UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Dissertação para obtenção do
grau

de MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bexiga, Natália Marchesan
B571p Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes / Natália Marchesan Bexiga. -- São Paulo, 2014.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Polakiewicz, Bronislaw

1. Matéria prima : Química farmacêutica 2. Seda I. T. II. Polakiewicz, Bronislaw, orientador.

615.191 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2014

Natália Marchesan Bexiga

Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Bronislaw Polakwicz, pela confiança, compreensão, auxílio e orientação durante todo o decorrer do trabalho.

Ao professor Adalberto Pessoa Jr por todo o auxílio e incentivo.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração.

À amiga Adriana Maia Bezerra, por todo companheirismo, paciência, dedicação e incentivos constantes.

À amiga Mariana Agostini de Moraes, por todo auxílio e amizade.

Ao amigo Marcos Camargo Knirsch, pelo apoio incondicional.

Aos funcionários do departamento, por toda ajuda.

Aos amigos e companheiros de laboratório, pela amizade e companheirismo.

Ao meu pai João Roberto Bexiga, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial.

À agência de fomento Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A FIBROÍNA	1
1.2 A SERICINA	5
1.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA	7
1.4 OS HIDROGÉIS	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA FIBROÍNA	14
2.2 PROPRIEDADES DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA	20
2.3 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE	27
2.4 MECANISMOS DE GELIFICAÇÃO	33
2.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS DE FIBROÍNA DE SEDA	38
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVOS GERAIS	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E COMPLEMENTARES	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 REMOÇÃO DA SERICINA	47
4.2 PREPARO DAS DISPERSÕES DE FIBROÍNA	48
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES	48
4.3.1 ENSAIOS DE TEXTURA	49
4.3.2 ENSAIOS REOLÓGICOS	49
4.6 PREPARO DOS HIDROGÉIS	50
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	51
4.7.1 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)	51

4.7.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS –X (DRX)	51
4.7.3 INFRAVERMELHO (FTIR)	52
4.7.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 REMOÇÃO DA SERICINA	54
5.2 PREPARO DAS DISPERSÕES DE FIBROÍNA	55
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES	61
5.3.1 ENSAIOS DE TEXTURA	62
5.3.2 ENSAIOS DE REOLOGIA	63
5.4 PREPARO DOS HIDROGÉIS	72
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	78
5.5.1 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)	79
5.5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	86
5.5.3 INFRAVERMELHO (FTIR)	94
5.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	101
6 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	122
APÊNDICE	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura primária da fibroína.	2
Figura 2. Conformações (a) hélice- α e (b) folha- β da fibroína.	3
Figura 3. Fibras de seda Meada 21 Denier.	53
Figura 4. Fibras de seda Frison Extra.	53
Figura 5. Fibras de seda Frison Extra antes e após o processo de degomagem (da esquerda para direita).	54
Figura 6. Fibras de seda Meada 21 Denier antes e após o processo de Degomagem (da esquerda para direita).	54
Figura 7. Dispersão obtida a partir de 10g da seda Frison Extra degomada e 100mL de solução CaCl_2 EtOH- H_2O na proporção molar 1:2:8.	56
Figura 8. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Frison Extra degomada e 100mL de solução aquosa de LiCl a 9.5 M.	56
Figura 9. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Meada 21 Denier não degomada e 100mL de solução LiCl a 9.5 M.	57
Figura 10. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Meada 21 Denier degomada e 100mL de solução LiCl-EtOH- H_2O na proporção 10:18:72 (p/p).	57
Figura 11. Variação da $F_{\text{máx}}$ entre as diferentes amostras avaliadas.	62
Figura 12. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra sem degomar em LiCl: H_2O a 9.5 M.	64
Figura 13. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra degomada em LiCl: H_2O a 9.5 M.	64
Figura 14. Comportamento reológico da dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em LiCl: H_2O a 9.5 M.	65
Figura 15. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra degomada em LiCl:EtOH: na proporção 10:18:72 (p/p).	65
Figura 16. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra sem degomar em CaCl_2 :EtOH: H_2O na proporção molar 1:2:8.	67
Figura 17. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra degomada em CaCl_2 :EtOH: H_2O na proporção molar 1:2:8.	67
Figura 18. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra sem degomar em LiCl:EtOH: H_2O na proporção 10:18:72 (p/p).	68
Figura 19. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em CaCl_2 :EtOH: H_2O na proporção molar 1:2:8.	68
Figura 20. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em CaCl_2 :EtOH: H_2O na proporção molar 1:2:8.	69

Figura 21. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	69
Figura 22. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	70
Figura 23. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	70
Figura 24. Diálise da dispersão de fibroína.	73
Figura 25. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda Frison Extra não degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	73
Figura 26. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda Frison Extra degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	74
Figura 27. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda Meada 21 Denier não degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	74
Figura 28. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	79
Figura 29. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	80
Figura 30. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	80
Figura 31. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	81
Figura 32. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	81
Figura 33. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	82
Figura 34. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	82
Figura 35. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	83
Figura 36. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	83
Figura 37. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	84
Figura 38. Análise termogravimétrica (TGA) de higrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	84

Figura 39. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p).	85
Figura 40. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	87
Figura 41. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	87
Figura 42. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	88
Figura 43. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	88
Figura 44. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:H ₂ O a 9.5 M.	89
Figura 45. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:H ₂ O a 9.5 M.	89
Figura 46. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:H ₂ O a 9.5 M.	90
Figura 47. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:H ₂ O a 9.5 M.	90
Figura 48. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p).	91
Figura 49. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p).	91
Figura 50. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p).	92
Figura 51. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p).	92
Figura 52. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	94
Figura 53. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em CaCl ₂ :EtOH:H ₂ O na proporção molar 1:2:8.	95

Figura 54. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	95
Figura 55. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	96
Figura 56. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	96
Figura 57. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	97
Figura 58. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	97
Figura 59. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	98
Figura 60. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	98
Figura 61. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{LiCl}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	99
Figura 62. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{LiCl}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	99
Figura 63. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{LiCl}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	100
Figura 64. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	102
Figura 65. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	103
Figura 66. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	104
Figura 67. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	105

Figura 68. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:H ₂ O a 9.5 M (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	106
Figura 69. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	107
Figura 70. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	108
Figura 71. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H ₂ O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de sericina nas amostras de seda Frison Extra e Meada 21 Denier.	55
Tabela 2 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	58
Tabela 3 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.	58
Tabela 4 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	59
Tabela 5 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.	76
Tabela 6 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema LiCl a 9.5 M.	76
Tabela 7 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).	77

RESUMO

BEXIGA, N. M. **Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A fibroína de seda é uma proteína sintetizada pela espécie *Bombyx mori*, popularmente conhecida como bicho-da-seda. O casulo de *Bombyx mori* é composto por fibras de fibroína e pela sericina, responsável por unir os fios de fibroína. A fibroína é um polímero natural bastante versátil e pode ser processada de maneira a formar materiais como filmes, microesferas e hidrogéis. Os hidrogéis são redes tridimensionais formadas por macromoléculas e capazes de absorver grande quantidade de água sem perder sua integridade estrutural. Devido às características como biocompatibilidade, elevado teor de água e boas propriedades de difusão de oxigênio e nutrientes, os hidrogéis são amplamente utilizados em pesquisa biomédica. A fibroína é biodegradável, termicamente estável, altamente cristalina, flexível, resistente à tração, além de insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. A fibroína derivada das sedas Frison Extra e Meada 21 Denier foi separada da sericina pelo processo de degomagem, onde as fibras de seda foram imersas em soluções alcalinas e submetidas à aquecimento com posterior remoção de sericina. Os fios de fibroína foram dispersos nas soluções de $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{LiCl}\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Diferenças nos tempos de dispersão para amostras distintas degomadas ou não foram observadas, bem como para cada um dos sistemas salino/solvente empregados. Após o processo de dispersão da fibroína as dispersões obtidas foram caracterizadas quanto à textura e reologia. As amostras não degomadas apresentaram maior firmeza e aumento do módulo elástico G' . Algumas amostras contendo sericina ou etanol apresentaram comportamento newtoniano. Em uma segunda etapa, as amostras foram dialisadas para a produção do hidrogel e em seguida liofilizadas. Não houveram diferenças entre os tempos de gelificação para amostras distintas. Finalmente objetivou-se a caracterização dos hidrogéis obtidos por meio de ensaios termogravimétricos, difratométricos, espectrofotométricos e microscópicos. Todos os hidrogéis de fibroína de seda apresentaram alta resistência térmica, com presença predominante da conformação em folha- β da fibroína. Morfologicamente, os hidrogéis obtidos a partir de dispersões em $\text{LiCl}\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ apresentaram aspecto de rede enovelada, enquanto que os hidrogéis oriundos de dispersões em $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ apresentaram estrutura lamelar.

Palavras-chave: Fibroína. Hidrogéis. Sericina. Seda.

ABSTRACT

BEXIGA, N. M. **Preparation and comparative evaluation of the physical-chemical properties of silk fibroin hydrogels with varied sericin content obtained from calcium salts and lithium in various solvent systems.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The silk fibroin is a protein synthesized by *Bombyx mori* species, popularly known as silkworm silk. The *Bombyx mori* cocoon is composed of fibroin fibers and the sericin protein, which is responsible for joining the fibroin yarns. The fibroin is a quite versatile natural polymer and can be processed to form materials such as films, microspheres and hydrogels. Hydrogels are three-dimensional networks formed by macromolecules and capable of absorbing large quantities of water without losing their structural integrity. Due to biocompatibility, ability to mimic biological tissues, high water content and good diffusion properties of oxygen and nutrients, hydrogels are widely used in biomedical research. The fibroin is biodegradable, thermally stable, highly crystalline, flexible and tensile resistant. Besides, it is insoluble in water and in most organic solvents. The fibroin from Frison Extra and Meada 21 Denier silks was separated from the sericin by the degumming process, whereby the silk fibers were immersed in alkaline solutions and subjected to heating with subsequent dissolution and removal of sericin. Fibroin yarns were dispersed in various solutions: $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$; $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$; and $\text{LiCl}\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$. It was observed that according to the fibroin type and solvent solution used the time to achieve dispersion varied. Texture and rheology were determined for every sample after dispersion. All non-degummed samples had shown increased firmness and elastic module G' . It was observed that the samples presented a wide behavior range, some that contained sericin or ethanol presented Newtonian behavior. Subsequently the samples were dialyzed to obtain the hydrogels and lyophilized. All samples (with exception of two) have formed hydrogels in a 24 hours period. The lyophilized hydrogels were analyzed by thermogravimetry, diffractometry, spectrophotometry and microscopy. All silk fibroin hydrogels presented high thermic resistance with β -sheet predominance. Morphologically, all hydrogels obtained from $\text{LiCl}\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CaCl}_2\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ solutions had shown entangled aspect while hydrogels from $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ solutions had shown lamellar structures.

Keywords: Fibroin. Hydrogels. Sericin. Silk.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FIBROÍNA

A seda constitui uma fibra natural produzida pela espécie *Bombyx mori* popularmente conhecida como bicho-da-seda, e também por larvas de outras espécies, porém de difícil cultura. Trata-se da espécie mais utilizada pela indústria têxtil há muitos séculos no oriente, e nos últimos duzentos anos na França. A partir de 1911 imigrantes japoneses que chegaram no interior do estado de São Paulo disseminaram tal cultura (LIN *et al.*, 2011).

Entretanto, existem relatos que remetem ao cultivo do bicho-da-seda onde hoje se localiza o bairro das Perdizes, na grande São Paulo, desde 1848 (PACHECO, 1983). A seda possui características interessantes como maleabilidade, brilho e maciez, que constituem aspectos de extrema importância para a indústria têxtil e vestuário. Em décadas passadas, muita atenção foi dada a estrutura e propriedades da fibroína, o principal componente da seda, e que possui uma imensa variedade de aplicações que vão desde o segmento têxtil até o campo biomédico, especialmente como biomaterial para engenharia tecidual (LIN *et al.*, 2011).

A fibroína é composta por duas cadeias, uma de alto peso molecular, em torno de 325 kDa, e a outra de baixo peso molecular, com aproximadamente 25 kDa, unidas por uma camada de sericina (ALTMAN *et al.*, 2003).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

A sericina exerce a função de manter os fios de fibroína unidos, e está associada à resposta imunológica do *Bombyx mori*, isto é, possui a função de proteção do casulo durante o período de crescimento (WENK *et al.*, 2010; ALTMAN *et al.*, 2003).

Na estrutura da fibroína, representada pela Figura 1 coexistem dois domínios, um amorfo, também chamado de seda I, e outro cristalino, ou seda II, sendo que o último é composto por uma série de repetições de alanina e glicina, conectados pelos aminoácidos serina ou tirosina. A porção cristalina da fibroína possui uma estrutura secundária em folha- β , o que confere à proteína características como resistência a tração por exemplo. (KITAGAWA; YABUKI, 2011; ALTMAN *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura primária da fibroína (NOGUEIRA, 2005)

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Na seda I, o polipeptídeo constituído por uma hélice (Figura 2a) está orientado para a direita, é mantido por pontes de hidrogênio e apresenta desde a ausência de estrutura secundária até cristais extremamente ordenados. Em contrapartida, a conformação em folha- β (Figura 2b) é resultante da formação de pontes de hidrogênio entre dois ou mais polipeptídeos adjacentes, resultando em uma estrutura termodinamicamente estável (VEPARI; KAPLAN, 2007).

Figura 2. Conformações (a) hélice- α (WIKIMEDIA COMMONS, 2009) e (b) folha- β da fibroína (GARRETT; GRISHAM, 2009).

De acordo com Lawrence *et al* (2008) podem existir simultaneamente os três arranjos estruturais, que por sua vez, podem ser selecionados por meio solventes orgânicos, bem como por temperaturas elevadas.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Diversas soluções têm sido utilizadas como solventes para a produção de dispersões de fibroína tais como LiBr-H₂O, CaCl-EtOH-H₂O, LiBr-EtOH-H₂O, Ca(NO₃)₂-MeOH, LiBr-EtOH-H₂O, LiSCN-H₂O e NaSCN-H₂O (HIRABAYASHI *et al.*, 1990; LI *et al.*, 2001; MATHUR *et al.*, 1997; MATSUMOTO *et al.*, 1997; AGARVAL *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 1997).

Nesta pesquisa foram escolhidos os seguintes sistemas de solventes: CaCl-EtOH-H₂O, LiCl-H₂O e LiCl-EtOH-H₂O, além disso foram utilizou-se dois tipos de fibras distintos com relação ao processamento da seda. Através de uma avaliação visual foram observadas diferenças no aspecto tanto das dispersões de fibroína quanto dos hidrogéis obtidos após o processo de diálise, além dos tempos distintos de processamento das amostras que também foram observados conforme o sistema solvente empregado.

Posteriormente objetivou-se a caracterização e a avaliação comparativa dos hidrogéis obtidos por meio dos diferentes sistemas de dispersão e com conteúdo variado de sericina, a fim de se estabelecer uma comparação entre algumas propriedades físico-químicas, tais como morfologia, cristalinidade, propriedades térmicas, e outras características inerentes ao tipo de amostra e processamento do material, além dos efeitos ocasionados pelo processo de degomagem das fibras de fibroína.

1.2 A SERICINA

A sericina constitui uma proteína globular, solúvel em água e com ampla faixa de massa molecular, variando de 10 a mais de 300 kDa (ZHANG *et al.*, 2004). É composta por 17 aminoácidos tais como serina (31%), glicina (19,1%), ácido aspártico (17,8%) e treonina (8,0%).

