JULIANA RAQUEL FRIGO ACIARI

PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DA SEDA CALCIFICADAS

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 titulo de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia.

Prof. Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka

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.

Aciari, Juliana Raquel Frigo
Ap Preparação de Micropartículas de Fibroína da Seda Calcificadas. / Juliana Raquel Frigo Aciari; orientador Prof. Dr. 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. 2. Calcificação. 3. Biomaterial. 4. Micropartícula. I. Título.



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

Juliana Raquel Frigo Aciari Título: "Preparação de micropartículas de fribroína da seda calcificadas".

> 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: 04/10/2013

Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka (Orientador)

Instituto de Química de São Carlos - USP

RESULTADO: Aprovoda

0 0

Instituto de Química de São Carlos - USP

ASSINATURA:

ASSINATURA: Ongs A Mphis

Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

ECSRigo

RESULTADO: <u>aprovado</u>

Prof^a. Dr.^a Fernanda Canduri

RESULTADO: APROVADA

ASSINATURA: Servenda andun

Homologado em: / /

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro - São Carlos - SP - 13566-590 Telefone/Fax: (16) 3373-9586 - E-mail: bioeng@sc.usp.br

Ao meu marido Luciano Aciari, meu filho Bruno Aciari, aos meus pais Sônia Frigo e Henrique Frigo (in memoriam) minha irmã Kelly e família e amigos, por fazerem parte da minha vida sempre me apoiando e incentivando para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, força e atitude para enfrentar mais esta etapa.

Ao meu marido Luciano que com amor e paciência soube me apoiar e ajudar em todos os momentos de dificuldade e desânimo. Ao meu filho Bruno por ter colaborado quando eu estava ausente e sempre me receber com seu sorriso.

À minha mãe Sônia por ter disponibilizado tempo de sua vida para me ajudar e estar ao meu lado em todos os momentos sempre me apoiando com seu carinho e amor. A memória de meu pai Henrique por me ensinar que com dedicação e esforço conseguimos conquistar nossos objetivos e por sempre ter confiado em mim.

À minha irmã Kelly e família pelo entusiasmo e coragem em terminar esse trabalho.

Aos amigos Priscila, Marcos e Mariana, que me ajudaram com suas experiências a tornar possível a minha experiência.

À meu orientador Prof. Sérgio pela paciência durante toda a pesquisa.

À Virginia por estar ao meu lado em todos os momentos da preparação e elaboração deste trabalho, me ajudando com muito amor e compreensão.

Ao grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - IQSC, pelo suporte técnico necessário para a preparação desta pesquisa.

RESUMO

ACIARI, J. R. F. **Preparação de micropartículas de fibroína da seda calcificadas.** 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A calcificação ocorre pela formação de depósitos de cálcio em diferentes matrizes envolvendo fatores mecânicos, químicos e biológicos. Alguns compósitos, polímeros e proteínas são utilizados na formação de matrizes por promover maior eficiência no processo de mineralização. Estima-se que a fibroína da seda apresente também esta finalidade. A fibroína é uma proteína fibrosa extraída do casulo do bicho-daseda (Bombyx mori), que pode ser processada como filme, membrana, esponja, pó, gel e aplicada em ossos e cartilagens, enxertos vasculares, reparação de nervos e córnea, como sistema de liberação de drogas, suturas, ligamentos, peles, tendões e substrato para cultura de células. Nesse trabalho houve a preparação de micropartículas de fibroína da seda através de dois procedimentos distintos, um por borrifamento em N₂ e outro por borrifamento em Na₂HPO₄ e o processo de calcificação realizado foi por imersão alternada de soluções tamponadas de cálcio e fosfato. As caracterizações realizadas foram Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FT-IR), Análise Termogravimétrica (TGA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados obtidos mostraram que a calcificação das micropartículas de fibroína ocorre pelas duas metodologias empregadas. O teor de calcificação foi de aproximadamente 29% para micropartículas borrifadas em N2 e de aproximadamente 80% para as micropartículas borrifadas em Na₂HPO₄. As micropartículas de fibroína calcificadas, não apresentaram transição térmica até a temperatura de 120°C, possibilitando a esterilização em autoclave a seco.

Palavras-chave: Fibroína; Micropartículas; Biomateriais; Calcificação.

ABSTRACT

ACIARI, J. R. F. **Preparation the microparticulas the silk fibroin calcifieds.** 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Calcification occurs by the formation of calcium deposits in different matrices involving mechanical factors, chemical and biological. Some composites, polymers, and proteins are used in forming matrices to promote higher efficiency in the process of mineralization. It is estimated that the silk fibroin also present for this purpose. The fibroin is a fibrous protein extracted from silkworm cocoon silkworm (Bombyx mori), which can be processed as film, membrane, sponge, powder, gel and applied in bone and cartilage, vascular grafts, nerve repair and corneal as a delivery system for drugs, sutures, ligaments, skins, tendons and substrate for cell culture. In this work was the preparation of microparticles of silk fibroin by two different procedures, sputter under N2 and in other sputter Na2HPO4 and calcification process was performed by immersion of alternating buffered solutions of calcium and phosphate. The characterizations were performed Absorption Spectroscopy Infrared (FT-IR), Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The results showed that the calcification of fibroin microparticles occurs by the two methodologies. The calcified fibroin microparticles showed no thermal transition temperature to 120 °C, enabling autoclaving of the microparticles dry

Keywords: Fibroin; Microparticles; Bimaterials; Calcification.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1: Esquema dos componentes do osso longo | 16 |
|---|--------------------|
| Figura 2: Fotografia digital do casulo do bicho da seda2 | 22 |
| Figura 3: Microscopia da fibra da fibroína da seda2 | 23 |
| Figura 4: Representação da cadeia molecular da fibroína da seda2 | 24 |
| Figura 5: Representação esquemática da estrutura da hidroxiapatita2 | 25 |
| Figura 6: Fotografias digitais do processo da extração da sericina. (A) o selecionados, (B) casulos picotados, (C e D) extração da sericina, (E) fios do (C) concerção manual das fibras da fibras | casulos e seda, |
| (F) separação manual das fibras de fibroina e (G) fibras de fibroina picotagem | para a 30 |

Figura 7: Processo da formação das micropartículas da fibroína (adaptado de32

Figura 13: Espectros no FTIR das amostras obtidas por borrifamento em N₂: MF2.5RC5I (—), MF5RC5I (—), MF5RC10I (—) e MF5C10I (—)......40

Figura 20: Curvas TG das amostras de MF2.5BNaRC10I (—), MF2.5BNaC10I (—), MF5BNaRC10I (—), MF5BNaC10I (—) e MF5BDNa₂HPO₄ (—).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 22: Curvas DSC das amostras: MF5BDN₂ (—) e MF5BDNa₂HPO₄ (—).50

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1: Descrição das amostras obtidas no procedimento experimental34 |
|---|
| Tabela 2: Porcentagem de resíduos inorgânicos presentes nas micropartículas a |
| 750°C |
| Tabela 3: Razão Ca/P dos sais depositados nas micropartículas mineralizadas49 |

LISTA DE SIGLAS

| FS | fibroína da seda | |
|-------|---|--|
| HA | hidroxiapatita | |
| TGF | fatores de transformação de crescimento | |
| TCP | fosfato-tricálcico | |
| Gly | glicina | |
| Ala | alanina | |
| Gin | glutamina | |
| Pro | prolina | |
| Tyr | tirosina | |
| Ca/P | relação cálcio- fósforo | |
| GA | glutaraldeido | |
| Tris | tris hidroximetil aminometano | |
| HCA | hidroxicarbonato-apatita | |
| Tyr | tirosina | |
| TGA | análise termogravimátrica | |
| MEV | microscopia eletrônica de varredura | |
| FT-IR | espectroscopia no infravermelho | |
| EDS | microscopia por energia dispersiva | |
| DSC | calorimetria exploratória diferencial | |

