

Murilo Álison Vigilato Rodrigues

Fibras ultrafinas de colágeno e gelatina: solventes benignos para a produção de potenciais biomateriais biomiméticos por fiação por sopro em solução

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Rodrigues, Murilo Álison Vigilato

Fibras ultrafinas de colágeno e gelatina: solventes benignos para a produção de potenciais biomateriais biomiméticos por fiação por sopro em solução / Murilo Álison Vigilato Rodrigues. — São Carlos, 2023.

131 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

1. Colágeno. 2. Gelatina. 3. Fiação por sopro em solução. 4. Fibras ultrafinas. 5. Reologia. I. Título.



À minha família

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo, apoio e torcida que contribuíram para minha formação, em especial à minha mãe Marlene, por todo seu apoio.

À Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelo conhecimento e tempo dedicados em minha orientação ao longo de grande parte de minha carreira acadêmica.

À Dra. Virginia C. A. Martins, pelo apoio, incentivo e valiosas contribuições oferecidos em muitas etapas da pesquisa e na minha formação.

Ao Prof. Luiz Henrique Caparelli Mattoso, pela supervisão na Embrapa Instrumentação, onde foram desenvolvidas muitas das etapas da pesquisa, bem como a seu grupo de pesquisa, onde pude aprender muito.

Ao Prof. Dr. Sérgio A. Yoshioka, pelas contribuições na extração do colágeno de pele de tilápia e nas análises por SDS-PAGE.

À amiga Mirella Romanelli Vicente Bertolo, pela ajuda com os planejamentos fatoriais, por todas as parcerias desenvolvidas neste período e pela amizade, que seguirá como mais uma conquista desta fase.

Aos companheiros do Grupo de Bioquímica e Biomateriais (IQSC-USP), pelos bons momentos de risadas e convivência.

Aos técnicos da Central de Análises Químicas Instrumentais, professores, bibliotecárias, funcionários do serviço de pós-graduação e demais funcionários do Instituto de Química de São Carlos, por toda a assistência oferecida.

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação, sobretudo aos técnicos e à estatística Milene Corso Mitsuyuki, por todo o apoio oferecido.

Aos amigos, pelo apoio e torcida pela realização deste trabalho, e em especial ao meu parceiro João Pedro, pelos incentivos e apoio durante esta etapa.

À CAPES, pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

E a todos que torceram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.” (FREIRE, 1996, p. 53).

RESUMO

RODRIGUES, Murilo Álison Vigilato. Fibras ultrafinas de colágeno e gelatina: solventes benignos para a produção de potenciais biomateriais biomiméticos por fiação por sopro em solução. 2023. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O principal constituinte da matriz extracelular (MEC) de diversos tecidos é o colágeno, proteína biodegradável, biocompatível e promotora de regeneração tecidual. Uma alternativa promissora na produção de MEC artificiais, *scaffolds*, envolve a produção de fibras nanométricas ou submicrométricas, dimensão das fibras naturais de MEC de muitos tecidos. Um método para produção de fibras ultrafinas denominado fiação por sopro em solução (SB-Spinning) permite a produção de fibras com altas taxas de alimentação e deposição *in situ*. Fibras ultrafinas de colágeno já foram produzidas por eletrofiação, contudo, não há ainda relatos da produção de fibras de colágeno tipo I por SB-Spinning. Portanto, esta pesquisa visou produzir fibras ultrafinas de colágeno e gelatina (polímero resultante da desnaturação do colágeno também empregado em biomateriais) pela técnica de SB-Spinning usando solventes que mantenham a integridade dos polímeros e avaliar os efeitos dos parâmetros usados na produção sobre a morfologia destas fibras. Colágenos de diferentes fontes foram obtidos, caracterizados e comparados, sendo selecionado o colágeno de pele de tilápia para os testes de fiação em função de sua melhor solubilidade em solventes benignos. A preservação da hélice tripla do colágeno de peixe foi confirmada por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho e eletroforese em gel (SDS-PAGE), identificando inclusive o colágeno obtido como sendo do tipo I. Estudos reológicos foram usados para orientar a obtenção de soluções fiáveis e fibras submicrométricas de gelatina e colágeno foram produzidas a partir de soluções de ácido acético 90%. Com planejamentos fatoriais os parâmetros mais influentes sobre o diâmetro médio destas fibras foram determinados: a concentração e a pressão para a gelatina e a concentração e a distância de trabalho para o colágeno. A otimização do diâmetro das fibras visando sua minimização foi capaz de produzir fibras de 188 e 313 nm para gelatina e colágeno, respectivamente. Por fim, as fibras foram caracterizadas por DSC e SDS-PAGE para avaliar sua estabilidade após processamento por SB-Spinning.

Palavras-chave: colágeno, gelatina, fiação por sopro em solução, reologia

ABSTRACT

RODRIGUES, Murilo Álison Vigilato. Ultrafine collagen and gelatin fibers: benign solvents for the production of potential biomimetic biomaterials by solution blow spinning. 2023. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

The main constituent of extracellular matrix (ECM) of various tissues is collagen, a biodegradable and biocompatible protein with excellent regenerative properties. A promising way for the production of artificial ECM, called scaffolds, involves the production of nanometric or submicrometric fibers, dimension of the natural fibers found in the ECM of many tissues. The method of production of ultrafine fibers called solution blow spinning (SB-Spinning) allows the production of fibers with high feed rates and in situ deposition. Ultrafine collagen fibers have already been produced by electrospinning, however, there are no reports of the production of type I collagen fibers by SB-Spinning. Therefore, this research aims to produce ultrathin collagen and gelatin (a polymer resulting from collagen denaturation and also used in biomaterials) fibers by SB-Spinning using solvents that preserve the integrity of the polymers and to evaluate the effects of the parameters used in fibers production on the morphology of these fibers. Collagen from different sources were obtained, characterized and compared, and collagen from tilapia skin was selected for the fibers production due to its better solubility in benign solvents. The preservation of the fish collagen triple helix was confirmed by differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy and gel electrophoresis (SDS-PAGE), even identifying the collagen obtained as being of type I. Rheological studies were used to guide the obtainment of spinnable solutions and gelatin and collagen submicrometric fibers were produced from 90% acetic acid solutions. Using factorial design the parameters with the greatest effects on the average diameter of these fibers were determined: the concentration and pressure for gelatin and the concentration and distance of work for collagen. The optimization of the diameter of the fibers aiming at its minimization was able to produce fibers of 188 and 313 nm for gelatin and collagen, respectively. Finally, the fibers were characterized by DSC and SDS-PAGE to evaluate their stability after processing by SB-Spinning.

Keywords: collagen, gelatin, solution blow spinning, rheology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Padrão de organização das fibrilas e fibras de colágeno do tipo I.....	20
Figura 2 - Síntese do colágeno do tipo I.....	22
Figura 3 - Representação das fibrilas de colágeno do tipo I com destaque para os telopeptídeos N e C-terminais.....	24
Figura 4 - Ilustração do sistema utilizado na técnica de fiação por sopro em solução.....	37
Figura 5 - Representação dos bicos concêntricos pelos quais passam o gás e a solução polimérica na fiação por sopro em solução, destacando as regiões de diferentes pressões do gás.....	38
Figura 6 – Planejamento fatorial “estrela” usado para obter as superfícies de resposta das variáveis concentração e distância de trabalho sobre o diâmetro das fibras de colágeno....	54
Figura 7 – Colágeno bovino (A) aniônico e (B) tratado com pepsina.....	56
Figura 8 - Curva DSC para o colágeno de tendão bovino obtida em atmosfera de ar sintético com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹	57
Figura 9 - Espectro no infravermelho do colágeno bovino aniônico.....	60
Figura 10 - Colágeno obtido de pele de peixe por solubilização ácida liofilizado.....	61
Figura 11 - Espectro FT-IR do colágeno de peixe (—) íntegro e (—) aquecido acima de 50°C.	61
Figura 12 - Espectro no infravermelho da gelatina.....	63
Figura 13 – Eletroforese em gel dos padrões de massa molar (A), da gelatina (B) e do colágeno de peixe (C).....	65
Figura 14 - Módulos G' e G'' em função da deformação (A) e da tensão oscilatória (B) para amostras de colágeno de peixe (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol.....	67
Figura 15 - Viscosidade complexa para as soluções de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol em função da temperatura.	70
Figura 16 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol....	71
Figura 17 - Gráfico de recuperação em função do tempo para a solução de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com 20% de etanol.	73
Figura 18 - Módulos G' (■) e G'' (□) em função da tensão oscilatória (A) e da deformação (B) para amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.....	75

Figura 19 - Módulos G' (■) e G'' (□) em função da tensão oscilatória (A) e da deformação (B) para amostras de gelatina (5,0 %) em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.	76
Figura 20 - Módulos G' (●) e G'' (○) em função da frequência angular de oscilação para amostras de (A) colágeno de pele de tilápia 3,0 % e (B) gelatina 5,0 % em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.	78
Figura 21 – Viscosidade para as soluções de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) em diferentes concentrações de ácido acético em função (A) da temperatura e (B) da taxa de cisalhamento.	80
Figura 22 – Viscosidade para as soluções de gelatina (5,0 %) com diferentes concentrações de ácido acético em função (A) da temperatura e (B) da taxa de cisalhamento.	81
Figura 23 - Viscosidade das soluções de colágeno (■) e gelatina (▲) a (■/▲) 5, (■/▲) 10 e (■/▲) 15% em HAc 90%.	84
Figura 24 - Viscosidade em função do tempo de estoque a 4°C para as amostras a 10% em HAc 90% de (■) colágeno e (▲) gelatina.	86
Figura 25 – Coletores dos tipos (A) cilíndrico e (B) cilíndrico com hastes para deposição das fibras ultrafinas produzidas por SB-Spinning. Em azul pode ser visto o motor que controla sua rotação.	92
Figura 26 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre um coletor do tipo cilíndrico.	92
Figura 27 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre um coletor cilíndrico com hastes.	93
Figura 28 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre hastes revestidas com alumínio.	93
Figura 29 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre hastes revestidas com alumínio, com destaque para a formação de fibras atrás do coletor.	94
Figura 30 - Manta de gelatina produzida por SB-Spinning usando um isopor ao fundo do coletor.	94
Figura 31 - Fibras de gelatina (15% em HAc 90%) a (A) 3,6 mL h ⁻¹ , (B) 7,2 mL h ⁻¹ e (C) 10,8 mL h ⁻¹	96
Figura 32 - Gráficos de distribuição de diâmetro das fibras de gelatina (15% em HAc 90%) obtidas a (A) 3,6 mL h ⁻¹ , (B) 7,2 mL h ⁻¹ e (C) 10,8 mL h ⁻¹	97
Figura 33 - Imagens obtidas por MEV das fibras de gelatina (10% em HAc 90%) a (A) 3,6 mL h ⁻¹ , (B) 7,2 mL h ⁻¹ e (C) 10,8 mL h ⁻¹	98
Figura 34 - Gráficos de distribuição de diâmetro das fibras de gelatina (10% em HAc 90%) obtidas a (A) 3,6 mL h ⁻¹ , (B) 7,2 mL h ⁻¹ e (C) 10,8 mL h ⁻¹	99

Figura 35 - Imagens obtidas por MEV das fibras de colágeno de pele de tilápia (10% em HAc 90%) a (A) 3 mL h ⁻¹ e (B) 6 mL h ⁻¹ .	100
Figura 36 - Gráficos de distribuição do diâmetro das fibras de colágeno de pele de tilápia (10% em HAc 90%) obtidas a (A) 3 mL h ⁻¹ e (B) 6 mL h ⁻¹ .	101
Figura 37 – Imagens obtidas por MEV das fibras de colágeno de pele de tilápia/PEO (9:1).	102
Figura 38 - Gráfico de distribuição de diâmetro das fibras de colágeno de pele de tilápia/PEO (9:1).	102
Figura 39 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina.	106
Figura 40 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina.	107
Figura 41 – Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina em função das variáveis significativas.	108
Figura 42 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de colágeno.	110
Figura 43 – Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de colágeno em função das variáveis significativas.	111
Figura 44 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para os resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de colágeno.	112
Figura 45 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial estrela do diâmetro médio das fibras de colágeno.	113
Figura 46 – Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial estrela do diâmetro médio das fibras de colágeno.	114
Figura 47 - Curvas DSC para o colágeno de peixe, gelatina e suas fibras produzidas por SB-Spinning obtidas em atmosfera de ar sintético com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹ .	116
Figura 48 – Eletroforese em gel dos padrões de massa molar (A) e das fibras de gelatina (B) e de colágeno (C) produzidas por SB-Spinning. Em destaque são mostradas as bandas discretas, porém visíveis apenas nas fibras de colágeno.	117
Figura A1 – Superfície de resposta para o planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina envolvendo a concentração em função das variáveis não significativas estatisticamente.	130
Figura A2 – Superfície de resposta para o planejamento fatorial 2 ⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina envolvendo a pressão em função das variáveis não significativas estatisticamente.	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fibras de colágeno produzidas por eletrofiação.....	27
Tabela 2 – Fibras de gelatina produzidas por eletrofiação.....	31
Tabela 3 – Amostras de proteínas estudadas e suas siglas.	44
Tabela 4 – Variáveis usadas no planejamento fatorial 2^4 e seus níveis (codificados e valores reais) aplicados na avaliação sobre o diâmetro médio das fibras produzidas por SB-Spinning.....	52
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^4 utilizado na avaliação dos efeitos dos parâmetros de processo e de solução sobre o diâmetro médio das fibras produzidas por SB-Spinning.....	53
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial “estrela” utilizado na avaliação dos efeitos das variáveis X1 e X4 sobre o diâmetro médio das fibras de colágeno produzidas por SB-Spinning.....	55
Tabela 7 – Temperaturas de desnaturação nas amostras de colágeno e de seus materiais fonte determinadas por DSC.....	57
Tabela 8 – Solubilidade das amostras de colágeno em diferentes solventes.	59
Tabela 9 – Bandas encontradas nas amostras de colágeno de peixe por FT-IR.	62
Tabela 10 – Propriedades físico-químicas de diferentes solventes.....	66
Tabela 11 – Valores dos parâmetros extraídos do ensaio oscilatório para as amostras de colágeno de peixe (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.	68
Tabela 12 – Valores de Td e viscosidade a 20°C para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.....	70
Tabela 13 – Valores de k, n e viscosidade a 1,0 Hz para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético com diferentes teores de etanol.	72
Tabela 14 – Valores de $D_{máx}$ e Tr para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.	73
Tabela 15 – Valores dos parâmetros extraídos dos ensaios oscilatórios para as amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de ácido acético.	77
Tabela 16 – Classificação das amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de HAc pelos resultados dos ensaios de frequência de oscilação.....	79
Tabela 17 – Valores de k, n e viscosidade complexa a 20°C para as amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de ácido acético..	82
Tabela 18 – Valores de k, n e η_{1Hz} para as amostras de colágeno e gelatina em HAc 90%.	85
Tabela 19 – Testes de fiação por sopro em solução feitos com as soluções de gelatina.....	87

