína é sensível à tensão de cisalhamento, e pode ser transformada em gel num período que depende da temperatura e da concentração de processo (NOGUEIRA, 2009). Outras aplicações da solução aquosa de fibroína são a produção de microesferas (LV *et al.*, 2004), filmes por *casting* ou *layer-by-layer* (NOGUEIRA, 2005; NOGUEIRA, 2009), *scaffolds* porosos (VEPARI; KAPLAN, 2007), e blendas, quando misturada a outros polímeros, como a celulose (MARSANO *et al.*, 2007).

O terceiro estado é a solução ácida de fibroína que pode ser preparada pela dissolução de fibroína liofilizada, proveniente da solução aquosa, em solventes ácidos, como ácido fórmico ou ácido trifluoracético. A solução ácida de fibroína não é tão sensível à tensão de cisalhamento ou à gelificação quanto a solução aquosa, mas as cadeias poliméricas são gradualmente degradadas com o tempo, devido à hidrólise ácida (HA *et al.*, 2005). A solução ácida é utilizada como base para a formação de fibras regeneradas de fibroína, pelas técnicas de *electrospinning* (ZHANG *et al.*, 2009) ou *wet spinning* (ZUO *et al.*, 2007), onde, no primeiro caso, a solução é injetada por uma seringa e em seguida é submetida a uma corrente elétrica, que altera a conformação da solução e a transforma em fibra. No segundo caso, a solução de fibroína é injetada para o interior de um banho contendo solução coagulante, que também altera a conformação da solução, transformando-a em fibra.

Por ser uma proteína, a fibroína é suscetível à degradação biológica, como foi demonstrado por estudos do comportamento de degradação de fibras e filmes expostos a diferentes enzimas proteolíticas (MONTI *et al.*, 2005). Além disso, a degradabilidade dos materiais de fibroína pode ser relacionada ao modo de processamento e do correspondente conteúdo de cristalinidade por folha- $\beta$ . Os

biomateriais de seda são biocompatíveis quando estudados *in vitro* e *in vivo*, e a fibroína tem sido estudada em diversas aplicações, como suporte para a imobilização de enzimas, cicatrização de feridas, e na engenharia de tecidual óssea, na regeneração de ossos, cartilagens, tendões e ligamentos (KI *et al.*, 2005; VEPARI; KAPLAN, 2007).

### 3.3 Esterilização de biomateriais

Infecções envolvendo órgãos artificiais, vasos sintéticos, substituição de articulações, ou dispositivos de fixação interna normalmente requerem reoperação, e podem resultar em amputação, osteomielite ou morte (KOWALSKI; MORRISSEY, 1996).

O termo desinfecção é associado a agentes que eliminam microrganismos causadores de doenças ou outros microrganismos que representem perigo à saúde, mas não garante a eliminação de formas mais resistentes dos microrganismos, como os esporos. A desinfecção pode ser realizada pela utilização de um agente químico, como o álcool, ou físico, como a radiação ultravioleta (BLOCK, 1991).

Já a esterilização é definida como o processo ou ato de inativar ou eliminar todas as formas de vida, especialmente microrganismos, inclusive na forma de esporos. De acordo com a AAMI (*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*), a exposição a um processo de esterilização válido deve atingir um nível de garantia de esterilidade (*Sterility Assurance Level – SAL*) de  $10^{-6}$  microrganismos, ou seja, indica a probabilidade da existência de não mais do que um microrganismo viável em  $1 \times 10^6$  itens do produto final esterilizado. Já o FDA (*Food and Drug Administration*) considera um SAL de  $10^{-3}$  como adequado para dispositivos médicos implantáveis (VON WOEDTKE *et al.*, 2002; VANGSNESS *et al.*, 2006).

O primeiro método utilizado para a esterilização de implantes foi o uso da autoclave, mas a maioria dos implantes não metálicos e materiais para embalagens não podem ser esterilizados por este método, devido à elevada

temperatura. Esta limitação levou ao desenvolvimento e utilização de outros métodos, como o óxido de etileno e radiação ionizante (KOWALSKI; MORRISSEY, 1996).

O principal problema envolvendo a esterilização é que o método utilizado deve não apenas garantir a esterilidade, mas também a funcionalidade do produto esterilizado. O método não deve afetar as propriedades biomecânicas, deve penetrar completamente no material, e não deve afetar o perfil de biocompatibilidade e as características de incorporação do material (VON WOEDTKE *et al.*, 2002; VANGSNESS *et al.*, 2006).

### **3.3.1 Métodos de esterilização de biomateriais**

#### **3.3.1.1 Álcool**

Apesar de, a rigor, ser considerado um método de desinfecção, o uso dos alcoóis apresenta muitas propriedades desejáveis em um agente esterilizante. Apresentam baixo custo, são normalmente de fácil obtenção, relativamente atóxicos, incolores e evaporam rapidamente. Sua ação bactericida prevalece com relação à bacteriostática contra microrganismos vegetativos, embora, como os demais desinfetantes químicos, sua ação destrutiva contra esporos seja pouco pronunciada (BLOCK, 1991).

A ação bactericida dos alcoóis se deve à desnaturação de proteínas. Na ausência de água, as proteínas não são desnaturadas tanto quanto na sua presença. Por essa razão, o álcool etílico absoluto, um agente desidratante, é menos bactericida do que misturas de álcool e água (BLOCK, 1991).

O álcool metílico apresenta a menor ação bactericida dentre os alcoóis e por esta razão é o menos utilizado como agente antibacteriano. Já o álcool etílico é amplamente utilizado para a destruição de formas vegetativas de microrganismos quando são realizados procedimentos médicos como aplicações de injeção e outros procedimentos simples que perfuram ou cortam a pele intacta, geralmente na concentração de 70% (BLOCK, 1991; HOH; BERRY, 2005).

### 3.3.1.2 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta abrange uma faixa de comprimento de onda entre 328 e 210 nm, com uma atividade bactericida máxima próxima de 260 nm, região de pico de absorção do DNA. Portanto, o DNA é o principal alvo para eliminação de microrganismos quando a radiação UV é utilizada (BLOCK, 1991).

Quando microrganismos vegetativos são expostos à radiação ultravioleta, dímeros de timina são formados entre moléculas de timina adjacentes na mesma seqüência do DNA (Figura 5). A indução de dímeros, que bloqueiam a replicação do DNA das células, explica a natureza letal da radiação ultravioleta (BLOCK, 1991).

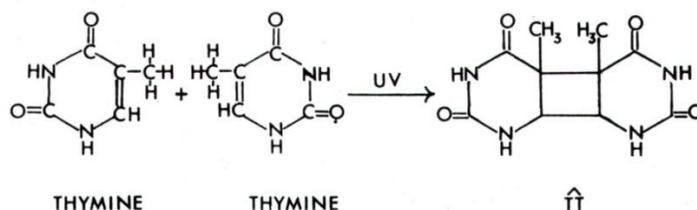


Figura 5: Formação de dímeros de timina no DNA de bactérias não esporulantes irradiadas. Adaptada de Block (1991).

A intensiva atividade antimicrobiana da radiação UV, incluindo esporos e vírus, é bastante conhecida. Mas a radiação UV não penetra nos sólidos e é extensivamente absorvida por vidros e plásticos (JÜLICH; VON WOEDTKE, 2001; VON WOEDTKE *et al.*, 2002).

### 3.3.1.3 Autoclave

O método de esterilização com calor úmido é realizado em autoclave, pela exposição do material a ser esterilizado ao vapor saturado a 121°C. O tempo de operação pode variar entre 15 e 30 minutos. A embalagem do material deve permitir a circulação livre de vapor, e o formato do mesmo deve ser tal que permita

que toda a superfície possa entrar em contato com o vapor (KOWALSKI; MORRISSEY, 1996).

Neste método, os microrganismos são eliminados pela destruição de componentes metabólicos e estruturais que são essenciais para o crescimento, como a coagulação de enzimas essenciais e a ruptura de complexos de proteínas e lipídeos (KOWALSKI; MORRISSEY, 1996).

A autoclave é amplamente utilizada tanto em escala de bancada quanto industrial devido à eficácia, facilidade do processo, rapidez e ausência de resíduos tóxicos. No entanto, as condições de elevada temperatura e pressão limitam a faixa de compatibilidade com implantes e embalagens. Por esta razão, o uso do calor úmido é o método mais utilizado para a esterilização de dispositivos metálicos, como instrumentos cirúrgicos (LAWRENCE *et al.*, 2008).

#### **3.3.1.4 Óxido de etileno**

Métodos de esterilização química, como a exposição ao óxido de etileno são utilizados em polímeros sensíveis ao calor e à umidade. O efeito letal do óxido de etileno nos microrganismos se deve principalmente à alquilação de grupamentos amino no ácido nucléico (ATHANASIOU *et al.*, 1996; KOWALSKI; MORRISSEY, 1996). No entanto, o óxido de etileno pode reagir quimicamente com o material esterilizado, além de ser um gás tóxico e cancerígeno, o que leva à necessidade de um procedimento de areação subsequente à esterilização a fim de se evitar efeitos tóxicos residuais (FRIESS, 1998; LEE *et al.*, 2008).

#### **3.3.1.5 Radiação gama**

A esterilização com radiação gama é um dos métodos mais aplicados para a esterilização de biomateriais, por ser um método econômico e eficiente (BLOCK, 1991). Os raios gama causam a ionização de componentes celulares importantes, especialmente o ácido nucléico, resultando na morte dos microrganismos (KOWALSKI; MORRISSEY, 1996). Para fins de esterilização, a dose de radiação

aplicada é de 25 kGy (em conformidade com a norma ISO 11137, 1995), para atingir o SAL de  $10^{-6}$  (SINGH *et al.*, 2007).

Este método apresenta vantagens tecnológicas, como o elevado poder de penetração, baixa reatividade química, baixo teor de resíduos, pequeno aumento de temperatura e poucas variáveis de controle de processo. Além disso, a esterilização pode ser realizada no produto final embalado (BASLY *et al.*, 1997). No entanto, alguns materiais podem ser degradados quando irradiados, e alterações químicas podem ser induzidas, dependendo da estrutura química envolvida. A esterilização de polímeros por radiação gama pode induzir tanto a formação de ligações cruzadas quanto a degradação do material, dependendo da estrutura química. As ligações cruzadas resultam no aumento da massa molar do polímero à medida que a dose de radiação é aumentada. Por outro lado, a degradação resulta na quebra das cadeias e diminuição da massa molar. As ocorrências de ligações cruzadas e degradação podem ocorrer simultaneamente em muitos sistemas poliméricos, com a predominância de um dos efeitos (PALSULE *et al.*, 2008).

### **3.3.1.6 Outros métodos de esterilização**

Além das técnicas de esterilização já mencionadas, outras também são utilizadas em dispositivos médicos e biomateriais. Alguns exemplos são o calor seco, plasma frio e radiação por feixe de elétrons.

A esterilização por calor seco é realizada em estufas. As temperaturas típicas são 160 °C por 120 min, 170 °C por 60 min, ou 180 °C por 30 min. No entanto, este método é pouco utilizado, pois muitos dispositivos não podem ser expostos a temperaturas tão elevadas. Além disso, este método é relativamente ineficiente e longo, quando comparado com a autoclave (DE ZOYSA; MORECROFT, 2007).

O plasma frio e a radiação por feixe de elétrons são técnicas de implantação mais recentes, indicadas para a esterilização de materiais sensíveis a temperaturas elevadas. A técnica de plasma frio utiliza uma combinação de vapor de peróxido de hidrogênio e plasma gasoso à baixa temperatura. O peróxido de

hidrogênio é um conhecido agente antimicrobiano e também serve como precursor da geração de radicais livres durante a fase plasma do ciclo. O ambiente biocida produzido, composto por muitas entidades reativas, é capaz de inativar os microrganismos por meio de interações químicas em múltiplos sítios de reação biologicamente importantes (KANJICKAL *et al.*, 2008). Já a radiação por feixe de elétrons pertence ao grupo dos métodos de radiação ionizante, como a radiação gama. Os elétrons acelerados reagem mais intensivamente com a matéria, sendo necessários apenas alguns segundos para a esterilização, melhorando a relação custo-benefício, mas apresentam menor profundidade de penetração, se comparados com a radiação gama, o que limita a sua aplicação (FRIESS; SCHLAPP, 2006).

### **3.3.2 Estudo da esterilização da fibroína**

Diversos artigos mencionam a esterilização de matrizes de fibroína por diferentes métodos, mas os efeitos destes nas propriedades físico-químicas e biológicas das matrizes ainda não foram reportados. No estudo da citocompatibilidade e compatibilidade sanguínea de matrizes de fibroína/colágeno/heparina, Lu *et al.* (2007) utilizaram como método de esterilização o álcool a 70% sob radiação ultravioleta durante a noite. Para o estudo da biocompatibilidade da fibroína de seda com células e tecidos nervosos periféricos *in vitro*, Yang *et al.* (2007) utilizaram a autoclavagem. Para a utilização de matrizes de fibroína na cultura de células do tecido ósseo, Li *et al.* (2006) esterilizaram as matrizes com álcool a 70% por 30 min. Fini *et al.* (2005) utilizaram a radiação gama para a esterilização de hidrogéis de fibroína de seda previamente à cultura de células e implantação óssea.

Outros estudos que mencionam a esterilização de matrizes de fibroína para aplicação como biomaterial utilizaram etanol a 70% por 15 min (FUCHS *et al.*, 2006), radiação ultravioleta por 30 min (GOTOH *et al.*, 1997), autoclave. (INOUE *et al.*, 1998; MORITA *et al.*, 2006), óxido de etileno (PANILAITIS *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2004; UEBERSAX *et al.*, 2006) e radiação gama (CAI *et al.*, 2002).

### 3.4 Biomineralização

A formação de ossos é um processo complexo no qual a precipitação de hidroxiapatita aparenta estar associada à matriz e subseqüentemente às fibras de colágeno (LIAN; STEIN, 1992). Pequenos cristais se formam paralelos uns aos outros, sob a influência da estrutura das fibras de colágeno como resultado da composição dos sais inorgânicos presentes no fluido corpóreo. O osso é então sintetizado como um compósito complexo, e a organização e a química interfacial dos componentes são otimizadas para seu uso funcional por processos mediados por células (MEYER *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, tem sido aceito dizer que a premissa essencial para que um material artificial apresente ligações do tipo das que são encontradas no osso é que esse material apresente, em sua superfície, a deposição de compostos de fosfato de cálcio similares às apatitas ósseas (KANNAN *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2006).

Os nanocompósitos hidroxiapatita-colágeno para ossos artificiais vinham sendo desenvolvidos por processo biomimético, baseados na idéia de que sistemas biológicos armazenam e processam informação no nível molecular. Este tipo de nanocompósito era preparado pela precipitação de nanocristais de hidroxiapatita em colágeno solúvel, o qual iria até certo ponto mimetizar a nanoestrutura do osso real devido à habilidade do colágeno de induzir a mineralização. No entanto, os maiores problemas práticos do colágeno são o alto custo, dificuldade de controlar infecções cruzadas e a caracterização precária de fontes comerciais deste material, o que torna difícil o seguimento de um processo bem controlado (KONG *et al.*, 2004). Isto leva à exploração de novos materiais orgânicos para substituir o colágeno no desenvolvimento de materiais ósseos biomiméticos.

Materiais não-bioabsorvíveis, como membranas de poli-(tetrafluoretileno) têm sido usadas devido a sua força mecânica, resistência à pressão produzida por tecidos vizinhos e flexibilidade. No entanto, estas membranas precisam ser

removidas em uma segunda cirurgia (KINO *et al.*, 2007). Estudos recentes verificaram que a fibroína, material bioabsorvível, pode ser utilizada como suporte para mimetizar a biomineralização, promovendo o crescimento de cristais de hidroxiapatita. Isto indica a importância da fibroína na biomineralização e na engenharia de tecidos ósseos (SUN *et al.*, 2007).

