MARCELO HENRIQUE KRAVICZ

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MEMBRANAS OBTIDAS A PARTIR DE BLENDS DE
FIBROÍNA DE SEDA E POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia.

Prof. Sérgio Akinobu Yoshioka, PhD

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

K91p Kravicz, Marcelo Henrique
Preparação e caracterização de membranas obtidas a
partir de fibroína de seda e poli(álcool vinílico) /
Marcelo Henrique Kravicz; orientador Sérgio Akinobu
Yoshioka. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Fibroína da seda. 2. Poli(álcool vinílico). 3.
Géis. 4. Membranas. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

MARCELO HENRIQUE KRAVICZ

Título: "Preparação e caracterização de membranas obtidas a partir de blendas de fibroína de seda e poli(álcool vinílico)".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS -
GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 10 / 06 / 2013

PROF. DR. SÉRGIO AKINOBU YOSHIOKA
(ORIENTADOR)

Instituto de Química de São Carlos-USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: Sergio A. Yoshio

PROF^a. DR^a. MARISA MASUMI BEPPU

Universidade Estadual de Campinas-
UNICAMP

Resultado: APROVADO

Assinatura: Marisa Masumi Beppu

PROF^a. DR^a. ELIANA CRISTINA DA SILVA
RIGO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos-USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: ECRigo

Aos meus pais Nestor Kravicz e Carmela Ferreira Kravicz (*in memoriam*), e às minhas irmãs Gisele e Gilda (*in memoriam*).

por fazerem parte da minha vida, apoiando-me e incentivando-me.

Agradecimentos

Ao meu Deus, Criador, pela minha vida e pela vida dos meus familiares e amigos.

Ao meu pai Nestor, que me apoia desde sempre, incentivando-me em inúmeros momentos.

À minha mãe querida Carmela, que durante sua vida me ensinou a ser uma pessoa interessada pela vida, pela família e pelos bons momentos.

Aos meus irmãos e irmãs, em especial a minha irmã Gisele, que sempre apoia com seu pensamento crítico, e com seu carinho e amor fraternal.

À minha irmã Gilda, que participou dessa fase da minha vida, e de outros momentos, com sua alegria.

Aos meus amigos de república Liboni, Allan, Thiago e Guilherme, por me receberem em seu meio, ajudando-me em muitas etapas da vida acadêmica e pessoal.

Ao Zorel, por proporcionar a minha vida algo bom, e que mereça ser levado a diante.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, em especial à Camila e Nízia, que em várias oportunidades mostraram-se parceiros e amigos dedicados.

Ao professor Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka pela orientação e compreensão das minhas limitações ao longo dessa pesquisa.

Ao Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - IQSC, pelo suporte técnico e intelectual, em especial à D.ra Virginia Martins.

Ao Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross”, em especial a D.ra Debora Terezia Balogh, por disponibilizar seu tempo na pesquisa aqui desenvolvida.

Ao Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, do Laboratório de Micros-

copia Eletrônica, do Instituto de Física de São Carlos - IFSC, pela ajuda nas análises de Microscopia de Força Atômica.

À Prof. Dr. Rosario Elida Suman Bretas, do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pela ajuda nos estudos de reologia.

À Prof. D.ra Fernanda Canduri e ao aluno Nikolas Paparidis pela ajuda com a eletroforese SDS-PAGE, e análise dos resultados obtidos nessa caracterização.

Existem momentos na vida onde a questão de saber se se pode pensar diferentemente do que se pensa, e perceber diferentemente do que se vê, é indispensável para continuar a olhar ou a refletir.

Michel Foucault

Resumo

KRAVICZ, M. H. **Preparação e caracterização de membranas obtidas a partir de fibroína de seda e poli(álcool vinílico)**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A fibroína da seda (SF) é uma proteína fibrosa, com caráter hidrofóbico, produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), cuja produção e armazenamento ocorre em glândulas especializadas antes do processo de fiação em fibras. Recentemente, soluções de fibroína de seda regenerada (RSF) têm sido utilizadas para formar diferentes materiais tais como géis, membranas, filmes e esponjas, para aplicações médicas (Medicina Regenerativa) e em sistemas de liberação de fármacos. Neste trabalho, procuramos estudar o comportamento da solução RSF 2% com adição de 0,25, 0,5 e 1% de PVA (polímero sintético e hidrofílico) por meio de ensaios de reologia dos géis obtidos (SF:PVA), e caracterização das membranas obtidas por meio da secagem em moldes dos géis. Os ensaios de reologia mostraram uma inversão de módulos, com transição de caráter elástico (G') para viscoso (G'') para SF 1 a 3%, entre 230 e 900% de deformação (γ); transição de caráter viscoso para elástico para as blendas SF:PVA 0,5 e 1% em ensaio de frequência (ω). Com o aumento de temperatura, todas as blendas mantiveram seus comportamentos elástico (SF:PVA 0,25%) e viscoso (SF:PVA 0,5 e 1%) até 49 – 51 °C, com transição líquido-gel; o aumento dos módulos G' e G'' com o resfriamento das amostras ocorreu em todas as blendas. As membranas obtidas das blendas SF:PVA tiveram maior absorção de tampão fosfato salino (PBS) após 5 min de ensaio, no qual a blenda SF:PVA apresentou maiores valores de absorção. A caracterização das membranas por FT-IR ATR e DRX mostrou que ocorreu uma transição de conformação aleatória e hélice α para folha β , para todas as membranas, indicando que a adição do PVA nas blendas promoveu transições *silk I* para *silk II*. Deslocamentos de modo vibracional de 1.637 cm^{-1} (amida I) para 1.616 cm^{-1} (amida I) com modo centrado em 1.512 cm^{-1} (amida II) foram vistos em todas as blendas no FT-IR ATR, e difratogramas apresentaram picos característicos às estruturas *silk I* ($2\theta = 10, 12^\circ$, $2\theta = 12, 2^\circ$ e $2\theta = 28, 2^\circ$) e *silk II* ($2\theta = 20 - 21^\circ$). TGA e DSC mostraram uma interação entre as cadeias de RSF e PVA, pela presença de uma temperatura única de transição vítrea (T_g) entre RSF e PVA. Imagens AFM das blendas mostraram a presença de estruturas nanofibrilares, em formato de ilhas compactas e ramos, confirmando a transição da fase amorfa de SF 2% para hélice α e folha β , com a adição do PVA.

Palavras-chave: Fibroína da seda; Poli(álcool vinílico); Géis; Membranas.

Abstract

KRAVICZ, M. H. **Preparation and characterization of membranes obtained by silk fibroin and poly(vinyl alcohol)**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Silk fibroin (SF) is a fibrous hydrophobic protein produced by silkworms (*Bombyx mori* L.), which production and storage occur into specialized glands previously fiber formation. Lately, regenerated silk fibroin (RSF) solutions have been used to produce different materials such as gels, membranes, films and sponges, for medical applications and drug delivery systems. In this study, the RSF with 0.25, 0.5 and 1% PVA (synthetic and hydrophilic polymer) blends were characterized by rheological tests of the gels (SF:PVA), also membranes produced by casting process were characterized as well. Rheological tests showed moduli inversion with elastic to viscous behavior transition for SF 1 to 3%, between 230 and 900% of strain (γ); a transition from viscous to elastic behavior to SF:PVA 0.5 to 1% blends into frequency sweep tests was observed. With the temperature increment, all blends have kept their viscous and elastic behavior until 49 – 51 °C, and a liquid-gel transition occurred in the SF:PVA 0.5 and 1% blends, as well as all moduli have increased with the cooling stage of the samples. All membranes had the highest buffer absorption after 5 min of test, in which SF:PVA 0.5% blend presented high absorption values. FT-IR spectra and XRD diffractograms showed a transition from random and α -helix to β -sheet, for all blends, indicating that PVA addition promotes silk I to silk II transition. Modal shifts were observed from 1.637 cm^{-1} (amide I) to 1.616 cm^{-1} (amide I) with a central mode in 1.512 cm^{-1} (amide II) in all blends in the FT-IR ATR spectra. XRD diffractograms showed characteristic peaks of silk I structures ($2\theta = 10, 12^\circ$, $2\theta = 12, 2^\circ$ e $2\theta = 28, 2^\circ$) and silk II structures ($2\theta = 20 - 21^\circ$). TGA and DSC studies showed the possibility of interaction between SF and PVA chains by acquirement of mobility at once, at an intermediate temperature between SF and PVA glass transition (T_g). AFM images exhibited different phases for all membranes, with the presence of nanofibers, wires, rods and branch islands, suggesting the formation of more organized structures, such as α -helix and β -sheet, with PVA addition.

Key-words: Silk fibroin; Poly(vinyl alcohol); Gels; Membranes.

Lista de Figuras

Figura 1	Formação do “novo tecido” (<i>neotissue</i>) na Engenharia Tecidual.	28
Figura 2	Medicina Regenerativa: Engenharia Tecidual e Terapia Celular.	28
Figura 3	Gerações de biomateriais.	30
Figura 4	Paradigma geral da Engenharia Tecidual.	32
Figura 5	Casulos do bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i> L.). Grupo de Bioquímica e Biomateriais, IQSC.	33
Figura 6	Estrutura quaternária da fibroína: folhas β assimétricas e α -hélices, de acordo com He et al. (2012), figura modificada.	35
Figura 7	Sequência de aminoácidos $[Gly - Ala - Gly - Ala - Gly - Ser]_n$ da folha β .	35
Figura 8	Estrutura dos aminoácidos glicina, alanina e serina.	36
Figura 9	a Padrão de hidrofobicidade na sequência primária da cadeia pesada de fibroína; b Montagem das micelas da fibroína em água, baseada na estrutura multibloco copolimérica hidrofílica-hidrofóbica; c Formação de glóbulos guiada pelo aumento da concentração de fibroína e diminuição do conteúdo de água, com interações hidrofóbicas;	

d	Elongação e alinhamento de glóbulos e interações entre glóbulos promovido por cisalhamento, levando a estrutura fibrilar.	36
Figura 10	Estrutura do poli(álcool vinílico), PVA.	39
Figura 11	Esquema da compatibilização da blenda polimérica dos polímeros A e B.	40
Figura 12	Faixa das técnicas experimentais para estudo da morfologia das blends.	41
Figura 13	Esquema da obtenção das soluções de fibroína regenerada e géis de fibroína:poli(álcool vinílico).	43
Figura 14	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% da RSF em diluição 1:10. <i>P</i> , padrão.	50
Figura 15	Curva de calibração obtida para determinação das massas moleculares: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% da RSF em diluição 1:10	51
Figura 16	Módulos G' e G'' em função da deformação γ para soluções de RSF 1 a 3% (m/m).	52
Figura 17	Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para soluções de RSF 1 a 3% (m/m).	53
Figura 18	Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω , e $\tan \delta$ para SF 2,5% (m/m).	54

Figura 19	Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2% apresentando as diferenças entre módulos dentro da mesma concentração de SF.	56
Figura 20	Tensão de oscilação τ e função da deformação γ . Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2%.	56
Figura 21	Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2% e PVA 2%.	57
Figura 22	Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para SF 2% e blendas SF:PVA 0,25 a 1%.	59
Figura 23	Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para SF 2% e PVA 2%.	60
Figura 24	Valores de $\tan \delta$ em função da frequência angular ω para SF 2%, blendas SF:PVA 0,0313 a 1% e PVA 2%.	61
Figura 25	Módulos G' e G'' em função da temperatura para SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%. Etapa 1: elevação da temperatura.	62
Figura 26	Módulos G' e G'' em função da temperatura para SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%. Etapa 2: diminuição da temperatura.	63
Figura 27	Módulos G' e G'' em função da temperatura para PVA 2%. Etapas 1 e 2 de aumento e diminuição da temperatura, respectivamente.	64
Figura 28	Modelo para medida de espessura das membranas obtidas.	68

Figura 29	Membrana de fibroína de seda (SF) a 2% m/m.	72
Figura 30	Absorção tampão fosfato salino (PBS) das membranas SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%.	73
Figura 31	Espectros FT-IR ATR das membranas de SF 2%, PVA 2% e mem- brana obtida da blenda SF:PVA 0,25 a 1%, região de $1900-650\text{ cm}^{-1}$	75
Figura 32	Difratogramas obtidos de amostras da membrana SF 2%. a e b correspondem a difratogramas obtidos em dias diferentes.	77
Figura 33	Difratogramas obtidos de amostras da membrana PVA 2%.	78
Figura 34	Difratogramas obtidos de amostras da membranas SF:PVA 0,25 a 1%.	79
Figura 35	Difratogramas obtidos de amostras da membranas SF:PVA 0,25 a 1%.	80
Figura 36	Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das membranas obtidas a partir dos géis de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%. Aumentos de 500 e 2.000 vezes.	82
Figura 37	Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membrana SF 2%. Tamanho: $10\text{ }\mu\text{m}$	83
Figura 38	Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membrana PVA 2%. Tamanho: $10\text{ }\mu\text{m}$	84

Figura 39	Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membranas SF:PVA 0,25 a 1%. Tamanho: 10 μm	85
Figura 40	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e força atômica (AFM) para a membrana SF:PVA 1%.	86
Figura 41	Curvas TGA e DTG das membranas de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%.	87
Figura 42	Esquema da degradação do PVA e formação de polienos acima de 200 °C.	88
Figura 43	Curvas DSC das membranas de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%.	89
Figura 44	Força aplicada a elemento de área S.	101
Figura 45	Componentes do tensor tensão, sistema de coordenadas cartesianas.	102
Figura 46	Deformação de um elemento (A) rotação sem deformação; (B) deformação por cisalhamento; (C) deformação por alongação.	103
Figura 47	Deformação por cisalhamento.	103
Figura 48	Fluidos newtoniano e lei de potências.	106
Figura 49	Viscoelasticidade e as porções elástica e viscosa.	107

Figura 50	Tensão e deformação em regime oscilatório.	107
Figura 51	Relação entre os módulos complexo em cisalhamento (G^*), módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'').	108

Lista de Tabelas

Tabela 1	Denominação das soluções de RSF para ensaio de reologia.	46
Tabela 2	Denominação dos géis para ensaio de reologia.	47
Tabela 3	Descrição das massas de RSF e PVA utilizadas no preparo das blendas. (a) concentração final de RSF e (b) concentração final de PVA.	47
Tabela 4	Valores dos módulos G' e G'' no ensaio de temperatura: etapas 1 e 2 de aquecimento e resfriamento, respectivamente.	65
Tabela 5	Denominação das membranas obtidas.	68
Tabela 6	Medida de espessura das membranas obtidas de SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%.	73
Tabela 7	Números de onda, vibrações típicas e grupamentos químicos carac- terísticos para a RSF e PVA; (a) deformação angular; (ax) de- formação axial; (e) estiramento; sec. ligação secundária.	74

Lista de Siglas

SBI	Strategic Business Insights
ECM	matriz extracelular
Gly	glicina
Ala	alanina
Ser	serina
BMP-2	proteína morfogenética óssea 2
PVA	poli(álcool vinílico)
PVP	poli(<i>N</i> -vinil-2-pirrolidona)
PVA-o	poli(álcool vinílico) oxidase
ADH	álcool desidrogenase
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
WAXS	espalhamento de raios X a alto ângulo
SAXS	espalhamento de raios X a baixo ângulo
SANS	espalhamento de nêutrons a baixo ângulo
RSF	solução aquosa de fibroína regenerada
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	dodecil sulfato de sódio
R_f	fator de retenção
SF	soluções de fibroína
SF:PVA	blenda fibroína:poli(álcool vinílico)
PVA	poli(álcool vinílico)
IR	infravermelho

FT-IR	infravermelho com transformada de Fourier
MIR	infravermelho médio
ATR	refletância total atenuada
SEM	microscopia eletrônica de arredura
AFM	microscópio de força atômica
TGA	termogravimetria
DTG	termogravimetria Derivada
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DMM	distribuição de massa molecular

Lista de Simbolos

kDa	quilodalton
m/v	massa/volume
m/m	porcentagem em massa
G'	módulo elástico ou módulo de armazenamento
G''	módulo viscoso ou de perda
γ	deformação
ω	frequência angular
$\tan \delta$	tangente do ângulo de fase
τ	tensão de oscilação
keV	quiloeltronvolt
$\tilde{\nu} \text{ cm}^{-1}$	número de onda
dm/dT	velocidade de variação da massa em função da temperatura
T_g	temperatura de transição vítrea
$\bar{\bar{\tau}}$	tensor tensão
$\dot{\gamma}$	taxa de deformação
$\vec{v}$	vetor velocidade
$\vec{\nabla} \vec{v}$	gradiente de velocidades