Tabela 20 – Testes de fiação por sopro em solução feitos com as soluções de colágeno...	90
Tabela 21 – Valores da média, mediana e da diferença entre estas duas medidas para o diâmetro de fibras de gelatina e colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.	104
Tabela 22 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de gelatina produzidas por SB-Spinning nas condições ótimas.	109
Tabela 23 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.	112
Tabela 24 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por SB-Spinning nas condições ótimas.	115
Tabela A1 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de gelatina produzidas por fiação por sopro em solução.	128
Tabela A2 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB – acrilamida/bis-acrilamida
- AcEt – acetato de etila
- ANOVA – análise de variância
- CB – colágeno bovino extraído por tratamento alcalino
- CBA_f – colágeno bovino grau alimentício em flocos
- CBA_p – colágeno bovino grau alimentício em pó
- CBE – colágeno bovino enzimaticamente tratado com pepsina
- CP – colágeno de peixe extraído por solubilização ácida
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DSC – calorimetria exploratória diferencial
- EDC-sNHS – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida com N-hidroxisulfossuccinimida
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EL – elastina
- EUA – Estados Unidos da América
- FT-IR – Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier
- G – gelatina
- GP – genipina
- GT – glutaraldeído
- HAc – ácido acético
- HAc_{aq(3,0)} – soluções aquosas de ácido acético a pH 3,0
- HFP – 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
- IQSC – Instituto de Química de São Carlos
- MEC – matriz extracelular
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- MM – massa(s) molar(es)
- PCL – policaprolactona
- PDO – polidioxanona
- PEO – poli(óxido de etileno)
- PHBV – poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxi-valerato)

pI – ponto isoelétrico

PLA – ácido polilático

PMMA – polimetilmetacrilato

PTHF – politetrahidrofurano

PVB – polivinil butiral

PVP – polivinilpirrolidona

RVL – região viscoelástica linear

SB-Spinning – *Solution Blow Spinning*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio

SF – solução de fixação

TA – tampão da amostra

TE – tampão do gel de empilhamento

TEMED – tetrametiletilenodiamina

TFE – 2,2,2-trifluoroetanol

TR – tampão do gel de resolução

LISTA DE SÍMBOLOS

- $D_{\text{máx}}$ – deformação máxima
- G'_{RVL} – módulo elástico na deformação crítica
- G_f – módulo elástico no ponto de fluxo
- k – índice de consistência do fluido
- n – índice de comportamento do fluido
- pH – potencial hidrogeniônico
- P_v – pressão de vapor
- $\tan\delta$ – fator de perda
- T_d – temperatura de desnaturação
- T_e – temperatura de ebulição
- T_r – taxa de recuperação
- $\dot{\gamma}$ – taxa de cisalhamento
- $\eta_{1\text{Hz}}$ – viscosidade a 1 Hz
- $|\eta^*|$ – viscosidade complexa
- $|\eta^*|_{20^\circ\text{C}}$ – viscosidade complexa a 20°C
- τ – tensão cisalhante
- τ_f – ponto de fluxo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Proteínas colagenosas: do colágeno à gelatina.....	18
1.2. Fibras ultrafinas de colágeno.....	26
1.3. Fibras ultrafinas de gelatina.....	30
1.4. Solventes benignos na produção de fibras ultrafinas.....	35
1.5. Fiação por sopro em solução	37
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
Objetivo geral.....	42
Objetivos específicos	42
4. PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1. Obtenção do colágeno	43
4.2. Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	45
4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	45
4.4. Preparo das soluções poliméricas.....	46
4.5. Caracterização reológica das soluções	47
4.6. Fiação por sopro das soluções poliméricas	48
4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	49
4.9. Análise estatística	52
4.10. Design experimental para otimização do diâmetro das fibras	52
4.10.1. Planejamento Fatorial 2 ⁴	52
4.10.2. Delineamento composto central	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Caracterização dos colágenos e gelatina	56
5.1.1. Colágeno de tendão bovino	56
5.1.2. Colágeno de pele de peixe	60
5.1.3. Colágeno bovino grau alimentício	62

5.1.4. Gelatina	63
5.2. Seleção da amostra de colágeno	64
5.3. Caracterização reológica das soluções	65
5.3.1. Efeitos do etanol sobre soluções de colágeno em ácido acético.....	67
5.3.2. Efeitos da acidez sobre soluções de colágeno e gelatina em HAc.....	74
5.3.3. Efeitos da concentração sobre soluções de colágeno e gelatina em ácido acético 90%	83
5.4. Fiação por sopro em solução	87
5.4.1. Seleção do coletor para deposição das fibras.....	91
5.4.2. Fibras ultrafinas de gelatina	95
5.4.3. Fibras ultrafinas de colágeno	100
5.4.4. Fibras ultrafinas de colágeno/PEO.....	101
5.5. Design experimental para otimização do diâmetro das fibras.....	103
5.5.1. Planejamento Fatorial 2 ⁴	106
5.5.2. Delineamento composto central	112
5.6. Caracterização das fibras ultrafinas de colágeno e gelatina	115
6. CONCLUSÃO	118
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	119
8. REFERÊNCIAS	120
9. ANEXOS.....	128

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma ciência interdisciplinar aplicada à regeneração ou substituição de órgãos ou tecidos. Portanto, essa ciência depende do desenvolvimento de novos materiais para produção de tecidos ou órgãos funcionais.

Um tecido biológico é composto basicamente de células parenquimais e mesenquimais (células funcionais e de suporte, respectivamente) em meio a uma matriz extracelular (MEC). Uma estratégia recentemente usada na engenharia de tecidos é a de mimetizar a MEC, visando se aproximar ao máximo da composição e arquitetura de cada tecido vivo. Para isso, alguns *scaffolds*, estruturas desenvolvidas para atuar como suportes que facilitem o crescimento e a proliferação de células, são desenvolvidas como MEC artificiais, buscando promover interações do tecido artificial com o organismo implantado que evitem o reconhecimento deste material como estranho e promovam uma resposta das células que resulte na adesão, proliferação e diferenciação celular (Barnes et al., 2007; Elamparithi; Punnoose; Kuruvilla, 2016).

O principal constituinte da MEC de diversos tecidos é o colágeno, proteína de origem animal com funções estrutural, de promover resistência à deformação, de prevenir falhas mecânicas nos tecidos que compõe e de transmitir sinais biológicos para células responsáveis por funções específicas (Salvatore et al., 2020; Koláčná et al., 2007).

Para produção de *scaffolds* há diversos métodos a serem empregados, como liofilização, prototipagem rápida (impressão 3D), *casting*, entre outros, contudo, uma alternativa muito abordada recentemente tem sido o uso de técnicas de produção de fibras nano e submicrométricas, já que são estas as dimensões de fibras naturais encontradas na MEC de diversos tecidos. A dimensão destas fibras proteicas (50 a 500 nm de diâmetro) contribui para sua interação com as células (tipicamente com 10 a 100 μm), pois sendo até 2000 vezes menor que estas, um contato direto das células com diversas fibras é permitido. Dentre as técnicas de produção de fibras em escala micro e nanométrica, podem ser citadas a automontagem, a separação de fases, a eletrofiação e, mais recentemente, a fiação centrífuga e a fiação por sopro em solução (Barnes et al., 2007; Oliveira et al., 2014; Stojanovska et al., 2016).

Além das técnicas de automontagem e separação de fases apresentarem baixo rendimento, os polímeros que podem ser preparados nestas técnicas são

limitados (Barnes et al., 2007). Como resultado, muitas pesquisas envolvendo a produção de *scaffolds* por eletrofiação podem ser encontradas (Lu; Guo, 2018; Sell et al., 2009). A técnica de fiação por sopro em solução (no inglês *Solution Blow Spinning*, SB-Spinning) se assemelha em alguns aspectos à eletrofiação, porém utiliza um gás pressurizado em substituição a um campo elétrico para promover a formação de fibras poliméricas (Medeiros et al., 2009; Kumar; Sinha-Ray, 2018).

Apesar de apresentar semelhanças com a técnica de eletrofiação, a SB-Spinning apresenta algumas vantagens sobre essa técnica, como o fato de permitir a produção de fibras com maiores taxas de alimentação, o que implica em uma maior facilidade de escalonamento da produção e na possibilidade de deposição *in situ* das fibras produzidas sobre tecidos biológicos, já que neste processo de fiação não são utilizadas correntes elétricas de alta tensão para formar as fibras. Além disso, os solventes utilizados na técnica de SB-Spinning não são limitados àqueles que apresentam alta constante dielétrica, o que permite testes com um número ainda maior de solventes (Daristotle et al., 2016; Medeiros et al., 2009; Santos et al., 2016). Algumas das desvantagens da SB-Spinning em comparação à eletrofiação, por outro lado, são o diâmetro das fibras, que tende a ser maior e uma menor capacidade de controlar a reprodutibilidade e o alinhamento das fibras produzidas por esta técnica (Dadol et al., 2020; Khan; Hassan, 2021).

Portanto, é de grande interesse para as áreas envolvidas com a produção de *scaffolds* que seja avaliada a capacidade de se produzir fibras nano ou submicrométricas de colágeno por meio da técnica de SB-Spinning, buscando um sistema de solvente adequado para um posterior uso destas fibras como um biomaterial que mantenha a integridade da estrutura natural do polímero. Além disso, é importante compreender a correlação entre os diversos parâmetros de produção sobre o diâmetro, a morfologia e as propriedades das fibras produzidas.

1.1. Proteínas colagenosas: do colágeno à gelatina

Em humanos, 30% das proteínas que compõem seu corpo são proteínas colagenosas, o que corrobora o motivo do colágeno ser considerada a proteína estrutural mais abundante em tecidos de origem animal. As proteínas colagenosas são um grupo com 29 tipos, todas compostas por moléculas triméricas com uma estrutura primária baseada na repetição do padrão Glicina-X-Y, isto é, com uma glicina

se repetindo a cada três aminoácidos e com os aminoácidos prolina e hidroxiprolina ocupando frequentemente as posições X e Y, respectivamente. Este padrão de repetição é o responsável pela formação das hélices triplas, elemento estrutural característico da família de proteínas do colágeno, embora não seja observado apenas nestas (Koláčná et al., 2007; Rýglová; Braun; Suchý, 2017; Salvatore et al., 2020).

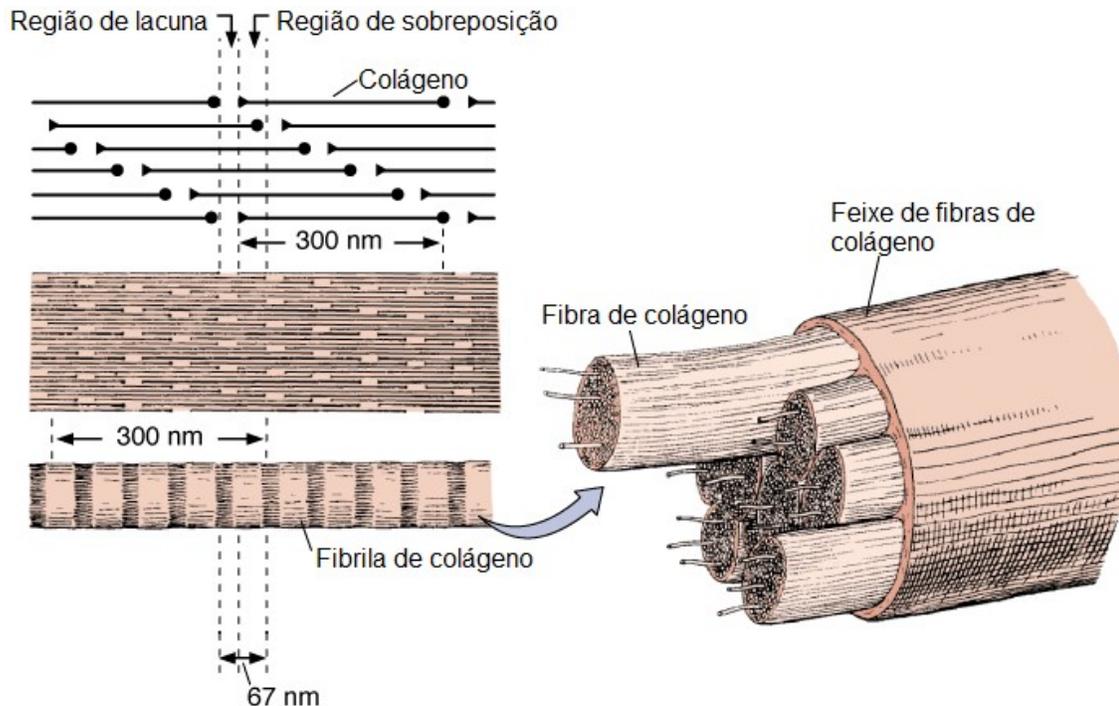
Para ser considerada uma proteína colagenosa, a proteína deve possuir ao menos um domínio de hélice tripla em sua molécula, ser capaz de formar agregados supramoleculares e ser produzida dentro de alguma matriz extracelular (Ricard-Blum; Ruggiero; Rest, 2005). Além disso, de acordo com a composição de cadeias hélice alfa, a proteína pode ser classificada como um homotrímero, isto é, com três cadeias de hélice α idênticas, ou como um heterotrímero, quando possuir apenas duas cadeias iguais e uma diferente (Koláčná et al., 2007). Os grupos laterais dos aminoácidos localizados nas posições X e Y nas moléculas de colágeno são dispostos na superfície das hélices triplas, o que resulta na capacidade desta proteína de promover interações laterais com outras moléculas, permitindo assim a formação dos agregados supramoleculares encontrados nas MEC (Ricard-Blum; Ruggiero; Rest, 2005).