O estudo de processos de biomineralização é importante não somente para o desenvolvimento de novos materiais que possam ser aplicados na área médica, mas também para o avanço na prevenção e tratamento de doenças e disfunções amplamente relacionadas à calcificação, como por exemplo, a arteriosclerose e o hiperparatireoidismo (GUYTON; HALL, 2002).

A premissa essencial para que um material seja bioativo e se ligue ao osso vivo é a formação de apatita óssea na sua superfície, e esta formação pode ser reproduzida em um fluido corpóreo simulado (*simulated body fluid* – SBF), em experimentos de calcificação *in vitro* (KOKUBO; TAKAMADA, 2006). Outros requisitos para que substratos possam ser aplicados na engenharia de tecidos ósseos incluem adequação química, morfologia e estrutura que permitam a adesão de células e síntese de uma nova matriz óssea (KIM *et al.*, 2008).

O uso de experimentos de calcificação *in vitro* apresenta algumas vantagens, se comparado ao uso de experimentos *in vivo* convencionais. Além de ser um método mais barato e rápido, os resultados de calcificação obtidos *in vitro* são mais reprodutíveis, sendo menos influenciados pela variabilidade das condições experimentais observadas em testes com organismos vivos. Este tipo de experimento é amplamente empregado em testes de matrizes desenvolvidas para a produção de válvulas cardíacas, onde é possível realizar experimentos conjugados do processo de calcificação e da fadiga do material (BERNACCA, *et al.*, 1994; AIMOLI, 2007).

### **3.5 Histórico do grupo**

Estudos da obtenção de membranas densas e porosas a partir de biopolímeros, e de calcificação, visando aplicações na área biomédica, têm sido

realizados por pesquisadores do Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP/FEQ/UNICAMP) ao longo dos últimos anos. O estudo iniciado por Beppu (1999), de obtenção de membranas densas e porosas de quitosana, e da calcificação promovida sobre estes substratos, foi seguido por Aimoli (2007), que estudou a deposição de fosfatos e carbonatos de cálcio sobre os mesmos substratos, investigando os estágios iniciais de deposição através de ensaios de curta duração, deposição similar à observada nos organismos vivos, por meio de ensaios de calcificação *in vitro*, e também a influência dos substratos sobre os depósitos formados, por testes de calcificação quimicamente induzida.

Nogueira (2005) iniciou os estudos com a fibroína de seda no grupo, produzindo e caracterizando membranas densas e porosas, sendo este o primeiro trabalho de pós-graduação relacionado à fibroína de seda realizado no país. A partir deste estudo, foi desenvolvida e patenteada uma nova técnica de produção de membrana porosa de fibroína, com duas características interessantes que a diferem de outras técnicas de processamento e obtenção de matrizes porosas de fibroína: eliminação da longa etapa de diálise e rapidez e simplicidade de produção. Posteriormente, Nogueira (2009) estudou a metaestabilidade da solução dialisada de fibroína, além de diferentes aplicações da fibroína, como a calcificação *in vitro* de hidrogéis, a obtenção de membranas pela técnica de *layer-by-layer* utilizando soluções de fibroína e quitosana, e o potencial da fibroína como agente anticalcificante, no recobrimento de pericárdio bovino utilizado para a confecção de válvulas cardíacas.

O estudo da esterilização e da calcificação *in vitro* das membranas densa e porosa de fibroína são aqui propostos como continuidade do estudo das diversas aplicações da fibroína, voltadas para o campo de biomateriais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Síntese das membranas de fibroína**

#### **4.1.1 Matéria-prima**

A seda utilizada nos experimentos, proveniente do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), foi adquirida da indústria brasileira Bratac (São Paulo, SP). O material (lote BR 08 B – Tipo 1, de maio de 2007) foi adquirido já na forma de fios, provenientes de descarte industrial. De acordo com informações do fornecedor, este material foi considerado descarte por não corresponder com algumas exigências do controle de qualidade que o destinaria a indústria têxtil, como o comprimento dos fios.

#### **4.1.2 Remoção da sericina**

A sericina presente nos fios da seda foi removida de acordo com o método de Li *et al.* (2002). Cada 50 g de seda foram pesados e lavados em 600 mL de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5% durante 30 min, em banho termostaticado, na temperatura de 85 °C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, os fios foram lavados com água destilada em abundância. Os fios foram secos a temperatura ambiente por 48 h.

#### **4.1.3 Preparo da solução salina de fibroína**

Para o preparo da solução salina de fibroína, os fios de fibroína secos e livres de sericina foram cortados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, para facilitar a dissolução. Para cada 10 g de fibroína, foram adicionados 100 mL de solução ternária composta por  $\text{CaCl}_2$ -etanol-água (na proporção 1:2:8 molar), para a obtenção de uma solução de fibroína com concentração de 10%. A suspensão obtida foi mantida a 85 °C em banho termostaticado até a dissolução completa dos fios (aproximadamente 90 min) (UM *et al.*, 2001). A solução salina obtida foi filtrada com gaze e estocada na temperatura de 8 °C.

#### 4.1.4 Preparo da membrana densa de fibroína

Para o preparo da membrana densa, a solução salina de fibroína foi dialisada, utilizando sacos de celulose, para reduzir a excessiva concentração de cálcio da solução, na temperatura de 8 °C. A diálise foi realizada em béqueres com água destilada (Figura 6a) trocada a cada 24h, na proporção volumétrica de água para solução de fibroína de 1:15. Nogueira (2005) observou que três dias de diálise são suficientes para a remoção desejada do cálcio presente na solução de fibroína.

A solução dialisada foi espalhada em placas de Petri de poliestireno para a formação da membrana densa (Figura 6b). A secagem das membranas ocorreu à temperatura ambiente num período entre 48 e 72 h. Depois de secas, as membranas foram imersas em etanol 70% durante 20 min, para torná-las hidrofóbicas. Após o tratamento com etanol, as membranas foram lavadas abundantemente com água destilada. As membranas destinadas ao estudo da calcificação foram armazenadas em água ultrapura, e as destinadas ao estudo da esterilização foram secas a 25 °C.

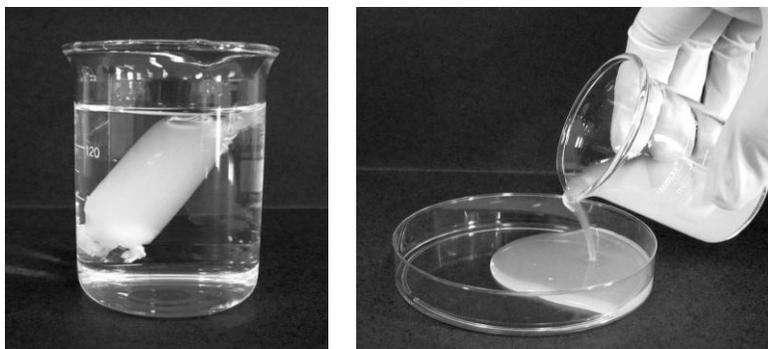


Figura 6: Diálise da solução de fibroína (a) e espalhamento da solução dialisada em placa de Petri para a obtenção da membrana densa (b).

#### **4.1.5 Preparo da membrana porosa de fibroína**

As membranas porosas de fibroína foram obtidas a partir de agitação da solução salina de fibroína, utilizando um agitador mecânico, e da compressão do material formado, obtido por separação de fase, de acordo com o método patenteado por Beppu, Polakiewicz e Nogueira (2006). O diâmetro e a espessura das membranas foram controlados pelo tamanho das placas de Petri utilizadas para a compressão e pela quantidade de material comprimido entre as mesmas. As membranas foram tratadas com etanol 70% por 20 min, e lavadas abundantemente com água destilada.

As membranas destinadas aos ensaios de calcificação foram armazenadas em água ultrapura. Visando a obtenção de um material com uma vida útil maior, as membranas porosas destinadas aos ensaios de esterilização foram congeladas em ultrafreezer, na temperatura de - 80 °C, por 24 h, e secas em liofilizador Liobras (L101, Brasil) por 24 h, de acordo com um estudo realizado previamente (WESKA *et al.*, 2009).

#### **4.2 Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, químicas e biológicas das membranas de fibroína**

Para avaliar o efeito da esterilização nas características das membranas de fibroína, membranas densas e porosas foram preparadas, e então divididas em seis grupos. O primeiro grupo não foi esterilizado, para controle, e as membranas dos demais grupos foram submetidas às diferentes técnicas de esterilização: etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama.

Para a esterilização com etanol, as membranas densas e porosas de fibroína foram imersas em recipientes plásticos contendo álcool etílico 70%. Os recipientes foram mantidos fechados por 48 h, na temperatura de 8 °C (MARRECO *et al.*, 2004). Para a realização da análise de citotoxicidade indireta, após a esterilização as membranas foram lavadas cinco vezes por imersão e agitação em recipiente contendo cerca de 100 mL de solução de NaCl 0,9%, trocada a cada lavagem, e foram analisadas na forma úmida. Para a realização

das análises de MEV, DRX, FTIR-ATR e testes mecânicos, as membranas foram lavadas cinco vezes por imersão e agitação em recipiente contendo cerca de 100 mL de água destilada, trocada a cada lavagem. Para que os resultados das análises de MEV, DRX, FTIR-ATR e testes mecânicos das membranas esterilizadas por etanol pudessem ser comparados aos resultados das membranas esterilizadas pelos demais métodos, as membranas foram congeladas e liofilizadas novamente.

A esterilização por radiação UV foi realizada em câmara de fluxo laminar com lâmpada de UV ( $\lambda = 254$  nm). Cada face das membranas foi irradiada por 30 min e, posteriormente, as membranas foram embaladas em envelopes plásticos selados, e armazenadas na temperatura de 25 °C, até a realização dos ensaios de caracterização. Para evitar posteriores contaminações, as membranas submetidas ao teste de citotoxicidade foram irradiadas no momento da realização do teste, na mesma câmara de fluxo laminar onde os extratos da análise foram preparados.

Para a esterilização em autoclave, as membranas densas e porosas de fibroína foram embaladas individualmente em envelopes compostos por papel grau cirúrgico em uma face, e filme plástico (polietileno e polipropileno) na outra. Os envelopes foram selados com uma seladora específica para este tipo de envelope. As membranas foram esterilizadas na temperatura de 121 °C, durante 30 min. Apesar das membranas serem submetidas ao vapor d'água neste método, as mesmas ainda se encontravam aquecidas quando foram retiradas da autoclave, e secaram rapidamente por evaporação, não sendo necessário um método de secagem posterior para a realização dos ensaios de caracterização.

A esterilização com óxido de etileno foi realizada na empresa Acecil – Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. (Campinas, SP). As membranas de fibroína foram embaladas com envelopes de papel grau-cirúrgico e filme plástico, e expostas ao óxido de etileno (Oxyfume 30, composto por 70% de CO<sub>2</sub> e 30% de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) sob as seguintes condições: vácuo de 400 a 450 mmHg, pressão de 0,5 a 0,6 kgf/cm<sup>2</sup>, tempo de exposição de 4 h e temperatura de 50 a 55 °C. Após a esterilização, foram realizadas três aerações forçadas dentro da

câmara com nitrogênio, e o processo foi finalizado com o armazenamento das membranas na temperatura de 25 °C por 72 h.

A esterilização por exposição à radiação gama foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/CNEN (São Paulo, SP). Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens de polietileno e seladas a quente. O equipamento apresentava as seguintes características: Fonte de  $^{60}\text{Co}$  tipo Gammacell, modelo 220 (Atomic Energy of Canada Limited, Canadá); dimensões: diâmetro de 14 cm e altura de 20 cm. As amostras foram irradiadas numa taxa constante de 2,27 kGy/h, num tempo de irradiação de 11 h, totalizando uma dose de 25 kGy.

#### **4.2.1 Ensaios de caracterização das membranas de fibroína esterilizadas**

Para verificar a influência dos métodos de esterilização nas características das membranas densas e porosas de fibroína de seda, as mesmas foram caracterizadas antes e após a realização dos ensaios de esterilização.

##### **4.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura**

A microestrutura da superfície e da área de seção transversal das membranas (fratura) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio Leica (LEO 440i, EUA), com uma corrente de 50 pA e tensão de 20 kV para as amostras de membrana densa, e 15 kV para as amostras de membrana porosa. No preparo das amostras, as membranas foram congeladas com nitrogênio líquido, fraturadas utilizando uma espátula metálica e liofilizadas por 24 h. Amostras da superfície e da área de seção transversal de cada membrana foram fixadas em suportes de alumínio utilizando fita dupla-face de carbono, e foram recobertas com ouro.

#### **4.2.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)**

A estrutura secundária das membranas densas e porosas de fibroína foi investigada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (MB 102, Bomem), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe. Os espectros foram obtidos na faixa de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e 256 varreduras.

#### **4.2.1.3 Difração de raios X**

Análises de difração de raios X (DRX) das membranas foram realizadas utilizando um difratômetro de raios X (X'Pert PW 3050, Philips Analytical), com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \times 10^{-10}$  m). A fonte de raios X foi operada a 40 kV e 40 mA, e a intensidade de difração foi medida na modalidade *spinning*, com uma taxa de varredura de 0,6°/min, e  $2\theta$  variando de 5 a 35°.

#### **4.2.1.4 Propriedades mecânicas**

Para verificar se os ensaios de esterilização alteraram as propriedades mecânicas quanto à resistência à tração das membranas densas e porosas de fibroína, foram determinados os valores de tensão de ruptura, de acordo com a norma ASTM D882-02 (2002), recomendada para a determinação das propriedades de tração de plásticos na forma de membrana.

Cinco amostras de cada tipo de membrana foram cortadas nas dimensões de 8,0 cm de comprimento e 2,54 cm de largura. A espessura das amostras foi calculada pela média da medida de dez pontos aleatórios, utilizando um micrômetro digital com precisão de 0,001 mm (MDC-25S, Mitutoyo, Japão). As amostras foram mantidas em dessecador com solução saturada de nitrato de magnésio (UR  $\cong$  50%) por três dias, até o momento da realização das análises.

O teste de tensão de ruptura foi realizado em um texturômetro, modelo TA.XT2 (Stable Microsystems SMD, Inglaterra). As condições de teste utilizadas

foram 50 mm de distância entre as garras e velocidade de teste de 10 mm/s. Foram obtidos os valores de força necessária para a ruptura de cada amostra. Para que houvesse independência entre os resultados obtidos, foi calculada a tensão na ruptura das membranas, utilizando os dados de força e área de seção transversal de cada amostra.

Foram calculados a média e o desvio-padrão dos valores de tensão de ruptura obtidos para cada tipo de membrana, e as médias das membranas densas e porosas de fibroína submetidas aos ensaios de esterilização foram comparadas às médias das membranas não submetidas às esterilizações, utilizando o teste estatístico *2-sample-t*.

#### **4.2.1.5 Citotoxicidade indireta**

Testes de citotoxicidade de amostras das membranas densas e porosas de fibroína, submetidas aos diferentes ensaios de esterilização, foram realizados por colaboradores do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), seguindo a norma ISO 10993-5 (1992). Para este teste, foi utilizada uma linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1), mantida em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco 23400-021).

Foram preparados extratos das amostras de membranas densas e porosas de fibroína, seguindo a proporção de 1 cm<sup>2</sup> de membrana por mL de meio de cultura. As amostras foram mantidas em banho termostático tipo Dubnoff a 37 °C por 48 h. Os extratos obtidos foram filtrados com membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 µm, e foram preparadas diluições seriadas dos extratos, de 100% a 6,25%, em meio de cultura RPMI estéril. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de fenol 0,4%, e como controle negativo, um extrato de polietileno de alta densidade (PEAD) 0,2 g/mL.