SUMÁRIO

| Resumo 6 | 3 |
|--|--------|
| Abstract7 | 7 |
| Lista de Figuras | 3 |
| Lista de Tabelas10 |) |
| Lista de Siglas 11 | l |
| Sumário 12 | 2 |
| I. Introdução14 | 1 |
| I.1. Ossos | 5 |
| I.1.1. Calcificação e Mineralização óssea 17 | 7 |
| I.2. Biomaterial | 3 |
| I.2.1. Classificação dos biomateriais20 |) |
| I.3. Fibroína | l |
| I.4. Hidroxiapatita (HA) 25 | 5 |
| II. Objetivos | 3 |
| III. Procedimento Experimental |) |
| III.1. Materiais e Métodos 29 |) |
| III.2. Obtenção da Fibroína Solúvel 29 |) |
| III.2.1. Extração da Sericina29 |) |
| III.2.2. Solubilização das fibras de fibroína |) |
| III.2.3. Determinação da concentração de fibroína |) |
| III.3. Preparo das micropartículas de fibroína da seda | l |
| III.3.1. Micropatrículas da fibroína da seda | l |
| III.3.2. Micropartículas da fibroína da seda calcificadas por borrifamento em se | olução |
| de fosfato tamponado | l |
| III.4. Calcificação das micropartículas de fibroína da seda | 2 |

| III.4.1. Por imersão alternada | 32 |
|--|----|
| III.5. Caracterizações das micropartículas de fibroína da seda | 34 |
| III.5.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR) | 34 |
| III.5.2. Análise termogravimétrica (TGA) | 35 |
| III.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 35 |
| III.5.4. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) | 35 |
| III.5.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) | 36 |
| IV. Resultados e DiscussÃo | 37 |
| IV.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR) | 39 |
| IV.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 41 |
| IV.3. Análise Termogravimétrica (TGA) | 44 |
| IV.4. Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X | 47 |
| IV.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) | 49 |
| V. Conclusões | 52 |
| VI. Trabalhos Futuros | 53 |
| VII. Referências ¹ | 54 |

I. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida tem aumentado nos últimos anos devido aos avanços obtidos com pesquisas destinadas a tratamentos que melhorem a qualidade de vida na senescência. Nesta etapa da vida, os idosos são acometidos por várias afecções, principalmente as ósseas degenerativas, causadas pelo processo de envelhecimento ou por traumas. Quando um osso sofre fratura seja por trauma, fadiga ou doenças crônicas há uma perda da continuidade do tecido ósseo com ou sem deslocamento, além da lesão de células, vasos sanguíneos, matriz óssea e tecidos moles adjacentes incluindo músculos e nervos (WESKA et al., 2009).

A cicatrização de uma fratura geralmente ocorre com sucesso, pois envolve uma série de eventos celular e molecular muito bem controlados (WESKA et al., 2009, KIRSCHBAUER, 2009). É um processo altamente complexo desde as fases de inflamação, proliferação e remodelagem. Inicialmente, quando ocorre uma lesão óssea, os vasos sanguíneos produzem uma hemorragia local que acarreta na formação de coágulo.

A maioria das fraturas ósseas resulta em cirurgias corretivas, que utilizam recursos de reabilitação e reconstrução como transplantes, terapias de drogas, próteses, enxertos e outros, visando substituir as funções teciduais ou órgãos lesados (NOGUEIRA et al., 2008). Os enxertos ósseos autógenos são considerados os de primeira escolha na regeneração tecidual óssea, devido as suas propriedades osteogênicas, por não transmitirem doenças infecciosas e não desencadearem reações imunológicas. No entanto, a disponibilidade deste tipo de enxerto é restrita, havendo a necessidade de dois procedimentos cirúrgicos, podendo ocorrer infecção no sitio doador e afetando economicamente a sociedade nos custos com a saúde bem como na produtividade (FUENTES et al., 2009, ZHANG et al., 2009). Diante destas preocupações a área médica em conjunto com a engenharia de tecidos busca desenvolver biomateriais que apresentem condições favoráveis para restabelecer a função do órgão ou tecido danificado.

Para reparar e promover a calcificação do tecido ósseo são necessárias três etapas osteogênicas: a *osteoindução*, processo de calcificação óssea a partir da indução, em que depósitos de sais de cálcio e hidroxiapatita mineralizam no local

lesado por meio de fatores de crescimento e agentes indutores de células osteoprogenitoras; *osteocondução*, o enxerto ou implante são estruturas de suporte, arcabouço para a neoformação óssea; e a *osteoestimulação*, que ocorre quando células osteogênicas transplantadas viáveis produzem novo osso no sítio com defeito (ZHANG et al., 2009). Após uma semana, o tecido formado ao redor da lesão ou de um implante, é transformado em tecido ósseo e os osteoblastos iniciam a produção de matriz óssea (RIBEIRO, 2008).

Para que o implante ou outro biomaterial seja implantado no tecido lesado deverá apresentar além das propriedades físicas, químicas e mecânicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade, previsibilidade de regeneração, ausência de riscos transoperatórios, sequelas e boa aceitação por parte dos pacientes. Dentro desses requisitos a fibroína da seda (FS) e a hidroxiapatita (HA) mostram resultados clínicos promissores. A FS é um polímero que vem sendo explorado como substrato para imobilização de enzimas e para cultura de células, por ser compatível com o osso, anti-trombogênico e atuar no transporte de drogas (INTROINI et al., 2010, CAO et al., 2009, KIM et al., 2008). A hidroxiapatita é uma biocerâmica utilizada na regeneração dos defeitos ósseos, por apresentar semelhança mineral com o tecido ósseo, biocompatibilidade e osteocondutividade (ZHANG et al., 2009).

I.1. Ossos

Os ossos formam a estrutura do esqueleto que está diretamente ligado ao suporte e proteção de tecidos moles e órgãos vitais, como coração, pulmões e sistema nervoso central. Eles compõem o sistema musculo-esquelético, responsável pelo sistema de alavancas e pelo deslocamento. Os ossos são compostos de 90% de matriz extracelular e 10% de água. A matriz possui 60-70% de mineral inorgânico (fosfato de cálcio microcristalino, fluoreto de sódio e magnésio, responsáveis pela resistência e deformação óssea). O componente orgânico da matriz é composto por colágeno tipo I e proteoglicanas (responsáveis pela resistência a fratura, compressão e tensão) (NOGUEIRA et al., 2008, SUSAN et al., 2000).

A união do fosfato com o cálcio formam cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo. Macroscopicamente, o tecido ósseo pode se apresentar como compacto, na região mais periférica dos ossos, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endósteo e periósteo (Figura 1). O periósteo constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos (SUSAN et al., 2000, ANDIA et al., 2006).



Figura 1: Esquema dos componentes do osso longo (http://histologianerd.blogspot.com.br).

As principais funções do tecido ósseo são suportar cargas mecânicas derivadas da contração muscular e da sustentação de peso, servir de reservatório de íons cálcio, magnésio e fosfato, além de auxiliar a manutenção da homeostase desses íons no sangue (MONDAI et al., 2007).

Há um crescente interesse em estudos esclarecedores dos mecanismos envolvidos na mineralização e remodelação óssea que possibilitem desenvolvimento de técnicas de intervenção que acelerem este processo (POLAK et al., 2010).

I.1.1. Calcificação e Mineralização óssea

A mineralização é um processo multifuncional que envolve parâmetros mecânicos, químicos e biológicos que envolvem deposição de cálcio em diferentes locais (KIRSCHBAUER, 2009).

A matriz óssea é constituída de uma substância fundamental mineralizada, com 10-20% de sua massa sendo água, 60-70% são compostos de material inorgânico (hidroxiapatita e fosfato de cálcio) responsáveis pela dureza e rigidez do osso e 90% do material orgânico é composto por colágeno tipo I. Essas proporções dos podem sofrer variações em função da idade, condição metabólica e localização (RIBEIRO, 2003).

O tecido ósseo, ao ser lesado pode reparar-se retomando sua capacidade funcional sem cicatrizes ou deformidades em diversos momentos. O tecido precisa modificar sua forma ou estrutura para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas (SANTOS et al., 2007, ANDIA et al., 2006).

A formação do osso envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação dos osteoblastos. Este processo é controlado por fatores sistêmicos e locais, hormônios, citocinas e fatores de transformação de crescimento (TGF). Estes componentes interagem entre si de maneira altamente organizada, permitindo a deposição de sais minerais atuantes na mineralização, no crescimento dos cristais de hidroxiapatita e na liberação de moléculas responsáveis por estimular a migração e adesão à superfície óssea que deve ser reabsorvida (SANTOS et al., 2007, ANDIA et al., 2006).