O colágeno pode ser considerado uma molécula hidrofílica, por possuir aminoácidos ácidos, básicos e hidroxilados em maior quantidade que os lipofílicos, fator diretamente relacionado à reconhecida histocompatibilidade deste polímero. Em contrapartida, os aminoácidos prolina e hidroxiprolina representam, em conjunto, 25% dos aminoácidos da molécula, sendo estes os responsáveis por formar as partes mais rígidas das cadeias de colágeno (Rýglová; Braun; Suchý, 2017).

Os tipos de colágeno mais abundantes em tecidos adultos como a pele, os ossos e os músculos são os colágenos do tipo I ($(\alpha_1)_2\alpha_2$) e do tipo III ($(\alpha_1)_3$), que representam, respectivamente, cerca de 80% e 10% do colágeno encontrado no corpo humano (Koláčná et al., 2007; Rýglová; Braun; Suchý, 2017). O colágeno tipo I se apresenta na forma de fibras alongadas e sua unidade, o tropocolágeno, é composta por três cadeias polipeptídicas do tipo hélice α com cerca de 1000 aminoácidos de comprimento (300 nm) estabilizadas por ligações de hidrogênio entre aminoácidos de glicina e hidroxiprolina de cadeias adjacentes, interações intermoleculares do tipo de van der Waals e também ligações covalentes (Huang et al., 2001; Zeugolis et al., 2008).

A formação de agregados destas unidades de hélice tripla leva à formação de fibrilas, que por sua vez formam as fibras e, então, os feixes de fibras do colágeno (Figura 1).

Figura 1 - Padrão de organização das fibrilas e fibras de colágeno do tipo I.



Fonte: adaptado de Mescher, 2013.

O arranjo molecular das unidades de colágeno resulta em um padrão estriado das fibrilas de colágeno conhecido como faixas de período-D, que se repetem a cada 67 nm. Este padrão é perceptível em análises com algumas técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica de transmissão, a microscopia eletrônica de varredura por transmissão e a microscopia de força atômica (Elamparithi; Punnoose; Kuruvilla, 2016; Zeugolis et al., 2008).

O tecido de onde é extraído o colágeno determina sua organização estrutural, que poderá ser, por exemplo, altamente anisotrópica no caso de ser extraído de tendões ou pouco interconectado, se extraído de peles, pois a função exercida pela proteína determinará seu arranjo estrutural, e conseqüentemente, suas propriedades mecânicas, o que poderá influenciar também no rendimento dos processos de extração da proteína. Espécies diferentes também costumam produzir colágenos com diferenças, inclusive na estrutura primária. Um exemplo é o colágeno de pele de peixe, que apresenta menores quantidades de hidroxiprolina em sua composição, o que resulta em uma menor resistência térmica, uma vez que este

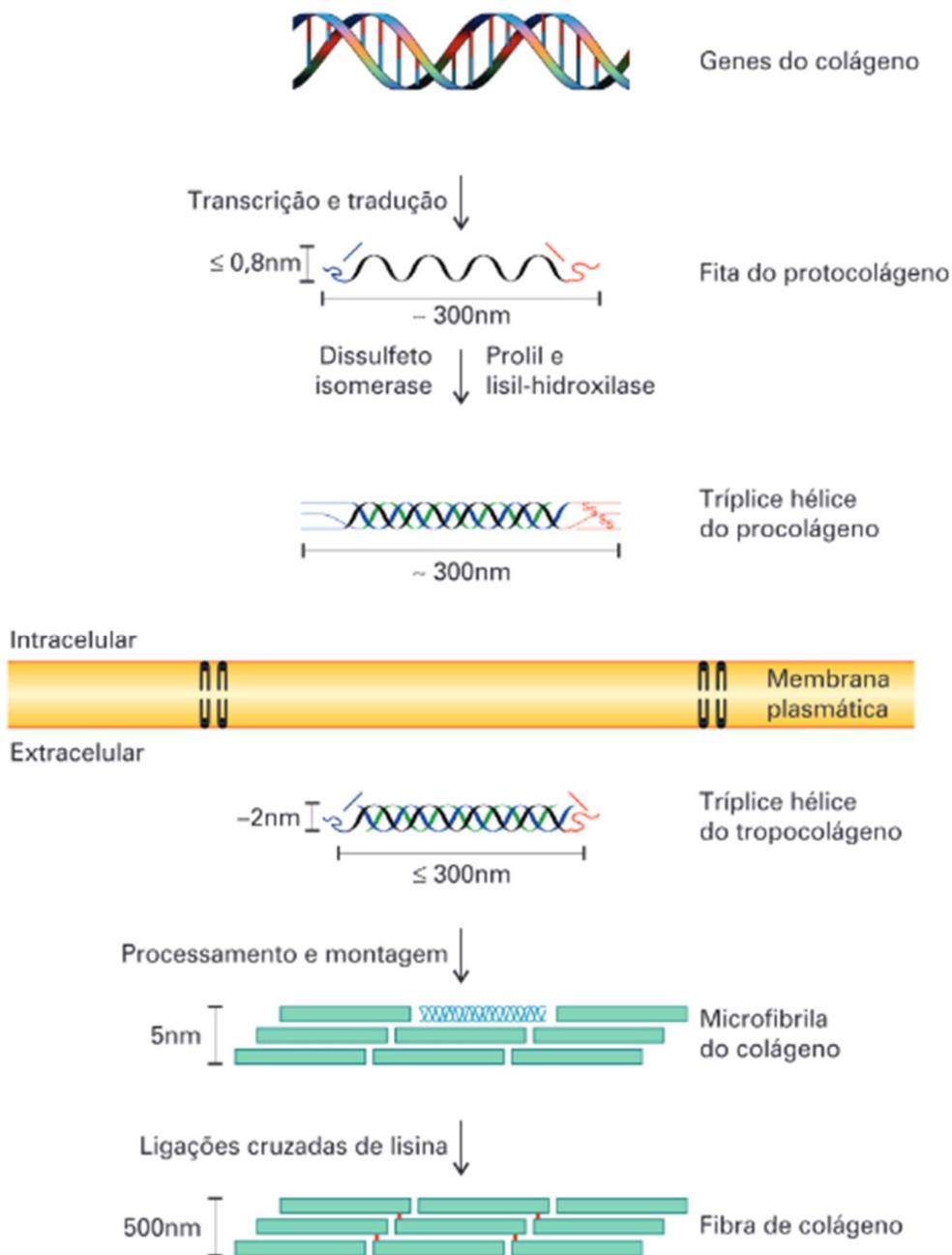
aminoácido está diretamente relacionado com a estabilização da hélice tripla (Rýglová; Braun; Suchý, 2017; Yamamoto et al., 2015; Zhang et al., 2020).

Enquanto material para aplicações em engenharia de tecidos, o colágeno é reconhecido por ser biodegradável, reabsorvível, apresentar excelente compatibilidade celular e promover regeneração tecidual, sendo estas atividades biológicas diretamente relacionadas à estabilidade de sua estrutura de hélice tripla (Koláčná et al., 2007; Salvatore et al., 2020; Yamada et al., 2014). A habilidade do colágeno de promover adesão e proliferação celular pode ser explicada por sua habilidade em interagir com receptores localizados na superfície das células, como as integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ e $\alpha 11\beta 1$ (DeFrates et al., 2018).

A síntese do colágeno (Figura 2) se inicia dentro de fibroblastos, osteoblastos e condroblastos, em seus ribossomos, com a produção de cadeias precursoras de folhas alfa, as pré-pró-cadeias α . Seus domínios N-terminais, que servem de sequência sinalizadora, são eliminados em seguida, ao serem liberados no retículo endoplasmático rugoso, gerando as pró-cadeias α . Neste, algumas lisinas e prolinas são hidroxiladas, das quais algumas são também glicosiladas com glicoses ou glicosil-galactoses. Depois disso ocorre a junção de três dessas cadeias com a formação de ligações dissulfeto na porção C-terminal, seguida da formação da hélice tripla, resultando nas moléculas de procolágeno, que quando já fora das células têm finalmente as extremidades C- e N-terminais do pró-peptídeo clivadas, formando o tropocolágeno (Harvey; Ferrier, 2012; Rýglová; Braun; Suchý, 2017).

A extração do colágeno é feita por meio de hidrólise ácida ou pelo uso de enzimas proteolíticas e uma vez extraído, pode ser convertido em diferentes formas, como pó, pasta, filmes, folhas, esponjas, flocos, soluções ou suspensões, por meio de sua ressolubilização ou suspensão seguida de diferentes processos, dentre eles a liofilização ou a secagem por *casting* (Salvatore et al., 2020; Zeugolis et al., 2008). Independentemente do método de extração e da forma obtida, sob condições apropriadas é possível se obter colágeno com a preservação do padrão estriado característico das faixas de periodicidade D, estrutura nativa do colágeno em MEC.

Figura 2 - Síntese do colágeno do tipo I.



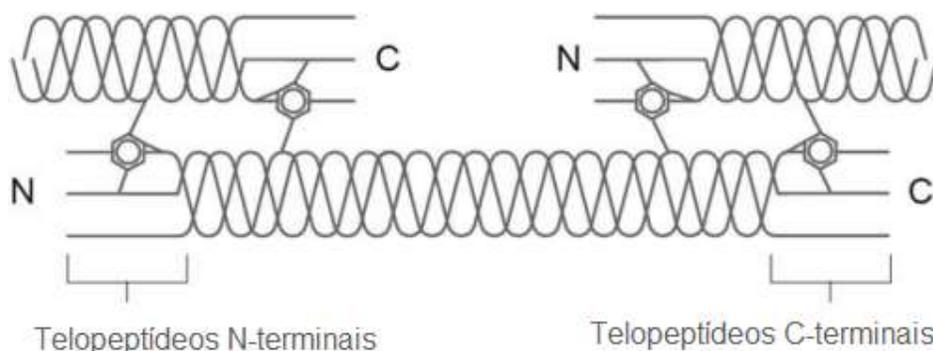
Fonte: Universidade de São Paulo, 2022.

Em sua forma natural o colágeno é encontrado como fibras insolúveis ou pouco solúveis, devido ao fato de suas fibrilas serem estabilizadas por interações intermoleculares e ligações químicas cruzadas, estando esta solubilidade também relacionada à maturidade do tecido. Para aumentar sua solubilidade é necessário isolar esta proteína por meio de tratamentos que, de modo geral, se iniciam com a remoção, quando necessário, de gorduras (com detergente ou álcool butílico, por

exemplo), seguido da remoção de proteínas não colagenosas e de cálcio com soluções de NaOH e EDTA (mais comum em extrações a partir de ossos ou escamas), respectivamente, e então sua extração em algum ácido ou com o uso de enzimas como a pepsina e a tripsina. Este processo segue com etapas de filtração, centrifugação e diálise, além de sua liofilização, etapa que garante a obtenção de uma forma mais durável de colágeno quando comparado com suas soluções, bem como de um material que pode ser facilmente convertido a outra forma após ressolubilização. A necessidade de diversas etapas para a obtenção de colágeno leva a perdas durante seu processamento e redução do rendimento deste processo. Desta forma, fontes de colágeno compostas por materiais que requeiram tratamentos mais brandos, como as peles de peixe, tendem a necessitar de menos etapas de obtenção e resultar em maiores rendimentos e economia de reagentes e outros recursos, quando comparado com fontes de animais mamíferos, por exemplo. A solubilidade do colágeno após tratamento dependerá da concentração de sais em suas soluções, já que o aumento da força iônica das soluções leva a precipitação das proteínas pelo aumento das interações hidrofóbicas e, também, da concentração de íons hidrogênio em solução, já que estes facilitam o acesso de moléculas de água às fibrilas de colágeno, favorecendo seu intumescimento e, conseqüentemente, sua solubilidade (Rýglová; Braun; Suchý, 2017; Salvatore et al., 2020; Yamada et al., 2014).

Nas extrações com a enzima pepsina ocorre a clivagem de reticulações apenas nos telopeptídeos C- e N-terminais (Figura 3), regiões não helicoidais, resultando em um derivado do colágeno denominado atelocolágeno (Hsieh; Periasamy, 2020; Zeugolis et al., 2008). Contudo, a estes telopeptídeos é atribuída a responsabilidade por manter o alinhamento da cadeia na forma de hélice tripla, o que sugere que a ação da enzima durante as extrações não deve ocorrer em todos os telopeptídeos, já que os materiais extraídos por este processo também preservam sua capacidade de automontagem espontânea *in vitro* sob condições apropriadas (Rýglová; Braun; Suchý, 2017; Siddiqui et al., 2013).