Sumário

1	Introdução	23
1.1	Motivação e Justificativa	24
1.2	Objetivos	24
2	Revisão Bibliográfica	26
2.1	Biomateriais	26
2.2	Função do <i>scaffold</i> (IKADA, 2006)	28
2.3	Engenharia Tecidual (RATNER et al., 2004)	30
2.3.1	Controle da estrutura e função de um Tecido de Engenharia	31
2.4	Fibroína da seda: estrutura, propriedades e aplicações na Engenharia Tecidual	32
2.4.1	A seda obtida do bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i> L.)	32
2.4.2	Estrutura da fibroína da seda	33
2.4.3	Propriedades e aplicações biomédicas da fibroína da seda	37
2.5	Poli(álcool vinílico): estrutura, propriedades e aplicações na Engenharia Tecidual	38
2.6	Blendas	39
3	Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)	42
3.1	Material	42
3.2	Métodos	42
3.2.1	Extração da fibroína de seda de casulos do bicho-da-seda	44

3.2.2	Solubilização da fibroína em solução ternária salina e diálise	44
3.2.3	Determinação da massa molecular: eletroforese da RSF	45
3.2.4	Preparo das soluções de RSF em diferentes concentrações	46
3.2.5	Preparo dos géis de fibroína:poli(álcool vinílico)	47
3.2.6	Propriedades reológicas das soluções de RSF e blendas SF:PVA	48
3.3	Resultados e Discussão	48
3.3.1	Extração, solubilização e diálise da fibroína de seda	48
3.3.2	Determinação da massa molecular: eletroforese da RSF	50
3.3.3	Propriedades reológicas das soluções de RSF	52
3.3.4	Propriedades reológicas das blendas SF:PVA	57
3.3.4.1	Ensaio de frequência	57
3.3.4.2	Ensaio de temperatura	60
3.4	Conclusão Parcial	65
4	Membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)	67
4.1	Material e Métodos	67
4.1.1	Preparo de membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)	67
4.1.2	Ensaio de absorção em tampão fosfato salino	69
4.1.3	Caracterização dos materiais por técnicas de espectroscopia: FT-IR ATR	69
4.1.4	Caracterização dos materiais por difração de raios X	70
4.1.5	Caracterização dos materiais por microscopia	70
4.1.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	70
4.1.5.2	Microscopia de força atômica	71
4.1.6	Caracterização dos materiais por análise térmica	71
4.1.6.1	Termogravimetria e termogravimetria derivada	71

4.1.6.2	Calorimetria exploratória diferencial	71
4.2	Resultados e Discussão	72
4.2.1	Preparo de membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)	72
4.2.2	Ensaio de absorção em tampão fosfato salino	73
4.2.3	Caracterização dos materiais por técnicas de espectroscopia: FT-IR ATR	74
4.2.4	Caracterização dos materiais por difração de raios X	76
4.2.5	Caracterização dos materiais por microscopia	81
4.2.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	81
4.2.5.2	Microscopia de força atômica	83
4.2.6	Caracterização dos materiais por análise térmica	87
4.2.6.1	Termogravimetria e termogravimetria derivada	87
4.2.6.2	Calorimetria exploratória diferencial	88
4.3	Conclusão Parcial	90
5	Conclusão	92
6	Trabalhos Futuros	94
	Referências	95
	Apêndice A – Reologia	100
A.1	Reologia	100
A.1.1	Tensão	101
A.1.2	Deformação e taxa de deformação	103
A.1.3	Reologia de Polímeros	105
A.1.4	Equações Reológicas de Estado	105
A.1.5	Viscoelasticidade	107

A.1.6	Propriedades em Regime Oscilatório	107
-------	--	-----

1 Introdução

Biomateriais são definidos como qualquer material utilizado para produzir dispositivos para a substituição de uma parte ou de uma função do corpo humano de uma maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (LAKES; PARK, 2007). Materiais de aplicação médica destacam-se nesse cenário, onde diversos biomateriais tem sido desenvolvidos visando numerosas finalidades como, por exemplo: próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateteres e tubos de circulação extra-corpórea.

Em 1993, Langer e Vacanti definiram a Engenharia de Tecido como sendo um campo interdisciplinar que aplica os princípios da Engenharia e das Ciências da Vida em busca do desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem ou melhorem dado tecido ou função de um órgão (CHAPEKAR, 2000).

Com os avanços na Biologia Celular e no desenvolvimento de biomateriais, novos estudos foram voltados para a Engenharia Tecidual, que vem sendo orientada ao desenvolvimento de micro ambientes celulares inspirados no ambiente biológico (BOUTEN et al., 2011). Segundo Chapekar (2000), o termo Engenharia Tecidual foi inicialmente definido em 1998 como uma aplicação dos princípios e métodos da Engenharia e Ciências da Vida na busca de um entendimento fundamental da relação estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos, e desenvolvimento de substitutos biológicos para o reparo ou substituição de um dado tecido ou função de um órgão.

A biocompatibilidade e a biodegradabilidade geralmente são problemas na utilização de polímeros sintéticos nos tecidos aplicados e, por isso, o estudo de novos materiais tem sido baseado na mistura de dois ou mais polímeros ou biopolímeros; as soluções destes polímeros são misturadas em diferentes proporções obtendo-se,

muitas vezes, materiais com propriedades distintas das de seus precursores e, dentre esses biomateriais, destacam-se os estudos com a fibroína de seda (VEPARI; KAPLAN, 2007).

1.1 Motivação e Justificativa

Como o desenvolvimento de novos biomateriais está conectado às áreas de Bioengenharia, Biotecnologia e Engenharia Tecidual, há a necessidade do estudo de novos materiais, sua caracterização química e morfológica, para a sua aplicação, por exemplo, na Engenharia Tecidual. Isso implica no desenvolvimento desses biomateriais com uma biocompatibilidade e na necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e esses biomateriais, para que exista sua otimização.

Dentre os biopolímeros utilizados, a fibroína tem sido investigada por pesquisadores como um recurso para a biotecnologia e biomateriais devido a sua compatibilidade com diversos tipos de células, sua biodegradabilidade, sua alta permeabilidade ao oxigênio e a vapores d'água possibilitando sua utilização como suporte para cultura celular e imobilização enzimática (NOGUEIRA, 2009).

Observando que a tendência atual para aplicações industriais se concentra nos produtos como agentes de liberação de fármacos no organismo, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos (DALLAN, 2005), novos biomateriais foram obtidos por meio dessa pesquisa veiculada ao Grupo de Pesquisa “Bioquímica e Biomateriais” do Instituto de Química de São Carlos - IQSC, fornecendo ao grupo dados relevantes para futuras pesquisas envolvendo a fibroína e suas blendas.

Sendo assim, este trabalho visou a obtenção de blendas de fibroína:poli(álcool vinílico) na forma de membranas e a caracterização dos biomateriais por meio de reologia das soluções obtidas e técnicas de espectroscopia, difração de raios X, microscopia e análise térmica para as membranas.

1.2 Objetivos

O objetivo principal desta dissertação foi propor a preparação de membranas a partir de blendas de fibroína de seda com poli(álcool vinílico) e realizar a

caracterização dos géis necessários ao preparo das membranas, para futura aplicação na Engenharia Tecidual.

No Capítulo **Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)**, os objetivos específicos foram:

- Obtenção da fibroína de seda a partir de casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori* L.;
- Obtenção da solução regenerada de fibroína de seda e sua caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE);
- Preparação de soluções de fibroína com diferentes concentrações e de suas blendas com poli(álcool vinílico);
- Realização de estudos de reologia das soluções e blendas;

No Capítulo **Membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)**, os objetivos específicos foram:

- Produção de membranas a partir das blendas obtidas de fibroína com poli(álcool vinílico);
- Observação da microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia de força atômica (AFM) das membranas;
- Caracterização das membranas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raios X;
- Realização de ensaios de análise térmica das membranas.
- Observação do comportamento das membranas em ensaio de absorção em solução tampão fosfato salino (PBS);

2 Revisão Bibliográfica

Nesta seção foi realizada uma revisão bibliográfica de trabalhos relevantes na área de Engenharia Tecidual envolvendo a fibroína da seda para a obtenção de soluções e membranas. Além disso, são apresentadas estrutura e propriedades da fibroína e do poli(álcool vinílico), mostrando algumas aplicações desses biomateriais na Engenharia Tecidual. Também, conceitos em relação a *scaffolds*, cultivo celular e Biomateriais são abordados.

2.1 Biomateriais

A introdução de materiais de origem não biológica no corpo humano data de períodos da Pré História, como mostram achados arqueológicos em Washington, Estados Unidos, datados em 9.000 anos: uma lança incorporada ao osso do quadril, demonstrando a capacidade do corpo em lidar com materiais estranhos incorporados (RATNER et al., 2004).

Outros relatos são de implantes dentários que foram concebidos pelo povo Maia por volta de 600 DC, mostrando uma osteointegração de nácar (madrepérola) nos dentes. A evidência da utilização de suturas é de 32.000 anos, e a utilização de suturas de linho ocorre entre os egípcios, bem como suturas metálicas pelos gregos cerca de 130 a 200 DC, descrevendo ligas de ouro (RATNER et al., 2004).

Biomateriais, juntamente com a Bioengenharia, Engenharia Biomédica, Biotecnologia, Biomecânica e Medicina Regenerativa, são especialidades do conhecimento relativamente novas e as suas definições nem sempre são claras, sendo grande a superposição entre essas áreas e temas (SOARES, 2005). Esses biomateriais são parte importante de cerca de 300.000 produtos na área da saúde, sendo que em

2000 o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares com uma taxa de crescimento de 12% ao ano, segundo o *Strategic Business Insights* (SBI)(SOARES, 2005). Segundo a ANVISA (2012), na área cardiovascular cerca de 58% dos gastos corresponde a equipamentos biomédicos.

Nesse contexto, os conceitos de biomateriais são formulados; Ratner et al. (2004) afirmam que biomateriais são materiais sintéticos ou naturais, sólidos e às vezes líquidos, utilizados em contato com sistemas biológicos ou dispositivos médicos. Soares (2005) cita uma definição de biomateriais segundo Helmus e Tweden (1995) como sendo parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Muitos dos “materiais de uso em saúde” segundo a definição da ANVISA (2012) são enquadrados como biomateriais, sendo eles, por exemplo:

- próteses;
- lentes;
- enxertos;
- catéteres;
- tubos de circulação extracorpórea;
- *scaffolds* empregados na Engenharia Tecidual.

Lakes e Park (2007) definem biomateriais como materiais utilizados como dispositivos que substituem parte ou função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável. Em contraste a esse conceito ele define *material biológico* como aquele produzido pelo sistema biológico, como osso, pele e artérias.

2.2 Função do *scaffold* (IKADA, 2006)

Na Engenharia Tecidual, “novo tecido”¹ é o tecido formado *ex vivo* ou *in vitro* (fora do corpo humano) e *in situ* ou *in vivo* (dentro do corpo humano), com formações intermediárias entre esses dois extremos (Figura 1).

Figura 1: Formação do “novo tecido” (*neotissue*) na Engenharia Tecidual.

Quando um tecido é danificado, não somente um grande número de células é perdido, mas também a matriz extracelular (ECM). Dentro da Medicina Regenerativa, e especificamente, na Engenharia Tecidual, é designado *scaffold*, *template* ou matriz artificial o substituto da ECM; quando um *scaffold* não é utilizado para o suporte celular, utiliza-se a denominação Terapia Celular. Os *scaffolds* devem promover crescimento e organização celular, fornecendo suporte enquanto o tecido é formado (Figura 2).

Figura 2: Medicina Regenerativa: Engenharia Tecidual e Terapia Celular.

A função primária do *scaffold* é fornecer estrutura para a organização das células dissociadas. Quando as células que estão aderidas ao *scaffold* são implanta-

¹Ikada (2006) utiliza o termo *neotissue* para definir o tecido que é formado com as células selecionadas e o *scaffold* servindo de suporte.

das, elas irão se incorporar ao corpo. A fixação dessas células ao dispositivo é um elemento crítico no início do crescimento celular.

Em geral, um *scaffold* biologicamente ativo deve fornecer as seguintes características:

1. estrutura 2D ou 3D porosa com alta relação entre superfície e volume;
2. estrutura físico química para suportar o crescimentos celular;
3. poros interconectados para permitir trocas de nutrientes e metabólitos celulares;
4. ser feito de um substrato atóxico, bioabsorvível², com taxa de absorção controlada;
5. propriedades mecânicas adequadas ao tecido;
6. estrutura biomecânica fornecida pela arquitetura do *scaffold* para a troca do “tecido” até a produção da ECM pelas células;
7. geometria adequada para a formação da estrutura anisotrópica tecidual;
8. possuir capacidade carreadora, no caso da utilização de fatores de crescimento;
9. apresentar arquitetura processável e reprodutiva, do tamanho e da forma;
10. ser estéril e estável em seu tempo de vida de prateleira, transporte e produção;
11. apresentar viabilidade econômica e uma produção escalonável, de purificação e processamento

O sucesso de um biomaterial está relacionado a todos esses fatores e também a condições do paciente e habilidade do médico que monitora o processo.

²Quando a degradação ocorre somente no ambiente biológico onde existem enzimas, o termo biodegradável é preferível. O processo de absorção inclui a degradação química (por exemplo, a clivagem enzimática) e absorção físico-química (por exemplo, a dissolução no meio).

2.3 Engenharia Tecidual (RATNER et al., 2004)

A perda ou falha de um tecido ou órgão é frequente, além de ser um problema de saúde pública, ocorrendo em milhões de pacientes o ano todo. Quando há perda de dado órgão ou tecido, o tratamento ocorre por transplante entre um indivíduo e outro, ou por meio de reconstituições cirúrgicas, com transferência de uma parte no corpo humano para a área doente.

Tecidos produzidos utilizando as próprias células do paciente (autólogas) ou células imunologicamente inativas oferecem o potencial para superar o problema com perda tecidual e fornece novas terapias para doenças, tais como deficiências metabólicas. Surge, assim, uma geração de biomateriais.

Observa-se que no estado da arte da Engenharia Tecidual encontram-se gerações de biomateriais: a primeira geração, baseada no conceito de materiais bioinertes; a segunda geração, baseada no conceito de bioatividade; e a terceira geração, onde são desejáveis biomateriais biointerativos e com estímulos específicos (Figura 3).

Figura 3: Gerações de biomateriais.

A Engenharia Tecidual vem, então, representando um campo novo e emergente, de caráter interdisciplinar, aplicando conceitos de várias áreas, e auxiliando na regeneração e formação tecidual. Além disso, o desenvolvimento e a pesquisa de biomateriais têm sido estimulados por uma evolução na Biologia Molecular e Celu-

lar, Ciência dos Materiais e engenharia, bem como pelo entendimento das interações desses materiais com o meio fisiológico.

Biomateriais de terceira geração procuram estimular reações com proteínas e células de maneira molecular, fornecendo fundamentos para o desenho molecular dos *scaffolds*, que podem ser semeados com células *in vitro* (para subsequente implantação), ou para atrair células endógenas funcionais *in vivo*. Um conceito importante é que o *scaffold* pode conter informação química e estrutural específica, controlando a formação do tecido, de maneira semelhante à comunicação intercelular e padrões do desenvolvimento embrionário.

2.3.1 Controle da estrutura e função de um Tecido de Engenharia

Para o controle de estrutura e função de dado tecido desenvolvido à luz da Engenharia Tecidual existem fases de desenvolvimento, aqui delimitadas. A primeira fase é a formação *in vitro* de um tecido construído, utilizando um ambiente de suporte para o *scaffold* com o meio de cultura, no qual as células proliferam e formam uma matriz extracelular.

Na segunda fase o implante é colocado na porção anatômica onde se deseja o remodelamento, que ocorre *in vivo*, necessário para resgatar a função do órgão ou tecido. Os principais processos que ocorrem durante as fases *in vitro* e *in vivo* da formação e maturação do tecido são:

1. proliferação celular, classificação e diferenciação;
2. produção de matriz extracelular e organização;
3. degradação do *scaffold*;
4. remodelamento e potencial crescimento do tecido.

O paradigma geral da Engenharia Tecidual (Figura 4) mostra que o primeiro passo de uma abordagem típica é dado pelas células diferenciadas e não diferenciadas semeadas em um *scaffold* bioabsorvível e depois o implante manufaturado dentro de um biorreator. Durante a fase de maturação, as células proliferam, produzindo a matriz extracelular para fornecer o novo tecido. O segundo passo é representado pelo

implante já substituindo a porção anatômica danificada para o seu remodelamento de estrutura e função normais.

Figura 4: Paradigma geral da Engenharia Tecidual.

Células, *scaffold* e biorreator são as principais variáveis do processo, e o controle desses parâmetros na fabricação do dispositivo tem impacto no resultado final. Além desses fatores, a Engenharia Tecidual compreende as relações entre estruturas e funções normais e as patológicas, controla as respostas celulares e teciduais às injúrias, estímulos físicos e superfície dos biomateriais, dentro de uma manipulação farmacológica, química, mecânica e genética.