O tecido ósseo é constituído principalmente pelos osteoblastos, osteoclastos e pelas células de revestimento.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela produção da matriz por sua mineralização que funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação. Neste momento pequenas vesículas desprendem-se dos osteobolastos para promover uma supersaturação de fosfato de cálcio, que se espalha por toda matriz. Sendo assim, os osteoblastos participam do processo de remodelação óssea, não somente produzindo matriz óssea, mas também controlando a atividade dos osteoclastos (MONDAI et al., 2007).

Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo, localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea e representam 95% do

componente celular, são considerados essenciais para remodelação e manutenção da integridade da matriz óssea. O tempo de vida desta célula óssea está estimado em 25 anos, sendo que a porcentagem de osteócitos mortos aumenta com a idade do indivíduo, em média 1% ao nascer e 75% quando o indivíduo atinge oitenta anos (SANTOS et al., 2007).

Os osteoclastos têm como principal função promover a desmineralização e a degradação da matriz óssea, mas participam do processo de reabsorção óssea (RIBEIRO, 2003).

As células de revestimento da superfície óssea são responsáveis pela produção de moléculas ativadoras da remodelação óssea. Tais células sob determinados estímulos, podem diferenciar-se em osteoblastos e consequentemente produzir matriz óssea, influenciando no metabolismo de cálcio e fosfato e na troca de substâncias (ANDIA et al., 2006).

Pesquisas visam esclarecer os diversos fatores que interferem na proliferação, migração, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas, com a finalidade de desenvolver protocolos de tratamentos efetivos que permitam estagnar as doenças que promovem a perda óssea como também para o reparo ósseo (FUENTES et al., 2009).

I.2. Biomaterial

Durante os séculos XVIII a XX a funcionalidade das próteses eram muito limitadas, devido a utilização de dispositivos inadequados como fios e pinos de ferro e outros metais e pelo desconhecimento da assepsia e antibióticos que provocavam infecções e a morte da maior parte dos candidatos à amputação. Os danos provocados aos pacientes foram considerados catastróficos, devido ao desconhecimento de materiais considerados hoje adequados para utilização cirúrgica (FUENTES et al., 2009).

Com o surgimento da cirurgia asséptica houve avanços como a criação de diferentes ligas metálicas como placas e parafusos, utilização de polimetilacrilato para substituição de articulações e córnea, substituição de vasos sanguíneos, comercialização de próteses vasculares cardíacas e substituição total do coração. Após as guerras mundiais, muitas pessoas que sofreram lesões ósseas graves, necessitaram de uma prótese ou de materiais que restabelecessem a função das áreas danificadas, nesta época houve o desenvolvimento dos materiais para fins médicos. Assim em 1947 foi recomendado oficialmente a utilização de aços inoxidáveis em próteses (RIBEIRO, 2008).

Visto a necessidade de desenvolver próteses adequadas houve a união da engenharia com áreas da ciência e saúde denominando uma nova área chamada engenharia tecidual. Uma área interdisciplinar com objetivo de produzir biomateriais para fins médicos, que sejam compatíveis, duráveis e funcionais quando em interação com sistemas biológicos, reunindo conceitos da engenharia e ciência da vida e permitindo restaurar, manter ou melhorar as funções de determinado órgão ou tecido (FUENTES et al., 2009).

Os biomateriais passaram por três gerações:

- Primeira (~ 1950): baseado no conceito de materiais bioinertes, com mínima interação e reação;
- Segunda (~1980): baseado no conceito de bioatividade, reabsorção, reação controlada com o meio fisiológico;
- Terceira (~2000): baseado no conceito de biointerativos, com regeneração tecidual funcional, reabsorção, estímulos específicos, proliferação, diferenciação e organização (RIBEIRO, 2003).

Atualmente são considerados biomateriais qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, utilizados para confeccionar dispositivos ou próteses que visam substituir, reparar, regenerar ou repor tecidos e órgãos danificados (por doenças crônicas, acidentes ou pelo envelhecimento natural) de uma forma segura, confiável e economicamente viável (FUENTES et al., 2009). Deve ser implantado e incorporado podendo servir ou não como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido, onde houve perda de matéria viva ou de sua função (CAO et al., 2009).

Para que um biomaterial desempenhe a função desejada, ou seja, ser biofuncional, ele deve apresentar propriedades específicas, pelo tempo necessário, que pode ser longo em caso de implante permanente, ou curto em caso de implante temporário. Um biomaterial é considerado biocompativel quando apresenta um desempenho satisfatório em contato com o organismo vivo, manifestando a resposta apropriada do tecido hospedeiro em uma dada aplicação. Além de apresentar como principais propriedades ser biofuncional e biocompativel, um biomaterial deve: ser atóxico, não carcinogênico, ter resistência mecânica, ser reprodutível, apresentar densidade e peso adequado para sua função, apresentar permeabilidade, estabilidade, elasticidade e flexibilidade (FUENTES et al., 2009, ZHANG et al., 2009).

A natureza química de um biomaterial pode ser natural ou sintética, os sintéticos envolvem materiais metálicos, cerâmica, polímeros e os compósitos; os naturais destacam-se o colágeno, a quitosana e a fibroína da seda. Os biomateriais empregados podem ser classificados como permanentes (substituir um tecido lesado por tempo indeterminado) produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e físico-químicas por longos períodos. Por outro lado existem situações onde se necessita que um suporte preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Nesse caso, uma alternativa são os biomateriais temporários (AMADEI et al., 2006).

I.2.1. Classificação dos biomateriais

Os materiais bioinertes (Alumina (Al2O3), Zircônia (ZrO2), Dióxido de Titânia (TiO2) e outros) mantêm as propriedades físicas e mecânicas durante a vida útil do implante clínico; são pouco suscetíveis a uma reação biológica devido a sua estabilidade química não causando rejeição do tecido hospedeiro. São usados tanto em fixações de revestimento, como de sustentação mecânica, como por exemplo nos implantes da cabeça de fêmur e de quadril (RIBEIRO, 2008).

Os materiais biotoleráveis, representados principalmente por metais e polímeros, apresentam respostas inflamatórias na interação com o tecido vivo, formando um envoltório de proteção ao redor do material implantado. São utilizados em função das propriedades mecânicas de sustentação.

Os materiais bioativos permitem uma resposta biológica específica com tecido vivo sem produzir reações tóxicas ou nocivas. Esses materiais são divididos em dois grupos, os reabsorvíveis e os de superfície ativa. Os reabsorvíveis (fosfato-tricálcico (TCP), Ca₃(PO₄)₂, e sulfato de cálcio, (CaSO₄)n.H₂O) possibilitam

preenchimento das cavidades ósseas, servindo de suporte e condutor ósseo pois são absorvidos e transformados naturalmente em novo tecido ósseo. Os materiais de superfície ativa (hidroxiapatita (HAp), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, fluorapatita, $F_{10}(PO_4)_3(OH)$ e o biovidro), em geral, não são absorvidos, mas desenvolvem ligações químicas com o tecido vivo que auxiliam no processo de união e fixação da prótese. Isso ocorre por promoverem o crescimento de cristais de carbonato apatita na superfície, análogos ao mineral ósseo associando-se com proteínas ósseas específicas, essencial para a reconstrução do tecido (RIBEIRO, 2003).

Uma área promissora da engenharia tecidual é a utilização de biomateriais que visam a proliferação de células ósseas e formação de hidroxiapatita para regeneração da matriz óssea, devido à grande necessidade clínica por substituição óssea que ocorre com maior frequência na população idosa (KIM et al., 2008).

Com esse desenvolvimento novos procedimentos passaram a ser utilizados na restauração óssea. Muitos polímeros são considerados suporte para o crescimento celular, permitindo a penetração de vasos sanguíneos e em alguns casos, até mesmo exercem atividade morfogenética (SUSAN et al., 2000, POLAK, 2010, CAO et al., 2009).

Materiais biorreabsorvíveis são muitas vezes enriquecidos com hidroxiapatita, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas além de outros elementos ósseos que os tornam muito eficientes no estímulo à neoformação óssea em regiões lesadas (AMADEI et al., 2006).

Atualmente, busca-se a produção de polímeros com características físicoquímicas e mecânicas, disposição de cargas elétricas, elasticidade, resistência e substratos mais hidrofílicos para suportar uma melhor interação com as células e promover a adesão desses biomateriais. Um polímero que representa tais propriedades é a fibroína da seda produzida pelo bicho da seda (POLAK, 2010).