Para o teste de citotoxicidade, a suspensão de células CHO-k1 e as diluições dos extratos foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços, e mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pela adição de solução de MTS (corante supravital de composto tetrazólico)/PMS (agente acoplador de elétrons) e incubação das placas por 2 h.

Após a incubação, as placas foram analisadas em espectrofotômetro ELISA a 495 nm. As amostras foram avaliadas quanto ao índice de citotoxicidade 50% (IC<sub>50</sub>), que corresponde à concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis.

### **4.3 Estudo da calcificação *in vitro* das membranas de fibroína**

#### **4.3.1 Preparo da solução calcificante (SBF)**

Para se reproduzir em laboratório as condições naturais de deposição de sais de cálcio observada em seres vivos, foi utilizada a metodologia de Kokubo (1990), a partir do preparo de uma solução que simula o fluido corpóreo humano (SBF) através da mistura de soluções de diversos sais que contém os íons presentes no plasma sanguíneo e de uma solução tampão. A Tabela 1 mostra a preparação do SBF em duas diferentes concentrações.

#### **4.3.2 Ensaio de calcificação**

Para observar o comportamento das membranas de fibroína quando colocadas em contato com soluções salinas de concentração similar à do plasma sanguíneo humano, foram realizados ensaios de calcificação *in vitro*.

Cortes de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> de membranas densas e porosas de fibroína foram imersos em frascos individuais de polietileno com tampa, contendo cada um 50 mL de solução calcificante, com pH 7,4. Os ensaios de calcificação foram realizados com SBF na concentração padrão (preparado de acordo com a Tabela 1) e também com excesso de Ca ou P, dobrando-se a quantidade dos respectivos sais (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou CaCl<sub>2</sub>). As soluções preparadas desta forma foram representadas por Ca↑ e P↑.

Tabela 1: Concentrações das soluções salinas e volumes utilizados para o preparo do SBF (BEPPU, 1999).

Sais	Concentração (M)	Volume (mL)	
		SBF	SBF 1,5×
NaCl	2,74	12,5	18,75
KCl	0,06	12,5	18,75
CaCl <sub>2</sub>	0,05	12,5	18,75
MgCl <sub>2</sub>	0,03	12,5	18,75
NaHCO <sub>3</sub>	0,0895	12,5	18,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02	12,5	18,75
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,01	12,5	18,75
“Tris” *	0,04	31,25	31,25
HCl	0,36	**	**
Volume final	-	250	250

\* (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>

\*\* Aproximadamente 28 mL (pH = 7,4).

Os frascos contendo as amostras foram mantidos a  $36,5 \pm 0,5$  °C em banho termostatizado tipo Dubnoff (Figura 7) com agitação leve. Após 48 e 96 h, as soluções calcificantes de cada frasco foram trocadas por soluções de mesma natureza, para evitar a proliferação de microrganismos nos frascos. Este procedimento foi realizado de duas formas. Na primeira, as soluções foram trocadas por outras na mesma concentração. Este procedimento de troca de soluções é representado por 1×/1×/1×. Na segunda, as soluções foram trocadas por outras, com concentração 50% maior que a inicial (SBF 1,5×). Este procedimento é representado por 1×/1,5×/1,5× e foi utilizado para acelerar o processo de calcificação.

No total, foram realizados 12 ensaios, variando os fatores estudados. A Tabela 2 apresenta as condições dos ensaios realizados.

Tabela 2: Condições dos ensaios de calcificação *in vitro* realizados.

Ensaio	Tipo de membrana	Tipo de SBF	Concentração do SBF
1	Densa	Padrão	1x/1x/1x *
2	Porosa	Padrão	1x/1x/1x
3	Densa	Padrão	1x/1,5x/1,5x **
4	Porosa	Padrão	1x/1,5x/1,5x
5	Densa	Ca↑	1x/1x/1x
6	Porosa	Ca↑	1x/1x/1x
7	Densa	P↑	1x/1x/1x
8	Porosa	P↑	1x/1x/1x
9	Densa	Ca↑	1x/1,5x/1,5x
10	Porosa	Ca↑	1x/1,5x/1,5x
11	Densa	P↑	1x/1,5x/1,5x
12	Porosa	P↑	1x/1,5x/1,5x

\* Uso de SBF com concentração de sais semelhante à do plasma sanguíneo durante os sete dias de análise.

\*\* Uso de SBF com concentração de sais semelhante à do plasma sanguíneo durante os dois primeiros dias de análise, seguido do uso de SBF com concentração 50% maior a partir do terceiro dia de análise.



Figura 7: Ensaio de calcificação *in vitro*.

Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Durante as trocas de solução, e ao fim de cada ensaio, o pH das soluções contidas nos frascos foi medido para detectar possíveis contaminações microbianas (indicadas pela diminuição do pH). Após o término dos ensaios, as amostras foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura para remover a solução de SBF e então liofilizadas.

#### **4.3.3 Caracterização dos depósitos de calcificação**

As análises morfológica e composicional das amostras foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDX), para a observação e caracterização dos possíveis depósitos de fosfato de cálcio formados nas membranas durante os ensaios de calcificação. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (JXA-840A, Jeol, Japão), acoplado a um equipamento de EDX (Electron Probe Microanalyzer, Thermo Electron Corporation, EUA).

No preparo das amostras, as membranas densas e porosas foram congeladas com nitrogênio líquido, fraturadas utilizando uma espátula metálica e liofilizadas por 24 h. Amostras da superfície e da área de seção transversal de cada membrana foram fixadas em suportes de alumínio utilizando fita dupla-face de carbono, e foram recobertas com ouro. A análise de EDX foi realizada de forma

pontual, por meio de escolha aleatória de cinco regiões calcificadas em cada amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção das membranas densas e porosas de fibroína

Foram obtidas membranas densas de fibroína, com espessura de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , e o aspecto das mesmas é apresentado na Figura 8a.

As membranas porosas de fibroína foram preparadas na forma úmida (Figura 8b), e apresentavam espessura de aproximadamente 4 mm. Após a secagem por liofilização (Figura 8c), a espessura das membranas era de aproximadamente 3,5 mm. As caracterizações químicas e físicas das membranas serão apresentadas juntamente com os resultados de esterilização a seguir.

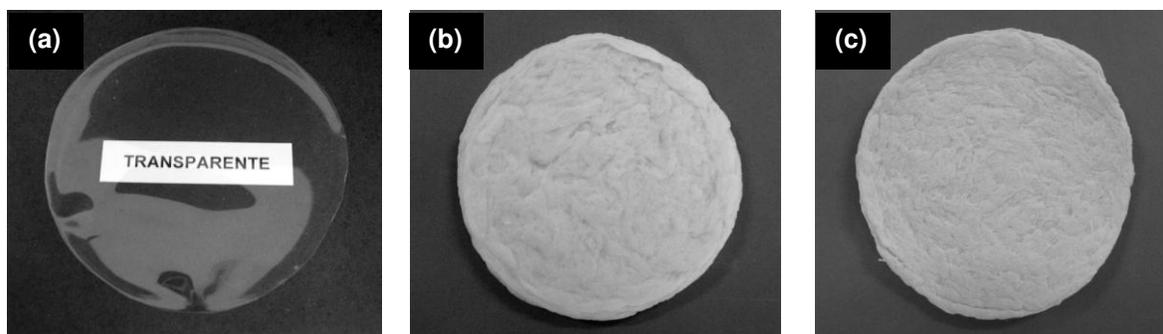


Figura 8: Membrana densa (a) e membrana porosa de fibroína úmida (b) e liofilizada (c).

### 5.2 Estudo dos efeitos da esterilização nas características físicas, químicas e biológicas das membranas de fibroína

As Figuras 9 e 10 apresentam as fotografias das amostras de membranas densas e porosas de fibroína, respectivamente, antes e após serem esterilizadas pelos métodos de etanol 70%, radiação UV, calor úmido, óxido de etileno e radiação gama.

A maioria das membranas não apresentou alterações macroscópicas devido aos ensaios de esterilização, com exceção das membranas esterilizadas em autoclave, sendo que as membranas densas (Figura 9) apresentaram certo grau de enrugamento e uma tonalidade um pouco mais amarelada que as demais amostras de membrana densa.

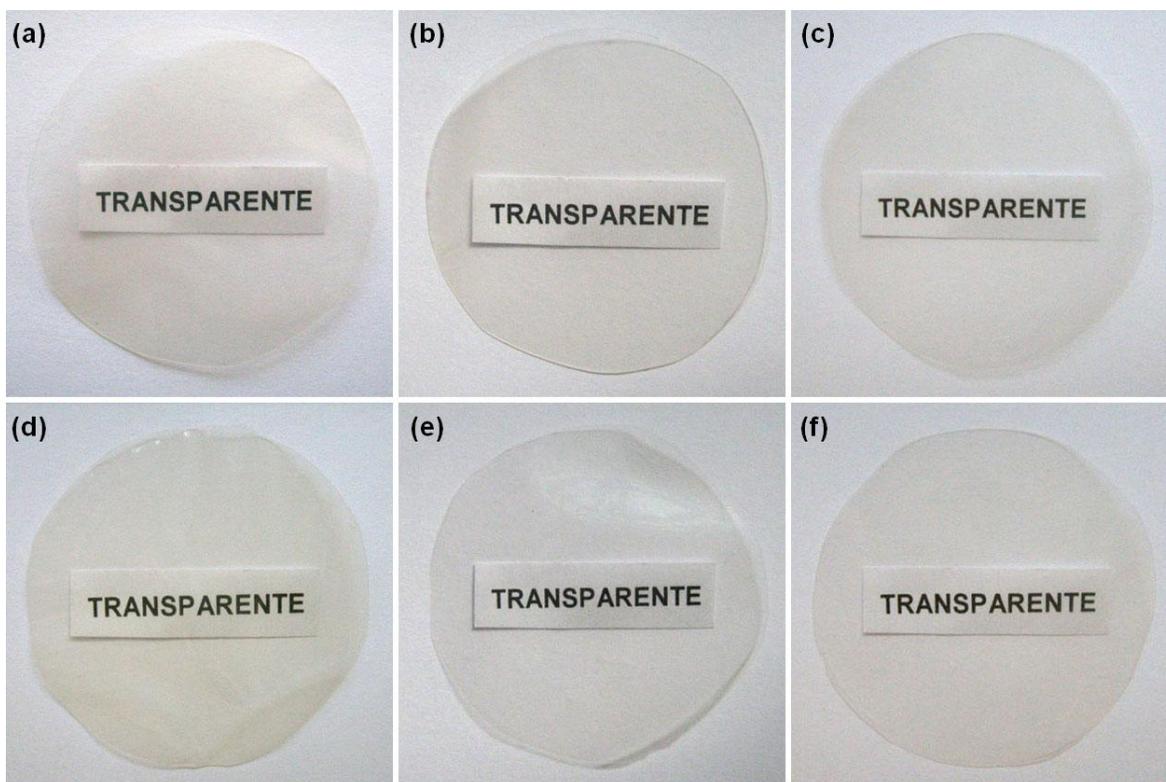


Figura 9: Fotografias das membranas densas de fibroína não esterilizada (a) e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

Nas membranas porosas (Figura 10), a submissão à autoclave resultou num encolhimento das membranas de aproximadamente 3 mm do diâmetro, provavelmente devido a um rearranjo molecular das cadeias da proteína ocasionado pela ação do vapor.

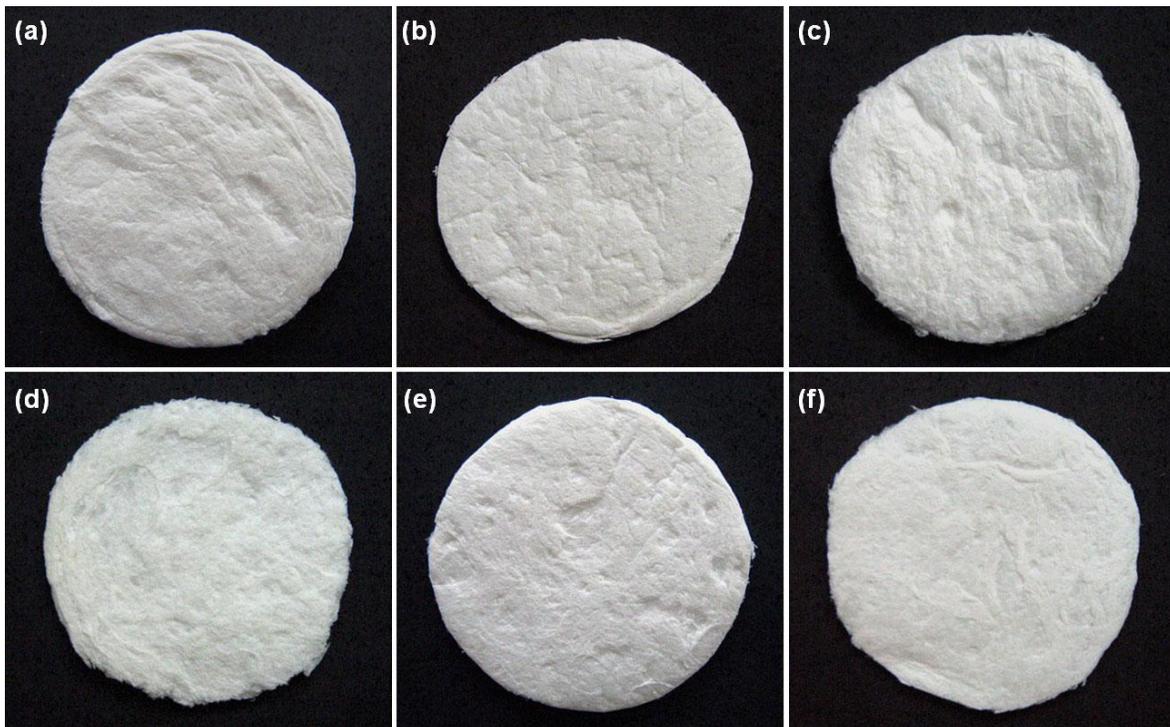


Figura 10: Fotografias das membranas porosas de fibroína não esterilizada (a) e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

### 5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 11 e 12 apresentam as micrografias obtidas por MEV das membranas densas e porosas de fibroína, respectivamente. Não foram observadas alterações morfológicas evidentes nas membranas em função das esterilizações. É possível observar na Figura 11 que as amostras de membrana densa possuem superfície e fratura regulares, homogêneas e lisas.

Já na Figura 12, é verificado que as amostras de membrana porosa apresentam uma superfície rugosa, e fratura com diversos poros. Tais observações indicam que este tipo de membrana apresenta características interessantes para ser aplicada como um *scaffold* para regeneração óssea, por exemplo.