2.4 Fibroína da seda: estrutura, propriedades e aplicações na Engenharia Tecidual

2.4.1 A seda obtida do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.)

A seda, popularmente conhecida na indústria têxtil, é definida como um conjunto de proteínas fibrosas fiadas em forma de fibras por algumas larvas, como o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), aranhas do gênero *Nephila clavipes* e *Araneus*

diadematus, e cuja produção é realizada em glândulas especializadas (glândulas sericígenas); inicialmente, ocorre uma biossíntese em células epiteliais da larva, no caso do bicho-da-seda, seguida da secreção por glândulas no lúmen, com armazenamento antes do processo de fiação e formação do casulo (Figura 5) (ALTMAN et al., 2003; VEPARI; KAPLAN, 2007).

Figura 5: Casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Grupo de Bioquímica e Biomateriais, IQSC.

Os tipos de seda se diferenciam amplamente em relação a composição, estrutura e propriedades pois, dependendo das fontes, cada seda possui um perfil de aminoácidos diferente, exibindo diferentes propriedades mecânicas (ALTMAN et al., 2003). Proteínas fibrosas, como a seda, são caracterizadas pelo alto grau de repetibilidade da estrutura primária que leva a uma homogeneidade da estrutura secundária, i.e., folha β no caso da seda (ALTMAN et al., 2003).

A seda representa uma família de proteínas estruturais que é biocompatível, biodegradável e com propriedades mecânicas superiores, podendo ser amplamente modificada para aplicações biomédicas (VEPARI; KAPLAN, 2007).

2.4.2 Estrutura da fibroína da seda

A seda proveniente do bicho-da-seda tem sido utilizada comercialmente como suturas biomédicas por muitas décadas. Ela é obtida de casulos do bicho-da-seda que contem duas proteínas majoritárias, a fibroína de cadeia leve e pesada, de ~ 25 e ~ 350 kDa, respectivamente (ALTMAN et al., 2003). Essas proteínas são re-

vestidas com uma película de sericina (20 a 310 kDa), proteína de caráter hidrofílico, facilmente removida por meio de água quente (JIN; KAPLAN, 2003), que forma um compósito juntamente com a fibroína, protegendo a larva em crescimento (ALTMAN et al., 2003).

As fibras de fibroína possuem entre 10 e 25 μm de diâmetro, e a quantidade de sericina corresponde de 25 a 35% da massa do casulo, que é removida do processo de degomagem (VEPARI; KAPLAN, 2007). Além disso, as cadeias leves e pesadas, presentes na razão de 1:1, estão ligadas por uma ligação dissulfídica entre o resíduo de cisteína Cis-c20 (resíduo de cisteína na 20ª posição da região carboxi terminal) da cadeia pesada e o resíduo de cisteína Cis-172 da cadeia leve (VEPARI; KAPLAN, 2007). Uma glicoproteína, denominada P25, está ligada também a essas duas cadeias de forma não covalente.

Um número de polimorfos de fibroína tem sido reportado, incluindo a fibroína do estado glandular prévio ao processo de cristalização (*silk I*), a fibroína fiada (*silk II*) que consiste na estrutura secundária folha β , e uma fibroína que provem de um estado de interface ar/água da fibroína (*silk III*) de estrutura helicoidal (VEPARI; KAPLAN, 2007).

A estrutura da fibroína *silk I* é uma estrutura solúvel em água que, ao ser exposta ao calor ou processo de fiação, facilmente se converte em uma estrutura *silk II*. Essa estrutura é observada *in vitro* em condições aquosas e é convertida a uma estrutura folha β quando exposta a metanol ou cloreto de potássio (VEPARI; KAPLAN, 2007).

A estrutura folha β é assimétrica, com um lado ocupado por hidrogênios de glicina e o outro ocupado por grupos metila das alaninas, que populam o domínio hidrofóbico (Figura 6). As folhas β estão em um arranjo no qual grupos metila e hidrogênios das folhas β opostas interagem para formar um empilhamento interestrutural nos cristais (VEPARI; KAPLAN, 2007).

A sequência de aminoácidos dessa conformação, formando os domínios cristalinos da fibroína, é dominada pela sequência hidrofóbica $[Gly - Ala - Gly - Ala - Gly - Ser]_n$ (JIN; KAPLAN, 2003), na qual Gly, Ala e Ser correspondem aos aminoácidos glicina, alanina e serina respectivamente, como visto nas Figuras 7 e 8. A formação da fibra da seda envolve deformação por cisalhamento e alonga-

Figura 6: Estrutura quaternária da fibroína: folhas β assimétricas e α -hélices, de acordo com He et al. (2012), figura modificada.

mento, atuando numa solução de fibroína de até 30% m/v na glândula, causando cristalização da fibroína em solução (JIN; KAPLAN, 2003).

Figura 7: Sequência de aminoácidos $[Gly - Ala - Gly - Ala - Gly - Ser]_n$ da folha β .

Também, de acordo com Vepari e Kaplan (2007), as fortes ligações de hidrogênio e as forças de van der Waals geram uma estrutura termodinamicamente estável, e as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias se formam entre os aminoácidos perpendiculares ao eixo da cadeia e a fibra. Além disso, essa estrutura exclui água e é insolúvel em muitos solventes incluindo ácidos fracos e condições alcalinas e agentes caotrópicos.

Jin e Kaplan (2003) relatam a identificação da formação de uma emulsão e estruturas micelares (Figura 9) de soluções aquosas reconstituídas de fibroína da seda obtida do bicho-da-seda como o primeiro passo para o processo de controle das interações proteína-proteína e proteína-água; o tamanho dessas estruturas micela-

Figura 8: Estrutura dos aminoácidos glicina, alanina e serina.

res, entre 100 e 200 nm de diâmetro, poderiam ser previstos a partir das parcelas hidrofóbicas da estrutura primária da fibroína.

Figura 9: **a** Padrão de hidrofobicidade na sequência primária da cadeia pesada de fibroína; **b** Montagem das micelas da fibroína em água, baseada na estrutura multibloco copolimérica hidrofílica-hidrofóbica; **c** Formação de glóbulos guiada pelo aumento da concentração de fibroína e diminuição do conteúdo de água, com interações hidrofóbicas; **d** Elongação e alinhamento de glóbulos e interações entre glóbulos promovido por cisalhamento, levando a estrutura fibrilar.

As micelas, na sequência, se agregariam em glóbulos e estados de gel com o aumento da concentração da fibroína, enquanto mantida a solubilidade devido às regiões hidrofílicas da proteína, intercaladas entre as regiões hidrofóbicas (JIN; KAPLAN, 2003).

Sobre as transições estruturais sob cisalhamento ou alongamento, o aumento da birrefringência ou alinhamento da morfologia foram demonstrados por Jin e Kaplan (2003), indicando que o processo mimetiza o comportamento da seda nativa *in vivo* e que o aspecto do material obtido (no caso, as soluções) é similar aos observados em fibras nativas do bicho-da-seda.

Ao examinar a estrutura primária da cadeia pesada de fibroína, um padrão de blocos hidrofóbicos e hidrofílicos foi identificado incluindo grandes blocos hidrofílicos nas posições terminais da estrutura, seis blocos hidrofílicos internos e menores, e sete blocos hidrofóbicos internos, sugerindo a formação de estruturas micelares (JIN; KAPLAN, 2003).

Esse modelo de montagem da seda sugere que as moléculas de fibroína atuam como polímeros hidrofílico-hidrofóbico-hidrofílico, com a formação de micelas de tamanho irregular dependendo do dobramento das cadeias e interações hidrofóbicas; há, entretanto, algumas distinções importantes entre esses polímeros e triblocos poliméricos sintéticos (JIN; KAPLAN, 2003).

Cada um desses conjuntos de interações desempenha um papel crítico da solubilidade da solução de fibroína e na cristalização nesse estágio do processo (JIN; KAPLAN, 2003). Com o aumento da concentração da fibroína ocorre o aumento de interações inter micelas, direcionando à coalescência e à formação de glóbulos e então, à formação do estado de gel (JIN; KAPLAN, 2003).

2.4.3 Propriedades e aplicações biomédicas da fibroína da seda

A grande estabilidade das fibras de fibroína em comparação com as proteínas globulares é devido a grande quantidade de ligações de hidrogênio em comparação com proteínas globulares, e também a natureza hidrofóbica e significativa cristalinidade. Esta estabilidade se deve às propriedades mecânicas da fibroína da seda, as quais estão relacionadas ao processo biológico de produção da fibroína no bicho-da-seda. (ALTMAN et al., 2003).

A fibroína da seda representa uma família de proteínas estruturais que é biocompatível, biodegradável e com propriedades mecânicas superiores, podendo ser amplamente modificada para aplicações biomédicas (VEPARI; KAPLAN, 2007). Os padrões estruturais encontrados na fibroína da seda são contribuições do processo biológico, que possui fases de líquido cristalino e polimorfismo, levando a propriedades mecânicas tais como notável combinação entre força, resistência e elasticidade, em comparação com outros biomateriais (ALTMAN et al., 2003).

Outras propriedades de filmes de fibroína da seda são a permeabilidade ao

oxigênio e a vapores d'água que, em filmes obtidos por *casting* de soluções aquosas, depende da quantidade de estruturas *silk I* e *silk II*, além do tratamento desses filmes com outros solventes orgânicos (VEPARI; KAPLAN, 2007).

A aderência de fibroblastos em filmes de fibroína também foi mostrada por Vepari e Kaplan (2007) sendo tão alta quanto filmes de colágeno; a utilização desses filmes promove aumento da ligação às células e formação óssea, ainda mais se modificados com o peptídeo arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp) ou proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2). Existe, porém, dificuldades em acessar respostas biológicas devido à falta de detalhamento e caracterização da fibroína da seda, incluindo processos de remoção da sericina, proteína responsável por muitos problemas de biocompatibilidade e hipersensibilidade (ALTMAN et al., 2003).

Altman et al. (2003) comentam sobre a aplicação da fibroína vista particularmente em suturas durante décadas, e que vem provando efetividade em outras aplicações biomédicas na forma de hidrogéis, filmes, esponjas e fibras. Alguns estudos de filmes de fibroína com poli(álcool vinílico) relataram a formação de filmes macroscopicamente uniformes, porém com separação de fases em nível microscópico (TANAKA et al., 1997).

2.5 Poli(álcool vinílico): estrutura, propriedades e aplicações na Engenharia Tecidual

Embora muitas tentativas do emprego do poli(álcool vinílico) (PVA) na Engenharia Tecidual, a aplicação prática desse polímero tem sido alcançada apenas em um número restrito de casos, devido a sua rápida biodegradação, resultante do seu alto caráter hidrofílico (SHTILMAN, 2003).

O PVA (Figura 10) é um polímero sintético, não tóxico, e uma de suas habilidades é a formação de filmes flexíveis, sendo assim utilizado em aplicações bioquímicas e médicas (TANAKA et al., 1997; TANAKA; TANIGAMI; YAMAURA, 1998). Além disso, o PVA possui alta resistência mecânica e, por isso, suas membranas são amplamente produzidas e estudadas de várias maneiras (DAI; LI; YAMADA, 2002). O hidrogel de PVA exibe uma propriedade mucoadesiva, e possui hemocompatibilidade, no caso dos hidrogéis não iônicos (RATNER et al., 2004).

Figura 10: Estrutura do poli(álcool vinílico), PVA.

Preparações a base de PVA e poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP) foram estudados na substituição do humor vítreo, na forma de implantes esféricos (SHTILMAN, 2003). Também, segundo Shtilman (2003), géis de PVA possuem a capacidade de responder a influência de um pulso elétrico, aumentando e diminuindo de volume, sob essa influência, sendo assim utilizáveis como materiais para modelos de músculos artificiais; além disso, bons resultados para cicatrização de feridas foram obtidos pela utilização de sistemas esponjosos baseados em proteínas como colágeno e PVA reticulado contendo antissépticos (SHTILMAN, 2003).

Alguns métodos de preparo do PVA foram descritos, como Hassan e Peppas (2000), que prepararam géis semicristalinos por meio da exposição das soluções de PVA a repetidos congelamentos e descongelamentos, induzindo a formação de cristais e de um arranjo reticulado quasi-permanente. Outros métodos de preparo utilizam agentes de reticulação como o glicolal, o glutaraldeído e boratos (RATNER et al., 2004), muito utilizados no preparo de materiais para a absorção de exudatos (SHTILMAN, 2003).

O PVA é degradado no organismo e, em alguns casos, na presença de microrganismos, tais como *Pseudomonas* sp. em simbiose, produzindo poli(álcool vinílico) oxidase (PVA-o) e hidrolase de PVA oxidado. O PVA oxidado contendo grupos carbonila também pode ser obtido pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (SHTILMAN, 2003).

2.6 Blendas

Blendas são definidas como misturas mecânicas entre polímeros, não sendo necessárias inicialmente ligações químicas fortes entre esses polímeros; usualmente as

blendas são imiscíveis, sendo observado um processo de separação de fases (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). No caso mais limite, todos os polímeros podem ser considerados blendas, visto que possuem uma distribuição de massa molar (DMM), fazendo com que moléculas adjacentes sejam diferentes (GARTON, 1992).

Entretanto, segundo Garton (1992), o termo blenda é utilizado para misturas de dois ou mais polímeros com diferenças notáveis de composição química e microestrutura; não é necessário que os polímeros se misturem em nível molecular para que o material seja considerado uma blenda.

Miscibilidade e compatibilidade são termos utilizados muitas vezes de forma intercambiável, porém o termo miscibilidade descreve uma mistura em escala molecular (UTRACKI, 1989), enquanto compatibilidade descreve o processo de obtenção da blenda dos polímeros com propriedades aprimoradas (Figura 11), por meio de processos físicos, aditivos e reativos. Isso difere de um compósito polimérico, no qual diferentes geometrias e estruturas estão, como por exemplo o compósito fibra de carbono/epóxi³ presentes (GARTON, 1992; SHONAIKE; SIMON, 1999).

Figura 11: Esquema da compatibilização da blenda polimérica dos polímeros A e B.

De forma pragmática, o termo miscibilidade significa uma única fase em nível molecular em dado sistema, sendo este homogêneo em determinado tipo de teste. Assim, para estudar a morfologia de dada blenda, podem ser utilizadas técnicas (Figura 12) de acordo com suas faixas úteis (UTRACKI, 1989), sendo elas, por exemplo: microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), infravermelho (IR), calorimetria diferencial exploratória (DSC),

³Nesse caso, a matriz contínua é de natureza polimérica.

espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS), espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS).

Figura 12: Faixa das técnicas experimentais para estudo da morfologia das blendas.

3 Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)

Neste capítulo são apresentados material e métodos, resultados e discussão e, por fim, uma conclusão parcial relacionados à elaboração das soluções de fibroína e suas blendas na forma de gel com poli(álcool vinílico). As blendas obtidas nesse capítulo foram utilizadas no preparo das membranas no Capítulo **Membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)**.

A caracterização nessa etapa foi predominantemente por estudos de reologia, visto que são obtidos soluções aquosas e géis, e estes materiais foram utilizados na preparação das membranas. Conhecer as propriedades reológicas foi uma forma de entrar em contato com a estrutura do material formado, possíveis interações e alterações no mesmo. Ambos fibroína da seda e poli (álcool vinílico) são polímeros e possuem características tanto de materiais elásticos quanto viscosos, propriedade esta chamada *viscoelasticidade*.

3.1 Material

casulos do bicho-da-seda espécie *Bombyx mori* L., fornecidos pelo sericultor Hélio Hatsugai, Bastos, São Paulo.

poli(álcool vinílico) 87–90% de grau de hidrólise, massa molecular média 30.000–70.000 g mol⁻¹, Sigma Aldrich.

3.2 Métodos

Os métodos utilizados nessa seção estão esquematizados na Figura 13.

Figura 13: Esquema da obtenção das soluções de fibroína regenerada e géis de fibroína:poli(álcool vinílico).

3.2.1 Extração da fibroína de seda de casulos do bicho-da-seda

Os casulos do bicho-da-seda possuem em sua estrutura, além da fibroína (proteína de interesse) outras proteínas como a sericina, solúvel em água. A extração envolveu a retirada da sericina e outras proteínas solúveis por meio de aquecimento em solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) e lavagem das fibras insolúveis com água desionizada.

Para a extração, 5 g de casulos de bicho-da-seda abertos foram imersos em 2 L de uma solução de Na_2CO_3 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, realizando uma extração entre 70 e 80 °C, por 30 min. Em seguida, as fibras foram retiradas com auxílio de uma peneira e colocadas em um béquer com 1 L de água desionizada, por 20 min, por 3 vezes.

As fibras de fibroína úmidas foram, então, colocadas em placa de Petri e mantidas em estufa, a 50°C, por 24 h. Após essa etapa, as fibras secas foram moídas em um moinho de facas SOLAB, modelo SL31 (EMBRAPA Instrumental São Carlos), com peneira de 10 mesh (2 mm) e armazenadas em saco plástico selado.

3.2.2 Solubilização da fibroína em solução ternária salina e diálise

A solubilização da fibroína envolve a mistura das fibras em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), a 50 °C. A solução final é estável devido a grande quantidade de sal presente, podendo ser armazenada a 4 °C.