I.3. Fibroína

A Fibroina da Seda (FS) produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Figura 2) é muito utilizada pela indústria têxtil e como sutura clínica há séculos (WENK et al., 2010, ROLIM, 2010). A FS é um polímero que tornou-se alvo de pesquisa para aplicações biomédicas e biotecnológicas, principalmente por

apresentar as seguintes propriedades (KUNDU et al., 2010, HARDY et al., 2008, XU et al., 2009, KONG et al., 2005):

- propriedades mecanicamente adequadas como: elasticidade, flexibilidade e resistência a tensão;
- biocompatibilidade e biodegradabilidade;
- versatilidade em processos;
- permeabilidade e fácil absorção;
- imobilização de enzimas;
- substrato para crescimento celular;
- baixa trombogenecidade e mínima resposta inflamatória;
- estabilidade térmica;
- oxigenação adequada;
- propriedade hemostática.



Figura 2: Fotografia digital do casulo do bicho da seda (http://ifmtsaudeebemestar.blogspot.com.br).

A FS (Figura 3) é composta principalmente por dois tipos de proteínas a fibroína (70 a 80 % proteína hidrofóbica) e sericina (30 a 20% proteína hidrofílica de revestimento) (KONG et al., 2005).



Figura 3: Microscopia da fibra da fibroína da seda (http://cienciahoje.uol.com.br).

Estruturalmente a FS é composta por uma cadeia de massa molar de 325 kD e outra de 25 kD que são ligadas por pontes de sulfeto e unidas por uma camada de sericina (Figura 4). A fibroína da seda contém sequência tripeptídica de glicina (43%) e alanina (30%) que são interconectadas com aminoácidos como serina ou tirosina (proporção 3:2:1) e dispostas de maneira altamente organizadas (MONDAL et al., 2007).

No estado sólido, a proteína é encontrada em dois tipos cristalinos (seda I e seda II). A seda I apresenta mudanças estruturais que estão associadas a α -hélice ou β -folha. A seda II é estabelecida como forma de folha β -antiparalela e é cerca de 55% da conformação total que confere as principais propriedades mecânicas, como a flexibilidade e a elasticidade (KUNDU et al., 2010, VEPARI et al., 2007, MEINEL et al., 2006). Também pode apresentar ácido aspártico (Asp) em sua composição que promove a adesão celular, especialmente com osteoblastos, fibroblastos e células-tronco (ROLIM, 2010).



R = substituinte para formação dos aminoácidos Gly, Pro, Tyr, Ala, Gln

Figura 4: Representação esquemática da cadeia da fibroína da seda.

A FS pode ser processada como filmes, membranas, esponjas, pó, géis, com aplicações em ossos e cartilagens, enxertos vasculares, reparação de nervos e córnea, como sistema de liberação de drogas, suturas, ligamentos, peles, tendões e substrato para cultura de células (WENK et al., 2010, XU et al., 2009, KONG et al., 2005).

A sericina induz a mineralização devido a formação de apatita, mas apresenta dificuldade em ser biocompatível o que pode causar hipersensibilidade e reações inflamatórias. Há dificuldades em obter respostas biológicas da fibroína da seda talvez devido a poucas informações sobre caracterizações e processos de remoção da sericina, responsável por problemas de biocompatibilidade e hipersensibilidade (ALTMAN et al., 2003).

A fibroína da seda é considerada um polímero importante no processo de biomineralização e para a engenharia de tecido ósseo por induzir a formação de apatita nas superfícies de soluções de proteína que se assemelham ao fluido corporal e por apresentar propriedades significativas de biocompatibilidade (KIRSCHBAUER, 2009, ZHANG et al., 2009).

Tais fatos levantam o interesse e a necessidade de desenvolver pesquisas nessa área do conhecimento (ROLIM, 2010).

I.4. Hidroxiapatita (HA)

A fórmula da hidroxiapatita (HA) é descrita como $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ com razão Ca/P de 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos (BATISTA, 2008), sendo sua estrutura mostrada na (Figura 5).



Figura 5: Representação esquemática da estrutura da hidroxiapatita (http://www.hiroshima-u.ac.jp).

A hidroxiapatita biológica ou hidroxiapatita carbonatada (HCA), apresenta grupos CO₃ em sua estrutura, esta composição é similar àquela da apatita presente no mineral ósseo. A bioatividade da HA está associada aos fenômenos que ocorrem na interface do material e a habilidade de um material ligar-se quimicamente ao osso, através da formação de uma camada de fosfato de cálcio, promovendo uma osteogênese verdadeira (RIBEIRO, 2008).

A síntese de HA pode ocorrer por via úmida em reações ácido-base e reações entre sais de fosfato e cálcio. Neste método normalmente o produto final é obtido como um pó e cristalinidade similar aos tecidos naturais, ou seja, baixa cristalinidade. Por via seca, o produto é normalmente um pó de alta cristalinidade, em função das altas temperaturas (950 a 1300°C) envolvidas na sua produção e por método hidrotérmico (NAPOLITANO, 2012).

Atualmente vários métodos são utilizados na obtenção de HA também como as suas aplicações na área biomédica, ambiental e eletrônica. Para a regeneração óssea (área da engenharia biomédica), as pesquisas têm como objetivo encontrar um biomaterial com características similares ao tecido ósseo para que possa haver uma possível migração celular, proliferação e deposição de matriz e por fim a regeneração óssea (BATISTA, 2008). A HA é um material cerâmico bioativo, reabsorvível que têm sido pesquisada na obtenção de novos materiais para enxerto ósseo, se liga ao osso, sem interposição de qualquer outro tipo de tecido. Isso é explicado pelo fato desse material ser composto dos mesmos íons que formam a fase mineral do osso natural, sendo, portanto capaz de participar do equilíbrio cálcio/fosfato no organismo (KAWACHI et al., 2000).

Sua composição química é semelhante ao constituinte da fase mineral dos dentes e ossos, demonstrando alto grau de biocompatibilidade e eficiência como suporte para regeneração dos tecidos. O reparo de defeitos ósseos com o uso de material artificial compatível com o osso natural contribui com a redução de complicações no que diz respeito à infecção e rejeição. A hidroxiapatita possui alta capacidade de adsorver e absorver moléculas, sendo, portanto um excelente suporte para ação prolongada de fármacos anticancerígenos no tratamento de tumores ósseos (KAWACHI et al., 2000, BATISTA, 2008).

Dependendo de sua aplicação a HA pode ser produzida com diferentes características físico-químicas e em forma de esferas, blocos, pó e grânulos que permitem promover implantes biológicos diferenciados. Sendo densa na forma de blocos e grânulos ela é recomendada para implantes de ouvido médio e de raízes do dente evitando grande perda óssea. A HA também é utilizada na área médica e odontológica, como material de recobrimento de implantes metálicos ou no preenchimento de cavidades ósseas permitindo a reestruturação óssea local (BATISTA, 2008)

Contudo, para a substituição de grandes defeitos ósseos a HA é considerada frágil, pois apresenta baixa resistência mecânica e uma lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após quatro ou cinco anos de implante (KAWACHI et al., 2000).

Wang et al., (2010), relatou excelentes resultados com a união da hidroxiapatita com fibroína, devido a uma interação que ocorre entre as estruturas desses biomateriais, o que favorece ainda mais o processo de mineralização similar ao tecido ósseo. Para Wang et al., (2010) a fibroína da seda é considerada um biomaterial com propriedades mais apropriadas para aplicação clínica quando comparada ao colágeno.

Weiwei, et al., (2009), verificou que além de ser um excelente osteoindutor a fibroína mostrou não apresentar alterações nas suas propriedades, principalmente relacionado a força e elasticidade sendo considerada eficaz para aplicações clínicas especialmente em tecidos ósseos.

Tais resultados mostram que a fibroína da seda é um biopolímero de grande interesse e importância no estudo do processo de biomineralização e também em processos de regeneração óssea. Neste trabalho realizaremos a obtenção de micropartículas de fibroína da seda calcificadas por imersão alternada para verificar-se a possível formação de fosfato de cálcio com relação Ca/P similar a hidroxiapatita e também a possibilidade de esterilização dessas micropartículas em autoclave a seco, já que a maioria das proteínas desnaturam em temperaturas superiores a 100°C.