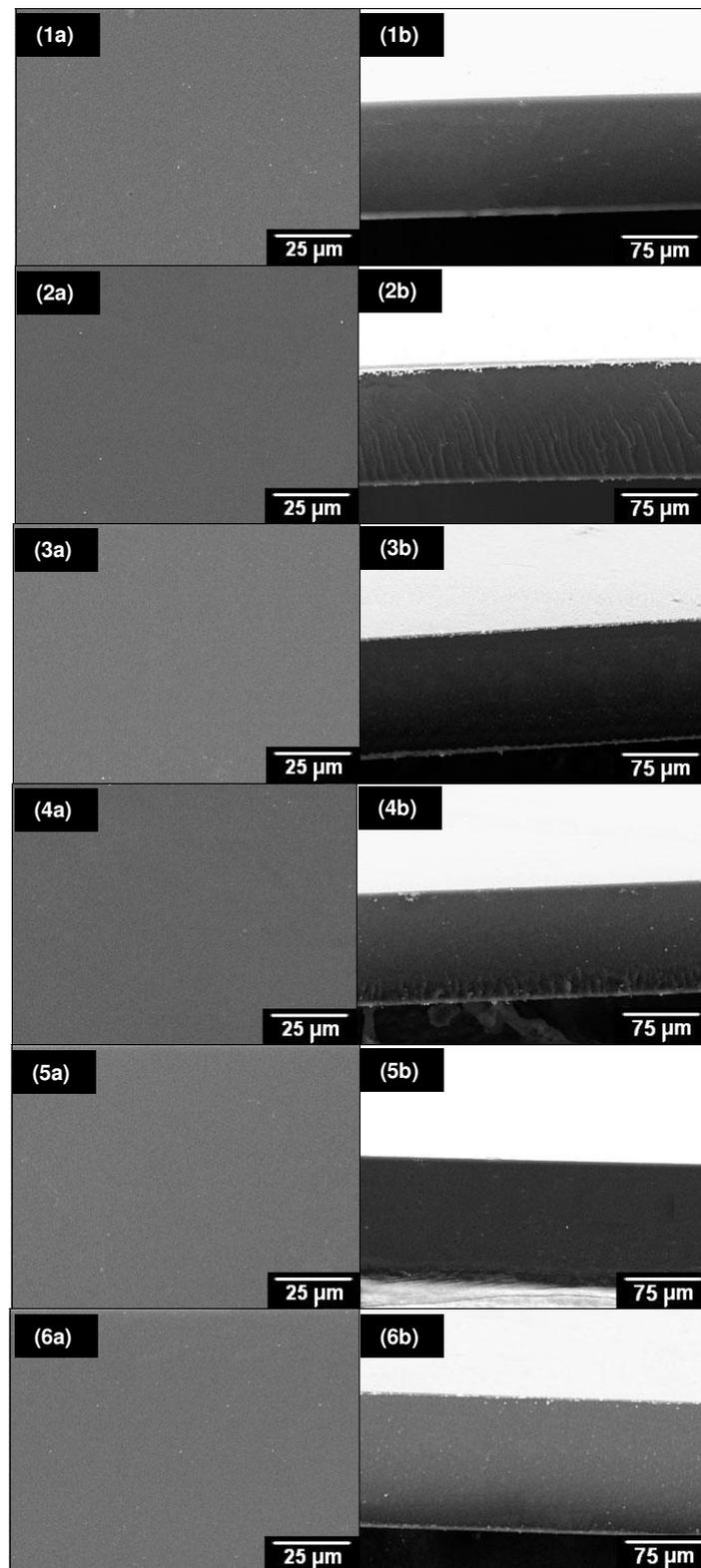


Figura 11: Micrografias da superfície (a) e fratura (b) das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (1), e esterilizadas por etanol 70% (2), radiação UV (3), autoclave (4), óxido de etileno (5) e radiação gama (6).

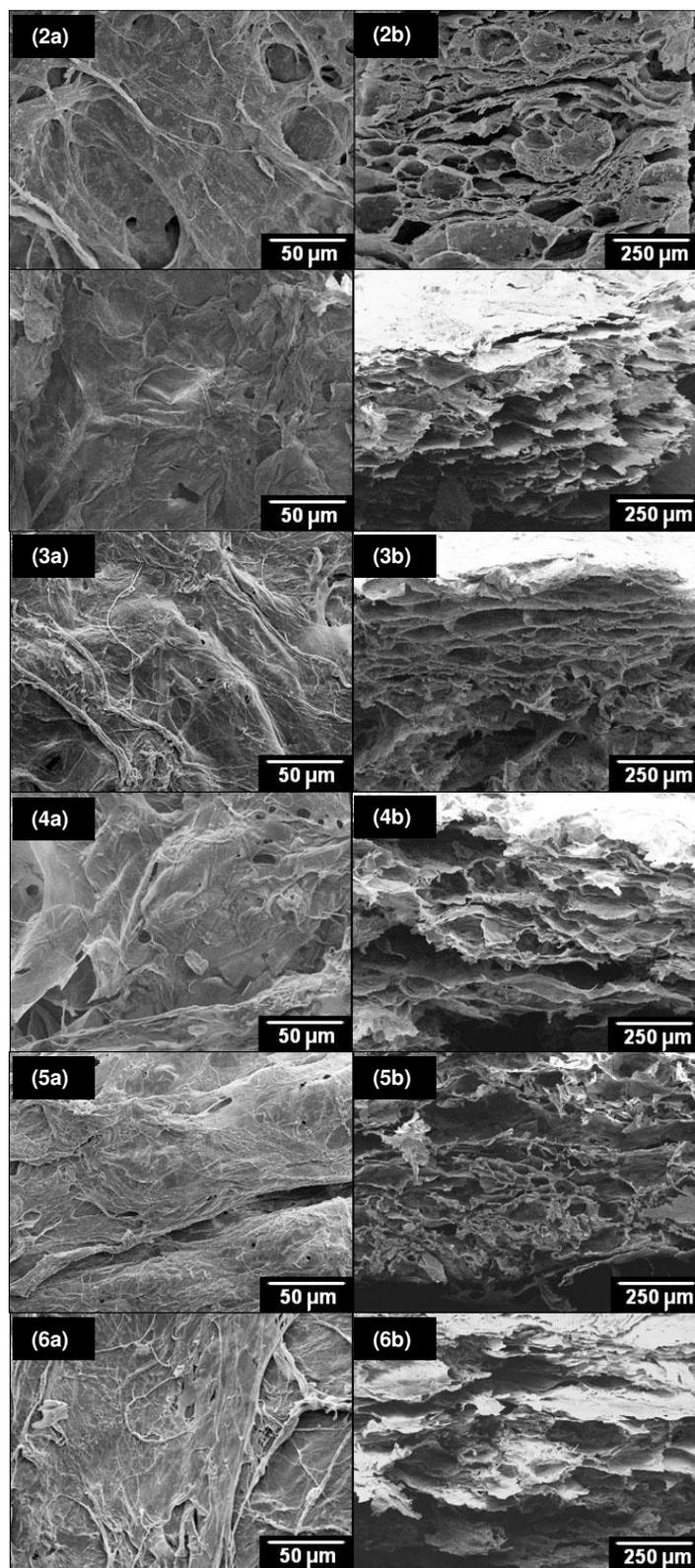


Figura 12: Micrografias da superfície (a) e fratura (b) das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (1), e esterilizadas por etanol 70% (2), radiação UV (3), autoclave (4), óxido de etileno (5) e radiação gama (6).

### 5.2.2 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de FTIR é sensível às diferentes conformações moleculares da fibroína (LV *et al.*, 2005). Cada conformação da fibroína possui bandas de absorção específicas em regiões de vibração distintas associadas aos grupos amida das proteínas. As bandas de amida I, II e III são atribuídas ao estiramento C=O, deformação N-H, e dobramento O-C-N, respectivamente. Duas bandas distintas têm sido associadas com as vibrações da amida I, aparecendo em 1660 e 1630  $\text{cm}^{-1}$  como contribuições das conformações seda I (enovelamento aleatório e estrutura hélice- $\alpha$ ) e seda II (estrutura folha- $\beta$ ), respectivamente. Uma observação similar pode ser feita na região da amida II, onde o pico em 1543  $\text{cm}^{-1}$ , devido à conformação seda I, é desviado para 1515  $\text{cm}^{-1}$  quando ocorre transição para a conformação seda II. Já a banda da amida III ocorre na faixa de 1230 a 1260  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1230  $\text{cm}^{-1}$  se deve à conformação seda I, enquanto que a banda em 1260  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à fase cristalina (seda II) (RUSA *et al.*, 2005).

A Figura 13 apresenta os espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana densa, antes e após os ensaios de esterilização. Nas regiões referentes às amidas II e III dos espectros de todas as amostras, foram observados picos em aproximadamente 1514  $\text{cm}^{-1}$  e 1235  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença das conformações moleculares seda II e seda I, respectivamente (LV *et al.*, 2005; MIYAGUCHI; HU, 2005; RUSA *et al.*, 2005). Estes resultados provavelmente foram obtidos, inclusive para a membrana não esterilizada, devido à forma como as membranas densas foram preparadas. Membranas de fibroína produzidas a partir de solução dialisada, e secas na temperatura de 25 °C apresentam predominância de estrutura seda I. O tratamento com etanol 70% por 20 min, realizado para tornar as membranas hidrofóbicas, induziu o aumento da proporção da conformação seda II (UM *et al.*, 2004; ZUO *et al.*, 2007; LAWRENCE *et al.*, 2008).

Na região do espectro referente à amida I, foram observadas diferenças entre os espectros. Para as amostras de membrana densa não esterilizadas, e esterilizadas por radiações UV e gama, foram observados picos em

aproximadamente  $1645\text{ cm}^{-1}$  (seda I), enquanto que nos espectros das amostras esterilizadas por etanol 70% e autoclave, foram observados picos em  $1622\text{ cm}^{-1}$  (seda II). Estes resultados indicam que as amostras esterilizadas por etanol 70% e autoclave apresentam uma proporção maior de estrutura folha- $\beta$ , e menor de enovelamentos aleatórios e hélice- $\alpha$ , quando comparadas com a membrana não esterilizada (LV *et al.*, 2005; MIYAGUCHI; HU, 2005; RUSA *et al.*, 2005).

A posição da banda referente à amida I das amostras de membranas densas esterilizadas com etanol 70% e autoclave indica que os grupos C=O nas estruturas folha- $\beta$  estão envolvidos em mais ligações de hidrogênio, quando comparadas com as estruturas folha- $\beta$  das demais amostras, o que desvia o pico de FTIR correspondente para um número de onda maior (RUSA *et al.*, 2005).

Lawrence *et al.* (2008) observaram que a esterilização por autoclave de membranas densas de fibroína mesmo não tratadas previamente com metanol ou etanol ocasionou um aumento da conformação seda II, o que indica que a esterilização por autoclave, devido à exposição das membranas de fibroína a condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, induz o aumento no conteúdo total da estrutura folha- $\beta$ , e conseqüente diminuição da proporção da conformação seda I, similar ao efeito do tratamento das membranas densas de fibroína com metanol ou etanol (UM *et al.*, 2004; ZUO *et al.*, 2007).

O espectro da membrana esterilizada por óxido de etileno apresentou picos de intensidade semelhante em  $1622$  e  $1645\text{ cm}^{-1}$ , indicando que esta amostra apresenta uma proporção de conformação seda II maior do que a membrana não esterilizada, mas menor do que as membranas esterilizadas por etanol 70% e autoclave. O efeito do tratamento prévio da membrana com etanol 70%, associado à temperatura de  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizada na esterilização com óxido de etileno provavelmente foram os fatores que resultaram no aumento da estrutura folha- $\beta$ . Convém ressaltar que no espectro da membrana esterilizada por óxido de etileno, a ausência de picos em posições não relacionadas à fibroína indica que não ocorreram interações químicas, e também que o processo de aeração que foi realizado após a esterilização provavelmente foi suficiente para a remoção efetiva do óxido de etileno (LEE *et al.*, 2008).

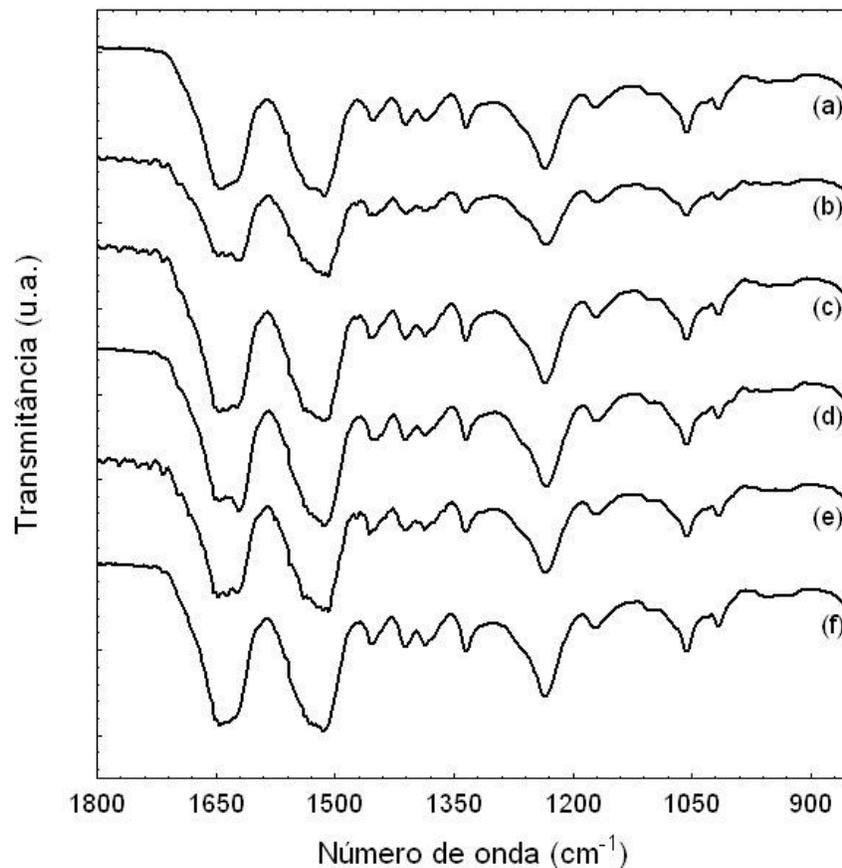


Figura 13: Espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

A Figura 14 exibe os espectros de FTIR das amostras de membranas porosas, antes e após os ensaios de esterilização. Todas as amostras apresentaram picos em aproximadamente 1622 e 1517  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a predominância da estrutura seda II, e em 1230  $\text{cm}^{-1}$ , referente à estrutura seda I (LV *et al.*, 2005; MIYAGUCHI; HU, 2005; RUSA *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que a membrana porosa não esterilizada já apresenta uma estrutura altamente cristalina, provavelmente devido à forma como a membrana foi preparada. A fibroína em solução salina, utilizada para a produção da membrana porosa, provavelmente se

encontra numa conformação seda I, com predominância de estrutura amorfa, devido ao  $\text{CaCl}_2$  presente no solvente ternário, que atua aumentando a força iônica do meio e rompendo ou modificando as ligações de hidrogênio das cadeias peptídicas (NOGUEIRA, 2005).

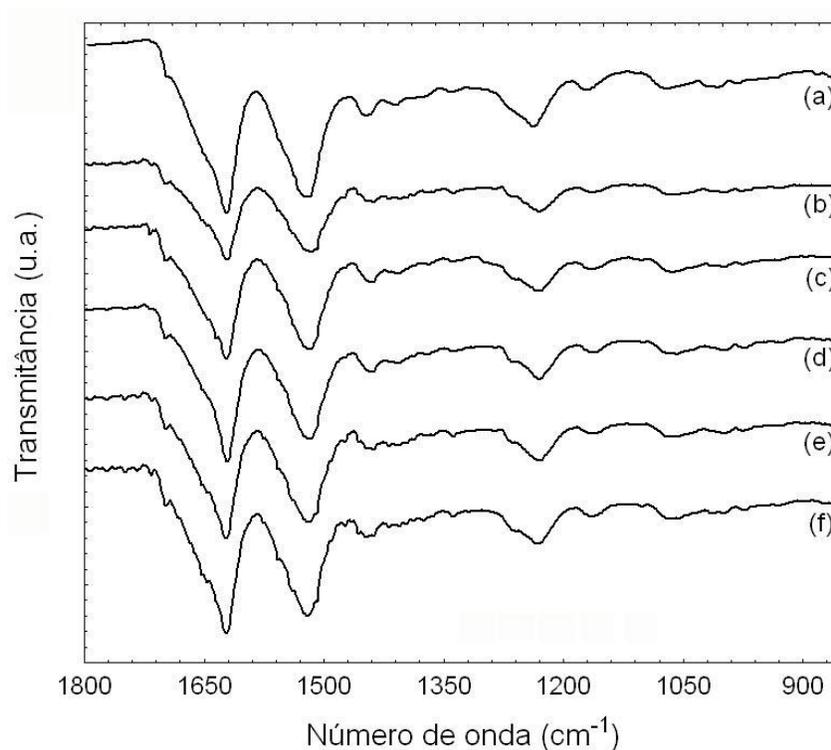


Figura 14: Espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

As moléculas de fibroína podem ser cristalizadas por estresse mecânico ou tratamentos que envolvam o uso de calor ou solventes, para formar uma estrutura de conformação folha- $\beta$  a partir de uma conformação aleatória (TAMADA, 2005). No caso da formação da membrana porosa, este aumento da cristalização é ocasionado pela agitação mecânica, que gera filamentos que são continuamente agregados para a formação da membrana. O tratamento posterior da membrana com etanol 70% por 20 min torna esta estrutura mais estável, devido ao aumento da estrutura folha- $\beta$ .