A sericina pode estar estruturada na forma randômica enovelada ou amorfa e, em menor extensão, como folha- β (PADAMWAR, 2005). A sericina pode ser reticulada, copolimerizada ou misturada com outro material macromolecular, principalmente polímeros sintéticos, para produção de materiais com melhores propriedades (SAROVART *et al.*, 2003).

Os peptídeos da sericina de alta massa molecular vem sendo avaliados quanto ao emprego como biomateriais degradáveis, biomembranas, polímeros compostos, tecidos e hidrogéis. Em contrapartida, os peptídeos hidrolisados são empregados em produtos cosméticos, tais como produtos para cabelos e pele.

No que se refere ao campo alimentício e cosmético, Kato *et al* (1998) avaliaram o emprego de sericina como agente antioxidante pela inibição da enzima tirosinase, uma polifenol oxidase, responsável pelas reações de Maillard em alimentos e síntese de melanina, evidenciando uma possível ferramenta para as indústrias alimentícia e cosmética.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Adicionalmente, a sericina apresentou propriedades de hidratação da pele e ação antirrugas (KATO *et al.*, 1998), atividade antibacteriana e resistência à radiação ultra-violeta (ZHANG, 2002). Também mostrou alta afinidade por outras proteínas, capaz de se ligar à queratina da pele e dos cabelos formando um filme resistente, hidratante e protetor, proporcionando boas propriedades de barreira (TYRRELL *et al.*, 2003).

Yao (2004) avaliou a relação entre a massa molecular de peptídeos de sericina e os efeitos nos cuidados com os cabelos. Avaliou-se a influência da adsorção desses peptídeos na superfície e nas propriedades mecânicas dos cabelos humanos. Os peptídeos com maior afinidade ao cabelo humano, formaram um filme transparente em sua superfície, protegendo os fios dos danos ocasionados por fatores externos, além de conferir brilho e elasticidade, facilitando a penetração para a reparação do cabelo danificado.

Padamwar *et al* (2005) demonstraram propriedades hidratantes de géis de sericina com pluronic PF-127 e carbopol 934 P, por meio da diminuição da impedância e pelo aumento nos níveis de hidroxiprolina e hidratação de células epidérmicas. Adicionalmente, observou-se diminuição da perda de água transepidermal (TEWL), decorrente do efeito oclusivo, que previne a perda de água da camada superior da pele.

O emprego da sericina em um produto cosmético para unhas foi patenteado por Yamada *et al* (2007). De acordo com estes os autores, a

sericina na concentração de 0.2 a 20%, é capaz de diminuir a secura das unhas, tornando-as brilhantes e mantendo ou melhorando sua saúde.

Aramwit *et al* (2007) também avaliaram os efeitos da sericina na cicatrização e redução do tamanho de feridas em ratos. Um creme contendo 8% de sericina não apresentou efeito tóxico em ratos, mostrando-se seguro e biocompatível. As reações inflamatórias da pele, em feridas tratadas com sericina, apresentaram menor intensidade com relação ao controle. A cicatrização das feridas tratadas com o creme à base de sericina foi mais rápida do que a cicatrização das feridas tratadas com o controle, 11 e 15 dias respectivamente.

1.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA

Para que a fibroína possa ser utilizada em uma variedade de aplicações dentro do segmento biotecnológico, como na reparação e regeneração tecidual, é necessário obter-se primeiramente uma dispersão de fibroína, com posterior regeneração em forma de pós, filmes, membranas ou géis, dependendo da aplicação (ALTMAN *et al.*, 2003).

A fibroína é separada da sericina por meio de um processo denominado degomagem. A fim de remover a sericina e manter as fibras de fibroína estáveis, diversos tipos de procedimentos vem sendo utilizados, como por exemplo a adição de água fervente contendo álcalis e detergentes às fibras. (ALTMAN *et al.*, 2003).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Em uma segunda etapa, a fibroína pode ser dispersa em soluções aquosas e orgânicas de sais, bem como em soluções concentradas de ácidos (SASHINA *et al.*, 2006). A dissolução limitada das fibras ocorre devido à presença de pontes de hidrogênio inter e intramoleculares, às suas propriedades físico-químicas e à sua alta cristalinidade (CHEN *et al.*, 2001).

Um solvente para esse uso deve ser capaz de penetrar na fibra promovendo a solvatação e evitar os fenômenos de derivatização ou despolimerização (OHGO *et al.*, 2003).

Diversos tipos de solventes têm sido utilizados para o preparo da dispersão de fibroína de seda. O solvente mais comum é a solução aquosa de brometo de lítio, embora outras misturas tais como soluções hidroalcoólicas de cloreto de cálcio, brometo de lítio, tiocianato de lítio e tiocianato de sódio também sejam utilizadas (CHEN *et al.*, 2001)

A alta concentração salina da solução é capaz de promover a dispersão dos fios por meio do aumento da condutividade e força iônica do meio, levando ao rompimento das pontes de hidrogênio e a conseqüente dissolução dos polipeptídeos (OHGO *et al.*, 2003). O etanol também auxilia o processo de dispersão evitando uma desnaturação rigorosa (CHEN *et al.*, 2001).

Finalmente, para que se possa obter o hidrogel de fibroína, um processo de diálise após a dispersão é realizado, resultando em uma suspensão isenta de sais e solventes (CHEN *et al.*, 2001).

1.4 OS HIDROGÉIS

Os hidrogéis são constituídos por redes tridimensionais formadas por macromoléculas e capazes de absorver uma grande quantidade de água mantendo íntegra sua estrutura (RATNER *et al.*, 2004).

Para que se possa reticular cadeias poliméricas, e obter uma conseqüente gelificação, podem ser utilizados agentes químicos ou físicos para promover o processo. No caso da reticulação química são utilizados agentes como radiação UV, raios X ou raios γ , que podem ocasionar a formação de resíduos tóxicos. Em contrapartida, na reticulação física, podem ser utilizados agentes como pH, temperatura, concentração de polímero, dentre outros, de forma que proteínas e células podem ser aprisionados na estrutura tridimensional mantendo-se sua integridade (HU *et al.*, 2010).

Em função de sua biocompatibilidade, elevado teor de água e capacidade de permitir a difusão do oxigênio e nutrientes, os hidrogéis estão sendo amplamente empregados no campo biomédico, principalmente na engenharia tecidual, pois são capazes de suportar o crescimento celular e sofrer uma degradação na mesma taxa de formação do novo tecido, e neste caso são denominados *scaffolds* (RATNER *et al.*, 2004).

Zhong *et al* (2012) prepararam hidrogéis por meio da mistura do copolímero PLA-PEG-PLA, que possui uma transição sol-gel próximo a temperatura corporal, com uma solução de fibroína de seda, a fim de acelerar o

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

processo de agregação na solução de fibroína resultando em um hidrogel com estrutura nanofibrosa e porosa, similar a estrutura do colágeno na matrix extracelular.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) mostraram que o hidrogel de copolímero/fibroína de seda apresentou uma estrutura lamelar em camadas contendo diversos nanoglóbulos com um núcleo central hidrofóbico que, segundo estes autores, serviria como reservatório para o carreamento de fármacos e fatores de crescimento. Através dos ensaios espectrofotométricos (FTIR) verificou-se que ocorre um aumento do conteúdo de folha- β durante o processo de gelificação, o que pôde ser confirmado pelas análises por difração de raios-X onde picos a 20.4, 19.5 e 24.6 indicaram a formação de seda II no decorrer da gelificação. Finalmente as análises térmicas (DTA) revelaram um pico de degradação do hidrogel copolímero/fibroína a 279°C, indicando a formação de folha- β durante o processo de gelificação. Os picos de degradação da solução de copolímero/fibroína e do hidrogel de fibroína foram menores do que aqueles do hidrogel copolímero/fibroína, ilustrando a influência que o copolímero exerce sobre a estrutura cristalina da fibroína de seda.

De forma similar, Hu *et al* (2012) propuseram o preparo de um hidrogel injetável composto por fibroína de seda e poliuretano por meio de cross-linking químico sob condições fisiológicas. Foi relatado que em doenças

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

degenerativas de disco o hidrogel pode preencher completamente uma área degenerada, reduzir o risco de migração do implante e a subsequente perda de altura do disco intervertebral, além de minimizar defeitos cirúrgicos .

Ainda no campo da engenharia tecidual, Nogueira *et al* (2008) verificaram que hidrogéis de fibroína de seda possuem a habilidade de atuar como substrato para a deposição de fosfato de cálcio com aplicação na reparação de tecido ósseo. As vantagens relacionam-se a resistência mecânica, a resistência ao crescimento microbiano, a biocompatibilidade dentre outras propriedades.

Foi demonstrado através de microscopia eletrônica de varredura (SEM) que as amostras de hidrogéis possuem uma superfície porosa irregular, o que pode favorecer a deposição de compostos de cálcio. Com a quebra das amostras visualizou-se poros consideravelmente maiores do que aqueles observados na superfície.

O perfil de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) indicou que hidrogéis imersos em 1.5 SBF foram capazes de induzir a deposição de fosfato de cálcio nos poros e superfície após o teste de calcificação.

A habilidade da fibroína na deposição de fosfato de cálcio pode estar relacionada a afinidade entre suas moléculas e sais de íons bivalentes, indicando que a superfície orgânica do hidrogel de fibroína de seda pode desempenhar um papel importantíssimo na deposição de fosfato de cálcio.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Além da influência da superfície, a termodinâmica de nucleação pode ser favorecida pela utilização de soluções supersaturadas, ou seja, com alta concentração iônica, o que pôde ser confirmado pela deposição mais acentuada de fosfato de cálcio nas amostras que foram imersas na solução 1.5 SBF.

Zaharia *et al* (2012) também realizaram ensaio de mineralização para amostras de hidrogéis de fibroína de seda/poliacrilamida (RSF/PAA) em diferentes composições. Para as composições 30/70 e 50/50 observou-se uma camada mineral mais uniforme, com alta concentração de microglóbulos de tamanho reduzido e aspecto de agulha. A medida que o conteúdo de fibroína é reduzido a fase mineral adquire aspecto de plaquetas (PAA pura), e o conteúdo de microglóbulos é reduzido.

As análises espectroscópicas por dispersão de energia (EDS) identificaram Ca/P na superfície das amostras RSF/PAA em proporções de 1.5 até 1.7. Além disso, nas curvas obtidas através das análises por XRD para as amostras nas composições 50/50, 30/70 e 20/80, todos os picos foram atribuídos a hidroxiapatita depositada na superfície dos hidrogéis, de maneira que a intensidade desta deposição aumentou com o aumento da concentração de fibroína nas amostras.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Os hidrogéis de fibroína também têm sido utilizados como suporte para incorporação de anticorpos monoclonais, servindo como um dispositivo de liberação modificada (GUZIEWICZ *et al.*, 2011).

Guziewicz *et al* (2011) verificaram que o controle da liberação local sustentada de anticorpos incorporados a hidrogéis liofilizados de fibroína de seda está primariamente relacionado às interações hidrofílicas/hidrofóbicas entre a fibroína de seda e os respectivos anticorpos. Adicionalmente, observou-se que a resistência à hidratação destes “liogéis”, como foram denominados, constitui um parâmetro secundário relacionado ao controle da liberação sustentada, que por sua vez refere-se à densidade da rede de fibroína na conformação em folha- β neste tipo de material.

Além da aplicação como matrizes para a incorporação de anticorpos bem como na regeneração tecidual, os hidrogéis vem sendo amplamente investigados como suporte para a imobilização enzimática. Zhang *et al* (2011) dissolveram fibroína de seda em solução altamente concentrada de CaCl_2 . Após obtida a seda líquida, adicionou-se a enzima L-asparaginase (ASNase) e posteriormente um excesso de acetona. A enzima não só permaneceu ativa como também foi bem imobilizada formando-se nanopartículas de fibroína de seda (SFNs).

O bioconjugado com enzimas altamente ativas apresentou parâmetros cinéticos tais como pH, temperatura reativa, termoestabilidade em solução e

constante de Michaelis similares a enzima na forma nativa. O bioconjugado resistiu a alta temperatura de 90 °C por trinta minutos, teve uma recuperação de 90%, um excelente aumento na resistência à digestão por tripsina e estabilidade na solução de armazenamento (ZHANG *et al.*, 2011)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA FIBROÍNA

Atualmente, diversas aplicações da fibroína de seda no campo biomédico têm sido investigadas, o que pode ser atribuído a algumas características inerentes a esta proteína, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e propriedades mecânicas diferenciadas (ZAHARIA *et al.*, 2012).

Uma vez obtida, a solução de fibroína pode ser processada de formas variadas para obtenção de filmes, hidrogéis, membranas ou até mesmo misturas com outros polímeros, incluindo modificações superficiais e funcionalizações (ZAHARIA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012).

Zaharia *et al* (2012) obtiveram matrizes de fibroína-álcool polivinílico (PVA) e filmes modificados com grupamentos acídicos, utilizando-se os ácidos itacônico (IA), 2-acrilamido-2-metilpropano sulfônico (AMPSA) e 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Os ensaios de mineralização indicaram que os filmes de fibroína modificados com os grupamentos carboxílico e sulfônico possuem o

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

potencial de induzir em sua superfície a deposição de apatita, revelando o uso potencial deste material na reparação óssea. Adicionalmente, as medidas do ângulo de contato, isto é, parâmetro relacionado à adesão e proliferação celular, revelaram o caráter hidrofílico dos filmes de fibroína, indicando que os filmes de fibroína-PVA possuem o potencial para que possam ser utilizados na reparação de vasos sanguíneos.

Ainda no contexto de modificações superficiais, de acordo com Kardestuncer *et al* (2006) fibras de fibroína modificadas com o peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico imobilizado proporcionaram maiores benefícios no que se refere a adesão, diferenciação e proliferação de tenócitos humanos *in vitro* quando comparadas com fibras de seda não modificadas. Observou-se que a modificação de fibras de fibroína com arginina-glicina-ácido aspártico aumentou substancialmente a adesão de fibroblastos do ligamento cruzado anterior, bem como a produção de colágeno *in vitro* (CHEN *et al.*, 2003). Além disso, estes scaffolds podem ocasionar calcificação e maior estruturação de matriz extracelular (MEINEL *et al.*, 2004).

As misturas de fibroína e outros polímeros têm sido amplamente investigadas com relação a otimização das propriedades destes materiais. Yang *et al* (2012) fabricaram scaffolds a partir de soluções de fibroína/gelatina nas concentrações (p/p) 4:2, 4:3 e 4:4. As misturas foram colocadas em moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) mantidas a -20°C por 24 horas e posteriormente

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

lioofilizadas. Os scaffolds porosos obtidos foram tratados com solução aquosa de metanol 95% por 24 horas e secos sob vácuo. A partir dos ensaios *in vivo* realizados com ratos “Sprague Dawley” foi verificado que os scaffolds de fibroína/gelatina possuem uma superfície adequada para a adesão e proliferação de células hepáticas da linhagem QZG, sendo que o aumento na proporção de gelatina resultou em maior crescimento celular. Após a implantação subcutânea dos scaffolds, foi observada a ocorrência de uma leve inflamação a partir os testes de rejeição imunológica, indicada pela presença de células inflamatórias no sétimo e décimo quarto dias. Adicionalmente, a implantação *in vivo* indicou que os scaffolds de fibroína/gelatina possuem baixa encapsulação e formação de granuloma especialmente aqueles com maior proporção de gelatina. Próximo ao trigésimo dia, os scaffolds foram totalmente infiltrados e organizados por células inflamatórias e fibroblastos. Finalmente, observou-se que quanto maior a proporção de gelatina na composição do scaffold maior foi o índice de degradação.