II. OBJETIVOS

Desenvolver materiais que restabeleçam e regenerem tecidos ósseos é de grande preocupação na área da engenharia tecidual. A fibroína da seda (FS) destaca-se neste contexto por apresentar características que se assemelham a esta necessidade. Assim, os objetivos deste trabalho são:

- Preparação e obtenção das micropartículas de fibroína por borrifamento:
 - \circ em N₂ líquido;
 - o em solução de fosfato de sódio.
- Calcificação das micropartículas por imersão alternada.
 - Formação de fosfato de cálcio nas micropartículas.
- Caracterização das micropartículas calcificadas por análise termogravimetrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia por energia dispersiva (EDS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Verificação da possibilidade de esterilização em autoclave a seco.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III.1. Materiais e Métodos

Os casulos vazios do bicho-da-seda (*Bombyx Mori L.*) foram fornecidos pelo sericultor Hélio Hatsugai, Bastos, SP. Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de grau PA.

Todas as caracterizações das amostras foram feitas no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

III.2. Obtenção da Fibroína Solúvel

III.2.1. Extração da Sericina

Para utilização da fibroína nas aplicações biomédicas e biotecnológicas, é necessário que ocorra a dissossiação de suas fibras após a remoção da sericina (VEPARI, 2007).

Inicialmente retiraram-se sujidades dos casulos, colocou-se 3,0 g de casulos em 1L de água destilada com 2,12 g de carbonato de cálcio a uma temperatura de 80-100°C, durante 30 min. Após esse tempo, os fios foram lavados em 1,0 L de água destilada a 25°C a cada 0,5 h por três vezes. Após a terceira lavagem, as fibras foram prensadas manualmente para retirar o excesso de água e então colocadas em uma placa de Petri para secagem na estufa a 50°C durante 24 h (Figura 6).

Depois de seca, as fibras foram picotadas no moinho de facas da Solab gentilmente cedido pela Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, com peneira de 20 *mesh* e guardadas em sacos plásticos.

III.2.2. Solubilização das fibras de fibroína

Dissolveu-se 3,0 g da fibroína picotada em 30,0 mL de uma solução ternária de CaCl₂:EtOH:H₂O na proporção molar de 1:2:8 a 60°C sob agitação constante. O material dissolvido foi colocado num tubo de diálise de celulose e dialisado contra água destilada, com troca a cada 12h aproximadamente, durante 72 h sob agitação magnética constante. A solução foi centrifugada primeiramente a 500 rpm durante 15 min e posteriormente em 1000 rpm por mais 15 min para total extração de impurezas.



Figura 6: Fotografias digitais do processo da extração da sericina. (A) casulos selecionados, (B) casulos picotados, (C e D) extração da sericina, (E) fios de seda, (F) separação manual das fibras de fibroína e (G) fibras de fibroína para a picotagem.

III.2.3. Determinação da concentração de fibroína

Uma massa conhecida de solução de fibroína foi colocada em moldes de teflon® e seca sob fluxo de ar até peso constante (aproximadamente 48h), para a

determinação da concentração. Essa medida foi feita em triplicata. A solução da fibroína da seda foi diluída por adição de água destilada sob agitação moderada, obtendo-se soluções com concentração final de 5,0% ou 2,5% (massa/massa).

III.3. Preparo das micropartículas de fibroína da seda

III.3.1. Micropatrículas da fibroína da seda

Colocou-se a solução de fibroína de concentração de 5,0% e 2,5% (massa/massa) em um borrifador de vidro acoplado com ar comprimido. Aos poucos o ar pressurizado proporcionou a formação das micropartículas por borrifamento em nitrogênio líquido, aleatoriamente para não haver sobreposição, conforme a patente desenvolvida por Montanha, et al. 2011. Após a evaporação do excesso de nitrogênio líquido, as micropartículas congeladas foram liofilizadas em um equipamento da EDWARDS modelo FREEZE DRYER Modulyo.

Após a liofilização, metade das micropartículas de concentração de 5 e 2,5% (massa/massa) foram reticuladas com glutaraldeído (GA, 0,05%, v/v) em acetona por 30 min e em seguida lavadas três vezes com água destilada. Congeladas novamente em nitrogênio líquido e liofilizadas até peso constante. As micropartículas secas passaram por peneiras granulométricas separando-se micropartículas entre 6 e 13 *mesh*, que foram armazenadas.

III.3.2. Micropartículas da fibroína da seda calcificadas por borrifamento em solução de fosfato tamponado

A solução ternária de fibroína foi borrifada diretamente em solução de Na₂HPO₄ 0,12 mol L⁻¹ em tampão Tris (tris(hidroximetil)aminometano), pH 9,0 e não em nitrogênio líquido, com proporção de Ca/P de 1,67, independente da concentração da fibroína. Após agitação por 4h, as micropartículas foram centrifugadas a 1.000rpm por 10min a 25°C e em seguida lavadas com água destilada; este processo foi repetido 3vezes.

Após a última lavagem, as micropartículas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas até peso constante.

A Figura 7 mostra o processo de formação das micropartículas de fibroína.



Figura 7: Processo da formação das micropartículas da fibroína (adaptado de

III.4. Calcificação das micropartículas de fibroína da seda.

III.4.1. Por imersão alternada

Para a realização desta etapa, as micropartículas secas foram umedecidas com água destilada e o ar contido no interior foi removido através de vácuo. Para o processo de calcificação foram preparadas duas soluções:

- - Solução 1: CaCl₂ a 0,2 mol L⁻¹ em tampão Tris, pH 7,41
- - Solução2: Na₂HPO₄ 7H₂O 0,12 mol L⁻¹ em tampão Tris, pH 9,01

Para iniciar o processo de calcificação foram colocados 10 mL da solução 1 nas micropartículas de fibroína equilibradas a 37ºC.

Com as amostras já equilibradas, foram removidos os 10 mL da solução 1 e as micropartículas foram lavadas com água destilada por três vezes. Após a lavagem, foram colocados 10 mL da solução 2 nas micropartículas lavadas anteriormente e estas foram mantidas com a solução 2 por trinta minutos em 37°C. Depois desse período, a solução 2 foi removida e as micropartículas foram lavadas três vezes com água destilada. Novamente, foram colocados 10 mL da solução 1 nas micropartículas por trinta minutos a 37°C.

O processo de calcificação por imersão alternada foi repetido por cinco e dez ciclos das soluções (Figura 8).



Figura 8: Esquema do processo de calcificação por imersão alternada das micropartículas de fibroína.

A Figura 9 mostra um esquema geral do procedimento experimental de obtenção das micropartículas de fibroína calcificadas.



Figura 9: Esquema geral do procedimento experimental de obtenção das micropartículas de fibroína mineralizadas. A Tabela 1 descreve todas as amostras obtidas neste trabalho.

| Código da Amostra | Descrição da amostra | | |
|---------------------------------------|---|--|--|
| | micropartícula de fibroína a 2,5% borrifada em nitrogênio | | |
| MI 2,01001 | líquido, reticulada e calcificada com cinco imersões | | |
| MF5BDN ₂ | micropartícula de fibroína a 5,0% borrifada em nitrogênio | | |
| | líquido. | | |
| | micropartícula de fibroína a 5,0% borrifada em nitrogênio | | |
| MFSKCSI | líquido, reticulada e calcificada com cinco imersões | | |
| | micropartícula de fibroína a 5,0% borrifada em nitrogênio | | |
| WIFSRCIU | líquido, reticulada e calcificada com 10 imersões | | |
| ME5C10I | micropartícula de fibroína a 5,0% borrifada em nitrogênio | | |
| WF5CTU | líquido, calcificada com 10 imersões | | |
| MF5BDNa ₂ HPO ₄ | micropartícula de fibroína a 5,0% borrifada em solução de | | |
| | Na ₂ HPO ₄ . | | |
| ME2 5BNaRC10I | micropartícula de fibroína a 2,5% e borrifada em | | |
| | Na ₂ HPO ₄ , reticulada e calcificada com 10 imersões | | |
| MF2,5BNaC10I | micropartícula de fibroína a 2,5% e borrifada em | | |
| | Na ₂ HPO ₄ , calcificada com 10 imersões | | |
| MF5BNaRC10I | micropartícula de fibroína a 5,0% e borrifada em | | |
| | Na ₂ HPO ₄ , reticulada e calcificada com 10 imersões | | |
| MF5BNaC10I | micropartícula de fibroína a 5,0% e borrifada em | | |
| | Na ₂ HPO ₄ , calcificada com 10 imersões | | |

Tabela 1: Descrição das amostras obtidas no procedimento experimental

III.5. Caracterizações das micropartículas de fibroína da seda

III.5.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)

A técnica de caracterização por espectroscopia no infravermelho foi realizada no Departamento de Química da USP São Carlos. O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em um intervalo entre 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando espectrofotômetro FTIR BOMEM MB-120.