O processo de secagem da membrana porosa por liofilização pode ser outro fator responsável pela sua estrutura altamente cristalina. Na membrana porosa de fibroína na forma úmida, a água está presente nos estados livre, fracamente ligado e fortemente ligado à estrutura da membrana. Durante o congelamento, a água é convertida em cristais de gelo, e durante a liofilização, a membrana congelada é seca a vácuo, por sublimação dos cristais de gelo, em uma temperatura abaixo do ponto de congelamento da água. Na medida em que as moléculas de água sublimam, os grupamentos da membrana que estavam ligados à água formam novas interações na cadeia polimérica e entre diferentes cadeias poliméricas. A formação de ligações cruzadas auxilia na estabilidade da membrana (MOONSRI *et al.*, 2008; ROYCHOWDHURY *et al.*, 2009).

Na Figura 14, não foram observadas diferenças entre os espectros das amostras de membrana porosa esterilizadas pelos diferentes métodos. Isto provavelmente se deve ao fato de que, como a membrana não esterilizada já apresenta um alto índice de estruturas folha- $\beta$ , a cristalização adicional ocasionada pelos métodos de esterilização é suprimida pela estrutura pré-cristalizada, o que leva a pouca ou nenhuma alteração da cristalinidade (UM *et al.*, 2004).

### 5.2.3 Difração de raios X

O difratograma de raios X é geralmente utilizado para o estudo da estrutura cristalina de um material (KUNDU *et al.*, 2008). A Figura 15 apresenta os difratogramas de raios X das amostras de membranas densas antes da esterilização, e após os diferentes ensaios de esterilização. Todas as amostras apresentaram picos semelhantes, e o maior pico observado em todas as amostras, em  $20^\circ$ , é referente ao espaçamento cristalino de  $4,55 \text{ \AA}$  (muito forte) de cristais folha- $\beta$ . Outros picos menores que indicam a presença de cristais folha- $\beta$  foram observados em  $24,5^\circ$  ( $3,8 \text{ \AA}$ ),  $16,5^\circ$  ( $5,37 \text{ \AA}$ ) e  $8,7^\circ$  ( $10,1 \text{ \AA}$ ). Também foram observados dois picos referentes à conformação seda I: o segundo maior pico dos difratogramas em  $12^\circ$ , e um pico pequeno em  $28,5^\circ$  ( $3,2 \text{ \AA}$ ), que indicam a presença de estruturas hélice- $\alpha$ . Pelos resultados observados, pode-se inferir que

a estrutura cristalina das membranas densas é formada por uma coexistência das conformações seda I e seda II (KIM *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2002; LV *et al.*, 2004; LV *et al.*, 2005).

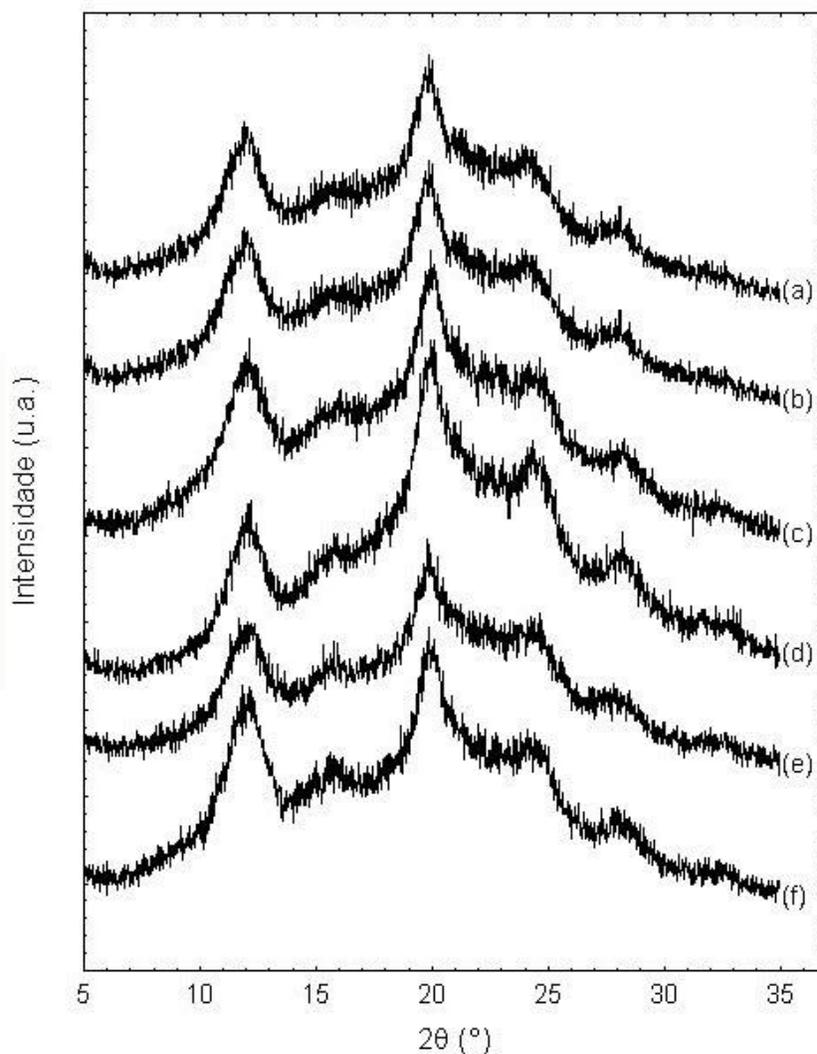


Figura 15: Difratomogramas de raios X das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

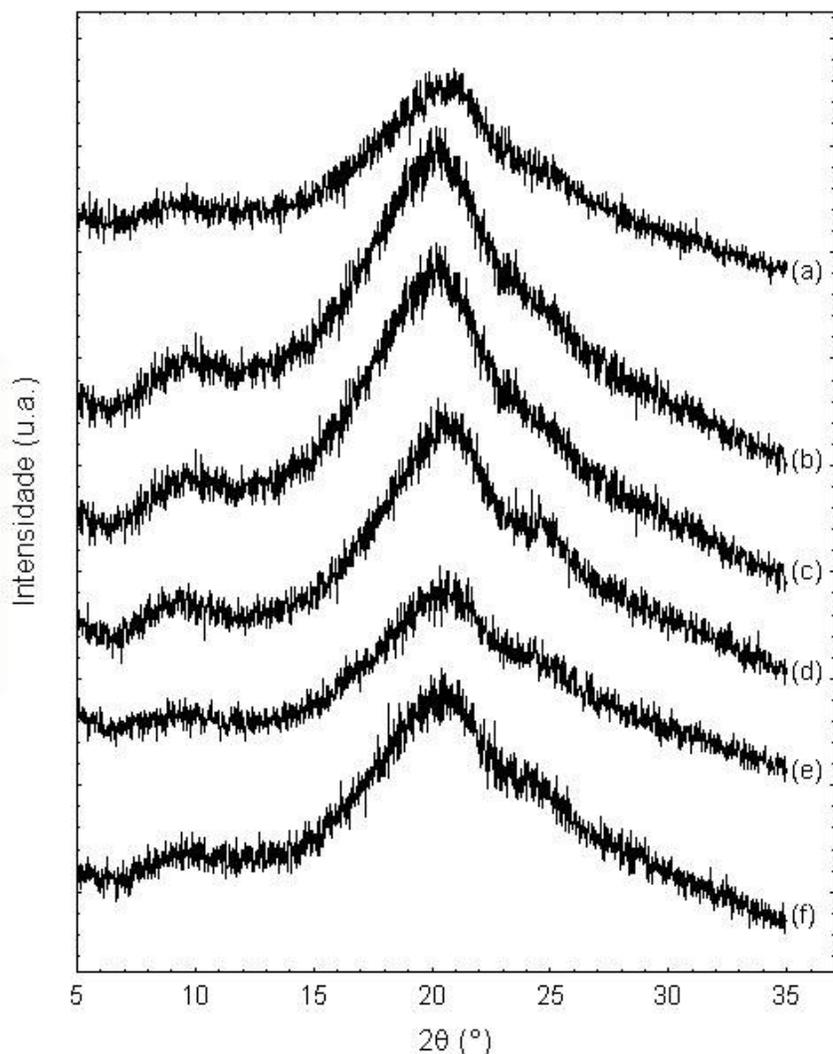


Figura 16: Difratogramas de raios X das amostras de membrana porosa de fibroína não esterilizada (a), e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

Os difratogramas de raios X das amostras de membranas porosas antes da esterilização, e após os diferentes ensaios de esterilização, são apresentados na Figura 16. Os difratogramas de todas as amostras apresentaram características semelhantes. O maior pico observado, em  $20^\circ$ , e os picos menores em  $9,5^\circ$  e  $24,5^\circ$ , indica a predominância da estrutura cristalina folha- $\beta$ , referente à conformação seda II da fibroína. Estes resultados confirmam a caracterização das membranas por FTIR. Um pico de menor intensidade em  $28,5^\circ$  indica a pequena

presença da estrutura hélice- $\alpha$  (KIM *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2002; LV *et al.*, 2004; LV *et al.*, 2005).

#### 5.2.4 Propriedades mecânicas

A Tabela 3 apresenta os resultados dos testes de resistência à tração das membranas densas de fibroína nas formas não esterilizada e esterilizada por etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama. Os resultados de tensão na ruptura obtidos em cada caso foram expressos em termos de valores médios para um conjunto de cinco amostras analisadas. Os valores médios dos resultados de cada método de esterilização foram comparados ao da membrana não esterilizada, pelo teste estatístico *2-sample-t*, e foi obtido o valor-p para cada caso, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 3: Resultados do teste de resistência à tração das membranas densas de fibroína não esterilizada, e após esterilização com etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama.

Amostra de membrana densa	Tensão de ruptura* (MPa)	Valor-p**
Não esterilizada	63,5 $\pm$ 5,6	
Esterilizada por etanol 70%	52,1 $\pm$ 7,3	<b>0,027</b>
Esterilizada por radiação UV	62,5 $\pm$ 4,3	0,747
Esterilizada por autoclave	32,1 $\pm$ 3,4	<b>0,000</b>
Esterilizada por óxido de etileno	49,4 $\pm$ 8,1	<b>0,016</b>
Esterilizada por radiação gama	58,5 $\pm$ 4,9	0,178

\* Média  $\pm$  desvio padrão (n = 5).

\*\* Se p < 0,05, valores estatisticamente diferentes do valor da amostra não esterilizada.

De acordo com a Tabela 3, as amostras de membrana densa esterilizadas por radiações UV e gama não apresentaram valores de tensão na ruptura

estatisticamente diferentes dos valores das amostras de membrana densa não esterilizada, o que evidencia que não houve alterações físicas ou químicas, como reticulações durante os processos de esterilização. Já os métodos de esterilização por etanol 70%, autoclave e óxido de etileno resultaram na diminuição da tensão na ruptura das amostras, indicando que os métodos utilizados ocasionaram a diminuição da resistência mecânica das mesmas. Relacionando os resultados obtidos no teste mecânico com os resultados de FTIR-ATR e XRD, foi verificado que as membranas densas de fibroína esterilizadas por estes métodos apresentaram uma proporção maior da conformação seda II, sendo, desta forma, mais cristalinas.

Lv *et al.* (2005) avaliaram a resistência à tração de filmes de fibroína produzidos a partir da secagem da solução dialisada utilizando temperaturas entre 40 e 80 °C. Eles observaram que a partir de aproximadamente 60 °C, a estrutura predominante das membranas passou a ser folha- $\beta$ , não sendo necessário o tratamento posterior das membranas com metanol ou etanol, e quanto maior a temperatura de secagem, mais cristalinas as membranas se tornavam. No entanto, quanto mais cristalina a estrutura, mais quebradiça ficava a membrana. Assim, a resistência das membranas foi avaliada na forma úmida, após 24 h de imersão em água. Os valores de tensão na ruptura das membranas passaram de 0,94 MPa, quando seca a 40 °C, para um máximo de 29,8 MPa, quando seca na temperatura de 70 °C.

O aumento da conformação seda II obtida por estes autores foi comparável com os resultados encontrados para a esterilização da membrana densa por etanol 70%, autoclave e óxido de etileno. No entanto, o fato das amostras estarem úmidas resultou em resultados contrários. Isto leva a crer que se as membranas esterilizadas fossem analisadas na forma úmida, as amostras que apresentassem um aumento da conformação seda II apresentariam resistência mecânica maior, se comparadas com a membrana densa não esterilizada. Esta diferença pode ser explicada pelo aumento do movimento molecular das cadeias da fibroína, induzido pela absorção de moléculas de água, que atuam como um plastificante, e tornam as estruturas com predominância de folha- $\beta$  mais estáveis (LAWRENCE *et al.*, 2008).

Tabela 4: Resultados do teste de resistência à tração das membranas porosas de fibroína não esterilizada, e após esterilização com etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama.

Amostra de membrana porosa	Tensão de ruptura* (kPa)	Valor-p**
Não esterilizada	41,7 ± 3,9	
Esterilizada por etanol 70%	101,7 ± 10,4	<b>0,000</b>
Esterilizada por radiação UV	46,3 ± 7,2	0,264
Esterilizada por autoclave	82,9 ± 17,6	<b>0,007</b>
Esterilizada por óxido de etileno	58,0 ± 5,2	<b>0,001</b>
Esterilizada por radiação gama	65,3 ± 3,1	<b>0,000</b>

\* Média ± desvio padrão (n = 5).

\*\* Se p < 0,05, valores estatisticamente diferentes do valor da amostra não esterilizada.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de resistência à tração das membranas porosas de fibroína nas formas não esterilizada e esterilizada pelos diferentes métodos. Da mesma forma que na membrana densa, a esterilização da membrana porosa com radiação UV não resultou em valores de tensão de ruptura estatisticamente diferentes dos valores da membrana não esterilizada. No entanto, foi verificado que os métodos que ocasionaram a diminuição da resistência mecânica da membrana densa foram responsáveis pelo aumento da resistência da membrana porosa. Isto se deve aos diferentes efeitos que a temperatura, umidade e tratamento com solventes orgânicos causam nos dois tipos de membrana. Acredita-se que estes resultados não seriam invertidos se as membranas porosas tivessem sido analisadas na forma úmida, pois tratamentos que aumentem a estabilidade da membrana são necessários para evitar que a mesma seja delaminada em água, como o tratamento com etanol, observado por Nogueira (2005).

Diferentemente da membrana densa, a membrana porosa esterilizada por radiação gama também apresentou um aumento na resistência mecânica, provavelmente devido ao aumento das ligações cruzadas que a radiação gama pode induzir em alguns materiais, que foram responsáveis pelo aumento da estabilidade da membrana porosa (PALSULE *et al.*, 2008).

### **5.2.5 Citotoxicidade indireta**

O teste de citotoxicidade é um dos primeiros testes que deve ser realizado para verificar a toxicidade de materiais para aplicações biomédicas, uma vez que pode ser aplicado para selecionar materiais que poderão vir a ser utilizados na manufatura de biomateriais (RODAS *et al.*, 2008).