Liu *et al* (2007) também modificaram fibras de fibroína de seda com gelatina, utilizando ácido nordihidroguaiarético (NDGA) como agente de “cross-linking” para mimetizar a estrutura natural de fibras de fibroína de seda nativa no emprego da engenharia tecidual de ligamentos. Foi verificado que além da gelatina conferir propriedades vantajosas aos scaffolds de fibroína tais como resistência mecânica e incorporação de água, ocorreu uma pequena ou

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

nenhuma reação inflamatória quando comparou-se com fibras de fibroína de seda nativa quatro semanas após a implantação subcutânea em ratos.

Ainda dentro do cenário relacionado às misturas poliméricas, Dyakonov *et al* (2012) propuseram um sistema de liberação controlada de naproxeno por meio de filmes compostos por fibroína de seda, gelatina, e glicerina, tratados com metanol, etanol e álcool isopropílico, além de micropartículas obtidas pelo sistema “spray-drying” compostas apenas por fibroína de seda e água. A caracterização da liberação de naproxeno pelos filmes contendo fibroína foi realizada a pH 7,4. Observou-se para o filme controle (isento de fibroína) uma liberação inicial de naproxeno acima de 75% em 5 minutos, demonstrando liberação imediata. Entretanto, para os filmes contendo fibroína observou-se uma liberação inicial reduzida de aproximadamente 60% em 5 minutos.

Segundo Dyakonov *et al* (2012) esses resultados demonstram a formação de uma rede cristalina de fibroína de seda e gelatina que retardam a liberação de naproxeno quando comparada com gelatina amorfa. A liberação de 90% de naproxeno pelos filmes de fibroína ocorreu dentro de 1 hora de dissolução a pH 7,4, enquanto que as micropartículas liberaram apenas 50% de naproxeno. Aproximadamente 4 horas foram necessárias para liberação de naproxeno acima de 80% pelas micropartículas, demonstrando que o sistema “spray-drying” acelerou a transição conformacional da fibroína para folha- β .

Os scaffolds de fibroína também devem possuir uma estrutura porosa adequada para abrigar e liberar fatores de crescimento de maneira controlada para que as funções celulares sejam preservadas e ocorra a formação de tecidos específicos (ZAHARIA *et al.*, 2012).

Assim, Lu *et al* (2010) obtiveram por meio de um processo de liofilização, scaffolds de fibroína-gelatina nas proporções 100:0, 90:10, 80:20 e 70:30. Observou-se que a adição de gelatina na solução ocasionou uma mudança conformacional na fibroína, bem como nas suas interações com a água, promovendo a formação de poros cujo tamanho era ajustado pela concentração de fibroína. Adicionalmente, a adição de gelatina e o baixo conteúdo da conformação em folha- β da fibroína, induziram um incremento na hidrofilicidade do material.

Chen *et al* (2008) também experimentaram um modelo de scaffold poroso para reparação de ligamentos colaterais mediais (MCLs) de coelhos, a partir da incorporação de fibras de seda à uma matriz de colágeno. Foi demonstrado que o scaffold de fibroína e colágeno possui um espaço interno ideal para o crescimento tecidual conectivo dos novos ligamentos, além de propriedades mecânicas adequadas e ambiente biocompatível. Doze semanas após o procedimento cirúrgico, foi observada uma reparação considerável dos ligamentos pelo scaffold de colágeno e fibroína, o que segundo Chen *et al.* (2008) ocorreu devido a capacidade do colágeno de modular a regeneração

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

através da regulação da expressão gênica, e de agregação das suas fibrilas, sugerindo uma aplicação prática promissora deste tipo de material na engenharia tecidual de ligamentos e tendões.

Adicionalmente, Correia *et al* (2012) investigaram os efeitos da arquitetura e propriedades mecânicas de scaffolds de seda preparados por técnicas distintas na reparação de tecido ósseo. Os scaffolds foram fabricados utilizando-se como solventes água e hexafluoro-2-propanol (HFIP), apresentando tamanhos de poro entre 250-500 μm e entre 500-1000 μm , e estruturas lamelar ou de poros esféricos. Os scaffolds foram semeados com células tronco derivadas de tecido adiposo humano, cultivados por 7 semanas em meio osteogênico e posteriormente comparados com osso trabecular descelularizado (DCB), considerando-o como padrão. Foi observado que para o scaffold de fibroína de seda derivado de HFIP com tamanho de poro entre 400-600 μm apresentou o melhor resultado com relação a formação de tecido ósseo, demonstrado pelo aumento da produção de osteopontina, colágeno tipo I e sialoproteína óssea, além do aumento da deposição de cálcio e volume ósseo total. Parâmetros como a atividade de fosfatase alcalina (AP) na segunda semana e a deposição de cálcio na sétima semana foram comparáveis às células cultivadas em DCB. Adicionalmente, verificou-se que a estrutura lamelar do scaffold promoveu um aumento na atividade AP superior aquela observada para estrutura de poros esféricos.

2.2 PROPRIEDADES DA SOLUÇÃO DE FIBROÍNA DE SEDA

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com a proposta de otimização das propriedades da fibroína por meio da investigação da influência que alguns fatores ambientais, tais como solvente de processamento das fibras, pH, temperatura e concentração da solução, exercem sobre o comportamento da fibroína, incluindo transições conformacionais, morfologia, comportamento reológico, flexibilidade e biodegradabilidade. (XIE *et al.*, 2011; TERRY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2012).

Xie *et al* (2011) prepararam soluções de fibroína de seda regenerada nas concentrações de 15, 19, 25, 30, 31 e 37% (p/p) para a realização dos ensaios calorimétricos (DSC), espectroscopia RAMAN e de comportamento reológico. Verificou-se a partir das curvas de DSC que nas soluções de concentração de até 30%, isto é, onde a conformação randômica é predominante, ocorre a transição para conformação em folha- β da fibroína, atribuída a cristalização durante o aquecimento e relacionada a presença de um pico na curva. Em contrapartida, nas soluções de concentração acima de 30%, onde além da conformação randômica ocorre a presença da conformação em α -hélice, ambas sofrem a transição para conformação em folha- β , representada pela presença de dois picos na curva de calorimetria.

Observou-se que devido à presença da conformação em α -hélice nas soluções mais concentradas, e conseqüentemente a presença significativa de

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

ligações de hidrogênio, a transição desta conformação para a conformação em folha- β ocorreu a temperaturas mais elevadas.

Os espectros RAMAN evidenciaram que para as soluções mais concentradas de fibroína, a concentração da conformação em folha- β esteve acima da concentração nesta mesma conformação encontrada nas soluções de baixa concentração de fibroína, isto é, concentrações abaixo de 30%, indicando que o conteúdo das conformações randômica e α -hélice diminuíram ao passo que a conformação em folha- β aumentou com o aumento da concentração da solução de fibroína. Portanto, as conformações randômica e em α -hélice foram convertidas para folha- β .

Adicionalmente, verificou-se que a viscosidade das soluções aumentaram com o aumento de sua concentração, de maneira que quando há um aumento da taxa de cisalhamento a viscosidade das soluções permanecem praticamente inalteradas, ao contrário do que ocorre a baixas taxas de cisalhamento, onde ocorre um decréscimo substancial das viscosidades das soluções.

A fim de investigar as mudanças induzidas por variações de pH sobre a reologia de soluções de fibroína de seda, Terry *et al* (2004) utilizaram um reômetro de placas paralelas e soluções de ácido acético e amônia 3 M.

Anteriormente as variações induzidas de pH, foram realizadas medições de viscosidade de uma solução inicial com uma concentração aproximada de

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

fibroína ao redor de 25% (p/p) e um pH em torno de 7,5. Observou-se que a baixas taxas de cisalhamento a viscosidade da solução praticamente permaneceu inalterada, isto é, a solução é quase Newtoniana. A taxa de cisalhamento zero a viscosidade estimada é de aproximadamente 2kPa.

Para taxas maiores de cisalhamento, acima de um valor crítico de cisalhamento ($\gamma_c \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$) observa-se um comportamento diferenciado da viscosidade que diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. O valor de γ_c depende do peso molecular do polímero bem como da concentração da solução em questão, e está relacionado ao tempo de relaxação da solução (ζ_p), isto é, o tempo de resolução dos emaranhados entre as cadeias poliméricas, de maneira que a queda de viscosidade observada com taxas de cisalhamento acima do valor de γ_c é influenciada fortemente por interações intermoleculares entre cadeias poliméricas e também por interações entre cadeia e solvente.

Segundo Terry *et al* (2004) o pH constitui um parâmetro de extrema importância no que se refere a reologia da solução de fibroína. Observou-se que a diminuição do pH induziu a formação de um gel, que pode ser revertida pelo aumento de pH, caso a exposição ao ácido tenha sido relativamente rápida (1-5 min).

De acordo com estes pesquisadores, o gel em questão pode ser formado em resposta a supressão de cargas negativas em duas regiões da molécula de fibroína que contém uma alta concentração de aminoácidos

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

carregados negativamente, o que permite uma estreita aproximação entre moléculas vizinhas, ocasionando a formação de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre as moléculas, com a consequente conformação em folha- β . Sendo assim, a exposição prolongada ao ácido pode prevenir a transformação gel-sol ocasionada por vapores de amônia. Adicionalmente, a aplicação de taxas de cisalhamento acima do valor crítico (y_c) pode promover o alinhamento das moléculas de fibroína, favorecendo interações hidrofóbicas e a formação de folha- β .

He *et al* (2012) também avaliaram a influência do pH sobre mudanças conformacionais na estrutura secundária da fibroína mediadas por seu domínio N-terminal (FibNT) no intervalo de pH 7,0-3,0 utilizando-se espectroscopia de dicroísmo circular. A pH 7,0 o espectro de CD indicou a dominância da estrutura randômica, entretanto quando o pH foi diminuído para 6,0 observou-se a emergência da conformação em folha- β . A um pH de 3,0, a fração da estrutura em folha- β aumentou para aproximadamente 40%. Quando o pH retornou a 7,0 FibNT retornou a conformação randômica.

Através do ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi demonstrado para FibNT que o raio hidrodinâmico de partículas em torno de 9 nm aumentou para um raio em torno de 200 nm quando ocorreu um decréscimo no valor de pH de inicialmente 7,0 para 6,0, indicando a ocorrência de alta taxa de oligomerização das proteínas. Notou-se que o padrão de

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

oligomerização em resposta ao pH coincidiu com a transição conformacional ocorrida entre os valores de pH de 7,0-6,0. Foi sugerido que a oligomerização provavelmente pode estar associada a formação estrutural de folhas- β e que em solução cada monômero de FibNT pode doar um grampo para reconstituir uma estrutura de oito filamentos resultando em uma oligomerização do tipo cabeça-cauda.

Com relação aos aspectos morfológicos, foi determinado através de microscopia eletrônica de varredura que a pH 5,0 e concentração proteica de 1 mg/mL, os oligômeros FibNT adotarão uma estrutura micelar, com diâmetros entre 50-100 nm. Esta morfologia micelar observada dos oligômeros de FibNT, é consistente não apenas com o modelo de formação de micelas de seda por agrupamento intermolecular, mas também com a formação de aglomerados intramoleculares, que possivelmente podem iniciar o agrupamento da fibroína em resposta ao decréscimo do valor de pH.

Segundo He *et al* (2012) a base estrutural para a transição conformacional ocorrida em resposta ao decréscimo do valor de pH pode estar relacionada a dezenove resíduos ácidos distribuídos em ambas as faces da estrutura dimérica em folha- β da fibroína. Os valores de pK_a de alguns destes aminoácidos podem ser elevados próximos ao ponto de transição e com isso ocasionar sua ionização, impedindo o enovelamento proteico devido a repulsão entre cargas. A ionização dos resíduos conservados Glu56 e Asp44 bem como

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Asp100 e Glu98 podem ocasionar a repulsão entre lados das cadeias e consequentemente reduzir a estabilidade estrutural ou até mesmo prejudicar o arranjo das folhas- β .

Outro tópico de interesse considerável refere-se ao impacto que solventes de processamento utilizados na etapa de coagulação da fibroína exercem sobre as propriedades finais da seda regenerada (RSF) (TSUKADA *et al.*, 1994; NAM; PARK, 2001; KINAHAM *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011). Dentro deste contexto, Zhang *et al* (2012) prepararam três tipos de filmes de fibroína de seda por meio de três métodos diferentes. Após o preparo da solução de fibroína e posterior diálise, os filmes foram formados com longo tempo de secagem, em torno de cinco dias (Slow Drying Silk Films – SD-SF). Após serem hidratados e esticados no comprimento de 200% do tamanho original foram secos novamente (Stretched Slow Drying Silk Films – SSD-SF). No terceiro método, filmes preparados com curto tempo de secagem foram imersos em uma solução de metanol 80% por aproximadamente 1 hora (Methanol Annealing Process Silk Films – MAP-SF).

Através de espectroscopia FTIR-ATR foi verificada uma mudança estrutural da fibroína após o processo de esticamento do filme (SSD-SF) bem como após o processo de exposição do filme a solução de metanol (MAP-SF), indicando a ocorrência de transição conformacional, isto é, transição da conformação randômica (seda I) para a conformação em folha- β (seda II).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

O ensaio por DSC revelou picos endotérmicos a 90 °C nas curvas para SD-SF e SSD-SF, devido a evaporação da água de solvatação, uma vez que a seda I consiste em uma estrutura hidratada ao passo que a seda II consiste em uma estrutura hidrofóbica. Este pico desaparece para MAP-SF. No caso de SSD-SF o pico a 90 °C permanece na curva embora em menor intensidade, o que pode ser explicado pela forte interação entre água e fibroína mantida nas regiões não cristalinas deste tipo de filme. De acordo com Zhang *et al* (2012), o balanço entre o aparecimento da conformação em folha- β e a quantidade e intensidade de interações entre fibroína e água de solvatação possui grande relevância no que se refere às propriedades mecânicas dos filmes de fibroína.

Com relação as propriedades mecânicas Zhang *et al* (2012) verificaram que SSD-SF se manteve flexível no estado seco embora seu conteúdo de água (~4,5%) fosse menor do que em MAP-SF (6.3%), de maneira que a água atuaria como um plastificante promovendo aumento de flexibilidade e extensibilidade na estrutura da fibroína. Em SD-SF a quantidade de água de solvatação foi maior do que em SSD-SF, e ainda assim o primeiro filme esteve frágil no estado seco, ou com baixa flexibilidade. Esse resultado indica que além do conteúdo, a distribuição da água de solvatação possui uma grande influência na flexibilidade da seda, e pode ser controlada por meio da regulação da nanoestruturação da fibroína.

Uma propriedade adicional da fibroína de seda é igualmente relevante para sua aplicação como biomaterial, se refere a biodegradabilidade. De acordo com Wenk *et al* (2009), quanto maior for a percentagem da estrutura em folha- β mais lenta será sua degradação, o que foi demonstrado através da exposição de *scaffolds* de fibroína ao vapor d'água *in vitro* na ausência de enzimas proteolíticas, com apenas 4% de perda de massa no tempo de sete semanas.