As micropartículas apresentaram formatos aleatórios, por isso foram totalmente prensadas com brometo de potássio (KBr) para serem analisadas em forma de pastilhas.

III.5.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Para a termogravimetria foram utilizados cerca de 10 mg de cada material que foram colocados no porta amostra de alumina sob atmosfera de ar sintético, com razão do aquecimento de 10°C min⁻¹, entre 25 e 800°C em um equipamento da TA Instruments modelo TGA-2050.

III.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV foi feito para observar-se a morfologia da superfície e se houve a formação de cristais de hidroxiapatita.

As amostras foram coladas com fita adesiva de carbono nos suportes de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) em um metalizador Balsers modelo SDC 050. As fotomicrografias foram obtidas em equipamento LEO-440 (LEO Electron Microscopy Ltda.), sendo utilizado um feixe de elétrons de 20 keV, com um detector da Oxford Instruments Inc.

III.5.4. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Esta técnica permite a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir de emissão de raios X característicos, podendo neste caso determinar a relação Ca/P para as amostras calcificadas. As análises foram feitas em um equipamento EDX Link Analytical (Isis System Series 200), com detector de SiLi pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um Microscópio Eletrônico LEO 440 (LEO Electronic Microscopy LTD), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Para serem analisadas as micropartículas foram recobertas com uma fina camada de carbono e prensadas com oito toneladas. Para análise semi-quantitativa foi utilizado o ISIS software 3.1. Foram utilizadas massas de cerca de 10 mg, em suportes herméticos de alumínio. As curvas de DSC foram obtidas em um equipamento TA Instruments, modelo DSC 2010 calibrado com padrão de índio. A razão de aquecimento foi de 10°C min⁻¹, na faixa de aquecimento de 25 a 120°C. Foi utilizado fluxo de gás 80 mL min⁻¹ em atmosfera nitrogênio.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente os casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*) foram selecionados para o processo de extração da sericina. A quantidade de sericina removida é por volta de 25 a 35% da massa do casulo (VEPARI, 2007). Este processo foi executado com cautela para não afetar as propriedades do biomaterial em que o objetivo foi resultar em fibras de fibroína para realização da picotagem e diálise (Figura 10) (PRITCHARD et al, 2013).





Figura 10: Fotografias Digitais (A) casulo do bicho da seda e (B) fibras de fibroína picotadas para solução ternária e (C) solução ternária.

Durante o processo de diálise foi controlado em temperatura ambiente para não ocorrer possível cristalização e para manter a concentração final da solução (NOGUEIRA, 2009, KAPLAN, 2003). Depois do processo de diálise a coloração obtida da solução ternária foi marrom clara (Figura 10 (C)).

O processo de obtenção das micropartículas de fibroína foi feito a partir da solução ternária. A concentração escolhida para este trabalho foi de 5% e de 2,5%. Foram realizados dois métodos de borrifamento para a formação das micropartículas. A solução ternária de fibroína foi dividida em duas partes com a finalidade de obtermos uma solução concentrada e uma diluída. Tais soluções foram borrifadas separadamente em N₂ e na solução Na₂HPO₄.

As micropartículas de fibroína que foram obtidas por borrifamento em N₂ estão representadas pela fotografia digital da Figura 11.



Figura 11: Fotografia digital das micropartículas formadas pelo processo de borrifamento em N₂.

As micropartículas obtidas por borrifamento em Na₂HPO₄ estão representadas na fotografia digital Figura 12.



Figura 12: Fotografia digital das micropartículas formadas pelo borrifamento da solução de fibroína diretamente em solução de Na₂HPO₄.

Foi observado que as micropartículas obtidas apresentaram formas diferentes. As que resultaram do borrifamento em N₂ apresentaram um formato mais arredondado não definido (Figura 11), talvez pelo congelamento imediato da solução borrifada. As micropartículas resultantes do borrifamento na solução de Na₂HPO₄ apresentaram formato similar a um pó (Figura 12).

As micropartículas resultantes do borrifamento em N₂ foram selecionadas por peneira granulométricas (entre 6 e 13 mesh). Após esta etapa todas as micropartículas resultantes dos dois métodos de borrifamento foram calcificadas por imersão alternada por soluções de cloreto de cálcio e fosfato de sódio para serem analisadas pelas caracterizações.

IV.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho mostraram regiões de amida I, II e III relacionadas com a conformação das cadeias peptídicas da fibroína. A banda de amida I tem frequência característica na faixa de 1600 a 1700 cm⁻¹ relacionada com a deformação axial da ligação de C=O. A banda de amida II está na faixa entre 1500 a 1550 cm⁻¹ e é relacionada à deformação angular da ligação N–H e ao estiramento C–N. Os espectros mostraram como resultado a formação de fosfato de cálcio nas bandas entre 1000 a 1100 cm⁻¹ e 550 a 500 cm⁻¹ (Batista, 2008). Os espectros de FTIR estão apresentados nas Figuras 13 e 14.



Figura 13: Espectros no FT-IR das amostras obtidas por borrifamento em N₂: MF2.5RC5I (—), MF5RC5I (—), MF5RC10I (—) e MF5C10I (—).



Figura 14: Espectros no FT-IR das amostras de micropartículas de fibroína borrifada em Na₂HPO₄, MF2,5BNaRC10I (—), MF2,5BNaC10I (—), MF5BNaRC10I (—) e MF5BNaC10I (—).

Os resultados obtidos mostram que independente do método de borrifamento utilizado como também do número de lavagens nas soluções de calcificação há a formação de fosfato de cálcio, presentes nas bandas características de íons PO₄³⁻. Batista, 2008 mostrou que em matrizes mineralizadas

houve a formação de fosfato de cálcio nas mesmas bandas que foram encontradas neste trabalho com micropartículas de fibroína mineralizadas.

IV.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV foi realizado nas micropartículas resultantes dos dois métodos de borrifamento para verificar a morfologia e a possível formação de fosfato de cálcio.

Primeiramente foram analisadas as micropartículas de fibroína 2,5% reticulada e calcificada com cinco imersões (MF2.5RC5I). Estas micropartículas apresentaram formato não uniforme com formação de aglomerados de microcristais de fosfato de cálcio, como visto nas fotomicrografias mostradas na Figura 15.



IQSC EHT=15.00 kV WD= 12 mn Mag= 61 X Detector 100µn H Photo No.=55 13-Feb-2012

IQSC EHT=15.00 kV WD= 12 mn Mag= 10.00 K X Detector 1µm Photo No.=59 13-Feb-2012

Figura 15: Fotomicografias da amostra de MF2.5RC5I em aumento de 61x (A) e de 10.000x (B).

Através das fotomicrografias das micropartículas de fibroína a 5% reticulada e calcificada com cinco imersões (MF5RC5I) foi observado formação de micropartículas homogeneamente calcificadas em sua superfície, contudo, a não apresentam um padrão definido (Figura 16).



Figura 16: Fotomicrografias da amostra de MF5RC5I com aumento de 61x (A) e de 10.000x (B).

As amostras obtidas através de borrifamento em solução de fosfato de sódio mostraram em todos os casos a formação de micropartículas de formato não definidos e tamanhos variados como mostrados na Figura 17.



Figura 17: Fotomicrografias das amostras de MF2.5BNaRC10I (A), MF2.5BNaC10I (B), MF5BNaRC10I (C) e MF5BNaC10I (D) com aumento de 200 x.

As mesmas amostras de micropartículas de fibroína borrifadas em solução de Na₂HPO₄ são mostradas na Figura 18 com aumento de 10.000x. Foi possível verificar através das fotomicrografias que as amostras MF2.5BNaRC10I e MF2.5BNaC10I (Figura 18A e B), que foram obtidas a partir de soluções diluída de fibroína, apresentaram a calcificação homogênea, mas observa-se que as partículas não são maciças, provavelmente devido a menor concentração de fibroína. As amostras MF5BNaRC10I e MF5BNaC10I (Figura 18C e D) estão calcificadas de forma compacta e homogênea por toda a extensão.