As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados dos testes de citotoxicidade das membranas densas e porosas de fibroína submetidas aos diferentes ensaios de esterilização. As curvas obtidas apresentam a correlação do percentual médio de células vivas em função da concentração dos extratos.

As amostras de membranas densas, esterilizadas pelos métodos de etanol 70%, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, não apresentaram citotoxicidade, conforme apresentado na Figura 17. A viabilidade celular das amostras foi mantida entre 90 e 100%, comparáveis ao controle negativo, para todas as concentrações de extrato analisadas. No entanto, não foi possível analisar a amostra de membrana densa irradiada por UV, pois foi observada contaminação microbiana durante o preparo do extrato para o teste de citotoxicidade. O teste foi repetido, e novamente foi observada contaminação, o que indica que a irradiação da membrana densa com UV durante o tempo adotado (30 minutos em cada face da membrana) não é suficiente para uma descontaminação eficiente do material.

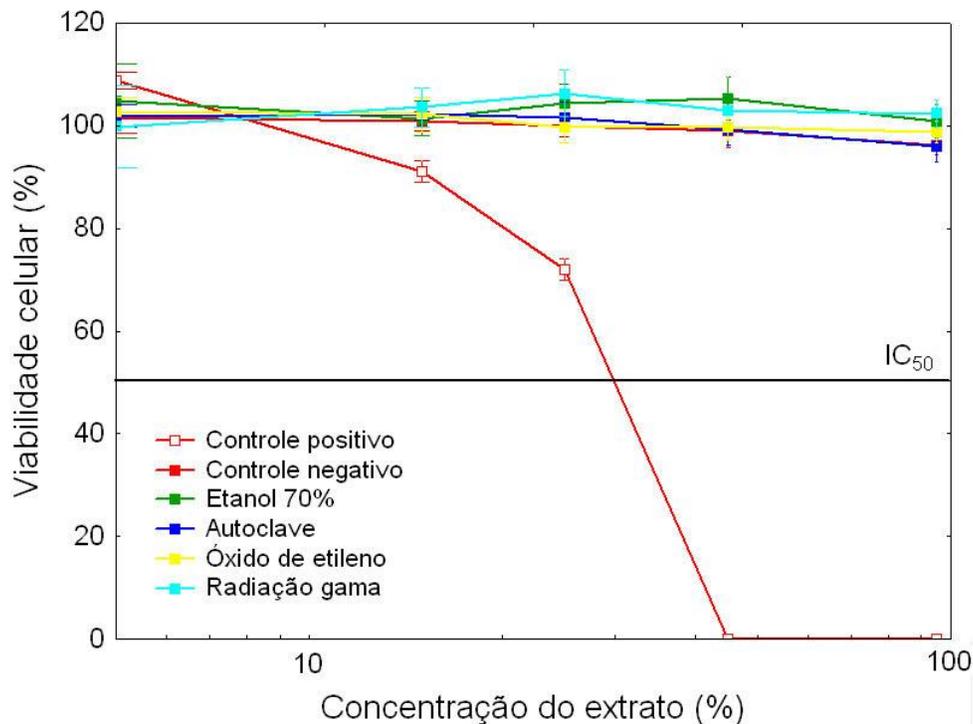


Figura 17: Viabilidade celular de amostras de membrana densa de fibroína de seda esterilizadas por etanol 70%, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, submetidas ao teste de citotoxicidade indireta.

Os resultados do teste de citotoxicidade das amostras de membranas porosas submetidas aos ensaios de esterilização (Figura 18) mostram que para todas as amostras, inclusive a membrana porosa irradiada com UV, os resultados de viabilidade celular foram mantidos entre 90 e 100%, comparáveis ao controle negativo, para todas as concentrações de extrato analisadas, indicando que as amostras não apresentaram citotoxicidade, reforçando a característica de biocompatibilidade das membranas.

A ausência de toxicidade da fibroína, processada em diversas formas, uma vez removida a sericina, já foi constatada por testes de citotoxicidade e crescimento celular *in vivo* e *in vitro* por outros autores (TAMADA, 2005; YANG *et al.*, 2007; ACHARYA *et al.*, 2008).

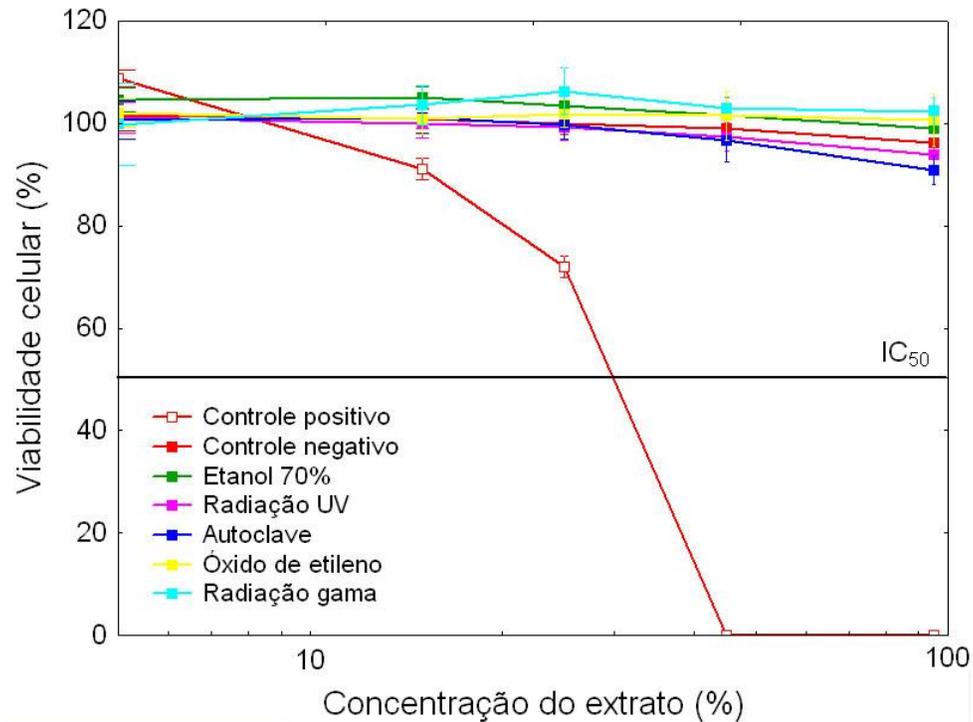


Figura 18: Viabilidade celular de amostras de membrana porosa de fibroína de seda esterilizadas por etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, submetidas a testes de citotoxicidade indireta.

### 5.3 Estudo da calcificação *in vitro* das membranas de fibroína

Durante os ensaios de calcificação, a cada troca de solução SBF e ao fim dos ensaios, o pH das soluções contidas nos frascos foi medido. Foi observado o aumento no pH de algumas soluções, que é um indício de calcificação (BEPPU, 1999). Quando ocorria a turvação da solução e diminuição do pH, indicando contaminação microbiana, a amostra era descartada e o ensaio era repetido.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios de calcificação realizados, com base na observação da formação ou não de depósitos de calcificação nas membranas pela análise de MEV.

Tabela 5: Resultados dos ensaios de calcificação *in vitro* das membranas densas e porosas de fibroína.

Ensaio	Substrato	Tipo de SBF	Conc. do SBF	Calcificação
1	Densa	Padrão	1x/1x/1x	Não
2	Porosa	Padrão	1x/1x/1x	Não
3	Densa	Padrão	1x/1,5x/1,5x	Não
4	Porosa	Padrão	1x/1,5x/1,5x	Sim
5	Densa	Ca↑	1x/1x/1x	Não
6	Porosa	Ca↑	1x/1x/1x	Sim*
7	Densa	P↑	1x/1x/1x	Não
8	Porosa	P↑	1x/1x/1x	Sim*
9	Densa	Ca↑	1x/1,5x/1,5x	Sim
10	Porosa	Ca↑	1x/1,5x/1,5x	Sim
11	Densa	P↑	1x/1,5x/1,5x	Sim
12	Porosa	P↑	1x/1,5x/1,5x	Sim

\* Não ocorreu calcificação na duplicata destes ensaios.

Na Figura 19, pode-se observar as fotografias das amostras obtidas dos ensaios 1 a 4, e as respectivas micrografias de superfície e fratura, obtidas por MEV. Nestes ensaios, foi utilizado SBF padrão, mantendo a concentração inicial durante os 7 dias de ensaio ou aumentando 1,5x a concentração do SBF a partir do 3º dia. Observa-se que apenas na amostra do ensaio 4, tanto na superfície quanto no interior da membrana porosa, ocorreu a formação de depósitos esféricos, com aproximadamente 2,5 µm de diâmetro. A análise de EDX confirmou que os depósitos eram compostos por fosfato de cálcio, com uma relação molar estequiométrica Ca/P variando de 1,27 a 1,69.

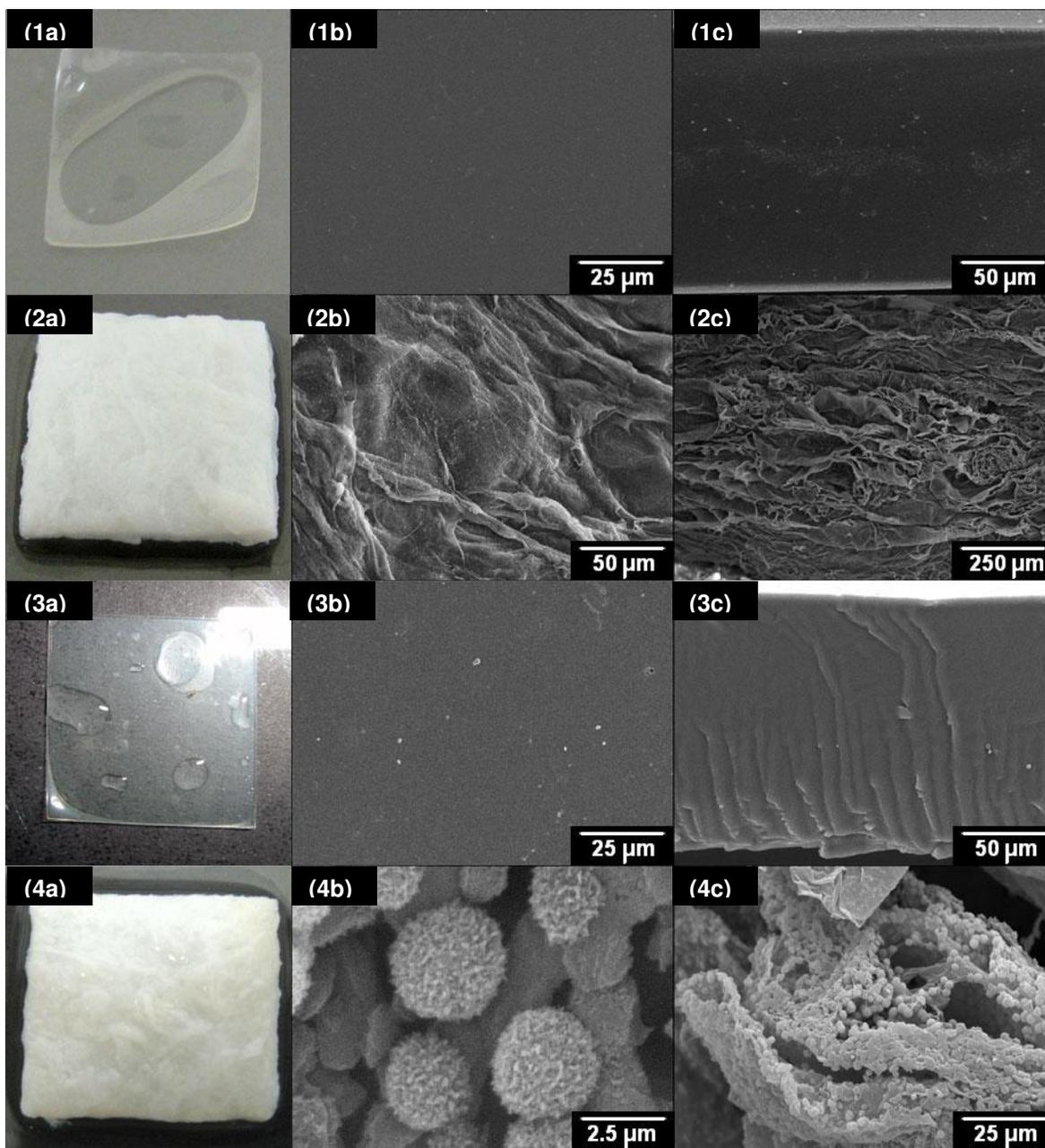


Figura 19: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 1 a 4, durante sete dias.

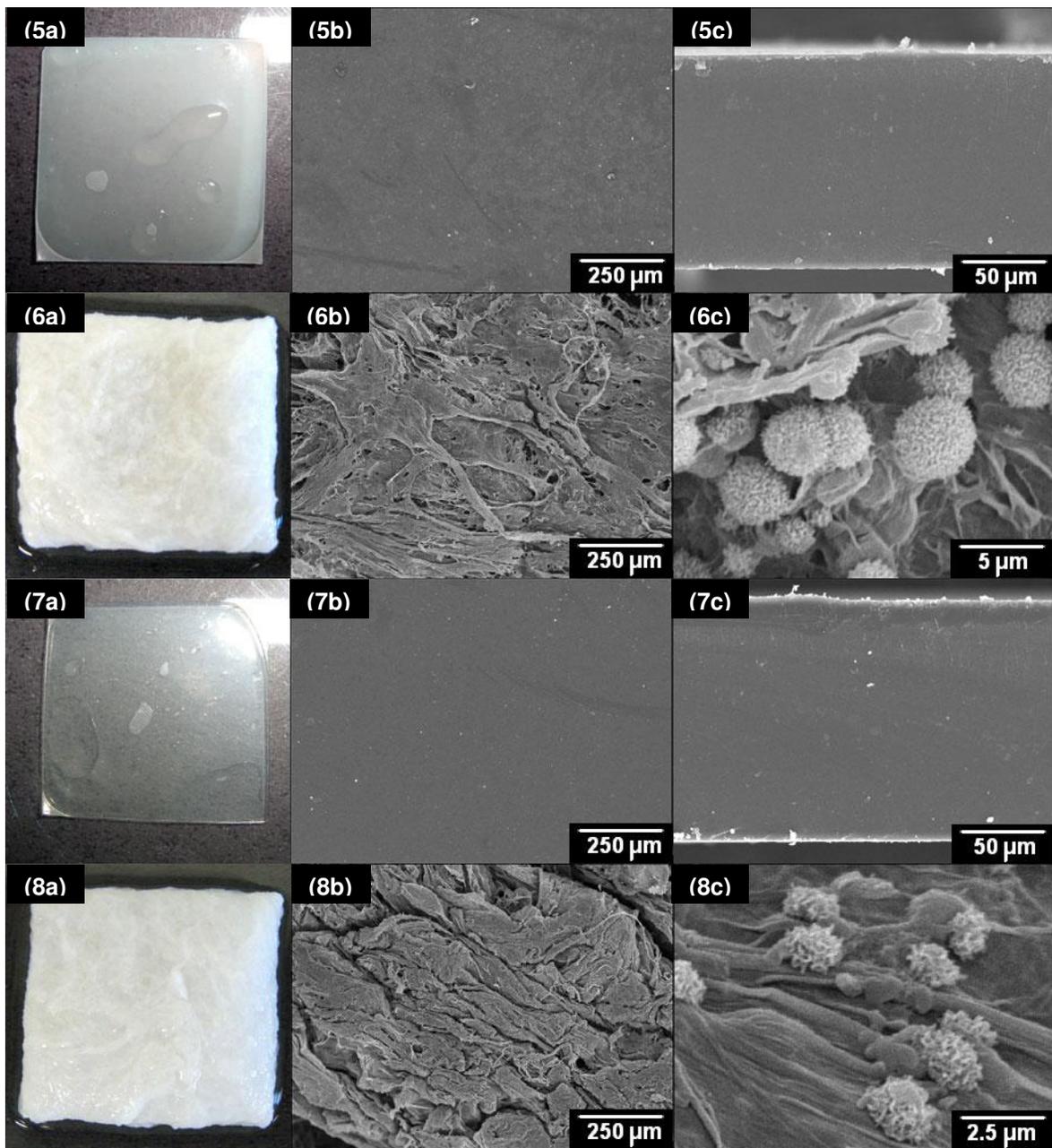


Figura 20: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 5 a 8, durante sete dias.