De forma similar, o comportamento de biodegradação a longo-prazo de membranas de fibroína foi investigado *in vitro* e *in vivo* por Lee *et al* (2012). Foi verificado no ensaio *in vitro* que 80% das membranas de fibroína degradaram em solução de proteinase K dentro de 10 dias. Para a realização do ensaio *in vivo* as membranas de fibroína foram implantadas subcutaneamente em ratos e retiradas 19 meses após a cirurgia. As análises microscópicas (SEM) e histológicas revelaram que após 16 meses as membranas dividiram-se em diversos pedaços, indicando o potencial da fibroína como biomaterial.

2.3 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE

A coagulação da fibroína de seda regenerada (RSF) consiste em uma etapa extremamente crítica do processamento da seda que pode afetar dramaticamente as propriedades finais deste tipo de material. Conseqüentemente, diversos métodos de processamento e solventes de coagulação têm sido experimentados, sendo que solventes orgânicos tais

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

como etanol e metanol são comumente utilizados (KINAHAN, *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 1998).

Chen *et al* (2001) verificaram a influência de alguns solventes comumente utilizados na dissolução de fibroína sobre a viscosidade e conteúdo das conformações randômica e folha- β das membranas obtidas.

A partir dos ensaios reológicos verificou-se que nos solventes $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -MeOH-H₂O e LiBr-EtOH-H₂O as cadeias de fibroína sofreram a solvatação mais intensa, apresentando uma viscosidade quase constante (comportamento Newtoniano) para as taxas de cisalhamento aplicadas ($0.1 - 500 \text{ s}^{-1}$). Em contrapartida, observou-se que em solução de brometo de lítio (LiBr-H₂O 9.5 M) as cadeias de fibroína apresentaram a mais fraca solvatação, similarmente ao que ocorreu em água pura, o que explicaria o fato da solubilidade da fibroína ser maior nas soluções de LiBr-EtOH-H₂O e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -MeOH-H₂O.

Com relação aos aspectos conformacionais da fibroína nas membranas foi verificado a partir dos ensaios espectrofotométricos (FTIR-MCT-A) que para todos os solventes utilizados em sua dissolução houve uma predominância da conformação randômica da proteína, com uma pequena proporção da conformação em folha- β , sendo que na solução de LiBr-EtOH a proporção da última conformação nas membranas de fibroína foi a maior.

Adicionalmente, Gil *et al* (2007) avaliaram especificamente para uma solução aquosa de metanol (MeOH), a influência da variação de composição

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

da mistura no processo de cristalização de membranas de fibroína de seda. Foram utilizadas misturas diluídas de fibroína e gelatina (SF/G). Verificou-se também a influência da variação de composição da mistura SF/G sobre a morfologia das membranas obtidas.

Os ensaios espectroscópicos (FTIR-ATR), evidenciaram que o aumento da proporção de metanol na solução aquosa conduziu a um aumento na extensão da cristalização da SF, isto é, nas proporções entre 50 e 75% de metanol (p/p) a transição conformacional da SF para a conformação em folha- β foi significativamente mais intenso. Ensaios calorimétricos (DSC) mostraram que temperaturas de transição térmica relativamente baixas e características da SF e SF/G, como a temperatura de cristalização da SF ($T_c = 120^\circ\text{C}$), desapareceram após o tratamento com metanol, em função da formação dos β -cristais.

Morfologicamente, verificou-se a partir de ensaios microscópicos de transmissão de elétrons (TEM) que a concentração de metanol exerce grande influência na segregação das moléculas de fibroína e gelatina, induzida pelo processo de cristalização, sendo que o aumento da extensão da cristalização ocorreu para as maiores proporções de metanol. Com relação à morfologia das membranas de fibroína produzidas por meio da extração seletiva de gelatina, Gil *et al* (2007) verificaram que a composição da mistura SF/G e a concentração de metanol são responsáveis pela distribuição espacial da SF e

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

pela densidade da conformação em folha- β respectivamente, e portanto consistem em dois parâmetros de grande relevância no que se refere a porosidade das membranas.

De forma similar, Lin *et al* (2011) realizaram um estudo à respeito dos mecanismos de transição conformacional da fibroína de seda especificamente para misturas de etanol e água. Foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD) para avaliação das mudanças na estrutura secundária da fibroína relacionadas às mudanças na composição do solvente e interações moleculares, e para a interpretação da estrutura protéica com resolução atômica respectivamente. Além de CD e da fluorescência intrínseca da fibroína, foi utilizado um composto exógeno de fluorescência, o ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (ANS), uma espécie de sinalizador de mudanças envolvendo interações hidrofóbicas.

Segundo Lin *et al* (2011) a transição conformacional da fibroína para folha- β em misturas de etanol e água está relacionada à solubilização da porção apolar da cadeia protéica, bem como ao estabelecimento de ligações de hidrogênio entre unidades peptídicas, processos que possuem estreita relação com a estrutura de agrupamento intrínseca do solvente.

Foi verificado que para um conteúdo de etanol abaixo de 30% na mistura, ocorreu uma pequena variação na solvatação da unidade peptídica, e a estrutura tetraédrica característica da água foi mantida. Entretanto, um

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

conteúdo de etanol acima de 30%, ocasionou a transição estrutural do solvente, isto é, da forma tetraédrica da água para a forma em cadeia do etanol, induzindo a conformação em folha- β , que por sua vez está relacionada à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares. Por outro lado, observou-se uma diminuição da agregação das porções hidrofóbicas da cadeia protéica ocasionada pela formação de ligações entre estas regiões e o etanol, um decréscimo observado através da redução na intensidade da fluorescência do ANS.

Em contrapartida, Goujon *et al* (2012) avaliaram o emprego de solventes iônicos próticos (pILs), com o intuito de se obter seda regenerada com propriedades diferenciadas. As amostras de seda foram dissolvidas com hexafluoroisopropanol (HFIP) a 5%. Os pILs investigados foram fosfato de trietilamônio (TeaH_2PO_4), lactato de trietilamônio (TeaLa), triflato de trietilamônio (Teatf) e mesilato de trietilamônio (TeaMs) a uma proporção fixa de 80% pIL: 20% H_2O (p/p). Ensaios espectroscópicos (FTIR) mostraram que quando TeaH_2PO_4 foi utilizado como coagulante as amostras de seda não apresentaram a conformação α -hélice, enquanto que na utilização de TeaMs as amostras apresentaram um conteúdo de 45% da conformação α -hélice.

Os ensaios microscópicos (SEM) e espectroscópicos (FTIR) mostraram que a escolha do solvente coagulante e de dissolução possuem um impacto na morfologia e composição das amostras. A estrutura da amostra de seda

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

produzida pela dissolução das fibras em BMIMAc (acetato de 1-butil-3-metilimidazolil) apresentou uma pequena diferença em sua composição em relação a estrutura derivada da dissolução das fibras em HFIP utilizando-se o mesmo agente de coagulação.

Goujon *et al* (2012) avaliaram também o impacto da variação da proporção de água na solução aquosa do solvente TMGLa (lactato de 1,1,3,3-tetrametilguanidina). Verificou-se que a 40% de água o conteúdo da conformação folha- β foi de 62%, uma porcentagem maior do que a encontrada nas fibras de seda nativa. Verificou-se também a ausência de hélice. No entanto, na ausência de água a contribuição da cadeia lateral de tirosina foi de aproximadamente 33%, similarmente a porcentagem encontrada com uma solução de 40TMGLa:60H₂O. O conteúdo da conformação folha- β em solução de TMGLa:H₂O diminuiu em função da água, o que pode estar relacionado a ligações de hidrogênio do solvente quando o conteúdo de água aumenta, impactando portanto na organização da proteína de seda durante o processo coagulativo.

Foi observada a formação de microesferas com o aumento do conteúdo de água, o que segundo Goujon *et al* (2012) ocorreu provavelmente devido a mudanças na tensão superficial, que pode ter promovido a formação destas estruturas. Verificou-se também que o aumento do conteúdo de água

ocasionou uma redução do rendimento, sendo necessário um tempo maior para regeneração da seda, uma vez que a seda amorfa é solúvel em água.

Adicionalmente, Wang *et al* (2012) avaliaram a influência do solvente 1-alil-3-metilimidazolil sobre a conformação e morfologia da fibroína de seda, bem como sobre as propriedades reológicas deste tipo de material. Segundo Wang *et al* (2012) a solução de fibroína movimenta-se ao longo da direção do cisalhamento na região de taxas reduzidas do mesmo, como um fluido Newtoniano, enquanto que a altas taxas de cisalhamento, as moléculas de fibroína passam por um processo de realinhamento para diminuição do atrito intermolecular, movimentando-se facilmente na direção direção do cisalhamento, refletindo um comportamento pseudoplástico da solução de fibroína a altas taxas de cisalhamento.

2.4 MECANISMOS DE GELIFICAÇÃO

As soluções aquosas de fibroína de seda constituem um sistema de dispersão coloidal cineticamente estável até certo grau e termodinamicamente instável. Do ponto de vista dinâmico, a transposição da barreira energética pela fibroína em direção à formação de uma rede tridimensional através da agregação de suas partículas ocorre lentamente. O movimento Browniano juntamente com a repulsão entre partículas carregadas negativamente a pH neutro (ponto isoelétrico da fibroína = 3,8-3,9) constituem impedimentos que

favorecem o estado estável da dispersão coloidal (KIM *et al.*, 2004; AYUB; ARAI; HIRABAYASHI, 1993; NAGARKAR *et al.*, 2009).

Uma vez que este sistema é destruído por meio da formação de interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, a agregação das partículas coloidais de fibroína resulta na formação de um material gelificado, isto é, do hidrogel (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O processo de gelificação é acompanhado por uma transição conformacional, onde as moléculas de fibroína passam de uma conformação randômica quando em solução para uma conformação antiparalela em folha- β no estado gelificado (WANG *et al.*, 2005; AYUB; ARAI; HIRABAYASHI, 1993; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a presença de uma grande quantidade de repetições Gly-Ala na molécula de fibroína favorece a formação de folhas- β (WANG *et al.*, 2005).

Nagarkar *et al* (2010) caracterizaram soluções de fibroína de seda regenerada (RSF) por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e investigaram o processo de gelificação das soluções, agregação das partículas de fibroína e estrutura do gel, utilizando-se de parâmetros como turbidez, reologia, dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz, além de microscopia confocal a laser (CSLM) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Adicionalmente foi verificada a influência do pH (2-4),

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

concentração de fibroína (0.5 g L^{-1}) e temperatura ($5-70^{\circ}\text{C}$) sobre o processo de gelificação e estrutura do gel formado.

Foi verificado que as soluções RSF recém-preparadas eram compostas principalmente por proteínas individuais, com uma pequena fração de baixo peso de material agregado. Em ambiente ácido até mesmo soluções protéicas de baixa concentração (menores que 0.5 g L^{-1}) foram gelificadas, com concomitante aumento da turbidez e módulo de cisalhamento, dois parâmetros que embora tenham aumentado com o aumento da concentração de fibroína não foram afetados substancialmente pelas variações de temperatura ($5-70^{\circ}\text{C}$) ou pH (2-4). O tempo para gelificação aumentou levemente com o decréscimo da temperatura, mas foi independente da concentração ($0.5-10 \text{ g L}^{-1}$) e do pH.

Tanto a taxa de formação de agregados quanto a fração de fibroína na conformação folha- β aumentaram exponencialmente até a ocorrência de gelificação, sendo que a estrutura do gel permaneceu estável uma vez que o mesmo era formado. A partir dos ensaios de DLS foi verificado que os agregados eram menores que 15 nm. Adicionalmente, ensaios de SAXS mostraram que os agregados eram formados a partir da ramificação randômica de fibras menores que 15 nm. Finalmente, a partir das imagens dos géis de fibroína obtidas por CSLM observou-se que os agregados formavam partículas com um raio de aproximadamente 1 micrón, que uma vez conectadas, ocasionavam a formação de um sistema em rede.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Hidrogéis injetáveis compostos por fibroína de seda (SF) têm sido amplamente estudados em função de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade frente a diversos tipos de aplicações, tais como a encapsulação e liberação direcionada de moléculas bioativas a sítios específicos, onde a gelificação e conseqüente formação do hidrogel ocorre *in situ*. Contudo, a utilização clínica de fibroína de seda é extremamente limitada devido ao tempo de gelificação (GT) extremamente longo das soluções sob condições fisiológicas (YU; DING, 2008; BALAKRISHNAN; BANERJEE, 2011; FINI *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2004; NAGARKAR *et al.*, 2010).

Neste sentido, Wu *et al* (2012) desenvolveram um método para aceleração da agregação de SF e conseqüente gelificação sob condições moderadas (37°C, pH 7,0 $\pm$ 0.2) por meio do emprego de dodecil sulfato de sódio (SDS) como agente gelificante. O monitoramento de parâmetros como tensão superficial, potencial ζ , turbidez, mudanças conformacionais da fibroína e morfologia das partículas micelares foi realizado com o auxílio de tensiômetro, potenciômetro, espectrofotômetro (UV-visível), dicroísmo circular (CD) e microscopia de força atômica (AFM) respectivamente.

Foi verificado que o processo de gelificação acelerado está relacionado a associação das porções hidrofóbicas das moléculas de fibroína e SDS, com a conseqüente formação de agregados moleculares contendo microdomínios

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

hidrofóbicos. Segundo Wu *et al* (2012), as interações hidrofóbicas associadas a efeitos eletrostáticos entre íons (tais como Na^+) e moléculas SF ocasionam uma associação intramolecular e o conseqüente surgimento da conformação em folha- β , que por sua vez relaciona-se a presença do hexapeptídio repetitivo (glicina-alanina-glicina-alanina-glicina-serina) na molécula de fibroína.

Adicionalmente, Wu *et al* (2012), observaram que para uma concentração de SDS de 10 mM, a dimensão das partículas micelares esteve entre 50 e 60 nm, sendo que o agrupamento das partículas SF/SDS resultou na formação de aglomerados ou “clusters” de 2 a 5 μm . A associação dos “clusters” por sua vez resultou na formação de um esqueleto do gel, com um conteúdo de água acima de 90%. Verificou-se que um aumento da concentração de SDS para 12 mM ocasionou um decréscimo no tempo de gelificação (GT) para um valor mínimo entre 15 e 18 min.

De acordo com estes pesquisadores, o aumento da concentração de SDS até a concentração micelar crítica (CMC), isto é, 5 mM, fez com que GT diminuísse lentamente. Entretanto, o aumento da concentração de SDS acima de 12 mM resultou em aumento de GT, o que segundo Wu *et al* (2012), ocorreu devido ao acúmulo de micelas carregadas negativamente (grupos DS^-).

Ainda com o intuito de acelerar o processo de gelificação, Floren *et al* (2012) propuseram uma técnica de preparo de hidrogéis baseada no decréscimo de pH ocasionado pela submissão de dispersões de fibroína em

água de concentração de 2 a 4% (p/p) a um ambiente pressurizado com dióxido de carbono (CO₂).

Floren *et al* (2012) observaram a presença de uma solução turva anteriormente a gelificação completa (após 90 minutos), o que segundo estes pesquisadores pode ter ocorrido em função da formação de pequenos cristais β (<10 μ m) (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Além disso, verificou-se que o aumento da pressão acima de 60 bar ocasionou uma redução no tempo de gelificação de 6-8 horas (controle realizado com ácido cítrico a pressão atmosférica) para 2 horas, independente da concentração inicial da solução (2 ou 4% (p/p)).

Finalmente, a partir dos ensaios espectrofotométricos (FTIR) verificou-se que após o processamento das soluções ocorreu além da formação da estrutura em folha- β da fibroína, um decréscimo das conformações em α -hélice e randômica. Não foram observadas mudanças na estrutura secundária da fibroína a partir de variações na pressão de processamento.