Figura 3 - Representação das fibrilas de colágeno do tipo I com destaque para os telopeptídeos N e C-terminais.



Fonte: adaptado de Hlaing e Compston (2014).

Ao expor o colágeno a tratamentos térmicos acima de sua temperatura de desnaturação ocorre o rompimento de ligações de hidrogênio e covalentes em tal número que acontece a desestabilização irreversível da estrutura de hélice tripla, resultando em gelatina. Previamente a este processo de desnaturação térmica é necessário intumescer a fonte de proteína e nessa etapa pode ser usada uma solução ácida ou alcalina, dependendo do grau de reticulação do material. Fontes menos reticuladas são tipicamente intumescidas com soluções ácidas, resultando em uma proteína com ponto isoelétrico (pI) entre 6,0 e 9,0 classificada como tipo A; materiais mais reticulados são tratados com soluções básicas, resultando na gelatina do tipo B, com pI entre 4,8 e 5,2. Ao fim deste processo é obtida uma mistura de polipeptídeos de cadeias α , β e γ , isto é, formados por cadeias simples ou por duas ou três cadeias α covalentemente reticuladas, respectivamente (Benjakul; Kittiphattanabawon, 2019; DeFrates et al., 2018; Grand View Research, 2020; Hanani, 2016; Rýglová; Braun; Suchý, 2017).

As gelatinas comerciais podem ser classificadas também quanto à força do gel que produzem, apresentando valores de Bloom de 50 a 300. De acordo com esta classificação, as gelatinas podem ser de alto (> 220), médio (de 150 a 220) ou baixo (< 150) Bloom, sendo esta propriedade diretamente relacionada à massa molar da proteína, que pode variar de 15 a 400 kDa (Benjakul; Kittiphattanabawon, 2019; Hanani, 2016).

Este produto da desnaturação do colágeno também é uma proteína de interesse para a engenharia de tecidos, pois apesar de não apresentar o mesmo desempenho que o colágeno em aplicações biomédicas, ainda apresenta

biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de maior disponibilidade comercial e baixo custo, já tendo inclusive demonstrado atividade cicatrizante, auxiliando na regeneração tecidual. A principal desvantagem da gelatina enquanto biomaterial é sua solubilidade em água, propriedade que afeta seu desempenho em sistemas biológicos, compostos de meios aquosos, o que resulta em uma rápida degradação e absorção da mesma, muitas vezes comprometendo as funções do dispositivo que a proteína compõe. No entanto, assim como o colágeno, a gelatina pode ser reticulada por meio de diversos agentes reticulantes para ganhar estabilidade e resistir aos efeitos da temperatura e da composição do local de aplicação (DeFrates et al., 2018; Rýglová; Braun; Suchý, 2017; Zhang et al., 2009) sem a perda de sua biodegradabilidade (Chen et al., 2022; Ko et al., 2017).

Embora seja difícil quantificar com precisão o tamanho do mercado internacional de colágeno e as cifras que este material movimenta, bem como sua taxa de crescimento, seu uso em diversas áreas é um forte indício da relevância econômica desta proteína. Se estima que em 2018 mais de US\$ 620 milhões foram movimentados mundialmente no comércio deste polímero natural, valor que em 2023 pode chegar a quase US\$ 900 milhões. No entanto, o custo desta matéria-prima varia de acordo com sua aplicação, já que aplicações mais nobres vão necessitar de maiores taxas de pureza, mais controle do processo de extração e, eventualmente, fontes menos disponíveis. Para exemplificar esta diferença, o colágeno usado em aplicações alimentícias custa, em média, menos de US\$ 100 por quilograma, enquanto para aplicações médicas pode chegar à faixa de US\$ 5.000 a US\$ 50.000 por quilograma (Salvatore et al., 2020).

No caso da gelatina, muito empregada nas indústrias alimentícia (como agente estabilizante, espessante, gelificante, de clarificação, formador de filmes, entre outros), farmacêutica e biomédica (principalmente para fabricação de cápsulas, curativos para feridas e suplementos), cosmética (em condicionadores, xampus e batons, por exemplo) e fotográfica (como agente gelificante para suspensão de sais de prata), seu mercado global em 2019 era de aproximadamente 620 mil toneladas, chegando a movimentar 3,2 bilhões de dólares em 2020, com custo variando entre US\$ 8 e 500 por quilograma (Benjakul; Kittiphattanabawon, 2019; Grand View Research, 2020).

1.2. Fibras ultrafinas de colágeno

Devido a vasta gama de aplicações do colágeno, como nas áreas alimentícia e nutracêutica, cosmética, na engenharia de tecidos, dentre outras, o número de estudos publicados empregando este polímero é cada vez maior (Salvatore et al., 2020; Silva et al., 2014). Quando focamos nos relatos da produção de fibras ultrafinas usando esta proteína, ainda é possível encontrar diversos trabalhos, sendo a maioria produzida por eletrofiação, técnica mais empregada para produção de fibras nano ou submicrométricas (Bahria, 2017; Lu; Guo, 2018; Santos et al., 2020).

Alguns destes trabalhos são listados na Tabela 1, destacando o tipo e fonte do colágeno, solvente empregado e diâmetro das fibras produzidas, entre outras informações. A análise das informações contidas na Tabela 1 permite algumas conclusões a respeito da produção de fibras ultrafinas de colágeno por eletrofiação. Primeiramente, fica evidente que apenas os colágenos dos tipos I, II e III são usados para este fim, com uma predominância do colágeno do tipo I. Estes três tipos de colágeno fibrilares são os mais abundantes em tecidos animais, o que explica seu uso (Dong; Lv, 2016).

É possível notar que diversas fontes são usadas para extrair o colágeno aplicado na produção de fibras por eletrofiação, embora a maioria dos estudos use como fontes de extração os tecidos de mamíferos. No entanto, há dois trabalhos que empregam tecidos de peixes como fonte de colágeno, uma tendência mais recente que visa contornar os raros, porém existentes, transtornos envolvidos com o uso de colágenos extraídos de alguns mamíferos, como a chance baixa (em torno de 3% da população) de despertar alguma reação imune, ou de transmitir zoonoses como as do grupo das encefalopatias espongiiformes bovinas. Para além dessa questão de saúde, fatores culturais também impulsionam o crescimento no uso de fontes de origem aquática para a extração de colágeno, como no caso de comunidades hindus, judias e muçulmanas, que podem evitar o uso de materiais desenvolvidos com colágenos de fontes bovinas ou suínas (Salvatore et al., 2020; Silva et al., 2014).

Tabela 1 – Fibras de colágeno produzidas por eletrofiiação.

Tipo	Fonte	Blenda	Solvente	Concentração	Diâmetro (nm)	Vazão (mL/h)	Autores
I	Pele de tilápia	-	HFP	8%	310 ± 117	1,0	Zhou et al., 2016
I	Peixe (Heliosorb®)	-	HAc/DMSO (93/7)	10%	200 – 1100	0,60	Elamparithi et al., 2016
I	Caudas de ratos	-	HFP/HAc (1/1)	9,1%	363 ± 148	1,0	Luo et al., 2018
I	Pele de bezerro	PLA	HFP	I/PLA (1:7) 8%	1670 ± 410	0,5 a 1,5	Barrientos et al., 2017
I	Pele de bezerro	PCL/PTHF copolímero	HFP	I/copolímero (1:9) 5,0%	444 ± 67	1,0	Jiang et al., 2018
I	Pele bovina	PCL (80 kDa)	HAc	I/PCL (3:1) I/PCL (1:1) I/PCL (1:3)	115 ± 39 130 ± 38 148 ± 30	0,70	Chakrapani et al., 2012
I	Tendões de caudas de ratos	PEO (900 kDa)	HCl	PEO/I 1%	100 - 150	6,0	Huang et al., 2001
I	Pele de bezerro	PHBV/óxido de grafeno	TFE/ clorofórmio (1/1)	16%	400 - 500	1,0	Zine et al., 2017
I	Pele de bezerro	PHBV	HFP	I/PHBV (3:7) 6%	495 ± 92	1,0	Wang et al., 2016
I, III	Pele de bezerro e placenta humana	-	HFP	I (5,2%) III (2,5%) I/III (3,75%)	100 ± 40 250 ± 150 390 ± 290	5,0	Matthews et al., 2002
I, III	Pele de bezerro e placenta humana	Elastina (EL)	HFP	I 1,9% I 6,2% III 5,2% I/III/EL (2:2:1) 5,2%	100 ± 40 4600 ± 2100 250 ± 150 490 ± 220	2,0 – 8,0	Boland et al., 2004
I/III	Pele fetal de bezerro	PDO	HFP	(I/III)/PDO (1:9) (3,75%/6,25%) (I/III)/PDO (3:7) (3,75%/6,25%)	210 ± 110 340 ± 140	8,0	Barnes et al., 2015
II	Articulações de fetos bovinos	-	HFP	3,75%	180 ± 69	2,0	Barnes et al., 2007
II	Cartilagem de frango	-	HFP	2,5% 6,25%	110 ± 90 1750 ± 900	2,0	Matthews; Boland, 2003

Fonte: autoria própria.

Outra vantagem no uso destas fontes para extração de colágeno é o fato de muitas serem consideradas resíduos da indústria pesqueira, como escamas, pele e barbatanas, que ao contrário da pele bovina - que pode ser usada na produção de couro, por exemplo - são usadas em aplicações menos nobres, como na produção de ração animal, quando não são descartadas (Mahboob, 2015). A tilápia, por exemplo, peixe a partir do qual tem se tornado comum a extração de colágeno (Sun et al., 2017; Yamamoto et al., 2014; Yamamoto et al., 2015; Yan; Qin; Li, 2015; Zhou et al., 2016) possui um mercado global que vem crescendo nos últimos trinta anos a uma média de 11 % ao ano, tendo sido avaliado em US\$ 11 bilhões em 2017, com uma produção estimada de cerca de 6 milhões de toneladas. No mesmo período o mercado brasileiro cresceu em média 14 % ao ano, chegando a produzir aproximadamente 600 mil toneladas avaliadas em US\$ 1,5 bilhão no ano de 2017 (Barroso; Muñoz; Cai, 2019).

Mesmo sendo menos estabelecidos comercialmente, a segurança e os benefícios dos colágenos de fontes aquáticas já foram comprovados, não apresentando citotoxicidade, reações intracutâneas ou toxicidade sistêmica aguda (Yamamoto et al., 2014). Fibras nanométricas de colágeno de tilápia produzidas por eletrofiação já inclusive demonstraram acelerar a cicatrização de feridas em ratos, induzindo a proliferação e diferenciação de queratinócitos durante o processo de reepitelização e apresentando bons resultados de intumescimento e molhabilidade, propriedades essenciais a materiais para cicatrização de feridas (Zhou et al., 2016).

Além de ser eletrofiado isoladamente, é comum a produção de fibras de blendas de colágeno com polímeros sintéticos, dentre eles polidioxanona, PDO (Barnes et al., 2015), ácido polilático, PLA (Barrientos et al., 2017), poli(óxido de etileno), PEO (Huang et al., 2001), policaprolactona, PCL (Chakrapani et al., 2012) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), PHBV (Wang et al., 2016; Zine; Sinha, 2017) ou naturais, como a quitosana (Chen et al., 2010) e a elastina (Boland et al., 2004), entre outros. Nos estudos de Chakrapani e colaboradores (2012), que produziram blendas de colágeno com PCL empregando como solvente o ácido acético (HAc), e de Huang et al. (2001), que combinou a proteína com PEO em soluções diluídas de ácido clorídrico (HCl), os polímeros sintéticos foram essenciais para a produção de fibras nanométricas, já que na ausência destes não foi possível formar fibras ou estas foram produzidas de modo irregular. Em alguns casos essas blendas são produzidas por eletrofiação coaxial, isto é, usando agulhas concêntricamente

posicionadas para que sejam produzidas fibras com núcleo de um polímero e exterior de outro (Bahria, 2017; Chakrapani et al., 2012).

Os dados da Tabela 1 permitem observar que a dimensão das fibras eletrofiadas de colágeno ou de suas blends varia da escala nanométrica a alguns micrômetros e que há uma relação direta entre o aumento do diâmetro das fibras com o aumento da concentração das soluções eletrofiadas, conforme demonstrado por Matthews e Boland (2003) e Boland et al. (2004). Além disso, outros materiais podem ser incorporados a estas fibras para agregar ou reforçar algumas propriedades, como o óxido de grafeno, uma forma oxidada de folhas de grafeno com atividade antimicrobiana (Zine; Sinha, 2017).

Quanto aos solventes empregados na produção de fibras de colágeno por eletrofiação, o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) é o solvente mais usado, um fluoroálcool, assim como o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Contudo, estes solventes são considerados potencialmente tóxicos, corrosivos e de alto custo (Arafat et al., 2015; Barros et al., 2020; Elamparithi; Punnoose; Kuruvilla, 2016). Zeugolis e colaboradores (2008) demonstraram que fibras de colágeno tipo I produzidas por eletrofiação com HFP e TFE não apresentam a estrutura de período-D, demonstram menores temperaturas de desnaturação e as mantas constituídas de fibras eletrofiadas com esses solventes se mostraram solúveis em água, todos indícios da desnaturação do colágeno durante seu processamento, resultando em gelatina. Estes solventes fortemente polares podem afetar o arranjo microfibrilar do colágeno por meio do rompimento de diversas interações intermoleculares, preservando, contudo, sua estrutura proteica secundária, alteração evidenciada por espectroscopia na região do infravermelho por Luo e colaboradores (2018). De modo controverso, Matthews et al. (2002) relataram a preservação do padrão estriado do colágeno em fibras produzidas por eletrofiação usando suspensões de colágenos dos tipos I e III em HFP e reticuladas com glutaraldeído.