Figura 18: Fotomicrografias das amostras MF2.5BNaRC10I (A), MF2.5BNaC10I (B), MF5BNaRC10I (C) e MF5BNaC10I (D) com aumento de 10.000x.

A amostra MF2.5BNaRC10I e MF5BNaRC10I (Figura 18A e C) mostram que ocorre a deposição de sais na superfície e aparentemente no interior de alguns poros, como indicado pelas setas. Pode-se observar na morfologia, que os cristais de fosfato de cálcio estão agrupados, mas sem forma definida. Wang et al, 2006, verificou em análise morfológica a formação de cristais de HA em fibroína semelhante aos encontrados nas micropartículas calcificadas, sugerindo assim que o sal resultante da calcificação pode ser HA.

IV.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

Com o objetivo de quantificar o material inorgânico presente nas amostras e determinar a estabilidade térmica das micropartículas foram realizadas análises termogravimétricas. As curvas TGA para todas as amostras mostraram três etapas principais: a perda de água, a degradação e a carbonização. Na primeira etapa, de 25 a 200°C verificou-se a quantidade de água presente nas micropartículas. Na segunda, de 200 a 435°C ocorre à degradação da proteína, de 435-700°C está relacionado á decomposição dos compostos e carbonização (MARKOVIC et al., 2004). A 750°C foi possível determinar o conteúdo de material inorgânico presente nas micropartículas.

Primeiramente foram analisadas as amostras obtidas por borrifamento em N_{2} , MF2,5RC5I, MF5RC5I, MF5RC10I e MF5C10I. Para uma comparação, realizamos a análise termogravimétrica com micropartículas de fibroína que não passaram pelo processo de reticulação e de calcificação por imersão alternada, ou seja, que foram borrifadas diretamente no nitrogênio liquido (MF5BDN₂) todas representadas na (Figura 19).

Através das curvas TGA que em nenhum caso ocorre modificação da estabilidade térmica da proteína, nem mesmo o conteúdo de água presente nas micropartículas é alterada, tem-se entre 6 e 8% de água para as micropartículas calcificadas e 11,5% para as micropartículas comparativas. Acima de 750°C foi analisado através dos resíduos a quantidade de material inorgânico presente nas micropartículas, neste caso oriundo da quantidade de fosfato de cálcio depositado durante o processo de calcificação por imersão alternada, visto que a essa temperatura o material orgânico carbonizou, o que não é observado na curva das micropartículas borrifadas diretamente no N₂.

Com relação a porcentagem dos resíduos houve variação das amostras das micropartículas calcificadas entre 9,6 a 29,9%, como mostrado na Tabela 2. Estes resultados indicam que o aumento da concentração da fibroína de 2,5 para 5% (MF2.5RC5I para MF5RC5I) induz a um aumento no conteúdo de fosfato de

cálcio, de 9,6 para 24,3%. O número de imersões alternadas do processo de mineralização (MF5RC5I e MF5RC10I) mostrou pouca alteração quanto a formação do fosfato de cálcio, que foi de apenas 1,7%.

A variação do conteúdo de fosfato de cálcio formado nas amostras não reticulada e reticulada que foram borrifadas no N₂ (MF5C10I e MF5RC10I) foi de 7,3%, mostrando que a ausência de reticulação favorece o processo de calcificação.



Figura 19: Curvas de TGA das amostras de MF2.5RC5I (—), MF5RC5I (—), MF5RC10I (—), MF5C10I (—) e MF5BDN₂ (—)

Foram analisadas também as micropartículas MF2.5BNaRC10I, MF2.5BNaC10I, MF5BNaRC10I e MF5BNaC10I borrifadas em Na₂HPO₄ que passaram pelo processo de calcificação e para comparação a MF5BDNa₂HPO₄ sem calcificação.

Diferentemente do que foi observado para as micropartículas provenientes do borrifamento em N₂, as micropartículas borrifadas em solução de Na₂HPO₄ (Figura 20) mostraram que a mineralização com a solução de fibroína de concentração de 2,5% (MF2.5BNaRC10I e MF2.5BNaC10I) têm um maior conteúdo de material inorgânico presente e superior a 80% e com diferença de apenas 2,2%

quando se compara em relação a reticulação. Contudo, quando comparada com as micropartículas de solução de fibroína com concentração de 5% tem-se valores ao redor de 65% em ambos os casos, com ou sem reticulação (MF5BNaRC10I e MF5BNaC10I).

Para as micropartículas borrrifadas diretamente em solução de fosfato de cálcio (MF5BDNa2HPO4) sem reticulação e calcificação observa-se a presença de resíduos oriundos da própria solução em que as partículas foram borrifadas e não ocorre uma estabilização na massa acima de 600°C, como observado para as micropartículas calcificadas, mostrando que alguma modificação no material formado ainda está ocorrendo mesmo a 800°C.



Figura 20: Curvas de TGA das amostras de MF2.5BNaRC10I (—), MF2.5BNaC10I (—), MF5BNaRC10I (—), MF5BNaC10I (—) e MF5BDNa₂HPO₄ (—).

| Micropartículas de | % de Resíduo |
|---------------------------------------|--------------|
| Fibroína | (750°C) |
| MF2.5RC5I | 9,6 |
| MF5BDN ₂ | 0 |
| MF5RC5I | 24,3 |
| MF5RC10I | 22,6 |
| MF5C10I | 29,9 |
| MF5BDNa ₂ HPO ₄ | ~65 |
| MF2.5BNaRC10I | 83,4 |
| MF2.5BNaC10I | 85,6 |
| MF5BNaRC10I | 65,3 |
| MF5BNaC10I | 65,0 |

Tabela 2: Porcentagem de resíduos inorgânicos presentes nasmicropartículas a 750°C

IV.4. Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X

Para verificar a relação cálcio e fósforo nas micropartículas após processo de calcificação por imersão alternada, foi feita a espectroscopia por energia dispersiva, como exemplificado na Figura 21 para as amostras MF5RC5I e MF5BNaRC10I. Os principais elementos encontrados foram o carbono (0,2keV), o oxigênio (0,5keV), o cálcio (3,7keV e 4,0keV) e o fósforo (2,0keV).



Figura 21: Espectro de dispersão de raios X das amostras de MF5RC5I (A) e MF5BNaRC10I (B).

Os valores de Ca/P foram obtidos pela média dos teores presentes nas micropartículas em três áreas distintas, e neste trabalho variaram de 1,49 a 2,19 como mostrado na Tabela 3, contudo estes valores são semi-quantitativos. De acordo com a mesma Tabela as micropartículas de fibroína apresentaram relações Ca/P para cinco imersões no processo de calcificação muito maiores (~2) em relação aos obtidos para dez imersões que ficam dentro de uma faixa onde se encontram vários fosfatos de cálcio (HABRAKEN, WOLKE, JANSEN, 2007).

| Micropartículas de | Relação |
|--------------------|------------|
| Fibroína | Ca/P(±sd)* |
| MF2.5CR5I | 2,02±0,01 |
| MF5CR5I | 2,19±0,04 |
| MF5CR10I | 1,52±0,01 |
| MF5C10I | 1,49±0,04 |
| MF2.5BNaRC10I | 1,72±0,04 |
| MF2.5BNaC10I | 1,76±0,03 |
| MF5BNaRC10I | 1,71±0,02 |
| MF5BNaC10I | 1,70±0,02 |

Tabela 3: Razão Ca/P dos sais depositados nas micropartículasmineralizadas.

*Média de três determinações

IV.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas do DSC (Figura 22) fornecem entendimento de possíveis eventos de térmicos em geral. O pico endotérmico aproximadamente em 100°C é atribuído a saída de água livre que não foi removida após secagem das micropartículas. Em aproximadamente 300°C têm-se a decomposição da micropartícula borrifada diretamente no nitrogênio liquido (MF5BDN2 (—)) o que não é visto nas micropartículas borrifadas diretamente na solução de fosfato de sódio (MF5BDNa2HPO4 (—)) que ocorre um pico endotérmico em 187°C, possivelmente referente a desidratação do fosfato disódio hidratado para anidro (Jager, Prinsloo, 2001).



Figura 22: Curvas DSC das amostras de micropartículas não reticuladas e não calcificadas: MF5BDN₂ (—) e MF5BDNa₂HPO₄ (—).

Com as análises das caracterizações apresentados neste trabalho foi possível verificar que as micropartículas de fibroína mineralizadas possuem uma deposição de fosfato de cálcio.