2.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS DE FIBROÍNA DE SEDA

A transição sol-gel da fibroína de seda, isto é, o processo de gelificação está intimamente relacionado à concentração protéica, ao pH e a temperatura da solução. A formação do hidrogel ocorre em decorrência da agregação das cadeias de fibroína, que passam da conformação amorfa para uma estrutura mais estável em folha- β . A formação de folhas- β confere estabilidade ao

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

hidrogel, que poderá ser degradado somente a partir de processos oxidativos ou enzimáticos (MATSUMOTO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2004).

A compreensão da transição sol-gel, bem como das variáveis que exercem alguma influência sobre este fenômeno, é de extrema importância no que se refere à definição do trajeto termodinâmico e dos produtos finais desejados. Durante o processo de diálise, a solução de fibroína se torna metaestável em função da falta de íons disponíveis para sua solvatação. Sendo assim, qualquer tipo de perturbação neste sistema metaestável resultará na formação do hidrogel (WANG *et al.*, 2005).

Neste sentido, Hirabayashi *et al* (1990) avaliaram o índice de resistência e gelificação de soluções de fibroína de seda sob condições distintas, tais como pH e concentração, bem como características estruturais dos géis, através de microscopia eletrônica e espectroscopia de infravermelho.

Verificou-se que a um pH ao redor e abaixo de 3.6 a gelificação de uma solução de fibroína a 3% ocorreu rapidamente, o que segundo Hirabayashi *et al* (1990) pode ter ocorrido devido a proximidade deste valor de pH com relação ao ponto isoelétrico da fibroína ($pI = 3,8-3,9$), onde a agregação proteica é favorecida. A facilidade na agregação proteica está relacionada à protonação dos grupamentos carboxil para sua forma não-iônica e a protonação dos grupamentos amina para sua forma catiônica resultando na redução da força

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

eletrostática de repulsão entre cadeias e na formação de ligações intermoleculares altamente energéticas.

Utilizando-se um tensiômetro Hirabayashi *et al* (1990) avaliaram a relação entre a resistência e valores de pH de soluções de fibroína a 7% e a 4%. Verificou-se-se que a resistência máxima foi observada a um valor de pH em torno de 3,3, independentemente da concentração da solução, o que segundo estes pesquisadores pode ter ocorrido devido a presença de ligações altamente energéticas estabelecidas próximo ao ponto isoelétrico da fibroína.

No que se refere às características estruturais dos géis formados, observou-se através de microscopia eletrônica um aspecto esponjoso das amostras obtidas a partir das soluções a 3% e a 6% de fibroína, de forma que na amostra do gel obtido a partir da solução de fibroína menos concentrada foi possível observar espaços maiores quando comparada com a amostra do gel obtida a partir da solução mais concentrada de fibroína.

Adicionalmente observou-se no espectro de infravermelho uma absorção característica a 1630 cm^{-1} indicativa da presença da conformação em folha- β no gel de fibroína formado, revelando a influência do pH no aparecimento da referida conformação relacionada a gelificação.

Com relação ao parâmetro térmico, Nogueira *et al* (2011) verificaram que o aumento da temperatura durante o processo de diálise da solução de fibroína, fez com que a gelificação ocorresse com mais rapidez bem como a

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

agregação molecular devido ao aumento de interações hidrofóbicas entre as cadeias de fibroína.

A concentração residual de cálcio após o processo de diálise também foi maior para as amostras que foram dialisadas a altas temperaturas, o que segundo Nogueira *et al* (2011) pode ter ocorrido devido a mudanças nas propriedades da membrana de diálise, inclusive a permeabilidade aos íons. A temperaturas mais altas a rápida gelificação pode atuar como uma barreira mecânica bloqueando a passagem de íons.

Com relação aos aspectos morfológicos e estruturais Nogueira *et al* (2011) observaram a partir de micrografias (SEM) que hidrogéis liofilizados apresentaram uma estrutura porosa com tamanhos de poro de 20 μm até 5 μm na superfície das amostras.

A partir do espectro de difração de raios-X (XRD), estes pesquisadores observaram um pico a 21° indicativo da presença da conformação secundária em folha- β , formada durante o processo de gelificação devido a desidratação e a formação de pontes de hidrogênio inter e intramoleculares. De acordo com Nogueira *et al* (2011) a proporção da conformação em folha- β presente no hidrogel de fibroína de seda é proporcional ao grau de gelificação da amostra, que por sua vez está relacionado ao tempo, temperatura, pH e concentração da solução.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Adicionalmente, o termograma de DSC apresentou um pico de degradação a 290° C característico da conformação em folha- β não-orientada. Em ambas análises (XRD e DSC) não foi possível verificar a presença das conformações randômica e α -hélice, o que de acordo com Nogueira *et al* (2011) pode ter acontecido devido ao fato das amostras terem sido liofilizadas, favorecendo a predominância da conformação em folha- β em função da desidratação.

A influência da variação da concentração de fibroína sobre a morfologia, resistência e capacidade de absorção de água por hidrogéis foi investigada por Zaharia *et al* (2012), que obtiveram hidrogéis de fibroína de seda/poliacrilamida (RSF/PAA) por meio de uma reação de polimerização de acrilamida e metilenobisacrilamida em solução de fibroína de seda. As composições obtidas foram 0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50.

A influência da variação da concentração de fibroína foi determinada por meio de análises microscópicas (SEM), através das quais foi possível observar que a concentrações maiores de poliacrilamida o formato dos poros tende a ser tubular com orientação longitudinal, enquanto que à medida que o conteúdo de poliacrilamina diminui, os poros adquirem um formato mais esférico. Além disso, o aumento da concentração de fibroína ocasionou a formação de poros com diâmetros maiores após o processo de liofilização, o que segundo Zaharia

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

et al (2012) fez com que a densidade da rede cross-linking diminuísse em função da diminuição da concentração de poliacrilamida.

Adicionalmente foi observado que a resistência à compressão dos hidrogéis diminuiu com o aumento da concentração de fibroína, que ocasionou diminuição da densidade e aumento da flexibilidade das amostras. De acordo com Zaharia *et al* (2012), o aumento da concentração de poliacrilamida fez com que a rede cross-linking adquirisse maior rigidez e portanto foi necessária a aplicação de uma pressão maior para que houvesse o rompimento da amostra. Entretanto a amostra de composição 50/50 e 689% de entumescimento sofreu a maior deformação quando comparada com o hidrogel de poliacrilamida pura devido a ação plasticizadora da água.

No que se refere à capacidade de absorção de água das amostras, foi observado que o grau de entumescimento aumentou com o decréscimo do conteúdo de acrilamida. A composição 50/50 apresentou o grau máximo de entumescimento de 689%, enquanto que para o gel de poliacrilamida pura este valor caiu para 273%, o que pode ter ocorrido devido ao tamanho de poro consideravelmente maior apresentado pela composição 50/50.

De forma similar, GIL; HUDSON (2007) propuseram o preparo de dois tipos de hidrogéis de cadeia interpenetrada (IPN) compostos por poli(N-isopropilacrilamida)/fibroína de seda (PN/SF) e poli(N-isopropilacrilamida)-co-ácido acrílico/fibroína de seda (PNA/SF) tratados com metanol (para indução

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

da cristalização da fibroína), com o intuito de investigar gravimetricamente o efeito da fibroína sobre a absorção e liberação de água pelo hidrogel.

Foi verificado que PN/SF100 e PNA/SF100 mantiveram a mesma cinética de absorção de água. Entretanto, PN/SF exibiu uma taxa superior de liberação de água quando comparado a PNA/SF, atingindo a taxa máxima para 30% de fibroína (p/p). Segundo GIL; HUDSON (2007), este resultado indica que as moléculas de água foram liberadas rapidamente devido à redução da formação de película ocasionada pelas moléculas de fibroína, que atuariam como canais de drenagem de água, enquanto que a força de agregação das cadeias de poli(N-isopropilacrilamida) competiriam com a restrição relacionada a rede de fibroína. De acordo com estes pesquisadores, em PNA/SF a força de restrição da rede de folhas- β da fibroína compete com a força de agregação da rede de poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico), enfraquecida pela adição de ácido acrílico, onde as taxas de liberação de água (taxa máxima com PNA70) foram menores do que aquelas observadas em PN/SF.

Em contrapartida, Ayub *et al* (1994) avaliaram a influência do conteúdo de água sobre a estrutura secundária de fibroína de seda bem como sobre a resistência a compressão dos hidrogéis. Foi verificado que a resistência dos géis aumentou com o decréscimo do conteúdo de água, ocorrendo um rápido aumento da resistência quando o conteúdo de água esteve abaixo de 40%. O maior valor medido de força aplicada foi de 30.60 Kg cm^{-2} , após 95 horas,

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

quando o conteúdo de água era de 23,50% (p/p). Segundo Ayub *et al* (1994) o aumento da resistência do gel pode ocorrer devido à agregação das moléculas de fibroína quando a água é retirada em função da desidratação.

Nos ensaios gravimétricos, todas as amostras apresentaram dois picos de decomposição, o primeiro em torno de 300°C e o segundo em torno de 500°C atribuídos a desintegração intra e intermolecular respectivamente.

Ayub *et al* (1994) reportaram que a decomposição a 300°C indicou baixa cristalinidade da conformação β não orientada, e portanto menor possibilidade de obtenção da conformação β orientada na faixa de temperatura de 325–330°C. Adicionalmente, na temperatura de 500°C as perdas de peso foram pequenas para as amostras com baixo conteúdo de água, o que de acordo com estes pesquisadores sugere a ocorrência de uma interação íntima entre moléculas de fibroína, que possivelmente seria responsável pela estabilidade térmica do gel de fibroína desidratado.

Finalmente, através de avaliações quantitativas, foi verificado que a proporção das conformações da fibroína (randômica, seda I e β) nas diferentes amostras permaneceu praticamente inalterada, independentemente do conteúdo de água, o que de acordo com Ayub *et al* (1994) indica que as alterações nos contornos dos espectros para as amostras com menor conteúdo de água ocorreram devido à contração ou encolhimento dos géis no processo de desidratação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo objetiva o preparo e a caracterização dos hidrogéis de fibroína de seda obtidos por meio de sistemas de solventes distintos e a partir de amostras de seda dos tipos Meada 21 Denier (retirada de um lote pronto) e resíduos Frison Extra (pontas de casulos que ficam enroladas no maquinário), bem como uma avaliação comparativa entre suas propriedades físico-químicas tais como viscosidade, cristalinidade, estabilidade térmica e morfologia dos hidrogéis, além de outras características inerentes ao tipo de amostra e processamento do material. Também serão avaliados elementos como rendimento e tempo de processamento, bem como a qualidade dos materiais obtidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E COMPLEMENTARES

- (I) Remoção da sericina presente nos dois tipos de seda, isto é, Meada 21 Denier e resíduos Frison Extra.
- (II) Preparo das dispersões de fibroína degomadas ou não através de sistemas distintos de solventes.
- (III) Preparo dos hidrogéis por meio do processo de diálise.

(IV) Caracterização das dispersões e hidrogéis de fibroína de seda por meio de ensaios reológicos, texturométricos, espectroscópicos, difratométricos, termogravimétricos e microscópicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seda proveniente da espécie *Bombyx mori* foi fornecida pela empresa de fiação de seda Bratac, indústria brasileira e terceira maior produtora mundial de seda. Foram fornecidos dois tipos de seda, Meada 21 Denier (retirada de um lote pronto) e resíduos Frison Extra (pontas de casulos que ficam enroladas no maquinário).

Todos os sais e solventes utilizados eram de grau técnico e não foram purificados antes dos ensaios.

4.1 REMOÇÃO DA SERICINA

Para a obtenção da dispersão de fibroína, inicialmente foi necessária à remoção da sericina presente nos fios de seda. Para cada 10 g de seda foram adicionados 600 mL de água, 5 mL de detergente alcalino e 6 mL de solução de hidróxido de sódio (sol. 50%). A suspensão foi aquecida durante 30 minutos, em chapa de aquecimento, à temperatura de 85°C (ROBSON, 1999). O procedimento foi repetido por mais duas vezes para cada amostra. Posteriormente os fios de fibroína foram lavados com água destilada em abundância e secos em estufa à 70°C por 24 horas.

4.2 PREPARO DAS DISPERSÕES DE FIBROÍNA

Os fios secos previamente degomados bem como os fios não degomados de cada tipo de seda, isto é, Meada 21 Denier e Frison Extra, foram pesados e cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm a fim de facilitar sua dispersão. A cada 10 g de fibroína foram adicionados 100 mL das seguintes soluções:

- 1- $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$, a 1:2:8 (proporção molar) mistura de CaCl_2 , etanol absoluto e água deionizada.
- 2- $\text{LiCl-H}_2\text{O}$, a 9.5 M mistura de LiCl e água deionizada.
- 3- $\text{LiCl-EtOH-H}_2\text{O}$, a 10:18:72 (proporção peso/peso) mistura de LiCl, água deionizada e etanol absoluto.

As suspensões obtidas foram aquecidas até aproximadamente 100 °C em chapa de aquecimento com agitação constante a fim de auxiliar no processo de dispersão da fibroína (CHEN *et al.*, 2001). O procedimento foi repetido por mais duas vezes para cada amostra.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES

Uma vez obtidas, as dispersões de fibroína foram caracterizadas por meio dos ensaios reológicos e texturométricos. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 25 °C.

4.3.1 ENSAIOS DE TEXTURA

A textura corresponde às características físicas percebidas pelo sentido do tacto que estão relacionadas com a deformação provocada por uma força e que são medidas em termos de força, distância e tempo. Os ensaios de textura das dispersões de fibroína foram realizados utilizando-se um texturômetro Stable Micro Systems TAXT2i, operando nas condições modo de compressão, com sonda cilíndrica de 13 mm (P0.5), distância de penetração de 2 mm, velocidade teste de 3 mm/s e *trigger force* de 0,050 N.

4.3.2 ENSAIOS REOLÓGICOS

Os ensaios reológicos foram realizados em um reômetro de cilindros coaxiais Brookfield Viscometer modelo LVDV-II +PRO. Este reômetro dispunha do software Brookfield Rheocalc 32, no qual é possível programar os intervalos entre casa leitura. O software retorna os valores lidos na forma de uma tabela. A coleta de dados foi realizada a cada 5 s, com 5 velocidades, no tempo de 2 minutos para cada velocidade. Os spindles utilizados foram SC4-18 e SC4-27. As velocidades variavam de 20 até 200 rpm. O princípio de operação do reômetro é medir o torque provocado pelo movimento rotacional de um spindle imerso no fluido teste através de uma mola calibrada. Com isso, é possível medir os valores de viscosidade (mPa.s), torque (%), tensão de cisalhamento (N/m²), taxa de deformação (1/s) e temperatura (°C). A fim de se estabelecer o equilíbrio térmico da amostra, esta foi deixada cerca de 10 minutos em contato

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

com o banho térmico e o spindle na temperatura desejada antes de cada ensaio.