Para a solubilização das fibras de fibroína foi utilizado o método modificado de Ajisawa (1998). Brevemente, 29,40 g de cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram pesados em um béquer, sendo 21,61 g de água acrescentados e a mistura levada para agitação, com agitador mecânico. Após a solubilização do sal, 18,42 g de etanol anidro foram adicionados. A razão molar da solução final é $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ 1:2:6.

5 g de fibras moídas foram adicionadas, aos poucos, na solução ternária, de modo a facilitar a mistura. A temperatura da agitação foi mantida em 50 °C, por aproximadamente 1 h 30 min. A solução, então, foi mantida por 24 h, sob agitação, sem aquecimento. A concentração final de fibroína na solução foi de 6,72% (m/m).

Após a solubilização da fibroína o processo de diálise foi realizado. Este processo é caracterizado pela remoção da alta quantidade de sal presente na solução de fibroína em solução ternária, além do etanol presente.

Para a etapa de diálise, dois tubos de diálise foram separados e uma de suas extremidades fechadas com prendedores plásticos. Em seguida, a solução de fibroína em solução ternária foi adicionada, sendo as outras extremidades, então, fechadas. Cada conjunto tubo de diálise/solução foi colocado em um béquer contendo aproximadamente 1,15 L de água desionizada, e mantido sob agitação por 72 h, em temperatura ambiente. A cada 24 h, uma troca da água de diálise foi realizada.

Após a diálise, a solução aquosa de fibroína regenerada (RSF) foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 min, a 10 °C e armazenada sob refrigeração. A determinação da concentração final da RSF foi realizada a partir da secagem, em triplicata, de 1 g da solução por 48 h, em placas de Teflon®, sob fluxo de ar.

3.2.3 Determinação da massa molecular: eletroforese da RSF

Eletroforese é um processo que consiste em fazer migrar qualquer íon ou grupo com carga elétrica por meio da aplicação de um campo elétrico, numa matriz que normalmente é um gel. A velocidade de migração da partícula depende do seu número de carga, do seu peso molecular e da intensidade do campo aplicado; para uma solução ou mistura que é aplicada numa matriz eletroforética, quanto maior a razão carga:massa de uma partícula, mais rápido essa irá migrar.

A determinação da massa molecular foi realizada utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS), a 12%. Como padrão, foi utilizado o padrão *P* de alta massa molecular da GE *Healthcare*, contendo uma mistura proteica de: miosina, 220 kDa; α_2 -macroglobulina, 170 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; transferrina, 76 kDa; desidrogenase glutâmica, 53 kDa.

Inicialmente, foram preparados 40 μ L de uma diluição 1:10 da solução de RSF com tampão da amostra, sendo aplicados 10 μ L no poço de amostra. Além da amostra, foram aplicados 10 μ L do padrão *P* como referência.

As condições para eletroforese foram de 150 V e 100 min. Ao final da ele-

troforese, o gel foi fixado com uma solução de metanol:água:ácido acético (5:4:1) e as zonas correspondentes às proteínas foram reveladas com corante Comassie Brillhante Azul R-250. Em seguida, o excesso de corante foi removido com ácido acético 7% e o gel escaneado.

As massas moleculares foram calculadas em função dos valores dos fatores de retenção (R_f) dos padrões, de acordo com a Equação 3.1

$$R_f = \frac{dp}{dc} \quad (3.1)$$

onde dp é a distância percorrida pela proteína e dc a distância percorrida pelo corante.

A partir dos valores de R_f foi construída uma curva de calibração do tipo *log* da massa molar versus R_f , sendo determinadas as massas moleculares da amostra por interpolação.

A determinação das massas moleculares utilizando a técnica SDS-PAGE foi realizada no Instituto de Química de São Carlos, com a supervisão da professora D.ra Fernanda Canduri.

3.2.4 Preparo das soluções de RSF em diferentes concentrações

Após a diálise, foram preparadas soluções aquosas com diferentes concentrações da RSF para a avaliação do comportamento reológico antes do preparo das blendas na seção 3.2.5. Foi estabelecido o preparo das soluções de fibroína (SF) de acordo com a concentração resultante média da solução aquosa de RSF após os processos de diálise. Segue a Tabela 1 com a denominação das soluções preparadas.

Tabela 1: Denominação das soluções de RSF para ensaio de reologia.

Géis	RSF (% , m/m)
SF 1%	1
SF 1,5%	1,5
SF 2%	2
SF 2,5%	2,5
SF 3%	3

As soluções obtidas foram armazenadas sob refrigeração antes da realização dos ensaios.

3.2.5 Preparo dos géis de fibroína:poli(álcool vinílico)

Para o preparo dos géis de fibroína:poli(álcool vinílico), aqui denominados SF:PVA, foi fixada uma única concentração de fibroína, a de 2%(m/m). Os géis obtidos apresentaram concentrações 0, 0,25, 0,5 e 1%(m/m) de poli(álcool vinílico) (PVA) para 10 g total. A Tabela 2 mostra a denominação dos géis preparados.

Tabela 2: Denominação dos géis para ensaio de reologia.

Géis	Descrição
SF 2%	RSF 2%
SF:PVA 0,25%	RSF 2% + 0,25% poli(álcool vinílico)
SF:PVA 0,5%	RSF 2% + 0,5% poli(álcool vinílico)
SF:PVA 1%	RSF 2% + 1% poli(álcool vinílico)
PVA 2%	poli(álcool vinílico) 2%

A Tabela 3 mostra as diferentes blendas preparadas, com as concentrações de partida das soluções e massas utilizadas. Inicialmente foram pesadas em béqueres as massas de PVA a partir de uma solução aquosa a 4%(m/m), correspondendo assim a 0, 0,25, 0,5 e 1%(m/m) de PVA para 10 g total de massa final de gel. Foram adicionadas massas de água desionizada para ajustar as massas finais.

Tabela 3: Descrição das massas de RSF e PVA utilizadas no preparo das blendas. (a) concentração final de RSF e (b) concentração final de PVA.

	SF 2%	SF:PVA 0,25%	SF:PVA 0,5%	SF:PVA 1%	PVA 2%
RSF (%)	4,43	4,43	4,43	4,43	-
PVA (%)	-	4	4	4	4
PVA (g)	-	0,625	1,25	2,5	5
H ₂ O (g)	5,49	4,86	4,24	2,99	5
RSF (g)	4,51	4,51	4,51	4,51	-
Total (g)	10	10	10	10	10
RSFf (a) (%)	2	2	2	2	0
PVAf (b) (%)	0	0,25	0,5	1	2

Após isso, uma massa fixa da solução de fibroína de partida, com concentração determinada, foi adicionada aos béqueres contendo PVA. Todas as soluções

foram misturadas sob agitação mecânica, não vigorosa, por 5 min.

Os géis obtidos foram armazenados em frascos de vidro transparente, sob refrigeração.

3.2.6 Propriedades reológicas das soluções de RSF e blendas SF:PVA

Os ensaios de reologia tiveram por finalidade estudar a deformação e a variação do caráter elástico e viscoso dos géis com incremento de temperatura, analisando as respostas a deformações provocadas pelo ensaio. Para isso, foram preparados 10 g dos géis com as concentrações finais de acordo com as Tabelas 1 e 2, nas seções 3.2.4 e 3.2.5, respectivamente.

As propriedades reológicas foram determinadas em um reômetro de tensão controlada, com o equipamento TA Instruments modelo AR1000N, utilizando uma geometria cone placa de 60 mm, ângulo de 30', *gap* de 15 μm .

A região viscoelástica foi obtida por varredura de deformação com frequência constante de 1 Hz a uma temperatura de 25 °C. Os ensaios de frequência foram realizados na faixa de 0,1 – 100 rad s^{-1} , a 25 °C.

Os ensaios de temperatura foram realizados de 25–85 °C com uma frequência de 1 Hz, deformação de 1%, razão de aquecimento e resfriamento de 5 °C min^{-1} .

Todos os ensaios de reologia foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Extração, solubilização e diálise da fibroína de seda

O processo de extração das fibras de fibroína da seda com a remoção da sericina é uma etapa crítica da preparação das soluções de RSF; a degomagem pode afetar as propriedades do biomaterial, incluindo massa molecular e viscosidade das RSF, devido ao aquecimento e degradação pelo meio alcalino (PRITCHARD et al., 2013).

Segundo Vepari e Kaplan (2007), a quantidade de sericina removida corresponde de 25 a 35% da massa do casulo. Neste trabalho foram obtidos, em média, $70,45 \pm 4,16$ % de fibras de fibroína nas extrações realizadas, sendo que os $30,56 \pm 1,77$ % correspondem à sericina e glicoproteína P-25 do casulo, dissolvidas na solução alcalina.

A condutividade do meio dialisador foi máxima após 24 h, com valores de $536,07 \pm 74,46 \mu\text{S cm}^{-1}$. Os valores iniciais e finais da condutividade para o meio dialisador foram $8,75 \pm 3,42$ e $7,98 \pm 0,87 \mu\text{S cm}^{-1}$, indicando que os mesmos valores foram encontrados e estão associados a retirada dos sais pela diálise (condutividade final foi igual a inicial, antes da diálise).

O processo de diálise influencia a concentração final da solução de RSF e também o processo de gelificação, como é visto em estudos de Nogueira (2009). Neste trabalho a temperatura do processo de diálise não foi controlada, porém, ela é um fator para aumento ou diminuição do processo de cristalização e formação do hidrogel de RSF (JIN; KAPLAN, 2003).

Estudos preliminares a esse trabalho mostraram um processo de gelificação imediatamente após as 72 h de diálise, sugerindo alterações provocadas pelo não controle da temperatura associado a diferentes quantidades de fibras solubilizadas em solução ternária (quantidades estas acima da estabelecida nesse trabalho, a de 6,72 % (m/m)).

Além disso, vale ressaltar que, além da característica metaestável de soluções de fibroína e formação de micelas (JIN; KAPLAN, 2003), com grande instabilidade, há o fator relacionado à mistura da proteína com um polímero hidrofílico, favorecendo separação de fases no sistema, e também durante os ensaios. São estes, então, fatores que dificultam o preparo das blendas.

Para o desenvolvimento das soluções de RSF e suas blendas, as diálises da fibroína em solução ternária forneceram soluções metaestáveis, com $3,84 \pm 0,53$ % (m/m), como observado em estudos de Zhou et al. (2004) e Mandal, Mann e Kundu (2009), com soluções aquosas de RSF a 4 % (m/m) fornecidas após processo de diálise.

3.3.2 Determinação da massa molecular: eletroforese da RSF

Uma distribuição de massa molecular entre 216 kDa e 294 kDa pode ser observada na Figura 14, o que corresponde a frações da cadeia pesada de fibroína. Os valores de massa molecular foram obtidos por meio de uma curva de calibração, por interpolação (Figura 15), fornecendo a Equação 3.2, com $r^2 = 0,9612$.

$$\log_{10}MM = 2,52 - 0,925R_f \quad (3.2)$$

Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% da RSF em diluição 1:10. *P*, padrão.

A presença de uma banda correspondendo a 43 kDa é vista, sendo atribuída à cadeia leve de fibroína. Como a diferença entre a massa molecular da cadeia leve e pesada é muito grande, houve uma dificuldade em correr o gel, e este forneceu uma banda alterada de difícil interpretação próxima à frente do corante.

Uma distribuição de massas moleculares ocorre principalmente devido à condição alcalina de extração das fibras de fibroína e a solubilização das mesmas pelo

Figura 15: Curva de calibração obtida para determinação das massas moleculares: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% da RSF em diluição 1:10

método utilizado por Ajisawa (1998). Segundo Yamada et al. (2001), as fibras de fibroína extraídas e solubilizadas pelo método de Ajisawa (1998) utilizando Na_2CO_3 para remoção da sericina fornecem nos estudos de eletroforese uma mancha ampla entre 350 e 25 kDa, correspondentes às cadeias pesa e leve, respectivamente.

Além de ter conhecimento da distribuição de massa molecular (DMM) na solução de RSF como forma de controle da degradação das fibras, saber que esta distribuição afeta o material final é essencial. Desde ensaios de reologia das soluções de RSF e suas blendas, até a formação dos materiais sólidos (membranas, filmes, esponjas), deve ser levada em consideração a DMM, visto que se tratam de materiais poliméricos. Segundo Bretas e DÁvila (2000) e Canevarolo (2007), as propriedades reológicas, como por exemplo, viscosidade, são determinadas pela presença de DMM do polímero.

Outros estudos com SDS-PAGE de Yamada et al. (2001) mostraram a presença de bandas definidas referentes às cadeias pesada e leve quando se utiliza a fibroína diretamente da glândula do bicho-da-seda, ou seja, não há uma degradação e uma DMM de polipeptídeos na amostra.

3.3.3 Propriedades reológicas das soluções de RSF

Alguns conceitos de reologia, viscosidade e fluidos são apresentados no **Apêndice A – Reologia**, na página 100.

Inicialmente, para as medidas reológicas, a região viscoelástica foi determinada para as soluções de RSF nas diferentes concentrações: 1, 1,5, 2, 2,5 e 3% (m/m). A região viscoelástica foi observada pela linearidade dos módulos elástico (G') e módulo viscoso (G'') com o aumento da deformação (γ).

A linearidade entre os módulos G' e G'' foi observada até 3% de deformação para todas as concentrações de RSF, de acordo com a Figura 16. A característica elástica ($G' > G''$) foi observada até 230% de deformação, com inversão dos módulos, surgindo a partir dessa deformação um comportamento viscoso, com G'' predominando, dando ao sistema um caráter de líquido. Essa inversão ocorreu em todas as concentrações estudadas, entre 230 – 900 %.

Figura 16: Módulos G' e G'' em função da deformação γ para soluções de RSF 1 a 3% (m/m).

O ensaio de frequência angular (ω) foi utilizado para caracterizar a natu-

reza do gel ou solução. A Figura 17 mostra que ambos os módulos G' e G'' foram dependentes de ω , indicando também um comportamento elástico com $G' > G''$, sem inversão dos módulos, para todas as concentrações avaliadas.

Figura 17: Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para soluções de RSF 1 a 3% (m/m).

Além disso, foi observado um comportamento dentre essas concentrações que pode ser associado a um rearranjo das cadeias poliméricas. Em $39,72 \text{ rad s}^{-1}$ ocorreu um pico resultante da diminuição do módulo G' para todas amostras, sendo bem evidente para SF 2,5%, que por sua vez tem um módulo G'' menor e também evidente na mesma frequência angular.

A Figura 18 apresenta com mais detalhes a região com diminuição dos módulos G' e G'' para SF 2,5% e o gráfico da tangente do ângulo de fase¹ ($\tan \delta$), obtido pela razão entre o módulo viscoso G'' e o módulo elástico G' , de acordo com a Equação 3.3.

¹No **Apêndice A – Reologia**, na página 100, são apresentados mais detalhes sobre a tangente do ângulo de fase.

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (3.3)$$

Figura 18: Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω , e $\tan \delta$ para SF 2,5% (m/m).

O módulo G' está associado à componente em fase com a deformação, ou seja, à contribuição elástica ou de armazenamento em cada ciclo. Já G'' está associado à componente fora de fase com a deformação, ou seja, contribuição viscosa ou dissipação de energia em cada ciclo. Valores de $\tan \delta$ menores que 1 foram observados para SF2,5%, assim como para as outras SF analisadas. Assim, as propriedades elásticas são dominantes em relação às viscosas durante o ensaio de frequência.

Com o aumento da frequência ocorreu a diminuição dos valores de $\tan \delta$ até 5 rad s^{-1} , fato este justificado pela presença de associações moleculares nas amostras aumentando os valores de G' ; outra justificativa para esse comportamento até 5 rad s^{-1} seria que os movimentos moleculares se tornaram mais restritos com altas frequências, fazendo com que o sistema se comporte como um sólido, assim, G' predominando sobre G'' (HORN, 2012).

Porém, acima de 5 rad s^{-1} , houve um aumento dos valores de $\tan \delta$, resultado do aumento da relação entre os módulos (dado ao aumento de G''), caracterizando uma diminuição do caráter elástico da amostra. Esse fato se justifica pelo rearranjo das moléculas associado às altas frequências que o material é submetido, conferindo ao material uma característica viscosa.

Assim, a escolha da SF 2% para os estudos com variação de PVA foi feita de acordo com ensaios de reologia e valores de concentração obtidos após processo de diálise. A concentração de SF 2% se apresentou adequada pois forneceu as mesmas características reológicas numa concentração intermediária, favorecendo o desenvolvimento das membranas em maior quantidade, quando se compara com concentrações de SF 3%, por exemplo (forneceriam menos membranas e utilizariam mais RSF). Além disso, a concentração SF 2% está abaixo da concentração micelar crítica.