Uma estratégia estudada para resolver o problema com a solubilidade destas fibras produzidas com fluoroálcoois foi sua reação com agentes reticulantes, dentre eles vapor de glutaraldeído (GT) e soluções de genipina (GP) ou de cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida com N-hidroxissulfossuccinimida (EDC-sNHS). Embora facilmente solúveis em água e soluções aquosas como o tampão fosfato-salino, após reticulação as mantas de colágeno demonstraram apresentar

estabilidade em meio aquoso por pelo menos dois meses. Todas as mantas favoreceram a adesão e proliferação de células da linhagem celular MC3T3-E1 (precursoras de osteoblastos), embora as fibras reticuladas com as soluções de GP ou EDC-sNHS tenham apresentado aumentos em seu diâmetro e as reticuladas com vapor de GT uma redução não significativa desta medida (Luo et al., 2018).

A estratégia usada por Arafat e colaboradores para contornar o problema da solubilidade destas fibras foi usar a técnica de fiação úmida, uma técnica desenvolvida pela indústria têxtil, para produzir fibras de colágeno. Contudo, apesar de terem obtido fibras estáveis em soluções aquosas por pelo menos uma semana e com a preservação quase completa de suas hélices triplas, seu diâmetro ficou em torno de 100 μm (Arafat et al., 2015). Outra estratégia empregada foi a substituição dos já comumente usados fluoroálcoois por solventes aquosos na eletrofiação desta proteína, assunto abordado na Seção 1.4.

1.3. Fibras ultrafinas de gelatina

A gelatina também é uma proteína muito empregada no desenvolvimento de biomateriais e de materiais para a área de alimentos e nutracêutica (Benjakul; Kittiphattanabawon, 2019). Quando usada na forma de fibras ultrafinas, a técnica mais empregada para produção de mantas a base de gelatina é a eletrofiação, assim como no caso do colágeno. Estas nano, submicro ou microfibras foram estudadas em aplicações na liberação de fármacos, reconstrução óssea, em curativos e na odontologia (Aldana; Abraham, 2017; Lu; Guo, 2018). Alguns destes trabalhos são listados na Tabela 2, destacando o tipo e fonte da gelatina, o solvente empregado e o diâmetro das fibras produzidas, entre outras informações.

É possível notar que há um predomínio de trabalhos usando a gelatina do tipo A, obtida de pele suína, possivelmente pelo fato desta ser obtida de fontes com colágeno menos reticulado (Noor et al., 2021), o que pode contribuir para sua solubilidade. Além disso, a gelatina do tipo B apresenta pI em uma faixa de pH ligeiramente ácida, próxima ao valor do pH de algumas soluções empregadas para solubilizar a gelatina para eletrofiação, o que pode contribuir para precipitação desta proteína e, portanto, para sua menor solubilidade.

Tabela 2 – Fibras de gelatina produzidas por eletrofiação.

Tipo	Fonte	Blenda	Solvente	Concentração	Diâmetro (nm)	Vazão (mL/h)	Autores
A	Pele suína	-	HAc _(aq) (70%)	15%	39 ± 6	0,1	Saadat; Emam-Djomeh; Askari, 2021
				20%	143 ± 33		
				25%	234 ± 34		
				30%	367 ± 40		
				35%	550 ± 82		
B	Bovina	-	HAc/AcEt/água	8 - 11%	47 – 145	0,06	Song; Kim; Kim, 2008
A	Pele suína	-	Ácido fórmico (98%)	7%	74 ± 16		Ki et al., 2005
				8%	76 ± 14		
				9%	90 ± 19		
				10%	131 ± 13		
				11%	145 ± 19		
				12%	169 ± 33		
A	Pele suína	Ácido hialurônico	Água/etanol (9:1)	4,5 - 15%	200 - 240	3,6	Li et al., 2006
A	Pele suína	MEC decelularizada	HAc _(aq) (90%)	14%	200 ± 70	0,4	Baiguera et al., 2014
				G/MEC (99:1) 14%	320 ± 70		
A	Pele suína	PCL (80 kDa)	HFP	5,0%	790	1,0	Longo et al., 2022
				G/PCL (1:4) 5,0%	520		
				G/PCL (2:3) 5,0%	890		
				G-PCL (core-shell) 5,0%	780		
A	Pele suína	PCL (80 kDa)	TFE TFE/HAc (99,9: 0,1)	PCL-G (core-shell) 5,0%	650	2,0	Feng et al., 2012
				G/PCL (1:1) 10%	440 ± 63		
B	Pele bovina	PHBV	HFP	G/PHBV (3:7) 6%	510 ± 86	2,0	Wang et al., 2016

Fonte: autoria própria.

Ratanavaraporn et al. (2010) produziram fibras ultrafinas de gelatinas dos tipos A e B por eletrofiação empregando ácido fórmico como solvente e notaram que a gelatina do tipo A produz soluções mais viscosas (para concentrações entre 20 e 40%, faixa em que foi possível obter fibras uniformes e sem *beads*, esferas presentes nas fibras também conhecidas como contas) e com menor condutividade elétrica; os autores relatam ainda que após reticular estas fibras o grau de reticulação das fibras de gelatina do tipo B foi maior para todos os tratamentos testados, exceto para a reticulação por meio de plasma acoplado indutivamente pulsado. Uma vez que o tratamento por plasma foi o único processo de reticulação testado que não depende do teor de grupos carboxílicos nas cadeias de gelatina, esses resultados foram associados ao maior teor de grupos -COOH presentes na gelatina do tipo B.

As atividades biológicas da gelatina e do colágeno foram comparadas em um estudo desenvolvido por Wang et al. (2016), no qual eles eletrofiaram PBHV puro e na forma de blendas contendo 30% em massa de colágeno, gelatina ou queratina, outra proteína. Os resultados obtidos com células da linhagem NIH 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongos) indicaram que embora a adesão celular tenha ocorrido em todas as fibras, a presença das proteínas melhorou os resultados de proliferação e viabilidade celular, com melhores resultados para as fibras contendo colágeno e depois nas com gelatina, o que reforça os benefícios destas proteínas na produção de biomateriais. Fibras de blendas contendo gelatina já foram produzidas com outros polímeros naturais, como o ácido hialurônico (Li et al., 2006) ou matriz extracelular de cérebro de ratos decelularizada, um material rico em glicosaminoglicanos (Bauguera et al., 2014).

Blendas de gelatina com polímeros sintéticos como a PCL também foram produzidas por eletrofiação (Feng et al., 2012; Longo et al., 2022.). Ao notar que a partir de 30% de PCL em relação à massa de gelatina levava à precipitação de gelatina em soluções de TFE, Feng et al. (2012) estudaram o efeito de estabilização destas soluções com a inclusão de HAc em quantidades mínimas (0,1; 0,2 ou 0,3%) e observaram que com apenas 0,1% deste ácido orgânico já é possível produzir soluções de gelatina/PCL (1:1) sem separação de fases; estas soluções acidificadas ainda apresentaram redução do pH, da viscosidade, da tensão superficial e dos diâmetros das fibras produzidas, além de uma aumento dos valores de condutividade das soluções e de elasticidade e resistência a tração das fibras obtidas.

Além das blendas convencionais, fibras ultrafinas de gelatina podem ser produzidas com outros polímeros na forma de fibras concêntricas por eletrofiação coaxial. Longo e colaboradores (Longo et al., 2022) avaliaram as diferenças entre fibras produzidas a partir de blendas de gelatina com PCL de modo convencional, isto é, misturando diretamente os dois polímeros (com 20 ou 40% de gelatina) e por eletrofiação coaxial, mudando o polímero que compunha o interior e o exterior da fibra. Primeiramente foi observado que a adição da gelatina diminuiu a cristalinidade das fibras de PCL de modo proporcional ao teor de gelatina, mas mais notáveis foram as alterações observadas nas propriedades mecânicas destes materiais; as fibras produzidas diretamente a partir das misturas de gelatina/PCL apresentaram aumentos no valor da deformação na ruptura, enquanto as fibras concêntricas apresentaram uma redução neste valor, independente de qual polímero compunha o interior das fibras. Este efeito de aumento da elasticidade das fibras foi associado a uma boa compatibilidade entre os dois materiais quando misturados em solução, o que deve ter aumentado a mobilidade das cadeias poliméricas, resultando em sua maior deformabilidade.

Os dados da Tabela 2 permitem notar que embora seja possível obter fibras nanométricas de gelatina, isso ocorre apenas em pequenas concentrações, já que com o aumento da concentração das soluções fibras mais espessas são obtidas (Ki et al., 2005; Li et al., 2006; Saadat; Emam-Djomeh; Askari, 2021). A formação de fitas em vez de fibras para soluções concentradas de gelatina em ácido fórmico foi relatada por Ratanavaraporn et al. (2010) (com 50 ou 60% de gelatina) e por Wang et al. (2011) (acima de 20% do polímero); este efeito foi associado à formação de fibras ocas devido à alta volatilidade do solvente, seguido de seu colapso, resultando na abertura destas estruturas. Wang et al. (2011) ainda relatou a formação de nanoteias, fibras mais finas e estruturadas como redes bidimensionais com um arranjo semelhante ao de teias de aranha, obtidas sob condições controladas, isto é, na presença de NaCl, baixa umidade relativa e usando ácido fórmico como solvente.

Uma alternativa para agregar ou reforçar algumas propriedades às fibras ultrafinas de gelatina é a incorporação de compostos ativos, como o extrato de casca de romã (Saadat; Emam-Djomeh; Askari, 2021), rico em compostos com atividades antioxidante e antibacteriana ou outros agentes antibacterianos (Rujitanaroj; Pimpha; Supaphol, 2008) ou antifúngicos (Lakshminarayanan et al., 2014). Saadat, Emam-

Djomeh e Askari (2021) encapsularam extrato etanólico de casca de romã em fibras nano ou submicrométricas de gelatina e conseguiram com isso aumentar sua biodisponibilidade, conservando uma maior quantidade de extrato após digestão estomacal ou intestinal simuladas. Lakshminarayanan et al., 2014 testaram a incorporação de cinco fármacos antifúngicos aprovados pela *US Food and Drugs Administration* em fibras de gelatina, obtendo com alguns destes fármacos mantas antifúngicas e não tóxicas. Já Rujitanaroj, Pimpha e Supaphol (2008) produziram nanopartículas de prata - reconhecidas por sua ação antibacteriana - nas próprias soluções de gelatina por simples adição de nitrato de prata; as nanopartículas foram formadas ao longo do tempo após adição nas soluções e quando em meios aquosos foram liberadas das fibras de gelatina, promovendo atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Visando aliar as propriedades promissoras destas fibras aos benefícios da aplicação *in situ* destes materiais, um dispositivo portátil foi desenvolvido para aplicação na cicatrização de feridas. Chen et al. (2021) criaram um dispositivo por impressão 3D com o qual produziram fibras submicrométricas de PLA/gelatina e testaram seu desempenho no reparo de feridas cutâneas em ratos. Além das mantas de PLA/gelatina não terem apresentado citotoxicidade, estas preservaram a atividade celular de fibroblastos cultivados *in vitro* aumentando sua proliferação. Por fim, os autores reportaram uma completa recuperação das feridas cutâneas no grupo tratado com as mantas de nanofibras, enquanto no grupo controle a recuperação foi apenas parcial, reforçando a aplicabilidade desta tecnologia na cicatrização de feridas da pele.

Já Xue et al. (2013) usou mantas eletrofiadas de gelatina/PCL e condrócitos para produzir materiais tridimensionais cartilagosos com forma tridimensional. Os autores partiram de um molde em liga de titânio com formato de orelha para depositar mantas de gelatina/PCL e condrócitos alternadamente, formando uma estrutura multicamada composta de 15 camadas poliméricas. Em seguida este material foi mantido por duas semanas em cultura celular e então implantado no subcutâneo de um rato por mais seis semanas sem o molde de titânio. Por fim o material obtido foi analisado por análises histológicas confirmando a formação de uma cartilagem com certa elasticidade e preservando sua forma, apresentando um índice de similaridade acima de 91% em relação ao molde usado.

Ao contrário do colágeno, os solventes aquosos são mais empregados na produção de fibras ultrafinas de gelatina que os fluoroálcoois (Tabela 2), o que pode estar relacionado com a maior facilidade de solubilizar altas concentrações de gelatina nestas soluções, uma vez que, diferente do colágeno, a gelatina é solúvel mesmo em água. Apesar desta vantagem no uso de solventes mais seguros, a solubilidade da gelatina torna necessário para a maioria de suas aplicações que se reticule os materiais a base de nanofibras de gelatina. Em virtude desta necessidade, diversos métodos podem ser encontrados, dentre eles métodos químicos, usando agentes reticulantes mais comuns como glutaraldeído ou opções mais seguras como a geninipina e até mesmo métodos de reticulação por irradiação ou com o uso de tratamento térmicos (Campiglio et al., 2019; Panzavolta et al., 2011; Sisson et al., 2009).

Embora eletrofiação seja a técnica mais empregada na produção de fibras ultrafinas de gelatina, algumas mantas deste polímero já foram produzidas usando a fiação úmida (Tronci et al., 2015) ou a fiação por sopro em solução (Greenhalgh et al., 2017; Vilches et al., 2019). Nas Seções 2.4 e 2.5 as fibras de gelatina produzidas com solventes benignos por eletrofiação e por SB-Spinning, respectivamente, serão abordadas.