Muitos fluidos se comportam como materiais viscoelásticos e somente a viscosidade aparente não é suficiente para caracterizar o fluido devido à maior complexidade de seu rearranjo molecular depois de submetido a uma deformação. Desta maneira, para algumas amostras, foram realizados ensaios reológicos por meio de testes oscilatórios, os mais comuns no estudo do comportamento viscoelástico de fluidos, onde as amostras são submetidas a uma pequena amplitude de deformação harmônica. Os ensaios reológicos foram conduzidos no reômetro Haake Rheostress 1 (Thermo Electron Corporation) com geometria cone e placa 35 mm, 2°. Os valores de G' e G'' foram avaliados pela varredura de frequência de 0,1 a 100 Hz. A temperatura foi controlada a 25.0 ± 0.1 °C. Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.4 PREPARO DOS HIDROGÉIS

Hidrogéis de fibroína de seda foram preparados por meio de diálise a temperatura de 25°C. Para tal, 5 mL de cada dispersão foram colocados em uma membrana de diálise (membrana de celulose Viscofan 22 EU – 20 USA) e imersas em béqueres contendo 75 mL de água ultra pura Milli-Q®. O processo foi finalizado após 5 dias.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Caracterizações químicas e físicas foram realizadas nos hidrogéis de fibroína de seda a temperatura de 25 °C. Uma vez obtidos, os hidrogéis foram congelados e liofilizados por 24h a -54°C e -760 mmHg no equipamento da marca Edwards L4KR118 e então submetidos às análises térmicas (TGA), espectroscópicas (FTIR), difratométricas (DRX) e microscópicas (MEV).

4.5.1 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A análise termogravimétrica foi empregada para medir a variação da massa em amostras do hidrogel liofilizado em função da temperatura. Com esta medida é possível observar o comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis, assim como os picos relativos à degradação da fibroína. Os testes foram realizados para uma faixa de temperatura de 25 a 600 °C, a taxa de 10 °C/min e vazão de N₂ de 50 mL/min no equipamento TGA/DSC1 (Zürich, Suíça) da marca Mettler-Toledo.

4.5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A análise da difração de raios-X incididos sobre uma amostra permite determinar sua estrutura cristalina através da medida dos ângulos de difração emergentes da mesma. Com esta técnica foi observada a estrutura cristalina do hidrogel de fibroína de seda liofilizado. O equipamento utilizado para análise foi X'PERT PW3050 PHILIPS (Holanda) e os parâmetros utilizados foram:

ângulo (2θ) entre 10 e 60°; passo de 0,02°; tempo/passo de 0,3 s; e velocidade de 0,06°/s.

4.5.3 INFRAVERMELHO (FTIR)

A estrutura secundária dos hidrogéis de fibroína foi investigada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier Nicolet 6700 (Madison/USA) da marca Thermo Scientific equipado com acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe. Os espectros foram obtidos na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 256 varreduras.”

4.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Esta é uma técnica para exame superficial de sólidos, onde um estreito feixe de elétrons varre a superfície da amostra, ponto a ponto em seqüência de tempos determinados. Os sinais obtidos são captados por detectores que podem produzir imagens tridimensionais com grandes aumentos. Para avaliação da morfologia das amostras, utilizar-se-á o microscópio de varredura Leo 440i da marca LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). As amostras foram aderidas em porta-amostras com a utilização de uma fita dupla-face condutora, de forma a expor tanto a superfície dos hidrogéis quanto partes fraturadas do mesmo. Antes da análise, as amostras foram liofilizadas e metalizadas para garantir a condutividade elétrica de sua superfície de observação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo nas Figuras 3 e 4, encontram-se os dois tipos de sedas, Meada 21 Denier e resíduos Frison Extra fornecidos pela Fiação de seda Bratac.

Figura 3. Fibras de seda Meada 21 Denier.

Figura 4. Fibras de seda Frison Extra.

5.1 REMOÇÃO DA SERICINA

Nas Figuras 5 e 6 encontram-se amostras de fibras de seda antes e após o processo de degomagem.

Figura 5. Fibras de seda Frison Extra antes e após o processo de degomagem (da esquerda para direita).

Figura 6. Fibras de seda Meada 21 Denier antes e após o processo de degomagem (da esquerda para direita).

A partir do ensaio gravimétrico verificou-se que a porcentagem de massa removida diferiu para as sedas Meada 21 Denier e Frison Extra. Conforme a

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Tabela 1 verificou-se que para as fibras Meada 21 Denier a porcentagem de massa removida esteve em torno de 30,7%, enquanto que para as fibras Frison Extra a porcentagem de massa removida esteve em torno de 42%. Para o método de degomagem utilizado, a porcentagem de remoção de massa esperada fica em torno de 25 a 30%, que indica remoção completa da sericina (ROBSON, 1999).

É importante ressaltar que, a maior porcentagem de remoção de massa obtida para as fibras do tipo Frison Extra pode estar relacionada não somente à remoção de sericina, mas também à remoção de outros tipos de impurezas, por se tratar de fibras residuais.

Tabela 1 – Porcentagem de sericina nas amostras de seda Frison Extra e Meada 21 Denier.

Amostras de 10g	% de sericina nas fibras Frison Extra	% de sericina nas fibras Meada 21 Denier
Amostra 1	40,40	31,90
Amostra 2	41,00	29,80
Amostra 3	44,63	30,40
Média	42,01	30,70
Desvio padrão	2,29	1,08
Coefficiente de variação	0,05	0,03

5.2 PREPARO DAS DISPERSÕES DE FIBROÍNA

As Figuras 7, 8, 9 e 10 representam algumas das dispersões obtidas após o processo de aquecimento das suspensões.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 7. Dispersão obtida a partir de 10g da seda Frison Extra degomada e 100mL de solução CaCl_2 -EtOH- H_2O na proporção molar 1:2:8.

Figura 8. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Frison Extra degomada e 100mL de solução aquosa de LiCl a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 9. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Meada 21 Denier não degomada e 100mL de solução LiCl a 9.5 M.

Figura 10. Dispersão obtida a partir de 10g de seda Meada 21 Denier degomada e 100mL de solução LiCl-H₂O-EtOH na proporção 10:18:72 p/p.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

As Tabelas 2, 3 e 4 fornecem o tempo de dispersão de cada amostra de seda para cada um dos sistemas de solventes empregados, bem como o aspecto de cada uma das dispersões obtidas.

Tabela 2 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Seda	$\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ (proporção molar 1:2:8)	Aspecto da dispersão
	Tempo para dispersão	
Frison Extra sem degomar	120 minutos	Marrom claro, viscosa, opaca, com presença de duas fases distintas
Frison Extra Degomada	90 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, homogênea
Meada 21 Denier sem degomar	120 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier Degomada	90 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, homogênea

Tabela 3 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.

Seda	$\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M	Aspecto da dispersão
	Tempo para dispersão	
Frison Extra sem degomar	40 minutos	Marrom claro, opaca, fluida, com presença de duas fases distintas
Frison Extra Degomada	25 minutos	Amarelada, translúcida, fluida, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier sem degomar	40 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier Degomada	25 minutos	Amarelada, translúcida, fluida, homogênea

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Tabela 4 – Tempos de dispersão das amostras de seda e aspectos das dispersões obtidas para o sistema LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Seda	LiCl:EtOH:H ₂ O 10:18:72 (p/p)	Aspecto da dispersão
	Tempo para dispersão	
Frison Extra sem degomar	90 minutos	Marrom claro, viscosa, opaca, com presença de duas fases distintas
Frison Extra Degomada	50 minutos	Amarelada, opaca, fluida, homogênea
Meada 21 Denier sem degomar	90 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier Degomada	50 minutos	Amarelada, opaca, viscosa, homogênea

Inicialmente, observou-se que o tempo médio de processamento para a obtenção das dispersões da fibroína de seda diferiu consideravelmente entre os sistemas solvente/salino empregados, isto é, para CaCl₂-EtOH-H₂O a 1:2:8 (proporção molar), o tempo médio de processamento das amostras esteve em torno de 105 minutos, ao passo que para LiCl-H₂O a 9.5 M e LiCl-H₂O-EtOH na proporção 10:18:72 (p/p), a dispersão da fibroína foi obtida em aproximadamente 32 e 70 minutos respectivamente. Uma hipótese para este fato estaria relacionada ao raio atômico do lítio, consideravelmente menor do que o cálcio, o que poderia facilitar a permeabilidade do primeiro em relação às fibras de fibroína, explicando então a diferença substancial entre os tempos de processamento.

Adicionalmente os dados observados estão de acordo com a série de Hofmeister (Hofmeister, 1888 apud Baldwin, 1996), também conhecida como

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

serie liotrópica. Durante o aquecimento, na presença de lítio, a fibroína mantém-se estável devido às forças de repulsão entre cargas presentes no meio e à maior intensidade do movimento browniano. Entretanto quando há redução da temperatura do meio, o lítio, que apresenta maior efeito de aumento da tensão superficial e diminuição da solubilidade de moléculas (ou frações moleculares) não polares (ou seja, maior efeito “*salting out*”) favorece a agregação das partes hidrofóbicas da fibroína, e desta forma a formação de agregados.

Esta segunda hipótese, explica também o efeito observado de menor precipitação da fibroína quando na presença de etanol no solvente. Neste caso, o etanol favorece a estabilidade das porções apolares da fibroína permitindo uma ligeira melhora em sua solubilidade, e consequentemente menor formação de agregados.

Por outro lado, uma possível explicação para a diferença considerável no tempo de processamento médio entre as amostras dispersas em LiCl:H₂O a 9.5 M e LiCl-EtOH-H₂O na proporção 10:18:72 (p/p), isto é, aproximadamente metade do tempo, estaria relacionada à alta concentração salina da solução LiCl:H₂O a 9.5 M, aproximadamente três vezes maior quando comparada com a concentração da solução LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p), uma vez que, a maior concentração de sais ocasiona uma solvatação mais intensa das fibras de fibroína, facilitando sua dispersão (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et*

al., 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Neste caso, o efeito da alta concentração salina se sobrepôs ao efeito provocado pelo etanol, que ocasiona uma diminuição da agregação das porções hidrofóbicas da cadeia proteica devido à formação de ligações entre estas regiões e o etanol, auxiliando a dispersão (LIN *et al.*, 2011).

Adicionalmente, verificou-se uma diferença no tempo de processamento das amostras que sofreram ou não o processo de degomagem, uma vez que as amostras tratadas com agentes alcalinos foram dispersas em tempo menor do que aquelas que não sofreram o processo de degomagem. Possivelmente isso pode ter ocorrido em função da modificação de ligações não-covalentes entre as fibrilas de seda ocasionada pelos álcalis empregados (HO *et al.*, 2012), que por sua vez tornam-se mais acessíveis aos solventes, evidenciando que as modificações superficiais que ocorrem durante o processo de degomagem podem possivelmente afetar as interações entre a fibroína e os íons de solvatação bem como entre a fibroína e o solvente empregado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES

Uma vez obtidas, as dispersões de fibroína foram caracterizadas por meio dos ensaios reológicos e texturométricos. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 25 °C.

5.3.1 ENSAIOS DE TEXTURA

Na Figura 11 está representado o gráfico correspondente à variação da F_{máx} (Firmeza) em função da natureza da amostra testada.

Figura 11. Variação da F_{máx} entre as diferentes amostras avaliadas.

Observa-se pela análise do gráfico anterior que todas as amostras que não sofreram o processo de degomagem apresentaram maior firmeza em relação às amostras que foram degomadas anteriormente, evidenciando a influência das sericinas sobre este parâmetro, uma vez que estas proteínas envolvem a fibra de fibroína com sucessivas camadas adesivas, auxiliando a

formação do casulo por meio da cementação das fibras de seda (KUNDU *et al.*, 2008).

Adicionalmente, observou-se que, no caso das dispersões preparadas com LiCl:H₂O a 9.5 M, a diferença no valor da F_{máx} entre amostras degomadas ou não degomadas foi consideravelmente mais sutil em relação aos outros sistemas de solventes empregados. Uma possível hipótese para este fato estaria relacionada à alta concentração salina da solução LiCl:H₂O a 9.5 M, aproximadamente três vezes maior quando comparada com a concentração da solução LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p), uma vez que, a maior concentração de sais ocasiona uma solvatação mais intensa das fibras de fibroína, facilitando sua dispersão (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Neste caso, o efeito da alta concentração salina se sobrepôs ao efeito provocado pelo etanol, que ocasiona uma diminuição da agregação das porções hidrofóbicas da cadeia proteica devido à formação de ligações entre estas regiões e o etanol, auxiliando a dispersão (LIN *et al.*, 2011).

5.3.2 ENSAIOS DE REOLOGIA

Nas Figuras 12, 13, 14 e 15 estão representados os gráficos correspondentes ao comportamento reológico das dispersões em LiCl:H₂O a 9.5 M das amostras de seda Frison Extra sem degomar, Frison Extra degomada e Meada 21 Denier degomada, bem como da dispersão em

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) da amostra de seda Frison Extra degomada respectivamente, em função da variação da taxa de cisalhamento. Para tais amostras utilizou-se o reômetro de cilindros coaxiais Brookfield Viscometer modelo LVDV-II +PRO.

Figura 12. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra sem degomar em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 13. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra degomada em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 14. Comportamento reológico da dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 15. Comportamento reológico da dispersão de seda Frison Extra degomada em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Inicialmente, comparando-se os gráficos correspondentes as dispersões em LiCl:H₂O a 9.5 M, observa-se que as amostras de seda Frison Extra e Meada 21 Denier degomadas apresentaram comportamento reológico mais instável com relação a amostra de seda Frison Extra não degomada, que por sua vez apresentou um comportamento de fluido Newtoniano, evidenciando um possível efeito da sericina sobre a mobilidade das cadeias de fibroína. Neste caso, possivelmente as cadeias de fibroína estariam fortemente agregadas e interagindo consideravelmente umas com as outras, uma vez que as sericinas envolvem a fibra de fibroína com sucessivas camadas adesivas para auxiliar a formação do casulo por meio da cementação das fibras de seda (KUNDU *et al.*, 2008), resultando em estruturas enoveladas que permanecem estáveis até mesmo quando submetidas a uma alta taxa de cisalhamento (MATHUR *et al.*, 1997).

Por outro lado, no caso da amostra de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p), e que não continha sericina, o comportamento Newtoniano também foi observado, um efeito que possivelmente poderia estar relacionado a presença de etanol no meio, que ocasionaria uma diminuição da agregação das porções hidrofóbicas das cadeias proteicas devido à formação de ligações entre estas regiões e o etanol, favorecendo a estabilidade das porções apolares da fibroína, e uma melhora em sua solubilidade (LIN *et al.*, 2011).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Nas Figuras 16, 17, 18 e 19, 20, 21, 22 e 23 estão representados os gráficos correspondentes aos ensaios reológicos conduzidos no reômetro Haake Rheostress 1 (Thermo Electron Corporation).

Figura 16. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra sem degomar em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 17. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra degomada em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 18. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Frison Extra sem degomar em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 19. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em CaCl₂:EtOH:H₂O na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 20. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em CaCl_2 : EtOH : H_2O na proporção molar 1:2:8.

Figura 21. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em LiCl : H_2O a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 22. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier sem degomar em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 23. Espectro de frequência em função de G' e G'' para dispersão de seda Meada 21 Denier degomada em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Inicialmente, comparando-se os espectros de frequência das amostras Frison Extra não degomada e Frison Extra degomada, dispersas em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, observa-se uma queda acentuada no módulo de armazenamento ou módulo elástico. Para a amostra isenta de sericina, G' foi consideravelmente menor com relação à amostra não degomada, evidenciando um possível efeito da sericina sobre a estruturação da fibroína, uma vez que a primeira é responsável por manter unidos os fios de fibroína para a formação do casulo do bicho-da-seda (HO *et al.*, 2012).