Também, muitos trabalhos utilizam uma concentração a 2% (m/m), tanto para soluções de RSF quanto para outros biopolímeros. Além disso, Kim et al. (2004), em seus estudos de estrutura e hidrogéis de fibroína, afirmam que um aumento da concentração da RSF favorece o processo de gelificação, principalmente se associado ao aumento da temperatura e à diminuição do pH.

Escolhida a SF 2%, ensaios de deformação foram realizados (Figura 19) em triplicata: **a**, **b** e **c**. Com eles pôde ser observado que, mesmo com uma concentração final da solução de RSF, há diferenças entre as amostras, devido à cinética lenta de mudança conformacional dos polímeros da proteína, bem como da característica metaestável da fibroína, ou seja, um sistema instável (NOGUEIRA, 2009).

Além da explicação sob a luz da metaestabilidade desses sistemas, devem ser observadas as diferentes concentrações da solução de RSF de partida (aquela obtida logo após o processo de diálise), à variação de temperatura durante o manuseio das amostras e ao ensaio de reologia em si (forma de acondicionamento da amostra na placa do reômetro), além da variação no próprio lote de casulos do bicho-da-seda.

Figura 19: Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2% apresentando as diferenças entre módulos dentro da mesma concentração de SF.

Figura 20: Tensão de oscilação τ e função da deformação γ . Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2%.

3.3.4 Propriedades reológicas das blendas SF:PVA

Na Figura 20 são observados a tensão de oscilação (τ) em função da deformação γ , e os módulos G' e G'' . Para a SF 2% a tensão de oscilação se relacionou com a deformação de forma linear até 3% de deformação; após essa porcentagem, a tensão de oscilação não seguiu essa linearidade.

Os módulos G' e G'' para SF 2% são constantes até $\sim 3\%$ de deformação, numa região linear e, para valores acima dessa porcentagem, G' e G'' são função da deformação, num comportamento não linear. Para o PVA 2%, essa região não foi bem definida, como observado para valores de deformação até de 50% (Figura 21). Sendo assim, o valor de deformação selecionado para esse trabalho foi de 1%, correspondendo à região viscoelástica da solução de RSF.

Figura 21: Módulos G' e G'' em função da deformação γ para SF 2% e PVA 2%.

3.3.4.1 Ensaios de frequência

Após a determinação da região viscoelástica para os ensaios subsequentes, a natureza de gel ou solução pôde ser caracterizada por meio dos ensaios de frequência

(ω). A Figura 22 mostra que ambos os módulos G' e G'' foram dependentes do aumento de ω , principalmente em SF:PVA 0,5%, SF:PVA 1% e PVA 2%.

Para SF 2% e a blenda SF:PVA 0,25%, os valores de G' foram maiores que G'' , o que os caracteriza com um comportamento de gel. O comportamento líquido foi observado pelos valores de G'' maiores que G' para as blendas SF:PVA 0,5%, SF:PVA 1% e PVA 2% (Figura 22); para essas blendas, após uma frequência específica ocorreu um cruzamento das curvas G' e G'' , com G' maior que G'' , e as blendas passam a ter um caráter de gel.

Os valores da inversão dos módulos foram de $31,69 \text{ rad s}^{-1}$ para a blenda SF:PVA 0,5% e $19,98 \text{ rad s}^{-1}$ para a blenda SF:PVA 1%; a inversão dos módulos para o PVA 2% ocorre em $15,85 \text{ rad s}^{-1}$, e o gráfico possui um perfil diferente da SF 2% (Figura 23). Foi observado, então, dois extremos: a fibroína da seda em solução a 2%, com comportamento elástico ($G' > G''$) e o PVA, em meio aquoso a 2%, com comportamento viscoso ($G'' > G'$)

A Figura 24 mostra as curvas de $\tan \delta$ em função de ω para SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%. Valores de $\tan \delta$ menores que 1 são observados para SF 2% e SF:PVA 0,25%, assumindo maiores valores de G' , sendo uma possível causa para esse efeito a formação de associações moleculares. A adição de PVA em SF:PVA 0,25% não afetou o comportamento elástico da blenda.

Um breve estudo com concentrações menores de PVA (Figura 24) formando blendas SF:PVA 0,0313 a 0,125%, foi realizado para acompanhar a evolução das curvas com o aumento do PVA. Pôde ser observado que, com o aumento da quantidade de PVA, há uma inversão dos módulos G' e G'' com uma concentração de PVA entre 0,125 e 0,25%. Isso mostra que, a partir dessa concentração de PVA, há o predomínio do módulo viscoso, G'' , além de indicar que o comportamento das curvas é o mesmo para concentrações acima de 0,25%, e semelhante ao PVA 2%.

Valores de $\tan \delta$ maiores que 1 foram observados para as blendas SF:PVA 0,5%, SF:PVA 1% e para o PVA 2%. Nesses casos, as propriedades viscosas são dominantes em relação às propriedades elásticas, sendo mais evidentes com aumento de quantidade de PVA, e no próprio PVA 2% (com os maiores valores de $\tan \delta$).

Com o aumento de ω ocorreu a diminuição dos valores de $\tan \delta$. Esse

Figura 22: Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para SF 2% e blendas SF:PVA 0,25 a 1%.

Figura 23: Módulos G' e G'' em função da frequência angular ω para SF 2% e PVA 2%.

fato deve ser justificado pela presença de associações moleculares entre a SF e o PVA, no caso das blendas SF:PVA 0,5 e 1%, aumentando os valores de G' ; outra justificativa seria o fato de os movimentos moleculares ficarem mais restritos com altas frequências, fazendo com que o sistema se comporte como um sólido, assim, G' predominando sobre G'' .

3.3.4.2 Ensaios de temperatura

Em geral, medidas de G' e G'' em função da variação de temperatura são utilizadas para a determinação do pontos de transição de estado líquido-gel de polímeros e suas blendas, sendo utilizados os ensaios de temperatura realizados com o incremento da temperatura e medida dos módulos. Aqui, uma etapa complementar, com diminuição da temperatura, forneceu medidas dos módulos após as blendas serem aquecidas no ensaio.

A Figura 25 apresenta os módulos G' e G'' da *etapa 1*, na qual foi realizado

Figura 24: Valores de $\tan \delta$ em função da frequência angular ω para SF 2%, blendas SF:PVA 0,0313 a 1% e PVA 2%.

o aumento de temperatura de 25 – 85 °C, para SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%. Entre 25 – 50 °C é possível observar que, com o aumento da concentração de PVA, os valores do módulo G' diminuem para todas as blendas. Especificamente em 25 °C e 1 Hz (6,28 rad s⁻¹), G'' é maior que G' , para as blendas SF:PVA 0,5 e 1%.

Esse comportamento se mantém até 49 – 51 °C, quando há inversão dos módulos para SF:PVA 0,5 e 1%, e G' predomina sobre G'' . É, assim, caracterizado um comportamento sólido para essas blendas, por meio de uma transição de estado líquido para estado de gel, ou seja, um ponto de gel. O ponto de gel não é observado para SF 2% e SF:PVA 0,25% pois ambos já possuem $G' > G''$, caracterizando um estado de gel. Porém, um aumento de ambos G' e G'' é observado, mantendo o comportamento elástico com predomínio de G' .

A Figura 26 mostra a *etapa 2*, na qual, após aumento da temperatura na etapa 1, há a diminuição da temperatura com medida dos módulos. Pôde ser observado que, com o aumento da temperatura na etapa 1, o módulo G' foi maior que

Figura 25: Módulos G' e G'' em função da temperatura para SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%. Etapa 1: elevação da temperatura.

Figura 26: Módulos G' e G'' em função da temperatura para SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%. Etapa 2: diminuição da temperatura.

G'' , caracterizando um comportamento elástico para SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%. Com a diminuição da temperatura e medida de G' e G'' foi visto que G' foi maior que G'' , caracterizando ao final do todas as blendas com comportamento elástico.

Ficou claro que, com o aumento da concentração de PVA nas blendas, o comportamento reológico das mesmas é conduzido ao comportamento do PVA a 2%: ambos os módulos G' e G'' iniciais (SF 2%) diminuíram com a adição do poli álcool, com inversão de módulos em SF:PVA 0,5% e SF:PVA 1%, essas últimas apresentando, então, comportamento viscoso, como o PVA 2% (Figura 27). Além disso, o PVA 2% teve uma transição sol-gel, permanecendo com G' maior que G'' , ou seja, comportamento elástico após o ensaio de temperatura.

Figura 27: Módulos G' e G'' em função da temperatura para PVA 2%. Etapas 1 e 2 de aumento e diminuição da temperatura, respectivamente.

A Tabela 4 mostra os valores dos módulos no ensaio. Com a diminuição da temperatura até 25 $^{\circ}\text{C}$ fica evidente que os módulos se mantiveram maiores do que quando realizada a etapa 1, sugerindo uma mudança estrutural em todas as amostras. No final da etapa 2 foi observado que, com a diminuição da temperatura

houve um aumento de ambos os módulos.

Tabela 4: Valores dos módulos G' e G'' no ensaio de temperatura: etapas 1 e 2 de aquecimento e resfriamento, respectivamente.

	SF 2%	SF:PVA 0,25%	SF:PVA 0,5%	SF:PVA 1%	PVA 2%
G' (Pa), 25 °C	0,52	0,076	0,045	0,023	0,016
G'' (Pa), 25 °C	0,187	0,047	0,039	0,024	0,018
G' (Pa), 85 °C	18.310	2.622	4.733	11.850	3.664
G'' (Pa), 85 °C	3.661	882,8	1.655	3.093	679
G' (Pa), 25 °C	22.790	2.572	21.490	27.800	4.786
G'' (Pa), 25 °C	9.855	739	5.725	8.582	1.667

3.4 Conclusão Parcial

No Capítulo **Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)** foram apresentados material e método para a obtenção dos géis de SF, preparo das blendas SF:PVA e estudos de reologia. Foram obtidas soluções metaestáveis de RSF, com sua utilização imediata após o processo de obtenção a partir dos casulos do bicho-da-seda.

A extração das fibras de fibroína teve um rendimento de $70,45 \pm 4,16\%$ e o processo de diálise forneceu soluções de RSF com concentração $3,84 \pm 0,53\%$ (m/m), de acordo com resultados da literatura (VEPARI; KAPLAN, 2007; ZHOU et al., 2004; MANDAL; MANN; KUNDU, 2009). A eletroforese SDS-PAGE mostrou que ocorreu uma distribuição de massa molecular (DMM) da RSF, entre 216 e 294 kDa, com formação de polipeptídeos da RSF, como previsto por Yamada et al. (2001).

Os resultados dos estudos de reologia apontaram para o caráter elástico da solução de RSF e viscoso do PVA, que pode ser evidenciado pela determinação da região viscoelástica para o ensaio de frequência. A porcentagem de deformação escolhida para o ensaio de frequência foi de 1%, sendo 3% o valor máximo para ser encontrada a região viscoelástica das soluções de RSF. Para todas as concentrações

das soluções de RSF analisadas foram encontradas transições de gel para líquido em aproximadamente 230% de deformação.

O ensaio de frequência das blendas SF:PVA mostrou a dependência dos módulos G' e G'' com o aumento da frequência angular, principalmente para as blendas SF:PVA 0,5%, SF:PVA 1% e PVA 2%, com uma inversão dos módulos a partir de $31,69 \text{ rad s}^{-1}$, $19,98 \text{ rad s}^{-1}$ e $15,85 \text{ rad s}^{-1}$, respectivamente.

Por fim, os ensaios de temperatura mostraram que o comportamento elástico (para SF 2% e SF:PVA 0,25%) e viscoso (SF:PVA 0,5 e 1%) se mantêm até $49-51^\circ\text{C}$, com uma inversão dos módulos para as blendas SF:PVA 0,5 e 1%, apresentando estas, então, comportamento elástico com G' maior que G'' . Com a diminuição da temperatura e medida dos módulos pôde ser observado que ocorreu o aumento de ambos os módulos, mantendo o comportamento elástico para todas as amostras.

Assim, comparando os módulos iniciais e finais em 25°C , nas duas etapas de aquecimento e resfriamento, respectivamente, pode ser afirmado que um incremento de temperatura fornece um gel com módulos muito maiores que iniciais, e que tratamentos térmicos são uma alternativa para formação de estruturas sólidas mais rígidas, em membranas por exemplo.

Por fim, a realização da etapa de aquecimento no ensaio de reologia mostrou que, ao aquecer as blendas SF:PVA 0,5 e 1%, há um fornecimento de energia para transições dentro dos géis, deixando-os com um caráter final elástico. Para a SF 2% ocorreu um aumento dos módulos, mantendo o módulo G' predominante sobre G'' , indicando um aumento de cristalinidade, com formações de folha β a partir de transições conformacionais a partir de conformações randômicas e hélice α , promovendo a estabilidade termodinâmica, com rompimento da barreira energética e a cinética lenta de transição de fases.

4 Membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)

Neste capítulo são apresentados material e métodos, resultados e discussão e, por fim, uma conclusão parcial relacionados à elaboração de membranas de fibroína:poli(álcool vinílico) a partir de seus géis obtidos no Capítulo **Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)**. Sabendo o comportamento das soluções de RSF e suas blendas, podemos prever algumas características antes do método de *casting* e obtenção das membranas, pois os ensaios reológicos são ricos em informações sobre o comportamento dos géis e complementam as informações obtidas pelas análises de caracterização das membranas.

A mistura e *casting* do poli(álcool vinílico) é simples, porém suas blendas com a fibroína da seda mereceram um cuidado especial. A fibroína é uma proteína de caráter hidrofóbico que está solúvel em água, formando uma solução metaestável, passiva de interferências como pH, força iônica, temperatura e tensões de deformação durante a manipulação da solução. Essas interferências, caso não sejam minimizadas, têm implicação durante a obtenção e caracterização das membranas obtidas.

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Preparo de membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)

Para o preparo das membranas de fibroína:poli(álcool vinílico) foram utilizadas as soluções obtidas na seção **Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)**, na página 47. As soluções de fibroína e de poli(álcool vinílico), bem como as suas blendas, foram preparadas e o método de *casting* e a secagem realizados imediatamente após a etapa de mistura.

Para o *casting*¹ das blendas foram utilizados moldes de Teflon®, com área e volume aproximados de 23 cm² e 11,5 cm³, respectivamente. 8 g de cada gel obtido foram colocados nos moldes e estes levados para uma câmara de fluxo de ar para secagem, por 72 h.

Após a etapa de secagem, as membranas obtidas foram cuidadosamente acondicionadas em sacos plásticos, e estes permaneceram lacrados até o momento das análises. As membranas obtidas foram denominadas de acordo com a Tabela 5, referindo-se às concentrações iniciais no estado gel.

Tabela 5: Denominação das membranas obtidas.

Membranas	Descrição
SF	fibroína da seda 2%
SF:PVA 0,25	fibroína da seda + 0,25% poli(álcool vinílico)
SF:PVA 0,5	fibroína da seda + 0,5% poli(álcool vinílico)
SF:PVA 1	fibroína da seda + 1% poli(álcool vinílico)
PVA	poli(álcool vinílico) 2%

Após a secagem, foram medidas as espessuras das membranas, com o micrômetro Mitutoyo MFG M110-25 Japan, em quadruplicata, em 10 pontos diferentes em cada membrana, segundo o modelo da Figura 28. As medidas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC.

Figura 28: Modelo para medição de espessura das membranas obtidas.

¹processo de moldagem em placas, no qual a solução polimérica é colocada em moldes com padrões de tamanho e superfície definidos.

4.1.2 Ensaio de absorção em tampão fosfato salino

Para o ensaio de absorção foram preparadas amostras das membranas SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%, com 2 cm², secas, com massa conhecida. Cada amostra foi colocada em 20 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4, a 37 °C, sendo medida a absorção das amostras após 5, 15 e 30 min, 1, 5, 17 e 30 h, 5 e 15 d. A Equação 4.1 foi utilizada para determinar a quantidade de PBS absorvida,

$$\%_{sol} = \frac{m_u - m_s}{m_s} \quad (4.1)$$

onde m_u correspondeu à massa da membrana úmida, m_s à massa membrana seca e, $\%_{sol}$, à porcentagem de solução tampão absorvida. O ensaio de absorção foi realizado em triplicata, no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC.

4.1.3 Caracterização dos materiais por técnicas de espectroscopia: FT-IR ATR

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, radiação esta composta por um vetor campo elétrico e campo magnético, mutuamente ortogonal. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do IQSC.

Assim, a estrutura secundária das membranas foi investigada utilizando a espectroscopia vibracional que engloba, basicamente, a técnica de absorção no infravermelho (IR) com transformada de Fourier (FT-IR), sendo que a maior parte dos estudos em IR ocorrem na região média (MIR), de 4000 – 400 cm⁻¹ em número de onda (CANEVAROLO, 2007). Moléculas simples e macromoléculas são constituídas de átomos que formam uma estrutura tridimensional, com distâncias interatômicas e ângulos de ligação definidos, apresentando uma simetria molecular (CANEVAROLO, 2007; ATKINS, 2004).