1.4. Solventes benignos na produção de fibras ultrafinas

O uso de solventes menos tóxicos e mais seguros, também denominados solventes verdes ou benignos é uma preocupação atual nas mais diversas áreas, tanto pela preocupação com a saúde das pessoas envolvidas nos processos produtivos que empregam tais solventes, quanto por seus impactos ambientais e pelos custos com a possível necessidade de etapas posteriores de purificação de produtos. Essa última preocupação se faz ainda mais relevante na produção de biomateriais, pelo risco de danos mais diretos à saúde de indivíduos já debilitados. No caso da produção de nanofibras de colágeno, vimos que há uma preocupação mais particular envolvida, o risco de destruição da estrutura nativa desta proteína e perda de algumas de suas propriedades (Liverani; Roether; Boccaccin, 2017; Pinto; Ribeiro; Machado, 2019). Neste sentido, diversos trabalhos têm se atentado a busca de solventes benignos para produção de fibras ultrafinas de colágeno e gelatina. A seguir, alguns resultados nesta área são apresentados.

A produção de fibras ultrafinas por técnicas como a SB-Spinning e a eletrofiação dependem de diversos parâmetros das soluções empregadas, dentre eles a concentração do polímero, a viscosidade da solução e a taxa de evaporação do solvente e, no caso da eletrofiação, um dos parâmetros mais relevantes é a tensão superficial, visto que esta deve ser superada pelo potencial elétrico aplicado para que os jatos de solução sejam formados, iniciando o processo de produção das fibras (Xue et al., 2019). Visando substituir os fluoroálcoois comumente empregados na produção de fibras protéticas por eletrofiação, um sistema de solventes composto por água, HAc e acetato de etila (AcEt) foi empregado por Song, Kim e Kim (2008) variando as proporções destes três solventes. Embora soluções com menos de 20% de água tenham se mostrado imiscíveis com a inclusão de AcEt, o HAc e o AcEt levaram à redução da tensão superficial das soluções de gelatina, já que possuem valores de tensão superficial menores que o da água. Além disso, o uso de solventes contendo um teor de AcEt igual ou superior ao de HAc levou à gelificação de suas soluções, enquanto soluções sem AcEt só produziram fibras sem a formação de *beads* com solventes contendo mais de 80% de HAc.

Visando manter a integridade do colágeno durante a eletrofiação, um solvente composto por HAc e dimetilsulfóxido (DMSO) foi testado com sucesso por Elamparithi, Punnoose e Kuruvilla (2016), produzindo fibras submicrométricas com a preservação do padrão D do colágeno tipo I. Este material ainda se mostrou capaz de promover o crescimento de células cardíacas, indício de um bom material para aplicação na área de biomateriais para tecido cardíaco.

Como já mencionado, uma vantagem da gelatina com relação ao colágeno no que diz respeito a sua solubilização em solventes benignos é o fato desta ser solúvel em água, diferentemente do colágeno, solúvel em soluções aquosas desde que na presença de ácidos. Contudo, soluções de gelatina em água apresentam uma dificuldade para uso na eletrofiação devido à sua gelificação em temperatura ambiente. Uma solução encontrada por alguns autores para esta limitação foi o aquecimento destas soluções para liquefazer a gelatina. Li et al. (2006) produziram fibras nanométricas de gelatina e de gelatina/ácido hialurônico em solvente água/etanol por eletrofiação sem a formação de *beads* por meio do ajuste de concentração das soluções e pelo uso de aquecimento do ambiente da eletrofiação a 40°C. Já Zhang et al. (2009) relatam a obtenção de fibras ultrafinas de gelatina em

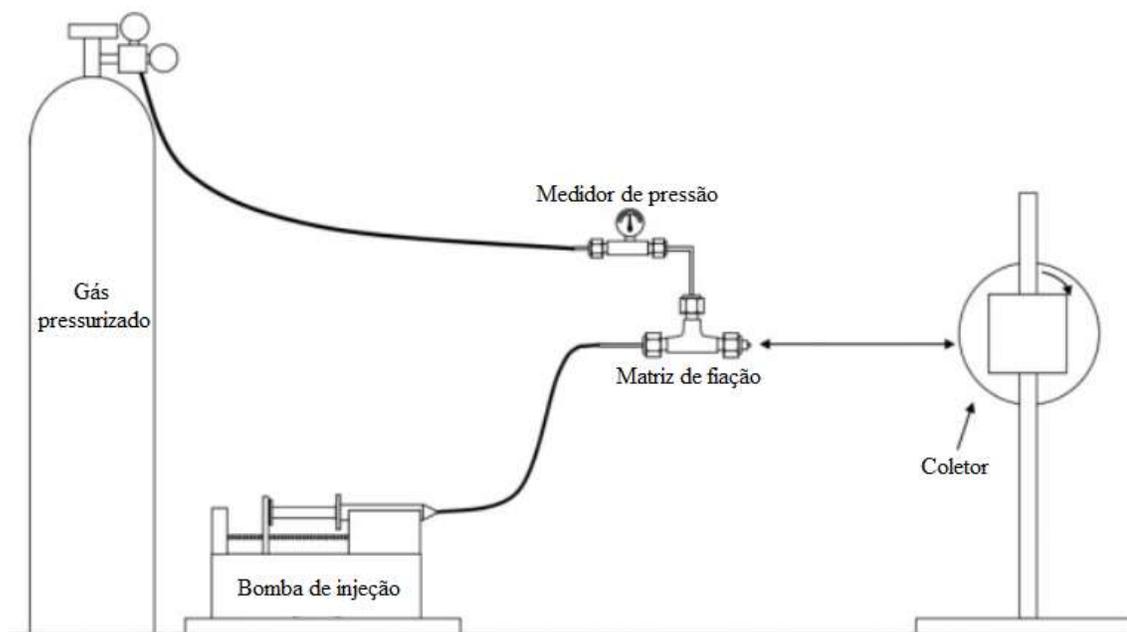
água por eletrofiação variando a concentração de gelatina (30 a 40% em massa) e a temperatura de operação do sistema (35, 40, 45 ou 50°C).

Mais recentemente foi relatada a produção de fibras nanométricas de atelocolágeno grau clínico por meio da técnica *pneumatospinning*, na qual é empregado um aerógrafo, instrumento usado comumente na produção de pinturas, no que se parece com uma variação da técnica de fiação por sopro em solução, pois o equipamento utiliza o mesmo princípio da SB-Spinning, com a desvantagem de que no aerógrafo não há controle da vazão da solução polimérica ou do diâmetro interno da agulha. No estudo, soluções aquosas de HAc (20 a 50%) foram usadas, produzindo fibras de 200 nm, contudo, os autores relatam que tal material não é estável em meio aquoso sem a prévia reticulação com genipina (Polk et al., 2018), provavelmente pelo fato de terem usado atelocolágeno, um derivado hidrossolúvel do colágeno.

1.5. Fiação por sopro em solução

Na técnica de SB-Spinning o fornecimento de uma solução polimérica é feito por meio de seringas com o uso de uma bomba de injeção até uma matriz de fiação, na qual é injetado externamente ao polímero um gás pressurizado (ar, nitrogênio, ar sintético, oxigênio ou argônio, por exemplo), conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4 - Ilustração do sistema utilizado na técnica de fiação por sopro em solução.

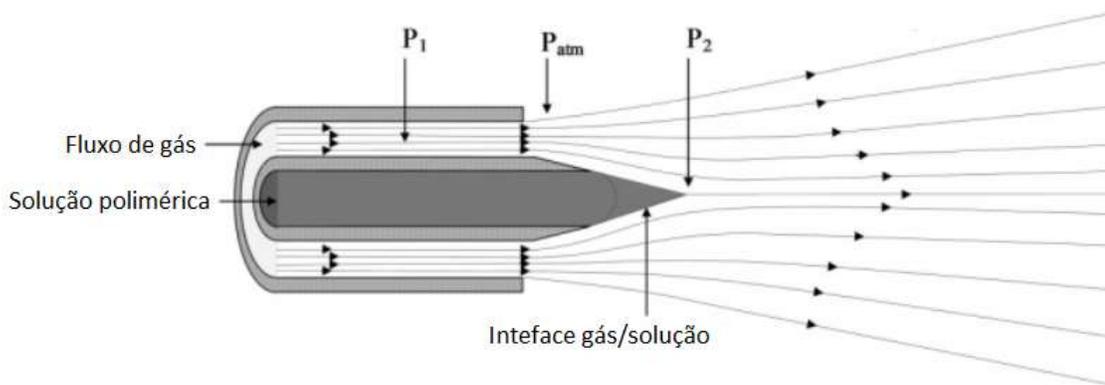


Fonte: adaptado de Medeiros et al. (2009).

Inspirada nas técnicas de eletrofiação e fiação a sopro por fusão, a SB-Spinning foi uma técnica desenvolvida por pesquisadores da Embrapa Instrumentação e tem as vantagens de não usar alta tensão, permitir o uso de solventes com baixa constante dielétrica e demonstrar versatilidade para a escolha dos coletores, já que permite a deposição de fibras sobre qualquer superfície, inclusive na deposição *in situ* em aplicações no campo biomédico (Daristotle et al., 2016; Gao et al., 2021; Jia et al., 2021; Medeiros et al., 2009; Medeiros et al., 2014; Santos et al., 2020).

A matriz de fiação empregada na técnica SB-Spinning é composta de dois bocais concêntricos, sendo que pelo bocal interno ocorre a passagem da solução polimérica e pelo externo é fornecido o gás pressurizado (Figura 5). A passagem de um gás pressurizado para um ambiente de pressão atmosférica leva a uma rápida conversão dessa variação de pressão em energia cinética, responsável pelo lançamento da solução de polímero até o coletor quando essa energia supera a tensão superficial da solução utilizada. Durante o percurso da solução até o coletor, que pode ser localizado em frente, abaixo ou mesmo acima dos bicos concêntricos, o solvente usado deve ser evaporado, resultando na formação de fibras que se depositam para formar uma malha de não-tecido (Daristotle et al., 2016; Medeiros et al., 2009; Santos et al., 2020).

Figura 5 - Representação dos bicos concêntricos pelos quais passam o gás e a solução polimérica na fiação por sopro em solução, destacando as regiões de diferentes pressões do gás.



Fonte: adaptado de Medeiros et al. (2009).

Desde seu desenvolvimento em 2009, o número de artigos que utilizam a fiação por sopro em solução vem aumentando, chegando a publicar anualmente dezenas de trabalhos desde 2013 com uma expectativa de aumentos ainda mais expressivos para os próximos anos, conforme a técnica se difunde, se destacando

pelas vantagens sobre a eletrofiação, atualmente a técnica mais empregada para produção de fibras ultrafinas (Dadol et al., 2020).

Durante a produção das fibras por SB-Spinning, vários parâmetros de produção, como diâmetro interno da agulha, vazão de solução polimérica, pressão de trabalho do gás e distância do coletor, bem como propriedades intrínsecas das soluções poliméricas, isto é, a concentração do polímero e o solvente empregado e parâmetros ambientais, como temperatura e umidade relativa do ar, devem influenciar o diâmetro e a morfologia das fibras produzidas. Portanto, para cada sistema polímero-solvente é necessário que sejam avaliadas as influências de todas estas variáveis sobre a produção das fibras, ou ao menos das que mais afetam a morfologia e as propriedades destes materiais (Gao et al., 2021; Oliveira et al., 2014; Parize et al., 2016).

Buscando a produção de nanofibras de gelatina de grau alimentício, Liu et al. (2017) testaram gelatinas de duas fontes distintas, pele porcina e pele de peixe solubilizadas em soluções aquosas de HAc para produção de fibras ultrafinas por SB-Spinning. A gelatina de pele de peixe de alta massa molar permitiu a produção de fibras nanométricas independente da concentração e dos parâmetros de operação do sistema de fiação, enquanto a gelatina porcina, que foi testada em diferentes massas molares (100, 150 e 225 Bloom) não produziu fibras em nenhuma das concentrações e condições testadas. Os autores relacionaram o tratamento mais brando usado na obtenção de gelatina de peixe e, conseqüentemente, uma maior preservação de algumas fibras de colágeno nativo nesta gelatina à capacidade de formação de emaranhamentos nestas soluções que proporcionam à esta gelatina a capacidade de formar fibras.

Assim como para as fibras eletrofiadas, é comum incorporar compostos ativos às fibras produzidas por SB-Spinning para melhorar ou incorporar algumas propriedades. Fibras ultrafinas de gelatina de pele de peixe foram produzidas com cinamaldeído (Liu et al., 2018b) ou carvacrol (Liu et al., 2018a), dois compostos antimicrobianos, por meio de soluções em HAc e foram avaliadas quanto à sua atividade contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*. Além de terem apresentado um aumento de seu diâmetro com a incorporação dos compostos ativos, a atividade dos materiais obtidos foi diretamente influenciada pelo teor de cinamaldeído ou carvacrol adicionados.

Visando produzir fibras híbridas inorgânicas/orgânicas pelo método de SB-Spinning nos modos convencional e criogênico para possíveis aplicações biomédicas, Greenhalgh e colaboradores (Greenhalgh et al., 2017) produziram fibras micrométricas de gelatina derivada de pele porcina com tetraetóxissilano, conseguindo obter inclusive fibras porosas no caso das amostras produzidas criogenicamente.

Apesar da vantagem da SB-Spinning sobre a eletrofiação com relação a produtividade, para produção industrial de fibras ultrafinas é necessário que seja promovido o escalonamento deste processo. Neste sentido alguns autores se preocuparam em estudar a montagem de sistemas compostos por muitas agulhas e avaliar como evitar ou corrigir problemas que podem surgir nesses arranjos de maior capacidade produtiva (Jia et al., 2021; Kolbasov et al., 2016), de modo semelhante ao ocorrido com a eletrofiação (Santos et al., 2020).