Para as amostras Meada 21 Denier não degomada e Meada 21 Denier degomada dispersas em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, a retirada de sericina fez com que o módulo de perda ou módulo viscoso (G'') fosse maior do que G' , que por sua vez também sofreu um decréscimo substancial.

Adicionalmente, comparando-se as amostras Frison Extra não degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ e Frison Extra não degomada dispersa em $\text{LiCl}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, observa-se uma queda considerável no valor de G' para a amostra contendo lítio. Uma hipótese para este fato poderia estar relacionada à força iônica do meio consideravelmente maior para tal amostra, bem como à uma característica própria do íon lítio, que possui um campo eletromagnético maior quando comparado ao cálcio, além de maior eficiência para o “salting out” de acordo com a série liotrópica (Hofmeister apud Baldwin,

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

1996). Esses efeitos somados facilitariam a dispersão da fibroína, resultando em menor interação entre suas cadeias e decréscimo do módulo elástico G' .

Estes resultados estão de acordo com aquilo que pôde ser observado com relação aos tempos de dispersão das amostras, onde aquelas que continham lítio foram dispersas em menor tempo quando comparadas às amostras dispersas em solução hidroalcoólica de cloreto de cálcio.

Finalmente, comparando-se as amostras Meada 21 Denier não degomada dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ e Meada 21 Denier não degomada dispersa em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$, observa-se que não há diferença significativa nos módulos de armazenamento e perda, sugerindo que, neste caso, o etanol possivelmente não exerceu influência significativa sobre os parâmetros avaliados. Por outro lado, avaliando-se as amostras Meada 21 Denier não degomada e Meada 21 Denier degomada dispersas em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$, é possível observar que a ausência de sericina não exerceu efeito significativo no caso das amostras dispersas em solução contendo lítio. Desta maneira, é possível conjecturar que haja alguma interação específica entre o cálcio e a sericina, o que faz com que a ausência desta proteína ocasione um efeito dramático sobre os parâmetros G' e G'' .

5.4 PREPARO DOS HIDROGÉIS

O processo de diálise das amostras é representado pela Figura 24. As Figuras 25, 26 e 27 representam os hidrogéis obtidos após 5 dias de diálise.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 24. Diálise de dispersão de fibroína.

Figura 25. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda menos processada não degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 26. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda menos processada degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 27. Hidrogel obtido a partir de 10g da seda mais processada não degomada e 100mL de solução $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

As Figuras 25, 26 e 27 representam hidrogéis de fibroína de seda obtidos durante o processo de diálise das respectivas dispersões proteicas. É possível observar a forma cilíndrica que os hidrogéis apresentam devido ao formato da membrana utilizada para a diálise. Diferentes formas deste hidrogel podem ser obtidas pela indução da gelificação de uma dispersão de fibroína em moldes adequados (KIM et al., 2004; KAPLAN et al., 2005; MEGEED et al., 2004), ou até mesmo cortando os hidrogéis obtidos em formato desejado.

Uma dispersão aquosa de fibroína é obtida após a remoção dos sais durante a diálise. Uma vez que a fibroína constitui uma proteína predominantemente hidrofóbica, suas moléculas tendem a aglomerar-se quando em meio aquoso. As dispersões não dialisadas, isto é, supersaturadas em sais podem ser armazenadas por vários meses sem que ocorra a gelificação, uma vez que as fibras de fibroína permanecem solvatadas em função da força iônica do solvente (WANG et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006).

As Tabelas 5, 6 e 7 fornecem o tempo para gelificação de cada amostra de seda para cada sistema solvente empregado, bem como o aspecto de cada um dos hidrogéis obtidos.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Tabela 5 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Seda	$\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ proporção molar 1:2:8	Aspecto do hidrogel
	Tempo para gelificação	
Frison Extra sem degomar	24 horas	Marrom claro, fibroso, opaco, com presença de duas fases distintas
Frison Extra degomada	24 horas	Bege, sólido, opaco, homogêneo
Meada 21 Denier sem degomar	24 horas	Bege, fibroso, opaco, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier degomada	24 horas	Branco, sólido, opaco, homogêneo

Tabela 6 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema LiCl a 9.5 M.

Seda	$\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M	Aspecto do hidrogel
	Tempo para gelificação	
Frison Extra sem degomar	Não ocorreu gelificação	Marrom claro, fluido, opaco, com presença de duas fases distintas
Frison Extra degomada	Não ocorreu gelificação	Bege, opaco, fluido, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier sem degomar	24 horas	Branco, fibroso, opaco, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier degomada	24 horas	Branco acinzentado, opaco, pastoso, homogêneo

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Tabela 7 – Tempos de gelificação das amostras de seda e aspectos dos hidrogéis obtidos para o sistema LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Seda	LiCl:EtOH:H ₂ O 10:18:72 (p/p)	Aspecto do hidrogel
	Tempos para gelificação	
Frison Extra sem degomar	24 horas	Marrom claro, fibroso, opaco, com presença de duas fases distintas
Frison Extra degomada	24 horas	Branco, sólido, opaco, homogêneo
Meada 21 Denier sem degomar	24 horas	Branco, fibroso, opaco, com presença de duas fases distintas
Meada 21 Denier degomada	24 horas	Bege, fibroso, opaco, homogêneo

A partir das Tabelas 5, 6 e 7, é possível observar que, embora as amostras tenham sido dialisadas por 5 dias, duas delas não sofreram gelificação, isto é, as amostras de fibras Frison Extra dispersas em LiCl:H₂O a 9.5 M. Uma hipótese para esse fato estaria relacionada primeiramente a ausência de etanol, que segundo Lin *et al* (2001), pode induzir a conformação folha- β da fibroína, e consequentemente a agregação de suas cadeias. Adicionalmente, a presença de impurezas presentes nas fibras do tipo Frison Extra possivelmente pode ter exercido alguma influência sobre o processo de gelificação, isto é, na formação de interações hidrofóbicas e forças de van der Waals entre as partículas coloidais de fibroína.

As soluções aquosas de fibroína de seda constituem um sistema de dispersão coloidal cineticamente estável até certo grau e termodinamicamente instável (KIM *et al.*, 2004; AYUB; ARAI; HIRABAYASHI, 1993; NAGARKAR *et*

al., 2009). Uma vez que este sistema é destruído por meio da formação de interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, a agregação das partículas coloidais de fibroína resulta na formação de um material gelificado, isto é, do hidrogel (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O processo de gelificação consiste em um processo cinético influenciado por diversos parâmetros tais como temperatura, pH, e concentração de sais (KIM *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2006), e é acompanhado por uma transição conformacional, onde as moléculas de fibroína passam de uma conformação randômica quando em solução para uma conformação antiparalela em folha- β no estado gelificado (WANG *et al.*, 2005; AYUB; ARAI; HIRABAYASHI, 1993; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a presença de uma grande quantidade de repetições Gly-Ala na molécula de fibroína favorece a formação de folhas- β (WANG *et al.*, 2005).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Caracterizações químicas e físicas foram realizadas nos hidrogéis de fibroína de seda a temperatura de 25 °C. Uma vez obtidos, os hidrogéis foram congelados e liofilizados por 24h a -54°C e -760 mmHg no equipamento da marca Edwards L4KR118 e então submetidos às análises térmicas (TGA), espectroscópicas (FTIR), difratométricas (DRX) e microscópicas (MEV).

5.5.1 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

As propriedades térmicas dos hidrogéis foram investigadas por análise de termogravimetria. As Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39 exibem os termogramas de TGA para os hidrogéis de fibroína de seda liofilizados, onde TGA' representa a derivada primeira da curva de TGA.

Figura 28. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 29. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 30. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 31. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 32. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl}:\text{H}_2\text{O}$ a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 33. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 34. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 35. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 36. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 37. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 38. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 39. Análise termogravimétrica (TGA) de hidrogel de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Na análise de TGA, observa-se um pico de TGA' próximo a 300°C que está associado à quebra das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos e rompimento de ligações peptídicas (UM *et al.*, 2001). Segundo Zhong *et al* (2012) este pico de degradação se deve a maior estabilidade térmica do hidrogel de fibroína de seda com estrutura em folha- β . De acordo com os resultados apresentados, a degradação das moléculas de fibroína de seda tem início por volta de 270°C, evidenciando alta resistência térmica do material.

Comparando-se as diferentes amostras, observa-se que exceto aquelas dispersas em LiCl:H₂O a 9.5 M, todas as demais amostras que continham sericina possuem uma deformação acentuada na curva de TGA' na região do

pico de degradação próximo a 300°C. Sendo assim, uma hipótese para este fato relaciona a presença de sericina à deformação na curva, uma vez que para as amostras degomadas isso não foi observado.

A estrutura secundária da sericina varia dependendo da maneira como é processada (KIM, 2007). A sericina pode permanecer em um estado parcialmente desdobrado com 35% de folha- β e 63% na conformação randômica, sem nenhum conteúdo em α -hélice (TSUKADA; BERTHOLON, 1981). Segundo Teramoto et al (2008) o etanol pode induzir a conformação folha- β da sericina.

Adicionalmente, no caso das amostras 10 e 12, é possível observar uma ligeira deformação na curva de TGA' próximo ao pico de degradação, o que poderia estar relacionado a um resíduo de sericina mesmo após o processo de degomagem.

5.5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Os difratogramas obtidos pela difração de raios-X das amostras de hidrogéis liofilizados de fibroína de seda estão representados pelas Figuras 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 e 51.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 40. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 41. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 42. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 43. Difratoograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 44. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 45. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 46. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.

Figura 47. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 48. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 49. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 50. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 51. Difratograma obtido por difração de raios-X de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Para todas as amostras é possível observar picos que variam de 2θ igual a 19 graus até 2θ igual a 21 graus, evidenciando que a conformação folha- β da fibroína no hidrogel liofilizado. (WANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002). Este resultado é condizente com o que se relata na literatura, isto é, que os hidrogéis de fibroína de seda apresentam predominância da conformação em folha- β , com alguma porcentagem das conformações α -hélice ou helicoidal aleatória (WANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2006; UM *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2007). Neste sentido, entretanto, não observou-se as regiões correspondentes as conformações α -hélice ou helicoidal, que tem seus picos localizados em 12, 19 ou 28 graus. Tais estruturas podem estar presentes em baixas concentrações nos hidrogéis de fibroína de seda e podem ter seus picos sobrepostos pelo pico maior localizado a 21° (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Durante o processo de gelificação, ocorre uma desidratação das moléculas de fibroína, além do estabelecimento de pontes de hidrogênio inter e intramoleculares resultando na formação da configuração folha- β . Em solução, as cadeias de fibroína encontram-se em sua maior parte organizadas na conformação α -hélice, sendo que esta estrutura tende a converter-se a folha- β , termodinamicamente mais favorável e conseqüentemente mais estável. A concentração da configuração folha- β no hidrogel de fibroína é proporcional ao grau de gelificação da amostra, que por sua vez depende do tempo, da temperatura, do pH da solução de fibroína, bem como de sua concentração.

Adicionalmente, parâmetros como estabilidade, solubilidade em água e degradabilidade *in vitro* e *in vivo* da molécula de fibroína são determinados pela proporção da conformação em folha- β (LI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

5.5.3 INFRAVERMELHO (FTIR)

A configuração secundária da fibroína de seda foi verificada por espectroscopia de infravermelho para as amostras de hidrogéis liofilizados. Os espectros de infravermelho estão representados pelas Figuras 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 e 63.

Figura 52. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 53. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em CaCl₂:EtOH:H₂O na proporção molar 1:2:8.

Figura 54. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em CaCl₂:EtOH:H₂O na proporção molar 1:2:8.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 55. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8.

Figura 56. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 57. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 58. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 59. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Figura 60. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 61. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Figura 62. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 63. Espectro de infravermelho para hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p).

A partir dos espectros apresentados foram observados picos referentes as amidas I, II e II para todas as amostras avaliadas, localizados em comprimentos de onda muito similares. Os picos típicos de fibroína de seda são 1621, 1515 e 1231 cm^{-1} , característicos para as amidas I (estiramento C=O), II (deformação NH e estiramento C-N) e III (estiramento C-N e deformação NH) respectivamente, e estão relacionados à conformação folha- β (ZAHARIA *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2012; GIL *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007 e XIE *et al.*, 2012). Uma vez que no ensaio de difração de raios-X não foi possível observar picos relacionados à outras conformações da fibroína tais como α -hélice ou conformação randômica, as amidas I, II e III foram atribuídas a folha- β .

Adicionalmente, não foi possível observar por espectroscopia de infravermelho nenhum pico que pudesse ser atribuído a sericina. Neste caso, a técnica em questão não seria adequada para a detecção desta proteína. Uma hipótese a ser considerada estaria relacionada a uma possível sobreposição de picos, onde um eventual pico relacionado a sericina estaria sendo sobreposto.

5.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias das amostras de hidrogel liofilizado de fibroína de seda estão representadas pelas Figuras 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 e 71. As amostras de seda Frison Extra sem degomar, Frison Extra degomada e Meada 21 Denier degomada, dispersas em LiCl:H₂O a 9.5 M não foram analisadas, pois mesmo após o processo de liofilização, permaneceram fluidas, bem como a amostra de seda Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O.

Este trabalho tinha como intuito o preparo e a caracterização dos hidrogéis formados durante o processo de diálise, sendo assim não foram aplicados nenhum tipo de tratamento ou técnica para o controle da porosidade das amostras. Entretanto, a porosidade das amostras pode ser controlada modificando-se parâmetros de congelamento ou liofilização, e até mesmo pela adição de sais segundo procedimentos descritos na literatura (TAMADA, 2005; NAZAROV *et al.*, 2004).

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 64. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 65. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 66. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 67. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 68. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 69. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Frison Extra sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 70. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier sem degomar dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Figura 71. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para fratura de hidrogel liofilizado de fibroína de seda Meada 21 Denier degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) (a) aumento 100 X (b) aumento 200 X (c) aumento 500 X.

Através das micrografias representadas nas Figuras 64, 65, 66 e 67 é observa-se que tais amostras apresentam um aspecto de rede enovelada sem organização aparente, ou orientação aleatória, também observado por Yang *et al* (2007) para dispersões de fibroína preparadas com $\text{CaCl}_2 \cdot \text{EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8. Além disso, é possível observar a presença de estruturas ao redor das fibras de fibroína especialmente para as amostras não degomadas da seda Frison Extra, que possivelmente se devem à presença não somente de sericina, mas também à outros tipos de resíduos provenientes do processamento da seda, ou ainda à deformidades da própria fibra de fibroína. Adicionalmente, observou-se uma mudança na morfologia das amostras após o processo de degomagem, uma vez que o método utilizado para a remoção de sericina das amostras é considerado um dos mais agressivos no que se refere à desestruturação das fibras de fibroína (HO *et al.*, 2012).

Observa-se por meio das micrografias representadas pela Figura 68 que a morfologia para tais amostras diferiu consideravelmente das demais, isto é, ao invés do aspecto de rede enovelada verificado anteriormente nas Figuras 64-67, as amostras em questão possuem aspecto lamelar bastante característico, também observado por Zaharia *et al* (2012) e Zhong *et al* (2012) para dispersões de fibroína preparadas com solução aquosa de LiBr 9.5 e 9.3 M respectivamente.