Para a obtenção do espectro de FT-IR com refletância total atenuada ATR foram utilizadas amostras das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2% de aproximadamente 1 cm², secas previamente em dessecador por 24 h. Foi utilizado o equipamento Thermo Nicolet Nexus 470, 64 a 128 *scans* e resolução de 4 cm⁻¹ e

faixa de observação de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ em número de onda.

4.1.4 Caracterização dos materiais por difração de raios X

Análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas para a determinação de estruturas cristalinas nas membranas. Para a realização das análises, foi utilizado um difratômetro de raios X Rigaku RotaFlex operando com radiação $\text{CuK}\alpha$, 40 kV e 40 mA. Os difratogramas foram obtidos no modo de varredura contínuo, com 2θ variando de $5 - 50^\circ$, a $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$.

Amostras das membranas foram preparadas com $2 \times 4 \text{ cm}$, e analisadas no Laboratório de Raios X do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), em duplicatas.

4.1.5 Caracterização dos materiais por microscopia

4.1.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica da superfície das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2% foi realizada a partir de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) marca Leica-Zeiss, modelo LEO 440, acoplado a um analisador Oxford. A fotomicrografia foi obtida da superfície das membranas que ficou exposta ao fluxo de ar durante a secagem.

Inicialmente, amostras das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2% de aproximadamente $0,25 \text{ cm}^2$ foram colocadas em um porta amostra de alumínio com fita adesiva de carbono, colocadas em dessecador por 24 h e depois metalizadas com uma camada de 20 nm de ouro em uma metalizadora Balsers, modelo SDS 050. A operação do feixe de elétrons foi de 20 keV.

Foram obtidas fotomicrografias nos aumentos de 500 e 2.000 vezes para cada amostra, na Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do IQSC.

4.1.5.2 Microscopia de força atômica

Para a obtenção das micrografias de força atômica foi utilizado microscópio de força atômica (AFM) Bruker, modelo Dimension® Icon®, com controladora NanoScopeV. Foi utilizado um *cantilever* de silício integrado com uma ponta de prova ou *tip*, com frequência de oscilação de 330 kHz. A constante de mola estabelecida foi de 70 N m^{-1}

Foram obtidas micrografias da superfície das membranas com *scan* de $10 \mu\text{m}$ e dessas imagens foram analisados relevo, amplitude e fase. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IFSC.

4.1.6 Caracterização dos materiais por análise térmica

Os métodos de análise térmica medem variações de um determinado parâmetro ocorridas em função da temperatura. Essas técnicas fornecem resultados na forma de curvas, as quais contêm informações a respeito do parâmetro medido. A caracterização foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC.

4.1.6.1 Termogravimetria e termogravimetria derivada

O perfil de decomposição dos materiais empregados na formação das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2% foi obtido por meio da termogravimetria (TGA). Para isso, foi utilizado o equipamento TA Instruments, modelo TGA-2050.

10 mg das membranas foram utilizadas para a análise, com uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de ar sintético, em um intervalo de temperatura de $25 - 800 \text{ }^\circ\text{C}$. Além da curva TGA, uma curva da termogravimetria derivada (DTG) foi obtida para cada amostra.

4.1.6.2 Calorimetria exploratória diferencial

As transições térmicas das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2% foram observadas por meio das curvas obtidas pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). O analisador foi um TA Instruments, modelo DSC-2010.

10 mg das membranas foram utilizadas para a análise, em um porta amostras, com uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de ar sintético, em um intervalo de temperatura de $25 - 250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Preparo de membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)

Foram obtidas membranas quadradas, rígidas e transparentes (Figura 29) de SF, PVA e suas blends SF:PVA, de 23 cm^2 ($4,8 \times 4,8\text{ cm}$). O processo de secagem dos géis nos moldes mostrou-se adequado, fácil e reprodutivo.

Figura 29: Membrana de fibroína de seda (SF) a 2% m/m.

A Tabela 6 apresenta os resultados de medidas de espessura para as membranas SF 2%, e suas blends SF:PVA 0,25 a 1%. Pôde ser observado que, com um aumento da concentração de PVA há um aumento da espessura das membranas. Porém, os valores das médias para SF:PVA 0,25% e SF:PVA 0,5% foram praticamente iguais, possivelmente pela pequena diferença de concentração entre as amostras juntamente ao erro das medidas.

Outro fator para um grande desvio entre os valores encontrados nas espessuras é desnível do fluxo de ar para secagem, que favorece uma maior concentração de material em determinada porção do molde. Esse fator deve ser verificado e serve

Tabela 6: Medida de espessura das membranas obtidas de SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%.

Membranas	Média (μm)	Mediana (μm)
SF 2%	$53,88 \pm 15,67$	50
SF:PVA 0,25%	$74,97 \pm 37,7$	65
SF:PVA 0,5%	$68,62 \pm 21,95$	67,5
SF:PVA 1%	$82 \pm 20,1$	85

de sugestão para pesquisas futuras.

4.2.2 Ensaios de absorção em tampão fosfato salino

O ensaio de absorção para as membranas mostrou que, após 5 min dos ensaios ocorreram as maiores absorções para todas as membranas, com valores de absorção praticamente constantes, exceto para a membrana SF:PVA 1%, que teve um decréscimo nas medidas (Figura 30).

Figura 30: Absorção tampão fosfato salino (PBS) das membranas SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%.

Esse decréscimo de medidas da membrana SF:PVA 1% é explicado pela

formação de material insolúvel no fundo do frasco de amostra, indicando um processo de degradação da membrana. Após 15 dias em contato com o PBS, as membranas já possuíam caráter de hidrogel (exceto SF:PVA 1%), formado pela absorção de PBS pelos materiais.

As medidas de absorção mostraram que, em pelo menos 5 dias, as membranas suportaram uma absorção do PBS e que, numa aplicação *in vivo*, esse período deve ser maior. Este fato sugere uma modificação das membranas com tratamentos físicos ou químicos, em trabalhos futuros, para fornecer o material na forma de membrana por tempo hábil.

4.2.3 Caracterização dos materiais por técnicas de espectroscopia: FT-IR ATR

Inicialmente, modos vibracionais referentes às ligações de hidrogênio e estiramento de hidroxila (OH) para o PVA, em 3240 cm^{-1} e, no caso da SF e suas blendas SF:PVA, referente a estiramento de NH, foram observados nas blendas. Já na região de impressão digital, região de $1900 - 650\text{ cm}^{-1}$, foram encontrados os modos vibracionais característicos das amidas, para SF 2% e suas blendas (Figura 31), modos estes típicos de peptídeos e proteínas (Tabela 7).

Tabela 7: Números de onda, vibrações típicas e grupamentos químicos característicos para a RSF e PVA; **(a)** deformação angular; **(ax)** deformação axial; **(e)** estiramento; **sec.** ligação secundária.

$\tilde{\nu}\text{ cm}^{-1}$	vibração típica	característica
3.240	ligações H, (e)OH, (e) NH	RSF, PVA
2.939	(ax) CH	PVA
1.637	(e) dupla CO	RSF (amida I)
1.511,9	(a) NH sec.	RSF (amida II)
1.238	(a) CH	PVA
1.232		RSF (amida III)
1.083,8	(ax) OH	PVA
1.045	(ax) C(CO)O(CO)C	RSF
831,2	(a) CH	PVA

Segundo Lu et al. (2010), a região de $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$ está associada à absorção de peptídeos da amida I, enquanto a região de $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ corresponde à absorção dos peptídeos correspondentes à amida II. Peptídeos, unidades de

Figura 31: Espectros FT-IR ATR das membranas de SF 2%, PVA 2% e membrana obtida da blenda SF:PVA 0,25 a 1%, região de 1900 – 650 cm^{-1} .

repetição das proteínas, fornecem bandas características, denominadas amida A, B, I, II, até VII. As bandas amida I e II são as principais bandas no IR, sendo que a amida I está associada à vibração por estiramento da dupla CO, e se relaciona com a conformação da proteína. Enquanto isso, a amida II resulta da vibração por flexão da ligação NH e da vibração da ligação CN por alongamento (LU et al., 2010).

Assim, foram observados deslocamentos dos modos vibracionais nas membranas SF:PVA 0,25 a 1%, de 1637 cm^{-1} para 1616 cm^{-1} , com modo centrado em 1512 cm^{-1} , ou seja, a banda da amida I se deslocou para um valor de número de onda menor, e a banda amida II não teve alterações.

Ki, Um e Park (2009) em seu trabalho observam esse deslocamento e o associam com a formação de estruturas em folha β , com forte evidência de formação de agregados, na presença de uma tensão de cisalhamento. Embora alguns pesquisadores sugeriram que picos em 1650 cm^{-1} e entre 1535 e 1542 cm^{-1} correspondem a conformação randômica da RSF, porém pesquisas utilizando DRX vem associando esses picos a estrutura *silk I* (LU et al., 2011).

Ao comparar a membrana SF 2% com suas blendas pôde ser observado que a mesma possui uma maior quantidade de RSF em conformação aleatória e *silk I* (hélices α) devido aos modos vibracionais característicos observados na região da amida I. A partir do momento da adição de PVA nas blendas, a formação de agregados foi promovida, visto pela presença de estruturas em folha β , a partir da transição das conformação aleatórias e hélice α .

4.2.4 Caracterização dos materiais por difração de raios X

Foram obtidos 2 difratogramas para cada amostra SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%, a fim de elucidar diferenças estruturais intra e inter amostras, visto que, para a preparação das membranas, foram obtidas diferentes concentrações da solução de RSF após diálise.

A Figura 32 mostra os difratogramas obtidos a partir das membranas de SF 2%, e dois dias diferentes, **a** e **b**. Para ambos os difratogramas, pôde ser observada a presença de amplos halos com máximo em $2\theta = 19,8^\circ$ e $2\theta = 22,3^\circ$, para **a** e **b**, respectivamente. Isso indica a presença de transições na membrana, de uma fase

amorfa para cristalina, seguindo uma cinética lenta mesmo após o *casting* e secagem das membranas (NOGUEIRA, 2009). Foi observado, então, uma transição de hélices α ou conformações randômicas para folha β , termodinamicamente mais estáveis.

Figura 32: Difratomogramas obtidos de amostras da membrana SF 2%. **a** e **b** correspondem a difratogramas obtidos em dias diferentes.

Segundo Kundu et al. (2010) e Li et al. (2002), valores entre $2\theta = 20 - 21^\circ$ correspondem a estrutura cristalina folha β , *silk II*, e halos entre $2\theta = 24 - 25^\circ$ são associados a estrutura *silk I*, referente ao estado glandular, antes de processo de cristalização (LI et al., 2002), ou seja, estrutura hélice α formada na ausência de cisalhamento (JIN; KAPLAN, 2003). Também Kundu et al. (2010) relataram em seu trabalho um valor de $2\theta = 24,16^\circ$ associado a estrutura *silk I*.

A Figura 33 mostra os difratogramas obtidos de membranas PVA 2%, com halos fortes em $2\theta = 19,6^\circ$ e fraco em $2\theta = 41,08^\circ$. Estudos de Uddin et al. (2012), Uddin, Middy e Chaudhuri (2013) afirmam em seu trabalho a presença de um halo correspondente a fase semi cristalina do PVA, em $2\theta = 19,46^\circ$ e um pequeno halo amorfo entre $2\theta = 39 - 40^\circ$, correspondente ao plano (101) em filmes de PVA (YANG, 2011).

Figura 33: Difratoogramas obtidos de amostras da membrana PVA 2%.

As Figuras 34 e 35 mostram os difratogramas das blendas SF:PVA 0,25 a 1%. Como as medidas foram realizadas em duplicata, foram obtidos dois difratogramas para cada membrana. Assim, foram observadas diferenças entre difratogramas para uma mesma membrana pois, como dito anteriormente, para o preparo das blendas foram utilizadas soluções de RSF com concentrações diferentes após diálise, bem como a cinética lenta de transição de conformações em hélice α e conformações randômicas para fases mais estáveis (folha β).

Para a membrana SF:PVA 0,25% foram observados halos em $2\theta = 10,12^\circ$ e $2\theta = 19,8^\circ$ (Figura 34) com intensidades menores quando comparados com os obtidos na Figura 35, além de nesta última ter a presença de halos fracos em $2\theta = 24,5^\circ$ e $2\theta = 27,98^\circ$.

Kundu et al. (2010) associam a presença de *silk I* aos halos $2\theta = 12,2^\circ$ e $2\theta = 28,2^\circ$ em seu estudo, bem como Weska et al. (2009), confirmando a presença de *silk I* ao observar halos entre $2\theta = 24 - 25^\circ$. As membranas SF:PVA 0,5% e 1% apresentaram halos em $2\theta = 12^\circ$ e $2\theta = 19,5^\circ$, associados a presença de *silk I* e

Figura 34: Difratomogramas obtidos de amostras da membranas SF:PVA 0,25 a 1%.

Figura 35: Difratoqramas obtidos de amostras da membranas SF:PVA 0,25 a 1%.

silk II (WESKA et al., 2009), e um halo característico de mistura entre SF e PVA, entre $2\theta = 22,7 - 23,4^\circ$ (KUNDU et al., 2012).

De acordo com Jin e Kaplan (2003), a estrutura *silk I* predomina em filmes antes de tratamento com solventes, como etanol. Nesse trabalho foi observado que há a formação de estrutura cristalina *silk II* para a membrana SF:PVA 0,25, 0,5 e 1%, e que a formação de estruturas *silk I* também está associada à presença do PVA.

Os resultados de DRX obtidos vem de encontro ao observado em literatura, onde se afirma que há uma maior quantidade de estruturas folha β em hidrogéis de fibroína (NOGUEIRA, 2009) e incerteza na quantidade de estruturas randômicas (YAN et al., 2012). Na solução de RSF há, predominantemente, hélices α , que se convertem a folhas β , energeticamente mais estável (KIM et al., 2004).

4.2.5 Caracterização dos materiais por microscopia

4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Foram obtidas as fotomicrografias das membranas SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%, nos aumentos de 500 e 2.000 vezes (Figura 36).

A superfície das membranas apresenta-se um pouco rugosa para os aumentos selecionados, mostrando uma microestrutura. Em aumentos menores essa rugosidade pode ser descartada, pois as imagens mostram membranas lisas ou com pouca rugosidade, muito evidente no caso da membrana de PVA 2%.

A membrana de SF 2% possui sua origem de géis obtidos de uma solução metaestável de fibroína de seda e, como se sabe, a fibroína em solução aquosa tende a mudar sua conformação, refletindo na condição final do *casting* dos géis e obtenção das membranas. Por exemplo, em seu trabalho, Kurland et al. (2012) mostram processos de auto-montagem das proteínas da seda, elucidando mecanismos, tais como formação de fractais.

Com o aumento da concentração de PVA não fica evidente uma diminuição ou aumento de rugosidade, e também há a dificuldade da avaliação da presença de fases distintas dentro do material.

Figura 36: Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das membranas obtidas a partir dos géis de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%. Aumentos de 500 e 2.000 vezes.

4.2.5.2 Microscopia de força atômica

Com a AFM foram obtidas imagens de relevo e fase das membranas de SF 2% e suas blendas SF:PVA 0,25 a 1%, bem como da membrana de PVA 2%. Estudos de microscopia forneceram informações da superfície, no que se refere a miscibilidade, homogeneidade ou formação de fases distintas entre a SF e o PVA.

A Figura 37 apresenta as imagens de relevo (a) e fase (b) para a membrana SF 2%. Para a SF pura, em imagem de fase, pôde ser observada uma superfície homogênea, sem diferença de padrões nano/micrométricos óbvios, com o aparecimento de agregados que, segundo Numata, Cebe e Kaplan (2010), estão associados a cristais de folha β formados a partir de nanofibrilas com aproximadamente 5 nm de espessura. Para este caso, foi encontrado um valor de 4,14 nm de espessura para essas nanofibrilas, com altura máxima dos cristais de 22,2 nm.

Figura 37: Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membrana SF 2%. Tamanho: 10 μm .

Os cristais encontrados para SF 2% não foram observados para o PVA 2% em suas imagens de relevo e fase (Figura 38), visto que esse polímero não possui um comportamento de auto-montagem como a fibroína (YANLIAN et al., 2009). Para o PVA foi observada uma superfície homogênea e sem fases distintas presentes, com altura máxima de 5,3 nm.

A formação de cristais de folha β na amostra SF 2% indica que ocorreram transições de hélice α e conformação randômica para folha β no momento da diluição

Figura 38: Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membrana PVA 2%. Tamanho: 10 μm .

da RSF com água e *casting* da solução SF 2%. Yamada, Tsuboi e Itaya (2003) citam a formação desses cristais de folha β com a diluição da RSF após diálise, devido ao estado metaestável da conformação randômica, com transição para folha β ao passar do tempo.