A Figura 20 apresenta as fotografias e micrografias das amostras obtidas dos ensaios 5 a 8, nos quais o SBF utilizado continha excesso de Ca e P, utilizados na concentração similar à do plasma sanguíneo durante os sete dias de ensaio. Os resultados mostram que as amostras de membrana densa não calcificaram, e as de membrana porosa calcificaram somente no interior, não

sendo observada calcificação na superfície. Os depósitos de fosfato de cálcio observados na amostra do ensaio 6 (SBF com  $\text{Ca}^{\uparrow}$ ) apresentavam diâmetro de aproximadamente  $2,5 \mu\text{m}$ , e os observados no ensaio 8 (SBF com  $\text{P}^{\uparrow}$ ), de aproximadamente  $1,5 \mu\text{m}$ . A análise de EDX indicou que a relação Ca/P destes depósitos variou de 1,41 a 1,51. Convém ressaltar que as duplicatas dos ensaios 6 e 8 não apresentaram nenhum tipo de calcificação (imagens não apresentadas).

A Figura 21 mostra os resultados obtidos dos ensaios 9 a 12, nos quais foi utilizado SBF com  $\text{Ca}^{\uparrow}$  e  $\text{P}^{\uparrow}$ , aumentando  $1,5\times$  a concentração das soluções a partir do 3º dia dos ensaios. É possível observar que todas as amostras apresentaram calcificação intensa, sendo perceptível a olho nu, e ao tocar as amostras. A membrana densa apresentava cor esbranquiçada e textura arenosa, e a membrana porosa apresentava certa rigidez.

Na superfície das amostras de membrana densa, e na superfície e interior das amostras de membrana porosa, foram formados depósitos esféricos de fosfato de cálcio, com aproximadamente  $4 \mu\text{m}$  de diâmetro. A análise de EDX indicou uma relação Ca/P variando de 1,34 a 1,68. No entanto, a morfologia dos depósitos variou dependendo de qual íon (fosfato ou cálcio) estava presente. Os depósitos formados com  $\text{Ca}^{\uparrow}$  apresentaram formatos mais esféricos, de superfície mais homogênea, enquanto que os depósitos com  $\text{P}^{\uparrow}$  apresentaram formas esféricas mais irregulares, e melhor interconectadas com a superfície.

As diferenças na morfologia dos depósitos sugerem a ocorrência de mecanismos de deposição diferentes em cada situação, uma vez que diferentes grupos químicos estão presentes nas soluções utilizadas para o processo de calcificação. Sabe-se que a separação de fases pode ocorrer por dois mecanismos básicos: nucleação e crescimento, onde uma ampla distribuição de tamanhos e baixa conectividade entre os núcleos é observada, ou decomposição spinodal, onde uma ampla conectividade entre duas fases é esperada. É possível que a deposição na fibroína sob excesso de fosfato permita a ocorrência de um processo mais similar à deposição spinodal (BEPPU; SANTANA, 2002).

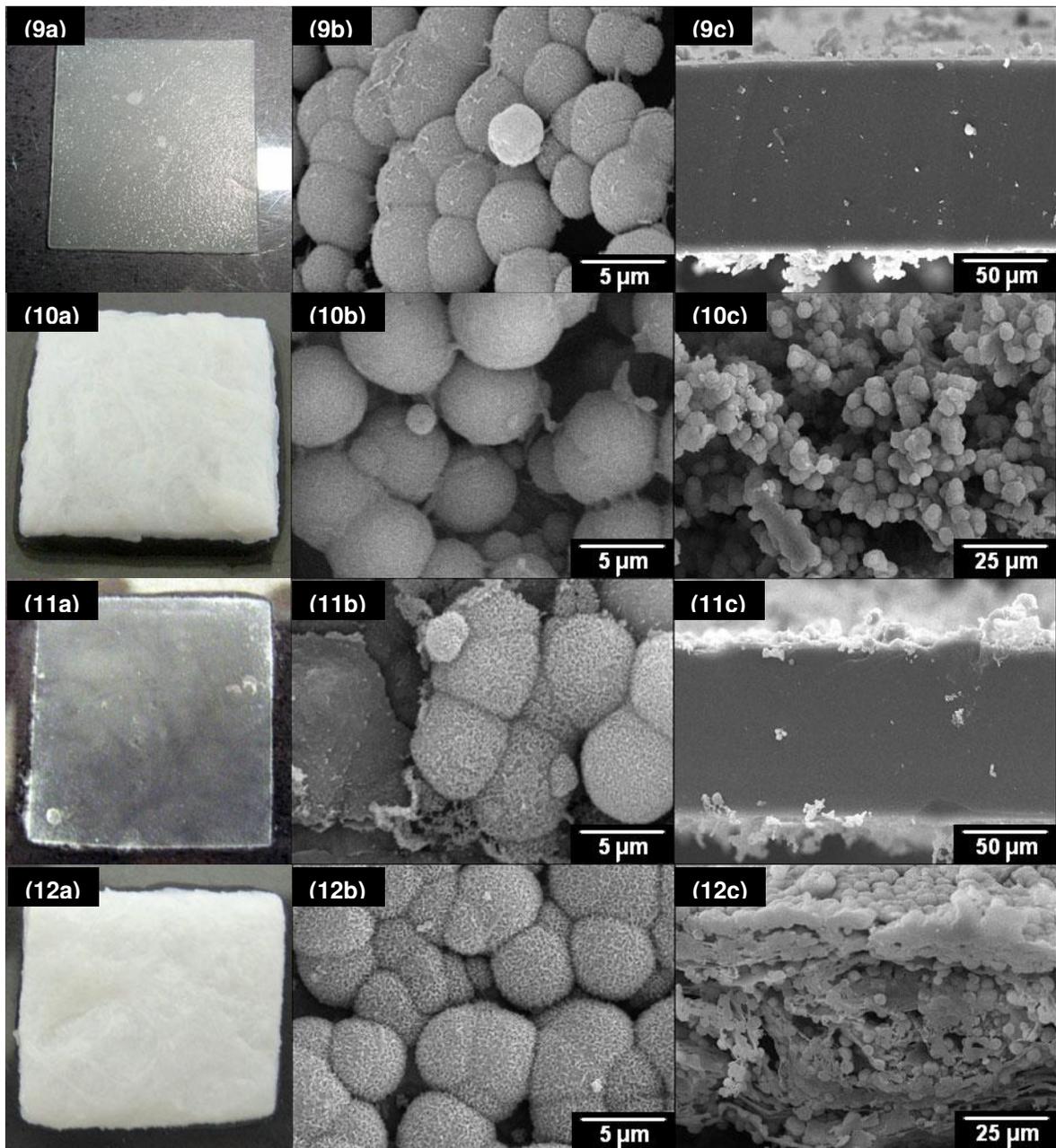


Figura 21: Fotografias (a) e micrografias da superfície (b) e fratura (c) das amostras obtidas dos ensaios de calcificação 9 a 12, durante sete dias.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de calcificação, é possível afirmar que a fibroína de seda, nas formas de membrana densa e porosa, induz a calcificação. A cadeia longa que compõe a fibroína possui uma forte preponderância de aminoácidos, com uma cadeia lateral carboxílica carregada

negativamente, que provavelmente apresenta excelentes sítios de afinidade com íons de cálcio para nuclear a formação de precursores da hidroxiapatita (KINO *et al.*, 2006).

A morfologia dos depósitos observados nas membranas de fibroína é diferente da observada em precipitados obtidos por processos sol-gel, que não apresentam forma bem definida, e ocorrem sem a presença de uma matriz orgânica, o que demonstra a influência da matriz no processo de calcificação (AIMOLI, 2007).

Os valores determinados por EDX para a relação Ca/P, sugerem que os depósitos de calcificação eram constituídos por misturas de hidroxiapatita (relação Ca/P = 1,67) e fases transientes precursoras da hidroxiapatita, tais como fosfato de octacálcio (Ca/P = 1,33) e dihidrato fosfato dicálcio (Ca/P = 1), indicando mineralização em estágio inicial (MIKROULIS *et al.*, 2002).

Os ensaios de calcificação mostraram que a membrana porosa induziu a calcificação, mais do que a membrana densa. Acredita-se que a morfologia da superfície de um substrato esteja relacionada com o sucesso ou fracasso da aplicação de um implante para auxiliar na regeneração óssea, e já foi observado que superfícies rugosas acentuam a osteocondutividade, quando comparadas com superfícies lisas, aumentando a fixação de osteoblastos, com conseqüente proliferação e diferenciação (HSU *et al.*, 2007). Parâmetros como a porosidade e a irregularidade do substrato são fundamentais, uma vez que o estágio de nucleação é fortemente dependente dos sítios de ancoragem termodinamicamente favoráveis.

Além disso, *scaffolds* altamente porosos, além de apresentarem maior área superficial, são normalmente usados como substratos para células que dependem de ancoragem e para facilitar a distribuição de nutrientes e metabólitos que guiam o crescimento celular, levando à formação do novo tecido ósseo (WOLKE *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2008).

Outro fator que pode ter auxiliado na calcificação das membranas porosas é o conteúdo residual de cálcio. De acordo com Nogueira (2005), as membranas porosas de fibroína, semelhantes às que foram utilizadas neste estudo, possuem

um teor de cálcio residual em torno de 5,5% em massa, determinado por espectrofotometria de absorção atômica. Kino *et al.* (2006) prepararam filmes de fibroína de seda pelo método de *casting* com vários conteúdos de cloreto de cálcio, e observaram que os filmes com conteúdo de cloreto de cálcio superiores a 5% em massa apresentaram a formação de depósitos de fosfato de cálcio após imersão em SBF 1,5x.

Apesar do estudo da calcificação *in vitro*, utilizando SBF, seja bastante utilizado, e bem aceito, para selecionar materiais que possam ser utilizados na regeneração óssea, este procedimento permite apenas uma avaliação simplificada da natureza dos processos de calcificação em matrizes moleculares. No entanto, o mecanismo de calcificação se torna complexo na presença de macromoléculas biologicamente ativas, incluindo enzimas (ZAINUDDIN *et al.*, 2006). Assim, se faz necessária a comparação dos resultados obtidos com estudos *in vivo* para a avaliação completa do fenômeno.

## 6 DISCUSSÃO FINAL

Para que um material possa ser utilizado como biomaterial, é importante determinar o método de esterilização mais adequado, que não prejudique a função do mesmo, e conhecer as potenciais aplicações que este material pode ter. Este estudo foi realizado para um novo tipo de membrana porosa de fibroína com a propriedade inovadora de não necessitar da etapa de diálise, necessária na grande maioria dos materiais produzidos a partir de fibroína relatados na literatura.

Devido às características desta membrana porosa de poder ser moldada na forma de um *scaffold*, e de apresentar superfície rugosa e porosidade, também foi avaliado seu potencial de calcificação *in vitro*. Como forma de comparação, e considerando que ainda são escassos os estudos que mencionam os efeitos de diferentes métodos de esterilização nas características físicas, químicas e biológicas de materiais derivados de fibroína, este estudo foi estendido à membrana densa de fibroína, cujo modo de obtenção é conhecido e amplamente relatado na literatura.

O estudo da esterilização das membranas densas e porosas de fibroína pelos métodos de etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, utilizando condições relatadas na literatura, normalmente utilizadas em materiais semelhantes, mostraram que nenhum método resultou na degradação das membranas ou na formação de produtos citotóxicos.

Um conjunto de fatores concorrentes, incluindo cristalinidade e, conformação mecânica, explicam os diferentes efeitos observados nos dois tipos de membrana. Apesar de serem derivadas da mesma matéria-prima, suas estruturas e características são bastante diferentes. Quando comparada com a membrana densa, a membrana porosa de fibroína compõe um diferente tipo de sistema, poroso, com uma maior superfície de interação, e maior reatividade. Materiais esponjosos, como a membrana porosa, apresentam uma interface rica em energia termodinâmica, se comparada com a membrana densa.

No caso da membrana densa, os métodos de esterilização que utilizam solvente orgânico, umidade e/ou temperatura elevadas, nos casos das esterilizações por etanol 70%, autoclave e óxido de etileno, resultaram no aumento da cristalinidade da membrana. Já no caso da membrana porosa, por se tratar de um material já bastante cristalino, o fator relacionado à alteração da conformação mecânica se destacou.

As alterações que ocorreram nas membranas devido à esterilização podem ser aproveitadas, no caso da membrana densa, em aplicações que exigem uma degradação mais lenta do biomaterial, e no caso da membrana porosa, em aplicações que requerem uma resistência mecânica maior. Tais alterações mostram que a esterilização é um processo que não apenas elimina os microrganismos, mas também funcionaliza materiais derivados da fibroína.

Se for desejado manter a estrutura semelhante à da membrana não esterilizada, a utilização da radiação UV é indicada para os dois tipos de membranas, apesar deste método não ser o mais adequado para a esterilização de biomateriais, por ser, a rigor, um método de desinfecção. No entanto, a impossibilidade de avaliação da citotoxicidade da membrana densa de fibroína esterilizada por UV, devido à contaminação microbiana durante o preparo do extrato, indica que um estudo mais aprofundado deve ser realizado para determinar as condições ótimas de esterilização das membranas densas e porosas de fibroína pelos diferentes métodos, por meio do estudo do *bioburden* das membranas antes e após os ensaios de esterilização, variando as condições de processo, para a determinação do SAL e a validação dos testes de esterilização. Este estudo não foi realizado, pois o objetivo principal foi avaliar vários métodos de esterilização na forma de *screening*, para excluir métodos que pudessem causar alterações indesejáveis nas membranas.

A esterilização por métodos mais acessíveis, como a autoclave, representa um problema para a maioria dos biopolímeros, como a quitosana, o alginato e o colágeno, por serem sensíveis a temperaturas elevadas. Os resultados aqui obtidos demonstram que a fibroína de seda é um material versátil, que pode ser submetido a diferentes métodos de esterilização, incluindo aqueles

que operam em condições elevadas de temperatura, umidade e/ou pressão, sem que ocorra perda de sua integridade estrutural.

O estudo da calcificação *in vitro* das membranas densas e porosas de fibroína indicaram que ambas induzem a formação de depósitos de fosfato de cálcio. Foi observado que o tipo de matriz (densa ou porosa) apresenta maior influência na etapa de nucleação do mecanismo de calcificação, enquanto que a etapa de crescimento dos depósitos de fosfato de cálcio é mais influenciada pelo tipo de fluido de calcificação utilizado. A membrana porosa de fibroína, devido às características de porosidade, rugosidade e teor de cálcio residual, induz mais a calcificação do que a membrana densa, sendo uma matriz mais interessante para aplicação em regeneração óssea, na forma de *scaffold*.

Apesar da membrana porosa não apresentar resistência mecânica suficiente para aplicação em regiões ósseas que necessitam de suporte a forças de tensão externa, ainda assim pode ser utilizada como uma alternativa aos pós de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita, que possuem campo de aplicação em regiões que demandam menos resistência, como a região crânio-facial, ou em situações onde membros estão imobilizados, mas necessitam de um agente que acelere o início da regeneração óssea, uma vez que a membrana porosa, por si só, é bioativa para a indução de crescimento de fosfato de cálcio.