Similarmente ao observado nas Figuras 64-67, nas micrografias representadas nas Figuras 69-71 observa-se que tais amostras apresentam um aspecto de rede enovelada sem organização aparente, isto é, com orientação aleatória, também observado por Yang *et al* (2007) para dispersões de fibroína preparadas com CaCl_2 : EtOH : H_2O na proporção molar 1:2:8. Além disso, é possível observar a presença de estruturas ao redor das fibras de fibroína especialmente para as amostras não degomadas da seda Frison Extra, que possivelmente se devem à presença não somente de sericina, mas também à outros tipos de resíduos provenientes do processamento da seda, ou ainda à deformidades da própria fibra de fibroína. Observou-se também uma mudança na morfologia das amostras após o processo de degomagem, uma vez que o método utilizado para a remoção de sericina das amostras é considerado um dos mais agressivos no que se refere à desestruturação das fibras de fibroína (HO *et al.*, 2012). Adicionalmente, verificou-se que a ausência de etanol na solução utilizada para a dispersão das fibras de fibroína possivelmente modificou a estrutura lamelar observada nas amostras representadas na Figura 68, isto é, que foram dispersas em solução aquosa de LiCl a 9.5 M, uma vez que para as amostras de seda dispersas em solução de LiCl : EtOH : H_2O na proporção 10:18:72 observou-se o aspecto de rede enovelada similar aquele verificado para as amostras dispersas em CaCl_2 : EtOH : H_2O na proporção molar 1:2:8.

6 CONCLUSÃO

Todos os sistemas solvente/salino empregados foram capazes de dispersar as amostras de seda, incluindo amostras que não haviam sido degomadas em uma etapa anterior. Houveram variações consideráveis no tempo de processamento das amostras, relacionadas ao tipo de seda, ao processo de degomagem, e a natureza e concentração do sistema solvente/salino empregado, sendo que o menor tempo obtido foi para as amostras previamente degomadas e dispersas em LiCl:H₂O a 9.5 M.

Variações consideráveis na firmeza das dispersões de fibroína foram observadas, uma vez que amostras que não foram previamente degomadas apresentaram firmeza significativamente maior com relação às amostras degomadas em etapa anterior. Entretanto, variações sutis relacionadas à firmeza foram observadas para as dispersões em LiCl:H₂O a 9.5 M.

As amostras Frison Extra não degomada dispersa em LiCl:H₂O a 9.5 M e Frison Extra degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) apresentaram comportamento reológico de fluido Newtoniano. Nas amostras dispersas em CaCl₂:EtOH:H₂O na proporção molar 1:2:8, a retirada de sericina resultou em redução no módulo elástico G'. Para a amostra Frison Extra não degomada dispersa em LiCl:EtOH:H₂O na proporção 10:18:72 (p/p) a redução no módulo elástico G' foi considerável.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

Não houve uma diferença considerável nos módulos de armazenamento e perda, isto é, G' e G'' , para as amostras Meada 21 Denier não degomadas dispersas em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M e $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p). A ausência de sericina não exerceu efeito significativo sobre G' e G'' no caso das amostras Meada 21 Denier degomada ou não degomada dispersas em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p).

Os hidrogéis de fibroína de seda foram obtidos diretamente do processo de diálise das soluções de fibroína, e não houveram variações nos tempos de gelificação das amostras independente da natureza da amostra e do sistema solvente/salino empregado, exceto as amostras que não foram gelificadas, isto é, seda Frison Extra não degomada e degomada dispersa em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M. Todas as demais amostras foram gelificadas em 24 horas de diálise.

Todos os hidrogéis de fibroína de seda apresentaram alta resistência térmica, com presença predominante da conformação em folha- β da fibroína. Morfologicamente, os hidrogéis obtidos a partir de dispersões em $\text{LiCl:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção 10:18:72 (p/p) e $\text{CaCl}_2\text{:EtOH:H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 apresentaram aspecto de rede enovelada, enquanto que os hidrogéis oriundos de dispersões em $\text{LiCl:H}_2\text{O}$ a 9.5 M apresentaram estrutura lamelar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, C., GHOSH, S. K., KUNDU, S. C. Interfacial bonding and degumming effects on silk fibre/polymer biocomposites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 8, p. 2827-2836, 2012.
- AGARWAL, N. *et al.* Effect of moisture absorption on the thermal properties of *Bombyx mori*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 401-410, 1997.
- ALTMAN, G. H.; DIAZ, F. JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R. L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J; KAPLAN, D. L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n.3, p. 401-416, 2003.
- ARAMWIT, P.; SANGCAKUL, A. The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.71(10), p. 2473-2477, 2007.
- AYUB, Z. H. *et al.* Quantitative structural analysis and physical properties of silk fibroin hydrogels. **Polymer**, v. 35, n.10, p. 2197-2200, 1994.
- AYUB, Z. H.; ARAI, M.; HIRABAYASHI, K. Mechanism of the gelation of fibroin solution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1910-1912, 1993.
- BALAKRISHNAN, B.; BANERJEE, R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 4453-4474, 2011.
- BALDWIN, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2056-2063, 1996.
- CHEN, J. *et al.* Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 67A, n. 2, p. 559-570, 2003.
- CHEN, X. *et al.* Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. **Polymer**, v. 42, p. 9969-9974, 2001.
- CHEN, X. *et al.* Conformational transition kinetics of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopic. **Biophysical Chemistry**, v. 89, n.3, p. 25-34, 2001.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- CHEN, X. *et al.* Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix. **Biomaterials**, v. 29, p. 3683-3692, 2008.
- CORREIA, C. *et al.* Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. **Acta Biomaterialia**, v.8, p. 2483-2492, 2012.
- DYAKONOV, T. *et al.* Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- FANG, J.Y., CHEN, J.P., LEU, Y.L., WANG, H.Y. Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.2 156-162, 2006.
- FINI, M. *et al.* The healing of confined critical size cancellous defects in presence of silk fibroin hydrogel. **Biomaterials**, v. 26, p. 3527-3536, 2005.
- FLOREN, M. *et al.* Carbon dioxide induced silk protein gelation for biomedical applications. **Biomacromolecules** (2012), dx.doi.org/10.1021/bm300450a.
- GIL, E. S. *et al.* Silk fibroin membranes from solvent-crystallized silk fibroin/gelatin blends: Effects of blend and solvent composition. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 426-431, 2007.
- GIL, E. S.; HUDSON, S. M. Effect of silk fibroin interpenetrating networks on swelling/deswelling kinetics and rheological properties of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 258-264, 2007.
- GOJJON, N. *et al.* Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties. **Chemical Communication**, v. 48, p. 1278-1280, 2012.
- GUZIEWICZ, N. *et al.* Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. **Biomaterials**, v. 32, p. 2642-2650, 2011.
- 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, p. 197-207, 2012.
- HIRABAYASHI, K. *et al.* Gelation of silk fibroin. **Transaction**, v. 46, n. 11, p. 521-524, 1990.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- HO, M. *et al.* Interfacial bonding and degumming effects on silk fibre/polymer biocomposites. **Natural Materials in Composites Engineering**, v. 43, n. 7, p. 2801-2812, 2012.
- HU, X. A. *et al.* Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin-hyaluronic acid hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3178-3188, 2010.
- HU, J. *et al.* Injectable silk fibroin/polyurethane composite hydrogel for nucleus pulposus replacement. **Journal of Material Science**, v. 23, p. 711-722, 2012.
- KAPLAN, D.L., KIM, U., PARK, J., JIN H. Aqueous silk fibroin solution having a specific concentration is useful for producing fiber, foam, fil, silk hydrogel, scaffolds and drug delivery meshes. **Derwent Innovations**, Patent number: W02005012606-A2, 2005.
- KARDESTUNCER, T. *et al.* RGD-tethered silk substrate simulates the differentiation of human tendon cells. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, v.448, p. 234-239, 2006.
- KATO, N.; SATO, S.; YAMANAKA, A.; YAMADA, H.; FUWA, N.; NOMURA, M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.62 (1), p. 145-147, 1998.
- KIM, U-J. *et al.* Structure and properties of silk hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 786-792, 2004.
- KINAHAM, M. E. *et al.* Tunable silk: using microfluidics to fabricate silk fibers with controllable properties. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1504-151, 2011.
- KWEON, H. *et al.* Physical Properties of silk fibroin/chitosan blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.80, n.7, p. 928-934, 2011.
- LAWRENCE, B. D. *et al.* Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 21, p. 6967-6985, 2008.
- LEE, O. J. *et al.* Biodegradation behavior of silk fibroin membranes in repairing tympanic membrane perforations. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.100A, n. 8, p. 2018-2026, 2012.
- LI, G. *et al.* Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 627-636, 2012.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- LI, M., LU, S., WU, Z., TAN, K., MINOURA, N., KUGA, S. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.30, p. 89-94, 2002.
- LI, M. *et al.* Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, p. 2192-2199, 2001.
- LIANG, C. X.; HIRABAYASHI, K. Improvements of the physical properties of fibroin membranes with sodium alginate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 45, p. 1937-1943, 1992.
- LIN, M., WEIREN, H.; AIMIN, H.; LISHUO, L.; QIAONA, W.; ZILUN, H. Mechanism of conformational transition of silk fibroin in alcohol-water mixtures. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 29, p. 877-882, 2011.
- LIU, H. *et al.* Modification of sericin-free silk fibers for ligament tissue engineering application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 82B, n. 1, p. 129-138, 2007.
- LU, Q. *et al.* Green process to prepare silk fibroin/gelatin biomaterial scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v.10, p. 289-298, 2010.
- MATHUR, A. B. *et al.* The dissolution and characterization of *Bombyx mori* silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films. **Biopolymer**, v. 42, p. 61-74, 1997.
- MATSUMOTO, A. *et al.* Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 21630-21638, 2006.
- MATSUMOTO, K. *et al.* Regenerated protein fibers. II. Viscoelastic behavior of silk fibroin solutions. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 35, p. 1955-1959, 1997.
- MEGEED, Z., HAIDER, M., LI, D., O'MALLEY Jr, B.W., CAPPELLO, J., GHANDEHARI, H. In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v.94, p. 433-445, 2004.
- MEINEL, L. *et al.* Engineering bone-like tissue *in vitro* using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 71A, n. 1, p. 25-34, 2004.
- NAGARKAR, S. Structure and gelation mechanism of silk hydrogels. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 3834-3844, 2010.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- NAGARKAR, S. *et al.* Some mechanistic insights into the gelation of regenerated silk fibroin sol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 8014-8023, 2009.
- NAM, J.; PARK, Y. H. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 81, p. 3008-3021, 2001.
- NAZAROV, R., JIN, H.J., KAPLAN, D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. **Biomacromolecules**, v.5, p. 718-726, 2004.
- NOGUEIRA, G.M. Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas 2005.
- NOGUEIRA, G. M. *et al.* "In vitro" calcification of silk fibroin hydrogel. **Key Engineering Materials**, v. 361-363, p. 503-506, 2008.
- NOGUEIRA, G. M. *et al.* Hydrogels from silk fibroin metastable solution: formation and characterization from a biomaterial perspective. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 997-1001, 2011.
- OHGO, K., ZHAO C., KOBAYASHI M., ASAKURA T. Preparation of non-woven nanofibers of *Bombyx mori* silk, *Samia cynthia ricini* silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. **Polymer**, v. 44, p. 841-846, 2003.
- PACHECO, J. A. A. **Perdizes**: história de um bairro. São Paulo: Gráfica Municipal de São Paulo, p. 56, 1983.
- PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A.P.; DAITHANKAR, A.V.; MAHADIK, K.R. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.4, p. 250-257, 2005.
- RATNER, B. D. *et al.* Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor. In: RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 1-9.
- ROBSON, R. M. Microvoids in *Bombyx mori* silk. An electron microscope study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 2-3, p. 145-150, 1999.
- SASHINA, E. S. *et al.* Structure and solubility of natural silk fibroin. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 79, p. 869-876, 2006.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- SAROVART, S.; SUDATIS, B.; MEESILPA, P., GRADY, B.P.; MAGARAPHAN, R. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. **Advanced Materials**, v.5, p.193-198, 2003.
- SUN, Y. Y. *et al.* Acrylic polymer-silk fibroin blend fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 65, p. 959-966, 1997.
- TAMADA, Y. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. **Biomacromolecules**, v.6, p. 3100-3106, 2005.
- TANAKA, T. *et al.* Phase separation structure in poly(vinyl alcohol)/silk fibroin blend films. **Polymer International**, v. 45, p. 175-184, 1998.
- TERRY, A. E. pH Induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of *Bombyx mori* silk worm. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 768-772, 2004.
- TYRRELL, D.J.; DI LUCCIO, R.C.; YAHIAOUI A.; EVERHART, D.S.; MAY, W.B. **Delivery of a skin health benefit agent to a treated substrate for transfer to skin** USPTO Nº 6503524, 2003.
- TSUKADA, M. *et al.* Preparation and application of porous silk fibroin materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 54, p. 507-514, 1994.
- UM, I.C., KWEON, J.Y., PARK, Y.H., HUDSON, S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.29, p.91-97, 2001.
- VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 991-1007, 2007.
- WANG, H. *et al.* A study on the flow stability of regenerated silk fibroin aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 66-70, 2005.
- WANG, Q. *et al.* Investigation of rheological properties and conformation of silk fibroin in solution of amimCl. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 1875-1881, 2012.
- WEI, W. *et al.* Posttreatment of the dry-spun fibers obtained from regenerated silk fibroin aqueous solution in ethanol aqueous solution. **Journal of Materials Research**, v. 26, p. 1100-1106, 2011.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

- WENK, E. *et al.* Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. **Biomaterials**, v.30, n. 13, p. 2571-2581, 2009.
- WENK, E. *et al.* Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release** (2010), doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.007.
- WU, X. *et al.* Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 2185-2192, 2012.
- XIE, F. *et al.* Effect of concentration on structure and properties of concentrated regenerated silk fibroin solution. **Advanced Materials Research**, v. 311-313, p. 1653-1656, 2011.
- YANG, Y. *et al.* Development and evaluation on silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 28, p. 5526-5535, 2007.
- YANG, Z. *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of silk fibroin/gelatin composite scaffolds for liver tissue engineering. **Journal of Digestive Diseases**, v. 13, p. 168-178, 2012.
- YAO, Y. *et al.* Relationship between molecular weight of sericin peptides and effects of hair-care, Fangzhi Xuebao. V.25(2), p. 14-16, 2004 (In Chinese) IN FOX, C. Wipes. **Cosmetics & Toiletries**. v. 121 (9), p.38-42, 2006.
- YU, L; DING, L. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 1473-1481, 2008.
- ZAHARIA, C. *et al.* Silk fibroin films for tissue bioengineering applications. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 14, n. 1-2, p. 163-168, 2012.
- ZHANG, C. *et al.* Flexibility regeneration of silk fibroin in vitro. **Biomacromolecules** (2012), doi: 10.1021/bm300541g.
- ZHANG, Y. *et al.* Highly efficient processing of silk fibroin nanoparticle-L-asparaginase bioconjugates and their characterization as a drug delivery system. **Soft Matter**, v. 7, p. 9728-9736, 2011.
- ZHANG, Y.Q. Applications of natural silk sericin in natural biomaterials. **Biotechnology Advances**, v.20, p.91-100, 2002.
- ZHANG, Y.Q.; TAO, M.L.; SHEN, W.D.; ZHOU, Y. Z.; DING, Y.; MA, Y.; ZHOU, L.S. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v.25, p.3751-3759, 2004.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

ZHONG, T. *et al.* Studies of in situ-forming hydrogels by blending PLA-PEG-PLA copolymer with silk fibroin solution. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 100A, n. 8, p. 1983-1989, 2012.

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

ANEXOS

Preparo e avaliação comparativa
das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com
conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em
sistemas distintos de solventes

Natália Marchesan Bexiga

APÊNDICE