Nessa transição ocorrem interações dos domínios hidrofóbicos da fibroína, deixando os grupos carboxil, por exemplo, do ácido glutâmico, expostos à fase aquosa, formando padrões nano/micrométricos hidrofóbicos durante a secagem da água no processo de *casting* (HU et al., 2010).

A Figura 39 apresenta as imagens de relevo e fase para as blendas SF:PVA 0,25 a 1%. Nelas, são observados padrões com diferentes cores na imagem de fase e separação de nanofases, como visto em estudos de Hu et al. (2010). Aglomerados macromoleculares com diferentes tamanhos de poros, em torno de 2 a 3 μm , bem como estruturas em forma de hastes pequenas com raio entre 10 e 20 nm, foram evidentes em todas as blendas. Esses aglomerados macromoleculares mostram claramente a separação de fases nas membranas.

Segundo Yamada, Tsuboi e Itaya (2003), estruturas em forma de haste com aproximadamente 100 nm de comprimento são atribuídos a uma molécula de fibroína com conformação em hélice α ou conformação randômica, que se agregam formando cristais devido a metaestabilidade da solução. Com isso, inicia-se a formação de nanofibrilas e estruturas em forma de ilhas.

Figura 39: Imagens de relevo (a) e de fase (b) obtidas por AFM, membranas SF:PVA 0,25 a 1%. Tamanho: 10 μm .

Também, com a formação das nanofibrilas, foi verificada a ocorrência da formação de redes, como nos estudos Lu et al. (2011), Shulha et al. (2006), que relataram a presença de nanofilamentos de 10 a 80 nm e agregados fibrilares com 150 a 400 nm de comprimento e 3,1 nm de altura.

Na membrana SF:PVA 0,25% foi visto que há tanto a presença de nanofibrilas, aglomerados em ilhas e estruturas esféricas micelares, que segundo Wu et al. (2012), apresentam tamanho de partícula em torno de 50 a 60 nm. A Figura 40 mostra a presença de uma estrutura em forma de micela, com imagens de SEM e AFM, para a membrana SF:PVA 1%.

Figura 40: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e força atômica (AFM) para a membrana SF:PVA 1%.

Para as membranas SF:PVA 0,5 e 1% foram observadas as mesmas estruturas, mudando apenas o contraste das imagens de fase. Isto sugere que, com a adição do PVA, ocorre uma mudança nas propriedades mecânicas e na estrutura química da membrana pois, segundo Yamada, Tsuboi e Itaya (2003), as imagens de fase são muito sensíveis a essas mudanças.

De acordo com Yamada, Tsuboi e Itaya (2003) e Wu et al. (2012), há uma diferença entre os ângulos de fase das estruturas em forma de micelas, hastes e ilhas, estas últimas apresentando sempre uma superfície plana, com constante altura nas imagens de relevo. Essas estruturas foram observadas associadas nas blendas, porém não foram encontradas na membrana SF 2%, que apresentou apenas cristais formados pela diluição da solução de RSF após diálise.

4.2.6 Caracterização dos materiais por análise térmica

4.2.6.1 Termogravimetria e termogravimetria derivada

Curvas TGA foram obtidas para determinar a dependência da composição das blendas em sua estabilidade térmica. A Figura 41 mostra as curvas TGA para SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%. Com as curvas TGA pôde ser determinada a estabilidade das membranas em três estágios: o primeiro, de 25 – 200 °C, correspondente à perda de água; o segundo, de 200 – 500 °C, correspondente à decomposição dos materiais; terceiro, de 500 – 850 °C, no qual a etapa de carbonização é observada.

Figura 41: Curvas TGA e DTG das membranas de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%.

De acordo com Du et al. (2009), a RSF apresenta uma velocidade de variação da massa em função da temperatura (dm/dT), dada pela curva DTG (Figura 41) entre 280 – 340 °C, dependendo do grau de cristalinidade. Nesse trabalho, a membrana SF 2% apresentou uma maior razão de degradação, em 290,46 °C, com o valor próximo às razões de degradação das membranas SF:PVA 0,25% (291,53 °C),

SF:PVA 0,5% (295, 13 °C) e SF:PVA 1% (299, 27 °C). Também, foi observado o aumento das temperaturas de degradação para as membranas SF:PVA com o aumento da concentração de PVA.

Zhu et al. (2010) afirmaram que a segunda perda de massa, para o PVA, corresponde a dehidroxilação entre as cadeias dos PVA, entre 120 – 250 °C; até 350 °C, ocorre um processo de pirólise e formação de polienos (Figura 42). Nesse caso, o PVA 2% possui uma razão de degradação máxima em 333 °C .

Figura 42: Esquema da degradação do PVA e formação de polienos acima de 200 °C.

As porcentagens de perdas de água no primeiro estágio das curvas TGA variam de 9,44% para o PVA 2% até 11,96% para SF:PVA 0,5%. Na curva DTG (Figura 41) foram observados aumentos da temperatura máxima de degradação pela razão dm/dT , de 53,01 °C para 66,6 °C e 75,2 °C para SF 2%, SF:PVA 0,25% e SF:PVA 1 %, respectivamente. A temperatura máxima nesse primeiro estágio para o PVA 2% foi de 73,2 °C.

4.2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC (Figura 43) foram obtidas para observar possíveis interações entre a RSF e o PVA nas membranas. O pico endotérmico entre aproximadamente 108 °C é atribuído à evaporação de água livre que não foi removida após secagem das membranas e a entalpia nesses picos representa a energia necessária para a vaporização da água presente nas membranas.

Segundo Magoshi et al. (2000), na curva DSC da RSF em solução, um pico endotérmico começa em 51 °C e tem o máximo em 60,5 °C; aumentando a temperatura acima de 60,5 °C, o líquido se transforma de transparente para um tom amarelado. As moléculas de RSF assumem em solução aquosa uma conformação aleatória, que com o aumento de temperatura, se converte em hélice α , e de hélice α para folha β em temperatura acima de 70 °C. Feng et al. (2007) afirma que o aumento da temperatura pode indicar uma transição estrutural *silk I* para *silk II*,

Figura 43: Curvas DSC das membranas de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%.

indicando maior estabilidade de filmes, o que pôde ser comparado com os estudos de FT-IR e difração de raios X.

Os picos endotérmicos entre 58–61 °C podem, então, ser atribuídos, no caso das membranas RSF 2%, SF:PVA 0,25 a 1%, às transformações de conformação da SF, de aleatória para hélice α . Segundo Abdelrazek, Elashmawi e Labeeb (2010), um pico endotérmico em aproximadamente 50 °C corresponde à temperatura de transição vítrea (T_g) do PVA. A T_g tem sido aceita como demonstração da miscibilidade de blendas, no caso da presença de uma única T_g , o que pode ser visto nas curvas DSC das membranas nesse trabalho (ABDELRAZEK; ELASHMAWI; LABEEB, 2010).

No caso do PVA 2%, Zidan (1999) relata a presença de quatro transições, resultado das fases cristalina e amorfa desse polímero, sendo uma dessas transições em 192 °C, correspondendo a uma transição cristalina. Para as membranas SF:PVA 0,5%, SF:PVA 1% e PVA 2%, um pico endotérmico em aproximadamente 192 °C foi observado, o que não ocorreu em SF 2%.

Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001), caso tenha ocorrido a formação de uma mistura imiscível entre os polímeros, suas cadeias não interagem entre si e são formados domínios separados. Nesse caso, pôde ter ocorrido uma completa interação entre as cadeias dos polímeros, como se tivessem a mesma estrutura, formando um sistema homogêneo, que adquire mobilidade de uma só vez, a uma temperatura intermediária entre SF e PVA, com uma T_g intermediária.

Lee e Ha (1999) atribuíram em seu trabalho um pico endotérmico para SF em 223 °C e outro exotérmico em 227 °C, porém nas curvas DSC aqui obtidas não ficaram muito evidente essas temperaturas.

4.3 Conclusão Parcial

No Capítulo **Membranas de fibroína:poli(álcool vinílico)** foi apresentada a obtenção de membranas rígidas e transparentes, de SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%, caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia, difração de raios X, microscopia e análise térmica. O ensaio de absorção em PBS mostrou que as membranas são viáveis para estudos *in vitro* até 5 dias, e a blenda SF:PVA 0,5% foi a que teve o melhor perfil de absorção dentre as amostras analisadas.

A espectroscopia FT-IR mostrou bandas características nas regiões de grupos funcionais e de impressão digital dos compostos puros SF e PVA, e a presença de modos vibracionais característicos desses compostos nas membranas obtidas das blendas SF:PVA. Um deslocamento de modo vibracional foi observado nas membranas SF 2% e SF:PVA 0,25 a 1%, de 1637 cm^{-1} para 1616 cm^{-1} , com o aparecimento de um braço vibracional em 1699 cm^{-1} , sugerindo para essas membranas uma transição estrutural de *silk I* para *silk II*.

Difratogramas das amostras revelaram a presença de transição estrutural da fibroína com a adição de PVA, pois ocorreu presença de estruturas em hélice α e folha β com essa adição. As microscopias revelaram superfícies distintas nas membranas, em especial as membranas SF:PVA, comparando com a membrana PVA 2%, que se apresentou lisa e uniforme por SEM. A AFM mostrou diferenças de relevo e fases para a SF e SF:PVA, tais como do tipo ilha e nanofibrilas, sugerindo a cada fase um comportamento mecânico e estrutural diferente.

Estudos da estabilidade térmica por meio das curvas TGA e DTG mostraram três regiões de degradação distintas nas membranas: uma região de perda de água, uma de decomposição e outra de carbonização, e o aumento da concentração de PVA nas membranas parece aumentar a temperatura de degradação das membranas. As curvas DSC apresentaram um único pico endotérmico na região de transição vítrea da SF 2%, SF:PVA 0,25 a 1% e PVA 2%, entre 58 e 61 °C, demonstrando uma miscibilidade entre os polímeros, sugerindo uma interação entre as suas cadeias.

5 Conclusão

Nesse trabalho foi possível a obtenção de soluções de RSF e suas blendas com o PVA, na forma de géis e membranas. A obtenção da fibroína é bem conhecida na literatura, com a obtenção de inúmeros biomateriais, porém poucos trabalhos utilizando o PVA foram encontrados, o que decidiu a escolha por esse polímero sintético na formação das blendas.

Inicialmente, os ensaios de reologia foram úteis na caracterização do comportamento das soluções de RSF e, posteriormente, suas blendas. Esses ensaios mostraram que, com a adição de PVA na solução de RSF, ocorre uma mudança de comportamento: o comportamento elástico característico de soluções de RSF se torna viscoso, ou seja, quanto maior a quantidade de PVA, maior o carácter líquido da amostra.

Com o ensaio de temperatura pôde ser visto que o comportamento das blendas com carácter viscoso mudou, a partir tratamento térmico durante o ensaio. Isso sugere que, com blendas com módulos elásticos muito maiores que os iniciais, membranas obtidas a partir desses géis provavelmente serão mais rígidos, com maior duração para ensaios *in vitro* e *in vivo*.

As membranas obtidas das blendas SF:PVA se mostraram úteis para aplicação até 5 dias em ensaios *in vitro*, de acordo com os resultados do ensaio de absorção em PBS. Além disso, foi visto que, ao comparar a membrana SF 2% com suas blendas, essas últimas tiveram a conformação da estrutura da fibroína alterada, ou seja, com a adição do PVA foi observada a presença de estruturas nanofibrilares e micelares por AFM, com uma transição de estruturas aleatórias e hélice α para folha β , observada com espectros FT-IR e difratogramas de raios X.

Assim, a presença do PVA foi adequada para a ocorrência de estruturas mais

organizadas e, conseqüentemente, candidatos para tratamentos químicos e físicos, em trabalhos futuros. A escolha de uma blenda, por exemplo, a SF:PVA 0,5%, para estudos futuros, é uma boa escolha dentre as possibilidades analisadas nesse trabalho, de acordo com os resultados obtidos.

Por fim, a maior dificuldade encontrada nesse trabalho foi o *link* entre as caracterizações e ensaios, ou seja, a ancoragem dos dados obtidos. Na literatura há muito discutido sobre a fibroína da seda. Entretanto, como essa proteína foi incluída recentemente no Grupo de Bioquímica e Biomateriais, muito deve ser revisto, analisado em conjunto e estruturado dentro no grupo, no que se diz respeito a biomateriais com fibroína. Exemplo disso são as padronizações de extração, solubilização e diálise da fibroína e mesmo das caracterizações, como outros biomateriais já bem conhecidos na prática do laboratório, tais como o colágeno e a quitosana.

6 Trabalhos Futuros

Como sugestão de trabalhos futuros, tem-se:

Ensaio mecânico estudos de tensões e deformações com membranas;

Molhabilidade estudos de ângulos de contato e determinação do grau hidrofílico das membranas;

Testes *in vitro* cultivo celular e avaliação da viabilidade celular das membranas;

Referências¹

- ABDELRAZEK, E.; ELASHMAWI, I.; LABEED, S. Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of pva/pvp blend films. **Physica B: Condensed Matter**, v. 405, n. 8, p. 2021 – 2027, 2010. ISSN 0921-4526.
- AJISAWA, A. Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution. **Journal of Sericultural Science of Japan**, v. 67, n. 2, p. 91 – 94, 1998.
- ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401 – 416, 2003. ISSN 0142-9612.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. Disponível em: <<http://migre.me/ebuXC>>.
- ATKINS, P. Atkins: Físico-Química. 7. ed. [S.l.]: Livros Técnicos e Científicos, 2004.
- BOUTEN, C. et al. Substrates for cardiovascular tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 221 – 241, 2011. ISSN 0169-409X.
- BRETAS, R. E. S.; DÁVILA, M. A. Reologia de Polímeros Fundidos. [S.l.]: EdUFSCar, 2000. 196 p.
- CANEVAROLO, S. V. Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber, 2002.
- CANEVAROLO, S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2007. 448 p.
- CHAPEKAR, M. S. Tissue engineering: Challenges and opportunities. **Journal of Biomedical Materials Research**, John Wiley & Sons, Inc., v. 53, n. 6, p. 617–620, 2000. ISSN 1097-4636.
- DAI, L.; LI, J.; YAMADA, E. Effect of glycerin on structure transition of pva/sf blends. **Journal of Applied Polymer Science**, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 86, n. 9, p. 2342 – 2347, 2002. ISSN 1097-4628.
- DALLAN, P. R. M. Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para a Aplicação na Regeneração de Pele. Tese (Doutorado) — UNICAMP, 2005.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

DU, C. et al. Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: Structure and properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 1, p. 62 – 68, 2009. ISSN 0928-4931.

FENG, X.-X. et al. Preparation and characterization of novel nanocomposite films formed from silk fibroin and nano-tio₂. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 2, p. 105 – 111, 2007. ISSN 0141-8130.

GARTON, A. **Infrared Spectroscopy of Polymer Blends, Composites and Surfaces**. 1st. ed. [S.l.]: Hanser Publishers, 1992. 279 p.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and morphology of freeze/thawed pva hydrogels. **Macromolecules**, v. 33, p. 2472 – 2479, 2000.

HE, Y.-X. et al. N-terminal domain of bombyx mori fibroin mediates the assembly of silk in response to ph decrease. **Journal of Molecular Biology**, v. 418, n. 3 - 4, p. 197 – 207, 2012.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Material selection. In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A**. [S.l.: s.n.], 1995. v. 1, p. 27–59.

HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. Tese (Doutorado) — Instituto de Química de São Carlos, 2012.

HU, X. et al. Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. **Biomaterials**, v. 31, n. 32, p. 8121 – 8131, 2010. ISSN 0142-9612.

IKADA, Y. Tissue engineering: Fundamentals and applications. In: **Interface Science and Technology**. [S.l.]: Elsevier, 2006. v. 8, p. 1 – 89.

JIN, H.-J.; KAPLAN, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. **Nature**, v. 424, n. 6952, p. 1057 – 1061, 2003. ISSN 0028-0836.

KI, C. S.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Acceleration effect of sericin on shear-induced β -transition of silk fibroin. **Polymer**, v. 50, n. 19, p. 4618 – 4625, 2009. ISSN 0032-3861.

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

KUNDU, J. et al. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 242 – 250, 2010. ISSN 0378-5173.

KUNDU, J. et al. Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 5, p. 1720 – 1729, 2012. ISSN 1742-7061.