O borrifamento da solução de fibroína mostrou ser um método eficiente para a formação de micropartículas a serem calcificadas independentemente se forem borrifadas em N₂ ou em solução de Na₂HPO₄, de forma que durante o processo o material utilizado não é desperdiçado.

As micropartículas obtidas apresentaram tamanhos e formas diferentes de acordo com cada método utilizado, mas independente da morfologia foi possível verificar a formação de fosfato de cálcio na superfície de todas as amostras e no interior de algumas.

Em relação a concentração, as micropartículas de 2,5% não apresentaram forma definida em comparação com a de 5% que obtiveram formato arredondado resultado já visto em pesquisas anteriores de Montanha e Yoshioka (2011). Além do formato, a reticulação para as micropartículas borrifadas em solução de Na₂HPO₄ também favoreceu a deposição de cálcio e fósforo, pois as micropartículas que foram reticuladas referiram um valor de mineralização maior em relação as que não foram reticuladas. A análise por DSC mostra que as micropartículas de fibroína borrifadas em N₂ calcificadas não apresentaram transição térmica até a temperatura de 120°C, resultado considerado importante para um biomaterial por poder ser esterilizado em autoclave a seco.

As borrifadas em fosfato de sódio apresentam a transição de saída de água nesse mesmo intervalo. Esses resultados são diferentes daqueles observados para o colágeno, que também é muito utilizado em processo de mineralização, mas que tem desnaturação e perda de água nesse mesmo intervalo (BATISTA, 2008), não sendo passível de esterilização por autoclave o que ressalta a importância das micropartículas de fibroina calcificadas devido a possibilidade de sua esterilização pelo método citado.

Assim, pode-se mostrar pelos resultados apresentados por TG, MEV e EDX que a calcificação das micropartículas de fibroína ocorre pelas duas metodologias empregadas. Pelo processo de borrifamento em N₂, têm-se uma formação de fosfato de cálcio que pode ser hidroxiapatita deficiente em cálcio (Ca/P<1,67) em 10 imersões. No processo de borrifamento em de Na₂HPO₄, mostra inicialmente um fosfato disódio hidradato, e quando as micropartículas passam por calcificação, também pode ter a formação da hidroxiapatita que é estável a temperatura até 800 °C (MARKOVIC et al., 2004), mas neste caso com excesso de íons Ca (Ca/P>1,67).

V. CONCLUSÕES

Foram realizados dois procedimentos diferentes para obtenção das micropartículas de fibroína calcificadas, por borrifamento da solução ternária de fibroína em N₂ e por borrifamento em Na₂HPO₄.

As micropartículas borrifadas em N₂ apresentaram forma arredondada e as borrifadas em Na₂HPO₄ não apresentaram forma definida.

Os resultados das caracterizações mostraram que o teor de calcificação obtido pelos dois métodos utilizados é diferente, sendo de aproximadamente 29% para as micropartículas borrifadas em N₂ com a formação de fosfato de cálcio que pode ser hidroxiapatita deficiente em cálcio (Ca/P<1,67).

As micropartículas borrifadas em Na₂HPO₄ a calcificação foi de aproximadamente 80% que também pode ter a formação da hidroxiapatita, mas neste caso com excesso de íons Ca (Ca/P>1,67).

As micropartículas de fibroína calcificadas, não apresentaram transição térmica até a temperatura de 120°C, possibilitando a esterilização em autoclave a seco das micropartículas favorecendo as micropartículas calcificadas em comparação com proteínas que desnaturam a mesma temperatura.

VI. TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros e possível comprovação dos resultados obtidos, tem-se:

Difrações de Raios X para comprovação da estrutura do fosfato de cálcio obtido pela calcificação;

Testes de citotoxicidade e biocompatibilidade para verificar possíveis propriedades nocivas das micropartículas em relação as células;.

Testes in vivo para avaliar possível crescimento celular.

VII. REFERÊNCIAS¹

ALTMAN, G. H. et al. Silk based biomaterials. Biomaterials, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003. ISSN 0142-9612.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. Bras Patol Med Lab, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

ANDIA, D. C.; CERRIB, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006. ISSN 1807-2577.

BATISTA, T. M. Mineralização in vitro de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos. Dissertação de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CAO, Y. WANG, B. Biodegradation of Silk biomaterials. Int. J. Mol. Sci, v.10, p. 1514-1524, 2009.

EL BRIAK-BENABDESLAM, H. et al. Dry Mechanosynthesis of Strontium-Containing Hydroxyapatite from DCPD + CaO + SrO. Engineering Materials, v.254-256, p. 103-106, 2003.

FUENTES, M. G.; MEINEL, A. J.; MERKLE, H. P. Silk Fibroin-hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. Biomaterials, v. 30, p. 5068-5076, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 234-248, 2007.

HARDY, J. O.; LIN, M. R.; SCHEILBEL, T. Polymeric materials based on silk proteins. Polymer, v. 46, p. 4309-4327, 2008.

INTROINI, S. Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por Microtomografia Tridimensional por Raio-X. Dissertação de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

JAGER, H. J.; PRINSLOO, L. C. The dehydration of phosphates monitored by DSC-TGA and in situ Roman apectroscopy. Elsevier, thermochimica Acta, v. 376, p. 187-196, 2001.

KAWACHI E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Química Nova, v. 23, n. 4, São Paulo, 2000.

KIM, H. J. et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. Bone, v. 42, p. 1226-1234, 2008.

KIRSCHBAUER, K. G. Mineralização in vitro de matrizes colagênicas derivadas de tendões calcâneos bovinos e de avestruz. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Carlos, 2009.

KONG, X. D.; WANG X. M.; CUI F. Z. Preparation of Hydroxyapatite-Fibroin Nanocomposites. Engineering Materials, v. 228-289, p. 191-194, 2005.

KRAVICZ, M. H. Preparação e caracterização de membranas obtidas a partir de blendas de fibroína da seda e Poli (álcool vinílico). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

KUNDU, B.; SUBHAS, B.; KUNDU, C. Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy. Progress in Polymer Science, v. 35, p. 1116-1127, 2010.

MARCKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. J. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. Journal of Research of the National Institute of Standars and Technology, v. 109, p. 553-568, 2004.

MEINEL, L. et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. Bone, v. 39, p. 922-931, 2006.

MONDAL, K.; TRIVED, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori. J. Env. Sci, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.

MONTANHA, C. V.; YOSHIOKA, S. A. Processo de preparação de esferas ou micropratículas de colágeno ou de fibroína, e esferas ou micropartículas de colágeno ou de fibroína obtidas pelo mesmo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Pl 1.108.774-1.

NAPOLITANO, M. A. Obtenção e caracterização de fosfato de cálcio visando aplicações médicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

NOGUEIRA, G. M. et al. In Vitro Calcification of Silk Fibroin hydrogel. Key Engineering Materials, v. 361-363, p. 503-506, 2008.

POLAK, R. Preparação, avaliação físico-química e biológica in vitro de pericárdio bovino conjugado com fibroína de seda-quitosana via liofilização e irradiação. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2010.

ROLIM, A. E. H. Avaliação de Esferas de Hidroxiapatita, dopados ou não com Estroncio no reparo de defeito ósseo critico, em calvário de rato. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

SALEH, J. et al. Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo, XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais, Porto Alegre, 2004.

SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SUSAN, S. et al. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, v. 18, 2000.

VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. <u>Silk as a biomaterial</u>, Progress in Polymer Science, v. 3n. 89, p. 991-1007, 2007. ISSN 0079-6700.

XU, W. et al. Preparation and Characteristics of gradient Silk Fibroin-Hydroxyapatite. Porous Composites Materials Science Forum, v. 610-613, p. 1231-1236, 2009.

WANG, Y.; YANG, C. Biomemetic formation of hydroxyapatite-collagen matrix composite. Advanced Engineering Materials, v. 71, p. 108-117, 2004.

WENK, E.; MERKLE, H. P.; MEINEL, L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications, Journal of Controlled Release, 2010.

WESKA, R. F. et al. Porous silk Fibroin Membrane as a Potential Scaffolds for Bone Regeneration. Key Engineering Materials, v. 396-398, p. 187-190, 2009.

ZHANG, Q.; YAN, S.; LI, M. Silk Fibroin Based Porous Materilas. Materials, v. 2, p. 2276-2295, 2009.