Explorando a vantagem da versatilidade na deposição de fibras por SB-Spinning, um dispositivo portátil foi desenvolvido por Gao et al. (2020) para produção de fibras ultrafinas de alguns polímeros sintéticos (PVP, PCL, PMMA e PVB). Os autores substituíram neste dispositivo os convencionais compressores de ar usados para produção ar pressurizado por uma garrafa de ar pressurizado comercial (com 284 g e pressão de quase 90 psi) e conseguiram completar a hemostasia de um fígado em ambiente de cirurgia minimamente invasiva por meio da fiação de uma cola médica que contém PMMA.

Embora o uso da técnica de fiação por sopro em solução de modo estabelecido na medicina ainda possa ser algo distante, podemos considerar este estudo como mais um passo no avanço para o uso das nanofibras de colágeno e gelatina na área médica de modo não experimental, uma vez que estes são polímeros reconhecidos como seguros para aplicações biomédicas e avanços no sentido de tornar portátil esta tecnologia podem aumentar o interesse por desenvolver alternativas comerciais que usem essa tecnologia. Para tanto, é necessário também conhecer fontes destas proteínas e solventes que permitam seu uso para produção de fibras por SB-Spinning, bem como os principais fatores que afetam a morfologia e as propriedades das fibras produzidas com estes dois importantes polímeros naturais.

2. JUSTIFICATIVA

A evolução da engenharia de tecidos depende da busca por novos materiais, que pode começar pelo uso de novas abordagens na concepção de *scaffolds*, como é o caso da biomimetização. Para a mimetização da MEC da maioria dos tecidos é necessário se dominar a habilidade de produzir fibras nanométricas de colágeno.

Além de ser encontrado em diferentes tipos, a fonte de extração do colágeno pode influenciar propriedades desta proteína como sua estabilidade térmica e solubilidade. A escolha do solvente empregado para solubilização do polímero também é de extrema importância, pois afeta as propriedades do material obtido após processamento e até mesmo sua capacidade de produzir fibras.

Embora existam diversos relatos da produção de fibras nanométricas de colágeno por eletrofiação, apenas alguns destes obtêm fibras insolúveis em água mesmo sem reticulação. Além disso, por meio da técnica de SB-Spinning, uma técnica que apresenta diversas vantagens na produção de fibras em comparação com a eletrofiação, não há relatos da produção de fibras nanométricas de colágeno, o que motiva o estudo da capacidade de produzir tais fibras por meio da fiação em sopro por solução com o uso de solventes que garantam a preservação do colágeno e de suas propriedades de interesse às aplicações biomédicas.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Esta pesquisa visou a produção de fibras ultrafinas de colágeno e gelatina pela técnica de fiação por sopro em solução com o uso de solventes benignos e, posteriormente, a avaliação do efeito de parâmetros de produção sobre a morfologia e as propriedades destas fibras, na tentativa de mimetizar a matriz extracelular.

Objetivos específicos

Para atender aos objetivos gerais desta pesquisa foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Extrair colágeno de fontes bovina e de peixe e caracterizar estes materiais;
- Selecionar o colágeno mais indicado para uso na fiação por sopro em solução
- Selecionar um solvente benigno adequado para a fiação de colágeno e gelatina por SB-Spinning;
- Caracterizar o comportamento reológico das soluções de colágeno e gelatina a fim de orientar a obtenção de soluções capazes de formar fibras por SB-Spinning;
- Produzir e caracterizar fibras ultrafinas de colágeno e gelatina por SB-Spinning;
- Compreender a correlação entre as diversas variáveis que afetam a produção das fibras com suas dimensões e propriedades;
- Comparar as propriedades das fibras de colágeno e gelatina produzidas por SB-Spinning.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção do colágeno

Foram utilizadas duas fontes para extração de colágeno, tendões bovinos (*Bos taurus*) e pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os tendões utilizados foram doados pela Casa de Carnes Qualidade (São Carlos) e as peles de tilápia pelo Pesque Pague Moinho (São Carlos). Ambos foram embalados e estocados a -20°C até o uso.

O colágeno de tendões bovinos foi extraído conforme método previamente relatado por Horn, Martins e Plepis (2009). Os tendões foram imersos em NaCl (Merck) 0,9% e depois água deionizada, os resíduos de outros tecidos foram removidos e as fibras de tendão desfiadas com o auxílio de um bisturi. O excesso de umidade foi removido e os tendões desfiados imersos em uma solução alcalina por 24 h a temperatura máxima de 25°C em recipiente semiaberto com eventuais agitações. Esta solução alcalina continha sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, sendo um procedimento estabelecido no Grupo de Bioquímica e Biomateriais (IQSC-USP). O material obtido foi filtrado em peneira e suspenso em outra solução contendo sulfatos e cloretos de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , na qual permaneceu por 6 h. Em seguida uma série de lavagens com ácido bórico (J.T.Baker®) 3%, água deionizada e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Mallinckrodt) 0,3% a pH 11,0 (três vezes por 2 h cada) foram procedidas. Finalmente, lavou-se este com água deionizada até pH constante e igual ao da água usada. O material resultante, colágeno bovino extraído por tratamento alcalino (CB) foi liofilizado em liofilizador Modulyo® (Edwards, Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC-USP) a -50°C e triturado.

O tratamento enzimático do colágeno bovino foi feito por um procedimento adaptado de Kittiphattanabawon et al. (2015), descrito a seguir. Em um béquer foram adicionados 2,0 g de colágeno bovino e 50 mL de ácido acético (J.T.Baker®) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi agitada e armazenada a 4°C durante a noite. Em seguida foram adicionados 100 mg de pepsina (de mucosa de estômago de porco, Sigma, $1:60000$, 2240 U mg^{-1} de sólido) solubilizada em 10 mL de ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi agitada e armazenada a 4°C por 24 h. Foram adicionados mais 40 mL de ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ à mistura, obtendo uma solução de colágeno a 2% (massa/volume). A solução foi neutralizada com NaOH (Panreac) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, centrifugada por três

vezes a 3000 g por 15 min a 15°C e seu precipitado liofilizado, resultando no colágeno bovino enzimaticamente tratado com pepsina (CBE).

A extração do colágeno de peles de tilápia foi feita por solubilização ácida, seguindo um procedimento reportado por Yan, Qin e Li (2015) com algumas modificações. As peles de tilápia foram imersas em NaCl 0,9% enquanto eram removidas manualmente suas escamas e os resíduos de carne, gorduras e pigmentos. Em seguida foram imersas novamente na solução salina (2 h) e depois em água deionizada e então em solução de NaOH 0,25% na proporção de 1:20 (massa/volume) por 12 h a 4°C com eventuais agitações, repetindo o procedimento com NaOH. Após isso a lavagem foi feita com água deionizada até a neutralidade e as peles tratadas foram liofilizadas. A extração do colágeno da pele de peixe foi feita por solubilização em ácido acético pH 2,0 na proporção de 3:100 (massa/volume). Após 4h a 4°C o material já intumescido foi homogeneizado (2 h) e armazenado a 4°C durante a noite. A solução foi filtrada em malha de 200 Mesh (abertura de 0,07 mm), neutralizada com NaOH 2,0 mol L⁻¹ e liofilizada. Após diálise (limite de exclusão de 1000 Da) contra água deionizada até condutividade constante e nova liofilização foi obtido o colágeno de peixe extraído por solubilização ácida (CP).

Além das amostras mencionadas, duas amostras comerciais de colágeno bovino grau alimentício foram testadas, os colágenos em pó (CBA_p) e em flocos (CBA_f) da NovaProm, doados pela pesquisadora Anny Manrich, da Embrapa Instrumentação (São Carlos). Na Tabela 3 são mostradas proteínas colagenosas usadas nesta pesquisa e as siglas usadas para definir as mesmas.

Tabela 3 – Amostras de proteínas estudadas e suas siglas.

Proteína	Sigla
Colágeno bovino extraído por tratamento alcalino	CB
Colágeno bovino enzimaticamente tratado com pepsina	CBE
Colágeno bovino grau alimentício em pó	CBA _p
Colágeno bovino grau alimentício em flocos	CBA _f
Colágeno de peixe extraído por solubilização ácida	CP
Gelatina (Sigma®)	G

Fonte: autoria própria.

4.2. Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Para confirmar a estrutura das amostras de proteínas estas foram analisadas por FT-IR. Os colágenos bovino e de peixe foram solubilizados em ácido acético (pH 3,0) e secos em fluxo de ar, formando filmes. A gelatina teve seu espectro obtido por adição de uma solução de gelatina em pastilha de silício e posterior secagem sob fluxo de ar. Para eliminar a umidade, as amostras foram mantidas em dessecador a baixa pressão na presença de $\text{NaOH}_{(s)}$ por no mínimo 24 h. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu IR Affinitu-1 (Central de Análises Químicas Instrumentais, IQSC/USP) no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras acumuladas no caso da gelatina e com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras no caso das amostras de colágeno.

4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para avaliar a desnaturação térmica das amostras de colágeno e de suas fontes, amostras sólidas de colágeno bovino e de peixe, bem como da pele de peixe após tratamento alcalino, do tendão bovino desfiado e do colágeno bovino tratado com pepsina foram hidratadas com água deionizada e em seguida o excesso de umidade foi removido com papel de filtro. Amostras de massa conhecida (18 a 20 mg) foram seladas em suporte de alumínio e as medidas foram feitas de 25 a 110°C com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em equipamento DSC-2010 da TA Instruments (Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC-USP). O gás de arraste utilizado foi ar sintético, com fluxo de 80 mL min^{-1} .

Já para verificar a influência do processamento por SB-Spinning sobre os polímeros naturais, gelatina em pó, colágeno de peixe e fibras ultrafinas de colágeno e de gelatina foram hidratadas em dessecador contendo uma solução saturada de NaCl (umidade relativa de 70%) por 24 h e analisadas em um calorímetro exploratório diferencial modelo Q100 da TA Instruments (Embrapa Instrumentação). Amostras com uma massa conhecida (de 6 a 12 mg) foram seladas em suportes de alumínio não herméticos e as medidas foram feitas de 25 a 110°C com uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de ar sintético de 50 mL min^{-1} .

4.4. Preparo das soluções poliméricas

A gelatina utilizada foi do tipo A, de pele porcina (Sigma®, 300 Bloom: 50 a 100 kDa). As soluções de gelatina em água, água/etanol 9:1 (v/v) e água/etanol 1:1 (v/v) foram preparadas em diferentes concentrações (Tabela 19) por aquecimento a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 min sob agitação magnética em frascos fechados. As amostras solubilizadas em soluções aquosas de ácido acético (90% em massa) e ácido fórmico (98%) foram preparadas por meio de agitação magnética em frascos fechados a temperatura ambiente. As soluções foram armazenadas a 4°C .

As soluções de colágeno bovino e de peixe em ácido acético (pH 3,0)/etanol 1:1 (v/v), ácido acético (pH 3,0)/etanol 2:1 (v/v) e ácido acético (pH 2,0)/etanol 2:1(v/v) foram preparadas em diferentes concentrações (Tabela 20) por agitação magnética da solução e da proteína em frascos fechados até completa solubilização do material a temperatura ambiente. Soluções de colágeno de peixe em ácido acético/água 9:1 (massa/massa) foram preparadas do mesmo modo. As soluções foram armazenadas a 4°C .

O colágeno tratado com pepsina foi solubilizado a 1% (massa/massa) em ácido acético (pH 3,0)/etanol 1:1 (v/v), enquanto as amostras de colágeno comercial foram adicionadas à solução de ácido acético (pH 3,0)/etanol 3:1 (v/v) nas concentrações de 1, 2 e 4% (massa/massa).

Durante o preparo das soluções foram determinadas as solubilidades das amostras de colágeno em diferentes solventes para identificação das amostras mais viáveis para uso na produção de fibras por fiação por sopro. As amostras foram preparadas conforme mencionado acima com aumentos gradativos de 1% na concentração da proteína. Após agitação, a solubilidade do colágeno era avaliada visualmente, pela identificação de soluções homogêneas como sinal de sua completa solubilização.

Blendas de colágeno de pele de tilápia com polietilenoglicol (Sigma, 200 kDa) foram preparadas pela mistura de soluções destes polímeros em ácido acético/água 9:1 (massa/massa) de forma a obter as concentrações de 2% (9:1 massa/massa), 3,5% (9:1 massa/massa) e 6,5% (9:1 massa/massa). As blendas foram armazenadas a 4°C . A mistura visa avaliar a possibilidade de se combinar um polímero sintético com o colágeno para produção das fibras, estratégia que pode ser

usada na busca pelo controle de propriedades das fibras como sua morfologia, diâmetro e taxa de degradação.

4.5. Caracterização reológica das soluções

Exclusivamente para a análise reológica dos efeitos do etanol sobre as soluções foram preparadas soluções de colágeno de peixe com diferentes concentrações de etanol (Panreac). Inicialmente foi preparada uma solução a 3% (massa/massa) de colágeno em ácido acético (pH 3,0). Esta solução foi diluída a 2% (massa/massa) com a adição de ácido acético (pH 3,0) ou misturas desta solução com etanol em proporções tais que resultaram em amostras com 0, 20 e 30% de etanol. As amostras foram analisadas logo em seguida. A caracterização reológica das soluções de colágeno de peixe em ácido acético (pH 3,0)/etanol com diferentes concentrações de etanol foi feita em geometria cone placa de aço inoxidável de 20 mm, ângulo de 2° e gap de 69 μm . Os ensaios de oscilação a 20°C foram feitos a 1 Hz na faixa de tensão de oscilação de 0,05 a 100 Pa, para determinação da região viscoelástica linear (RVL), do módulo elástico na deformação crítica (G'_{RVL}), do ponto de fluxo (τ_f , deformação na qual $G' = G''$) e seu correspondente módulo (G_f) e do fator de perda ($\tan\delta$). Uma varredura de temperatura na faixa de 15 a 50°C a uma taxa de aquecimento de 5°C min^{-1} , 1,0 Hz e 2% de deformação foi feita em função da viscosidade complexa. Os ensaios de fluxo foram realizados de 0,1 a 100 s^{-1} e os de recuperação (*creep*) foram feitos pela aplicação de uma tensão de 1,0 Pa por 120 s seguida da recuperação por 180 s, ambos a 20°C.