No entanto, a limitação mecânica da membrana porosa de fibroína pode ser contornada, uma vez que nos últimos anos tem crescido o interesse no desenvolvimento de compósitos orgânicos/inorgânicos mecanicamente mais resistentes, que combinam a flexibilidade, firmeza e biodegradabilidade dos polímeros, com a rigidez, resistência e osteocondutividade das cerâmicas.

Alguns autores já estudaram a aplicação da fibroína de seda como um *scaffold* para auxiliar na formação óssea, por meio de modificações químicas da fibroína, adição de cálcio, e pré-mineralização dos *scaffolds*, na tentativa de aprimorar a formação de hidroxiapatita na fibroína de seda e aumentar a resistência mecânica do compósito (KINO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008). No entanto, uma vez que os métodos para obtenção de *scaffolds* de fibroína apresentados na literatura demandam a etapa de diálise, a utilização da

membrana porosa utilizada neste estudo se torna uma rota simplificada (quando comparada com outras conhecidas) de se obter membranas porosas de fibroína. Além disso, considerando que todo e qualquer biomaterial precisa ser esterilizado antes de ser implantado, os resultados dos testes de esterilização aqui mencionados podem ajudar a controlar e prever o aumento da resistência mecânica da membrana porosa, aprimorando as características do composto como um todo, se a aplicação final pretendida é na regeneração óssea.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados das esterilizações de membranas densas e porosas de fibroína de seda pelos métodos de etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama mostraram que nenhum método ocasionou degradação das membranas ou a formação de produtos citotóxicos. A integridade estrutural da fibroína foi mantida, mostrando que a esterilização é um processo viável para este biopolímero. Os métodos que utilizam solvente orgânico, e aumento de umidade e/ou temperatura (etanol 70%, autoclave e óxido de etileno) tornaram as membranas densas mais cristalinas, e as membranas porosas mais resistentes mecanicamente, características que podem ser aproveitadas na aplicação como biomaterial.

Os resultados de calcificação *in vitro* indicam que a fibroína de seda, nas formas de membrana densa e porosa, pode induzir a calcificação, observada pela formação de depósitos de fosfato de cálcio, com uma relação Ca/P semelhante à da hidroxiapatita e seus precursores. A membrana porosa apresenta maior tendência à calcificação, quando comparada com a membrana densa, devido à sua rugosidade e porosidade, podendo desta forma ser considerada para aplicação em regeneração óssea.

## 8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o comportamento mecânico das membranas densas e porosas de fibroína na forma úmida, antes e após serem submetidas à esterilização por etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno, e radiação gama, para simular o comportamento das membranas quando implantadas e em contato com fluidos corpóreos;

- Definir as condições ótimas dos diferentes processos de esterilização, por meio de estudo microbiológico;

- Estudar o efeito da esterilização na degradação das membranas densas e porosas de fibroína, por meio de testes de armazenamento em diferentes temperaturas;

- Estudar a calcificação *in vitro* de membranas densas e porosas de fibroína esterilizadas por diferentes métodos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, 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, n. 8, p. 2827-2836, 2008.

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

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

AMBARD, A.J.; MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 5, p. 321-328, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. Philadelphia: ASTM, 2002. (ASTM D882-02).

ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 93-102, 1996.

BASLY, J.P.; LONGY, I.; BERNARD, M. Influence of radiation treatment on two antibacterial agents and four antiprotozoal agents: ESR dosimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 1, p. 109-113, 1997.

BENSON, R.S. Use of radiation in biomaterial science. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 191, n. 1-4, p. 752-757, 2002.

BEPPU, M.M. **Estudo da calcificação *in vitro* de quitosana**. 1999. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

BEPPU, M.M., POLAKIEWICZ, B., NOGUEIRA, G.M., **INPI/Brasil**, PI: 0601975-7, 2006.

BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Influence of calcification solution on *in vitro* chitosan mineralization. **Materials Research**, v. 5, n. 1, p. 47-50, 2002.

BERNACCA, G.M., MACKAY, T.G., WHEATLEY, D.J. In: Gabbay, S., Frater, R.W.M., **New horizons and the future of heart valve bioprostheses**, Austin: Silent Partners, 1994, p. 25.

BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1991.

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

CLEEK. The spider at the beach. Disponível em: <<http://ok-cleek.com/blogs/?m=200609>>. Acesso em: 2 jan. 2009.

DE ZOYSA, H.; MORECROFT, E. Cleaning, disinfection and sterilization of equipment. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 8, n. 11, p. 453-456, 2007.

DOLTPOMS – Dissemination of IT for the Promotion of Materials Science. Strength – Density selection map. Disponível em: <[http://www.doitpoms.ac.uk/msm-impee-dev/optimisation-biomaterials/strength\\_density.php](http://www.doitpoms.ac.uk/msm-impee-dev/optimisation-biomaterials/strength_density.php)>. Acesso em: 2 jan. 2009.

FINI, M., *et al.* The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3527-3536, 2005.

FRIESS, W. Collagen: biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 113-136, 1998.

FRIESS, W.; SCHLAPP, M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 176-187, 2006.

FUCHS, S., *et al.* Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. **Biomaterials**, v. 27, n. 31, p. 5399-5408, 2006.

GARRETT; GRISHAM. Biochemistry – Fibroin and  $\beta$ -keratin:  $\beta$ -sheet proteins. Disponível em: <<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter6/chp6.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2009.

GOMES, M.E.; REIS, R.L. Tissue engineering: key elements and some trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 737-742, 2004.

GOTOH, Y., *et al.* Synthesis of poly(ethylene glycol)-silk fibroin conjugates and surface interaction between L-929 cells and the conjugates. **Biomaterials**, v. 18, n. 3, p. 267-271, 1997.

GROSS, K.A.; RODRÍGUEZ-LORENZO, L.M. Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, n. 20, p. 4955-4962, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.

HA, S.; TONELLI, A.E.; HUDSON, S.M. Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1722-1731, 2005.

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

HOH, C.S.L.; BERRY, D.P. Decontamination and sterilization. **Surgery (Oxford)**, v. 23, n. 8, p. 282-284, 2005.

HSU, S., *et al.* Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. **Biomedical Materials and Engineering**, v. 17, n. 1, p. 53-68, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de casulos do bicho-da-seda**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pr&tema=pecuaria2007>>. Acesso em: 5 mar. 2007

INOUE, K., *et al.* Use of *Bombyx mori* silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 37, n. 3, p. 159-164, 1998.

INTERNATIONAL YEAR OF NATURAL FIBRES. **Natural fibres: silk**. Disponível em: <<http://www.naturalfibres2009.org/en/fibres/silk.html>>. Acesso em: 5 mar. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological testing of medical and dental materials devices – part 5 tests for cytotoxicity: in vitro methods**. Switzerland: ISO, 1992. (ISO 10993-5).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Sterilization of health care products – requirements for validation and routine control: radiation sterilization**. Switzerland: ISO, 1995 (ISO 11137).

JÜLICH, W.D.; VON WOEDTKE, T. Reprocessing of thermosensitive materials – efficacy against bacterial spores and viruses. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, n. 1, p. S69-S79, 2001.

- KANJICKAL, D., *et al.* Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research – Part A**, v. 87, n. 3, p. 608-617, 2008.
- KANNAN, S.; LEMOS, A.F.; FERREIRA, J.M.F. Synthesis and mechanical performance of biological-like hydroxyapatites. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 8, p. 2181-2186, 2006.
- KI, H.L., *et al.* Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme. **Fibers and Polymers**, v. 6, n. 3, p. 181-185, 2005.
- KIM, S.H., *et al.* Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties and structure. **Polymer Journal**, v. 35, n. 2, p. 185-190, 2002.
- KIM, R., *et al.* Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. **Bone**, v. 42, n. 6, p. 1226-1234, 2008.
- KINO, R., *et al.* Deposition of bone-like apatite on modified silk fibroin films from simulated body fluid. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 5, p. 2822-2830, 2006.
- KINO, R., *et al.* Preparation and characterization of multilayered hydroxyapatite/silk fibroin film. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 514-520, 2007.
- KOKUBO, T., *et al.* Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, n. 6, p. 721-734, 1990.
- KOKUBO, T.; TAKAMADA, H. How useful is SBF in predicting *in vitro* bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.
- KONG, X.D., *et al.* Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 270, n. 1-2, p. 197-202, 2004.
- KOWALSKI, J.B.; MORRISSEY, R.F. Sterilization of implants and devices. In: Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E., eds. **Biomaterials Science – an Introduction to Materials in Medicine**, 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1996.
- KUNDU, J., DEWAN, M., GHOSHAL, S. Mulberry non-engineered silk gland protein via-a'-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 7, p. 2679-2689, 2008.
- LAWRENCE, B.D., *et al.* Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 21, p. 6967-6985, 2008.

LEE, M.H., *et al.* Effects of low temperature hydrogen peroxide gas on sterilization and cytocompatibility of porous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds. **Surface & Coatings Technology**, v. 202, n. 22-23, p. 5762-5767, 2008.

LI, M., *et al.* Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, n. 2, p. 89-94, 2002.

LI, C., *et al.* Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3115-3124, 2006.

LI, J., *et al.* Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1635-1642, 2009.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 269-305, 1992.

LIU, C.; XIA, X.; CZERNUSZKA, J.T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 7A, p. 1051-1064, 2007.

LU, Q., *et al.* Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, n. 14, p. 2306-2313, 2007.

LV, Q., *et al.* The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 11, p. 1193-1197, 2004.

LV, Q., *et al.* Preparation of insoluble fibroin films without methanol treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 6, p. 2168-2173, 2005.

MACINTOSH, A.C. *et al.* Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 71-80, 2008.

MARRECO, P.R., *et al.* Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 268-277, 2004.

MARSANO, E., *et al.* Fibers based on cellulose-silk fibroin blend. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, p. 2187-2196, 2007.

MEYER, U.; KRUSE-LÖSLER, B.; WIESMANN, H.P. Principles of bone formation driven by biophysical forces in craniofacial surgery. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 4, p. 289-295, 2006.

MIKROULIS, D., *et al.* Physicochemical and microscopical study of calcific deposits from natural and bioprosthetic heart valves. Comparison and implications for mineralization mechanism. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 9, p. 885-889, 2002.

MIYAGUCHI, Y.; HU, J. Physicochemical properties of silk fibroin after solubilization using calcium chloride with or without ethanol. **Food Science and Technology Research**, v. 11, n. 1, p. 37-42, 2005.

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

MOONSRI, P., *et al.* Fibroin membrane preparation and stabilization by polyethylene glycol diglycidyl ether. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, n. 3, p. 1402-1406, 2008.

MORITA, Y., *et al.* Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. 1, p. 103-109, 2006.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NOGUEIRA, G.M. **Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial**. 2005. 64f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

NOGUEIRA, G.M. **Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais**. 2009. 150f.. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PALSULE, A.S., CLARSON, S.J., WIDENHOUSE, C.W. Gamma irradiation of silicones. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 18, n. 2, p. 207-221, 2008.

PANILAITIS, B., *et al.* Macrophage responses to silk. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3079-3085, 2003.

POZA, P., *et al.* Fractographic analysis of silkworm and spider silk. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 69, n. 9, p. 1035-1048, 2002.

RATNER, B.D. A history of biomaterials. In: Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E., eds. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**, 2<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2004.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

REZWAN, K., *et al.* Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413-3431, 2006.

RODAS, A.C.D., *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of bovine pericardium preserved in glycerol. **Artificial Organs**, v. 32, n. 4, p. 272-276, 2008.

ROYCHOWDHURY, P., *et al.* Effects of fabrication parameters on viscoelastic shear modulus of 2,3-dialdehyde cellulose membranes – Potential scaffolds for vocal fold lamina propria tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 88, n. 3, p. 680-688, 2009.

RUSA, C.C, *et al.* Conformational changes induced in Bombyx mori silk fibroin by cyclodextrin inclusion complexation. **Macromolecules**, v. 38, n. 13, p. 5640-5646, 2005.

SEHNAL, F.; ZUROVEC, M. Construction of silk fiber core in lepidoptera. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 666-674, 2004.

SINGH, R., *et al.* Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. **Burns**, v. 33, n. 4, p. 505-510, 2007.

SUN, X., *et al.* Effect of pH on the fibroin regulated mineralization of calcium phosphate. **Current Applied Physics**, v. 7, n. 1, p. e75-e79, 2007.

TAMADA, Y. New process to form a silk fibroin porous 3-D structure. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3100-3106, 2005.

UEBERSAX, L., *et al.* The support of adenosine release from adenosine kinase deficient ES cells by silk substrates. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4599-4607, 2006.

UM, I.C., *et al.* Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 2001.

UM, I.C., *et al.* Wet spinning of silk polymer II. Effect of drawing on the structural characteristics and properties of filament. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1-2, p. 107-119, 2004.

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

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

VON WOEDTKE, T., *et al.* Sterilization of enzyme glucose sensors: problems and concepts. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 373-382, 2002.

WEI, J., *et al.* Study on biodegradable scaffold of self-hardening bone-like apatite. **Chinese Journal of Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 765-770, 2006.

WESKA, R.F. *et al.* Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. **Materials Research**, 2009 (*in press*).

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterial. **Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**. Chester: Elsevier, 1987.

WISE, D.L., *et al.* **Human Biomaterials Applications**. New Jersey: Humana Press, 1996. 462 p.

WIKIMEDIA COMMONS. Alpha helix protein. Disponível em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaHelixProtein\\_fr.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaHelixProtein_fr.jpg)>. Acesso em: 12 mar. 2009.

WOLKE, J.G.C., *et al.* In vivo dissolution of various RF magnetron-sputtered Ca-P coatings on roughened titanium implants. **Biomaterials**, v. 24, n. 15, p. 2623-2629, 2003.

YANG, Y., *et al.* Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1643-1652, 2007.

ZAINUDDIN, *et al.* In-vitro study of the spontaneous calcification of PHEMA-based hydrogels in simulated body fluid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 12, p. 1245-1254, 2006.

ZHANG, Y. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 91-100, 2002.

ZHANG, F., *et al.* Studies of electrospun regenerated SF/TSF nanofibers. **Polymer**, v. 50, p. 279-285, 2009.

ZHOU, C.Z., *et al.* Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 2413-2419, 2000.

ZUO, B.; LIU, L.; WU, Z. Effect on properties of regenerated silk fibroin fiber coagulated with aqueous methanol/ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 1, p. 53-59, 2007.

## APÊNDICE

### Produção bibliográfica relacionada à dissertação

- **Artigos completos publicados em periódicos**

WESKA, R.F.; NOGUEIRA, G.M.; VIEIRA JR, W.C.; BEPPU, M.M.. Porous silk fibroin membrane as a potential scaffold for bone regeneration. **Key Engineering Materials**, v. 396, p. 187-190, 2009.

WESKA, R.F.; VIEIRA JR, W.C.; NOGUEIRA, G.M.; BEPPU, M.M.. Effect of freezing method in the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. **Materials Research**, 2009 (*in press*).

- **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

WESKA, R.F.; NOGUEIRA, G.M.; VIEIRA JR, W.C.; BEPPU, M.M.. Porous silk fibroin membrane as a potential scaffold for bone regeneration. In: Bioceramics 21 - International Symposium of Ceramics in Medicine, 2008, Búzios. Bioceramics, 2008. (Apresentação de pôster).

- **Resumos publicados em anais de congressos**

VIEIRA JR, W.C.; WESKA, R.F.; NOGUEIRA, G.M.; BEPPU, M.M.. Efeito do congelamento nas propriedades de membranas porosas liofilizadas de fibroína de seda. In: COLAOB - 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto. Anais do COLAOB 2008, 2008. (Apresentação de pôster).

WESKA, R.F.; NOGUEIRA, G.M.; SILVA, M.F.; BEPPU, M.M.. Porous and dense silk fibroin membranes used in biomimetic calcification. In: 27th CBS - Conference of the Canadian Biomaterials Society, 2009, Quebec. CBS - Final Program, 2009. (Apresentação oral).