- KURLAND, N. E. et al. Self-assembly mechanisms of silk protein nanostructures on two-dimensional surfaces. **Soft Matter**, The Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 18, p. 4952 – 4959, 2012. ISSN 1744-683X.
- LAKES, R. S.; PARK, J. **Biomaterials**. 3rd. ed. New York, NY: Springer New York, 2007. ISBN 978-0-387-37879-4.
- LEE, K.; HA, W. Dsc studies on bound water in silk fibroin/s-carboxymethyl keratine blend films. **Polymer**, v. 40, n. 14, p. 4131 – 4134, 1999. ISSN 0032-3861.
- 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. ISSN 0141-8130.
- LU, Q. et al. Water-insoluble silk films with silk i structure. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1380 – 1387, 2010. ISSN 1742-7061.
- LU, Q. et al. Silk fibroin electrogelation mechanisms. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2394 – 2400, 2011. ISSN 1742-7061.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. [S.l.]: E-papers, 2001.
- MAGOSHI, J. et al. Crystallization of silk fibroin from solution. **Thermochimica Acta**, v. 352, p. 165 – 169, 2000. ISSN 0040-6031.
- MANDAL, B. B.; MANN, J. K.; KUNDU, S. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 160 – 171, 2009.
- NOGUEIRA, G. M. **Hidrogéis e Filmes de Fibroína de Seda para Fabricação ou Recobrimento de Biomateriais**. Tese (Doutorado) — UNICAMP, 2009.
- NUMATA, K.; CEBE, P.; KAPLAN, D. L. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals. **Biomaterials**, v. 31, n. 10, p. 2926 – 2933, 2010. ISSN 0142-9612.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 1. ed. [S.l.]: Cultura Médica, 2006.
- PRITCHARD, E. M. et al. Effect of silk protein processing on drug delivery from silk films. **Macromolecular Bioscience**, WILEY-VCH Verlag, v. 13, n. 3, p. 311 – 320, 2013. ISSN 1616-5195.
- RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science : an introduction to materials in medicine**. 2nd. ed. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2004. ISSN 0125824637 9780125824637.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2. ed. [S.l.]: Art, 2006.

SHONAIKE, G. O.; SIMON, G. P. **Polymer Blends and Alloys**. [S.l.]: Marcel Dekker, 1999. 748 p.

SHTILMAN, M. I. **Polymeric Biomaterials: Polymer Implants (New Concepts In Polymer Science)**. [S.l.]: VSP Intl Science, 2003. 294 p.

SHULHA, H. et al. Unfolding the multi-length scale domain structure of silk fibroin protein. **Polymer**, v. 47, n. 16, p. 5821 – 5830, 2006. ISSN 0032-3861.

SOARES, G. A. Biomateriais. In: **Forum de Biotecnologia e Biomateriais**. [S.l.: s.n.], 2005. p. 77.

TANAKA, T. et al. Properties of silk fibroin/poly(vinyl alcohol) blend solutions and peculiar structure found in heterogeneous blend films. **Polymer International**, John Wiley & Sons, Ltd., v. 42, n. 1, p. 107 – 111, 1997. ISSN 1097-0126.

TANAKA, T.; TANIGAMI, T.; YAMAURA, K. Phase separation structure in poly(vinyl alcohol)/silk fibroin blend films. **Polymer International**, John Wiley & Sons, Ltd., v. 45, n. 2, p. 175 – 184, 1998. ISSN 1097-0126.

UDDIN, M. J. et al. Black tea leaf extract derived ag nanoparticle-pva composite film: Structural and dielectric properties. **Materials Science and Engineering: B**, v. 177, n. 20, p. 1741 – 1747, 2012. ISSN 0921-5107.

UDDIN, M. J.; MIDDYA, T.; CHAUDHURI, B. Room temperature ferroelectric effect and enhanced dielectric permittivity in rochelle salt/pva percolative composite films. **Current Applied Physics**, v. 13, n. 3, p. 461 – 466, 2013. ISSN 1567-1739.

UTRACKI, L. A. **Polymer Alloys and Blends: Thermodynamics and Rheology**. [S.l.]: Hanser Publishers, 1989.

VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 89, p. 991 – 1007, 2007. ISSN 0079-6700.

WESKA, R. F. et al. Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. **Materials Research**, scielo, v. 12, p. 233 – 237, 2009. ISSN 1516-1439.

WU, X. et al. Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 6, p. 2185 – 2192, 2012. ISSN 1742-7061.

YAMADA, H. et al. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. **Materials Science and Engineering: C**, v. 14, p. 41 – 46, 2001.

YAMADA, K.; TSUBOI, Y.; ITAYA, A. Afm observation of silk fibroin on mica substrates: morphologies reflecting the secondary structures. **Thin Solid Films**, v. 440, n. 1 - 2, p. 208 – 216, 2003. ISSN 0040-6090.

YAN, L.-P. et al. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 289 – 301, 2012. ISSN 1742-7061.

YANG, C.-C. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/montmorillonite/poly(styrene sulfonic acid) proton-conducting composite membranes for direct methanol fuel cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 7, p. 4419 – 4431, 2011. ISSN 0360-3199.

YANLIAN, Y. et al. Designer self-assembling peptide nanomaterials. **Nano Today**, v. 4, n. 2, p. 193 – 210, 2009. ISSN 1748-0132.

ZHOU, P. et al. Effects of ph and calcium ions on the conformational transitions in silk fibroin using 2d raman correlation spectroscopy and ¹³c solid-state nmr. **Biochemistry**, v. 43, n. 35, p. 11302 – 11311, 2004.

ZHU, M. et al. Preparation and characterization of pssa/pva catalytic membrane for biodiesel production. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2299 – 2304, 2010. ISSN 0016-2361.

ZIDAN, H. Effect of agno₃ filling and uv-irradiation on the structure and morphology of pva films. **Polymer Testing**, v. 18, n. 6, p. 449 – 461, 1999. ISSN 0142-9418.

APÊNDICE A – Reologia

Nesse apêndice serão apresentados alguns fundamentos teóricos e práticos da técnica de reologia, utilizada para a caracterização dos géis obtidos no Capítulo **Géis de fibroína:poli(álcool vinílico)**. Como referência bibliográfica, serão citados Bretas e DÁvila (2000), Canevarolo (2002), Schramm (2006).

A.1 Reologia

A reologia estuda a deformação e o fluxo da matéria, analisando as respostas das tensões e deformações provocadas pela aplicação de dada tensão ou deformação, em determinado material. O estado do material pode ser líquido, sólido ou gasoso.

Os polímeros podem ser enquadrados em um tipo especial de material, já que apresentam características tanto de materiais líquidos quanto de materiais viscosos. Essa propriedade é chamada de viscoelasticidade, algo inerente aos materiais com alta massa molecular.

A elevada massa molecular dos polímeros contribui para que estes adquiram inúmeras conformações, o que leva a um emaranhamento e desemaranhamento entre estas conformações, formando laços e nós temporários. Esse processo é dinâmico, visto que as as moléculas estão em constante movimento: nós e emaranhados são feitos e desfeitos continuamente.

Existe, então, uma densidade de emaranhados e, a intensidade e duração desses emaranhados determinará o tempo de relaxação do material após a aplicação de dada tensão ou deformação. A conformação aleatória é a conformação de equilíbrio, e as macromoléculas sempre tentaram voltar a esse estado.

A.1.1 Tensão

Quando um fluido entra em movimento, forças começam atuar sobre ele. Essas forças podem ser devido ao movimento do fluido (forças de convecção), ação gravitacional (forças de campo), gradientes de pressão e interações entre as moléculas do fluido (forças de superfície). Essas forças estão relacionadas à tensão, pelo limite

$$\tau = \lim_{\Delta A \rightarrow 0} \frac{\Delta F}{\Delta A}$$

em que ΔF é a força atuando na área ΔA .

A tensão pode ser definida de maneira mais rigorosa lembrando que tanto área quanto força são grandezas vetoriais; a área aqui é considerada vetorial pois para descrever uma determinada área precisamos conhecer sua magnitude A e sua direção, dada pelo vetor unitário normal à superfície $\hat{n}$ (Figura 44).

Figura 44: Força aplicada a elemento de área S .

Um escalar associado a uma direção resulta em um vetor; então, quando associamos a força a uma direção, obtemos um tensor. O tensor tensão $\bar{\bar{\tau}}$ é definido como

$$\vec{F} = \hat{n} \cdot \bar{\bar{\tau}}$$

em que $\vec{F}$ é a força vetor e $\hat{n}$ é o vetor unitário normal à superfície onde ocorre a

aplicação da força (Figura 45).

Figura 45: Componentes do tensor tensão, sistema de coordenadas cartesianas.

Para cada componente do vetor força há uma direção associada e, então, o tensor terá nove componentes. Assim, em coordenadas cartesianas, o tensor tensão ($\bar{\bar{\tau}}$ ou τ_{ij}) é representado em forma de uma matriz

$$\tau_{ij} = \begin{bmatrix} \tau_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \tau_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \tau_{zz} \end{bmatrix}$$

As componentes τ_{ij} para $i = j$, ou seja, τ_{xx} , τ_{yy} e τ_{zz} são chamadas componentes normais da tensão, conhecidas como tensões normais, pois atuam na direção normal às faces de elemento de fluido. Componentes τ_{ij} para $i \neq j$ são denominadas tensões de cisalhamento, e atuam na direção paralela a uma dada face de elemento de fluido.

O índice i representa o paralelismo da componente com determinado eixo; o índice j representa o plano perpendicular a determinado eixo onde a componente atua. Um exemplo para isso é a componente τ_{xz} que é paralela ao eixo x e perpendicular ao eixo z .

A.1.2 Deformação e taxa de deformação

O conceito de deformação está associado às mudanças de forma do corpo, como pode ser visto na Figura 46: movimento sem deformação, deformação por cisalhamento e deformação elongacional de um mesmo elemento.

Figura 46: Deformação de um elemento (A) rotação sem deformação; (B) deformação por cisalhamento; (C) deformação por elongação.

Sendo o parâmetro de deformação γ , para uma distância H entre as superfícies, e X_w é o deslocamento da superfície superior, e assumindo que não há escorregamento do fluido nas superfícies, cada elemento de fluido está sendo sujeito a uma mesma deformação local (Figura 47).

Figura 47: Deformação por cisalhamento.

Extrapolando para todo o fluido, a partir de um elemento de volume, temos

$$\gamma_{xy} = \frac{X_w}{H}$$

e as taxas de deformação $\dot{\gamma}$ e de cisalhamento podem ser definidas por

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma_{xy}}{dt}$$

A taxa de cisalhamento está associada a um gradiente de velocidade

$$\frac{dv_x}{dy}$$

e, sendo assim, o vetor velocidade $\vec{v}$ possui três componentes, as quais em coordenadas cartesianas são v_x , v_y e v_z , e a variação dessas componentes em cada eixo produz um gradiente de velocidades $\vec{\nabla}\vec{v}$.

$$\frac{\partial v_i}{\partial x_j}$$

O gradiente de velocidades é, então, uma grandeza vetorial, assim como o tensor tensão, podendo ser representado em coordenadas cartesianas

$$\frac{\partial v_i}{\partial x_j} = \begin{bmatrix} \frac{\partial v_x}{\partial x} & \frac{\partial v_x}{\partial y} & \frac{\partial v_x}{\partial z} \\ \frac{\partial v_y}{\partial x} & \frac{\partial v_y}{\partial y} & \frac{\partial v_y}{\partial z} \\ \frac{\partial v_z}{\partial x} & \frac{\partial v_z}{\partial y} & \frac{\partial v_z}{\partial z} \end{bmatrix}$$

As componentes $\dot{\gamma}_{ij}$ para $i = j$ são chamadas de componentes normais da taxa de deformação, e as componentes $\dot{\gamma}_{ij}$ para $i \neq j$ são chamadas de componentes de cisalhamento da taxa de deformação.

Uma deformação por cisalhamento ocorre quando um fluido está, por exemplo, entre duas superfícies paralelas e uma delas se desloca em relação à outra. Para um escoamento cisalhante simples, a taxa de deformação e a taxa de cisalhamento são equivalentes. O que difere a taxa de cisalhamento é que esta é uma grandeza escalar, enquanto a taxa de deformação é uma grandeza tensorial.

Relações entre tensões e deformações caracterizam um material e podem se apresentar de diferentes formas. Um exemplo é a relação tensão/taxa de deformação constante, independente da deformação ao longo do tempo. Esse é o chamado fluido

Newtoniano, ou fluido com comportamento Newtoniano. Para cada tipo de deformação ou taxa de deformação diferente em que a tensão ou resposta à deformação for diferente, há uma variação entre a relação tensão/taxa de deformação, sendo esse comportamento chamado de não-Newtoniano.

A.1.3 Reologia de Polímeros

Os polímeros são materiais compostos de moléculas de cadeias longas, de elevada massa molecular, também denominados macromoléculas. A elevada massa molecular dessas macromoléculas contribui para a ocorrência de muitas conformações, levando a um emaranhamento e desemaranhamento, ocorrendo a formação de laços e nós temporários, de forma dinâmica.

A intensidade e duração desses emaranhados contribui ao tempo de relaxação do material após a aplicação de uma tensão ou deformação, visto que as moléculas tentarão voltar ao seu estado de equilíbrio adquirindo conformações de cadeia aleatória. Além do emaranhamento, as macromoléculas apresentam tamanhos diferentes entre si, contribuindo para uma distribuição de massa molecular. Assim, a distribuição de massa molecular (DMM) também influenciará a quantidade de emaranhamentos possíveis que as moléculas formam, influenciando no comportamento reológico.

Existem relações entre a tensão e a deformação que caracterizam reologicamente um material, e que podem se apresentar de diferentes formas. Essas relações são chamadas de equações reológicas de estado ou equações constitutivas do material, influenciando as condições de processamento, propriedades mecânicas, óticas e elétricas do produto final.

A.1.4 Equações Reológicas de Estado

Para muitos materiais, as componentes τ_{ij} dependem apenas das componentes $\dot{\gamma}_{ij}$, e a relação entre essas variáveis chama-se *equação reológica de estado* ou *equação constitutiva* dos polímeros. Algumas equações mais comuns são as dos fluidos newtonianos e os fluidos de lei de potências

Fluido newtoniano é aquele que, em um escoamento cisalhante, a relação

entre a tensão de cisalhamento τ_{ij} e a taxa de deformação, ou taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}_{ij}$ do fluido em movimento é uma constante. Essa relação é expressa por

$$\tau_{ij} = \mu \dot{\gamma}_{ij}$$

em que μ é a *viscosidade newtoniana*. A viscosidade relaciona a resistência ao escoamento apresentada pelo fluido

O Fluido de lei de potências é um fluido com comportamento não newtoniano, fluidos esses que não seguem a proporcionalidade do primeiro caso, e apresentam a relação

$$\tau_{ij} = \eta \dot{\gamma}_{ij}$$

onde

$$\eta = m \dot{\gamma}^{n-1}$$

Nessa equações, η é a viscosidade em função de $\dot{\gamma}$, $\eta(\dot{\gamma})$, m é a consistência e n é o índice da lei de potências da viscosidade. Para $n > 1$, tem-se os líquidos dilatantes, nos quais a viscosidade aumenta com $\dot{\gamma}$; $n < 1$ para líquidos pseudoplásticos, nos quais a viscosidade diminui com $\dot{\gamma}$ e, $n = 1$, para o líquido newtoniano (Figura 48).

Figura 48: Fluidos newtoniano e lei de potências.

A.1.5 Viscoelasticidade

A viscoelasticidade é um fenômeno apresentado pelos materiais poliméricos, por se comportarem como fluido viscoso e sólido elástico, simultaneamente (Figura 49).

Figura 49: Viscoelasticidade e as porções elástica e viscosa.

A.1.6 Propriedades em Regime Oscilatório

O material responde a uma solicitação com atraso, devido a componente viscosa de um polímero. A solicitação deve ser de pequena amplitude para garantir o regime de viscoelasticidade linear. A tensão e deformação dependem da frequência (Figura 50). O regime oscilatório está presente nos estudos de reologia dos polímeros.

Figura 50: Tensão e deformação em regime oscilatório.

Tem-se as equações

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma_{xy}}{dt}$$

$$\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \exp(i\omega t)$$

em que γ_0 é a amplitude da deformação e ω é a frequência

$$\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega$$

A tensão de cisalhamento oscilará com a mesma frequência, mas estará fora de fase, sendo representada por

$$\tau_{yx} = \tau_0 \exp[i(\omega t + \delta)]$$

δ corresponde ao ângulo de defasagem em relação à deformação.

$$G^* = \frac{\tau_{yx}(t)}{\gamma_{yx}(t)} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} e^{i\delta} = \left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \right] + i \left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \right]$$

A Figura 51 apresenta a relação entre os módulos G' , G'' e G^* .

Figura 51: Relação entre os módulos complexo em cisalhamento (G^*), módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'').

O termo $\left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \right]$ corresponde a parte real da equação, relacionado a contribuição elástica do material, chamado de módulo elástico (G'). O módulo G' é chamado também de módulo de armazenamento em cisalhamento, associado à contribuição elástica ou armazenamento de energia durante o ciclo.

O termo $i \left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \right]$ corresponde a parte imaginária da equação, relacio-

nado a contribuição viscosa do material, chamado de módulo viscoso (G''). O módulo G'' é chamado também de módulo de perda em cisalhamento, associado à contribuição fora de fase com a deformação, contribuição viscosa ou dissipação de energia em cada ciclo.

G^* é chamado de módulo complexo em cisalhamento

A relação entre os módulos G'' e G' é chamada de tangente do ângulo de fase δ , ou seja

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$