Para estudar o efeito da acidez, soluções de colágeno de peixe (3% massa/massa) foram preparadas por agitação em soluções de HAc nas concentrações de 2,5; 5,0; 10, 20, 40 e 80% (massa/massa), enquanto soluções de gelatina (5% massa/massa) foram preparadas por agitação em soluções de HAc nas concentrações de 2,5; 5,0; 10, 30, 60 e 90% (massa/massa). As soluções foram armazenadas durante a noite (4°C) e analisadas em seguida. As amostras contendo 2,5; 5,0 e 10% de HAc foram analisadas com a geometria cone placa de aço inoxidável de 20 mm, ângulo de 2° e gap de 69 μm , enquanto para as amostras com 20, 30, 40, 60, 80 e 90% de HAc foi empregada a geometria cone placa de aço inoxidável de 60 mm, ângulo de 0°30' e gap de 15 μm . Os ensaios de oscilação foram feitos a 20°C e 1 Hz na faixa de tensão de oscilação de 0,1 a 500 Pa, para determinação da RVL, do

G'_{RVL} , do t_f , deformação na qual $G' = G''$ e seu correspondente módulo (G_f) e do $\tan\delta$. Uma varredura de temperatura na faixa de 15 a 45°C a uma taxa de 5°C min⁻¹ e 1,0 Hz foi feita em função da viscosidade complexa, estabelecendo-se para as amostras de colágeno 5% de deformação quando analisadas em geometria de 20 mm e 40% para as demais; enquanto para as amostras de gelatina a deformação foi estabelecida como 0,3% independente da concentração de HAc. Os ensaios de fluxo foram realizados de 0,5 a 100 s⁻¹ a 20°C e os de varredura de frequência de 0,1 a 100 rad s⁻¹ a 20°C com as mesmas deformações dos ensaios de varredura de temperatura.

Para analisar o efeito da concentração de polímero sobre a viscosidade de amostras de colágeno de peixe e de gelatina, soluções nas concentrações de 5, 10 e 15% em ácido acético/água 9:1 (massa/massa) foram caracterizadas em geometria cone placa de aço inoxidável de 60 mm, ângulo de 0°30' e gap de 15 µm a 20°C. Os ensaios de fluxo foram feitos de 0,5 a 100 s⁻¹.

A caracterização reológica de todas as soluções foi feita em reômetro de deformação controlada AR-1000N da TA Instruments (Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC-USP). A temperatura foi controlada por sistema Peltier com variação de 0,1°C ligado a banho circulatório modelo FS18 (Julabo). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.6. Fiação por sopro das soluções poliméricas

Os testes de produção das fibras foram feitos em um equipamento de fiação por sopro em solução da Embrapa Instrumentação, sob supervisão do Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso. A agulha (diâmetro interno de 0,5 mm) foi posicionada 2 mm além do bocal exterior através do qual o ar pressurizado flui. A pressão do ar foi controlada com o uso de um regulador de pressão, enquanto o fornecimento de solução polimérica foi controlado com uma bomba de seringa (KD Scientific, modelo 780101, Holliston, EUA), ambos ajustados de acordo com o experimento. O coletor foi localizado a uma distância de trabalho do bocal definida e variável e variou de acordo com o experimento. Nos casos em que foi usado um cilindro giratório, este teve sua velocidade de rotação controlada a 180 rpm. A temperatura de fiação foi de 23 ± 2° C, enquanto o ar pressurizado foi utilizado a 21°C, exceto quando aquecido com o uso de um sistema de aquecimento de ar comprimido.

Primeiramente as soluções foram vertidas em uma seringa de vidro de 20 mL conectada a uma agulha por uma mangueira Tygon®. Após retirada do excesso de bolhas na seringa e na mangueira o sistema foi montado e procedeu-se a purga de uma alíquota da amostra até que se estabelecesse um equilíbrio no fornecimento do jato polimérico e, então, foram iniciados os testes de fiação. Os polímeros foram coletados em folhas de alumínio. Coletores diferentes foram testados buscando a superfície que resultasse em um melhor rendimento na coleta das fibras. As amostras coletadas foram analisadas em microscópio óptico digital para triagem das amostras antes de análise por microscopia eletrônica de varredura.

4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fibras tiveram sua morfologia e diâmetro analisados por MEV em microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-6510/GS (Embrapa Instrumentação) com 10 kV a 10 mm de distância de trabalho. O recobrimento das amostras foi feito com ouro em uma metalizadora. O diâmetro médio das fibras foi medido por meio do software ImageJ.

4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação das massas molares (MM) das amostras de colágeno de peixe e de gelatina foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), técnica descrita por Laemmli (1970). Primeiramente foram preparadas as soluções empregadas na técnica, como descrito a seguir.

Tampão do gel de resolução (TR): foram dissolvidos em 40 mL de água deionizada 12,12 g de tris(hidroximetil)aminoetano (Sigma®) seguido do ajuste do pH para 8,8 com HCl (Panreac). A solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume completo, confirmando em seguida o pH. O tampão foi armazenado a 4°C.

Tampão do gel de empilhamento (TE): 12,12 g de tris(hidroximetil)aminoetano foram dissolvidos em 40 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 6,8 com HCl, completando o volume em seguida (50 mL) e checando novamente o pH. O tampão foi armazenado a 4°C.

EDTA (0,2 mol L⁻¹): foram pesados 3,72 g de EDTA.2H₂O e solubilizados em 40 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH, completando o volume em seguida (50 mL). A solução foi armazenada a 4°C.

Acrilamida/bis-acrilamida (AB): foram pesados 30 g de acrilamida (Merck) e 0,8 g de N,N-metileno-bisacrilamida (Merck) e solubilizados em 100 mL de água deionizada. Em seguida foi adicionado 1 g de carvão ativado (Reagen) à solução, seguido de agitação por 10 min e filtração. A solução foi armazenada a 4°C.

Tampão da amostra (TA): 1,5 g de dodecil sulfato de sódio (SDS, Merck) foi solubilizado em aproximadamente 7,5 mL de água deionizada. Acrescentou-se à solução 2,35 mL da solução de Tris-HCl pH6,8; 0,75 mL de EDTA 0,2 mol L⁻¹; 0,5 mL de solução de azul de bromofenol (Merck) 0,5% (massa/volume) e 7,5 mL de glicerol (Sigma). Agitou-se até completa homogeneização e o volume foi completo (25 mL) com água deionizada. O tampão foi armazenado a 4°C.

Solução da amostra: foram preparadas amostras de colágeno de peixe e gelatina e de suas fibras (3 mg mL⁻¹) em ácido acético (pH 3,5). Em um microtubo tipo *ependorf* foram colocados 50 µL de TA e 100 µL da solução da amostra, aquecendo a 100°C por 3 min.

Tampão superior dos eletrodos a pH 8,3: foram pesados 0,5 g de SDS, 1,515 g de tris(hidroximetil)aminoetano e 0,362 g de EDTA e solubilizados em 400 mL de água deionizada. Foram acrescentados 7,2 g de glicina (Sigma) seguido de agitação. Ajustou-se o pH para 8,3 e o volume foi ajustado (500 mL) com água deionizada e o pH checado novamente. A solução foi armazenada a 4°C.

Tampão inferior dos eletrodos a pH8,3: 1,515 g de tris(hidroximetil)-aminoetano, 0,5 g de SDS e 0,362 g de EDTA foram solubilizados em 400 mL de água deionizada. Após ajustar o pH para 8,3 e o volume foi ajustado (500 mL) com água deionizada. O pH foi checado novamente e a solução foi armazenada a 4°C.

Persulfato de amônio: 0,1 g de persulfato de amônio foi solubilizado em 1,0 mL de água deionizada e a solução foi imediatamente usada.

Em seguida foi procedida a preparação das placas de vidro, que inicialmente foram lavadas com detergente, secas e limpas com acetona. Sob a placa com uma borda saliente foi depositada uma fina camada de vaselina nas bordas, sobre as quais foi colocada outra placa de vidro, resultando em uma região para

formação do gel. As placas foram presas com garras e presas no suporte para formação do gel sobre uma tira de nylon para vedação.

Foram preparados então os géis de resolução (7%) e de empilhamento (5%). O gel de resolução foi preparado pela mistura de 1,5 mL de TR, 1,87 mL de AB, 80 μL de EDTA 0,2 mol L⁻¹, 4,43 mL de água deionizada, 50 μL de persulfato de amônio 10% e 10 μL de tetrametiletilenodiamina (TEMED, Sigma). O gel de empilhamento foi preparado misturando-se 0,25 mL de TE, 0,6 mL de AB, 40 μL de EDTA 0,2 mol L⁻¹, 3,05 mL de água deionizada, 30 μL de persulfato de amônio 10% e 5 μL de TEMED.

O gel de resolução foi adicionado lentamente pela lateral da placa levemente inclinada com o uso de uma pipeta Pasteur evitando formação de bolhas até a altura de 8 cm. O volume da placa foi completo com água deionizada e permaneceu em repouso por 4 h para polimerização. Retirou-se a água entre as placas e acrescentou-se o gel de empilhamento. Colocou-se o pente de nylon na parte superior das placas que permaneceram em repouso por no mínimo 3 horas para a polimerização do gel.

Como referências de massa molar utilizou-se um conjunto de padrões de massa molar Sigma composto de aprotinina bovina (6500 g mol⁻¹), α -lactoalbumina bovina (14200 g mol⁻¹), inibidor de tripsina (20000 g mol⁻¹), anidrase carbônica bovina (29000 g mol⁻¹), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de coelho (36000 g mol⁻¹), ovoalbumina de galinha (45000 g mol⁻¹), desidrogenase glutâmica de fígado bovino (55000 g mol⁻¹), albumina de soro bovino (66000 g mol⁻¹), fosforilase B de músculo de coelhos (97400 g mol⁻¹), β -galactosidase de *E. coli* (116000 g mol⁻¹) e miosina de coelho (200000 g mol⁻¹).

As condições da eletroforese foram inicialmente de 20 mA e 75 V até as bandas alcançarem o gel de resolução. A partir deste ponto a corrente é aumentada para 25 mA. Ao final da eletroforese o gel foi fixado com uma solução de fixação (SF) de metanol:água:HAc (5:4:1) por durante a noite e as zonas correspondentes às proteínas foram reveladas com corante Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Sigma) 01% em SF por 1 h. O excesso de corante foi removido com ácido acético 7%, e, por fim, o gel foi seco entre duas folhas de celofane com uma solução de metanol:glicerol:água (30:3:67). A intensidade de cada banda foi determinada por densitometria ótica a partir de fotografia dos géis com uso do software ImageJ.

4.9. Análise estatística

Os dados de reologia foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para confirmar a distribuição normal dos valores analisados, sendo então empregada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para encontrar diferenças significativas entre os dados, utilizando como nível de significância o valor de 5%.

4.10. Design experimental para otimização do diâmetro das fibras

4.10.1. Planejamento Fatorial 2⁴

Após seleção das fontes de colágeno e do solvente usados na produção das fibras por SB-Spinning foi empregada a ferramenta de planejamento fatorial para verificar quais variáveis mais afetam o diâmetro das fibras produzidas e como estas variáveis influenciam esta variável resposta. Quatro variáveis foram avaliadas inicialmente (Tabela 4): um parâmetro da solução (concentração do polímero) e três parâmetros do processo (vazão da solução polimérica, distância de trabalho e pressão do gás).

Tabela 4 – Variáveis usadas no planejamento fatorial 2⁴ e seus níveis (codificados e valores reais) aplicados na avaliação sobre o diâmetro médio das fibras produzidas por SB-Spinning.

Variável	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Concentração (%)	X1	12	13,5	15
Vazão (mL h ⁻¹)	X2	6	9	12
Pressão (psi)	X3	30	45	60
Distância (cm)	X4	30	35	40

Fonte: autoria própria.

Como foram estudadas quatro variáveis em um experimento 2⁴ (resultando em 16 experimentos) mais uma triplicata do ponto central (para cálculo do erro), foram efetuados 19 experimentos para cada polímero. As fibras de gelatina e de colágeno foram produzidas a $25,6 \pm 2,4$ °C e $46 \pm 14\%$ de umidade relativa e a $25,4 \pm 4,2$ °C e $57 \pm 13\%$ de umidade relativa, respectivamente. A matriz com os experimentos feitos pode ser vista na Tabela 5.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^4 utilizado na avaliação dos efeitos dos parâmetros de processo e de solução sobre o diâmetro médio das fibras produzidas por SB-Spinning.

N	X1	Concentração (%)	X2	Vazão (mL/h)	X3	Pressão (psi)	X4	Distância (cm)
1	-1	12	-1	6	-1	30	-1	30
2	1	15	-1	6	-1	30	-1	30
3	-1	12	1	12	-1	30	-1	30
4	1	15	1	12	-1	30	-1	30
5	-1	12	-1	6	1	60	-1	30
6	1	15	-1	6	1	60	-1	30
7	-1	12	1	12	1	60	-1	30
8	1	15	1	12	1	60	-1	30
9	-1	12	-1	6	-1	30	1	40
10	1	15	-1	6	-1	30	1	40
11	-1	12	1	12	-1	30	1	40
12	1	15	1	12	-1	30	1	40
13	-1	12	-1	6	1	60	1	40
14	1	15	-1	6	1	60	1	40
15	-1	12	1	12	1	60	1	40
16	1	15	1	12	1	60	1	40
17	0	13,5	0	9	0	45	0	35
18	0	13,5	0	9	0	45	0	35
19	0	13,5	0	9	0	45	0	35

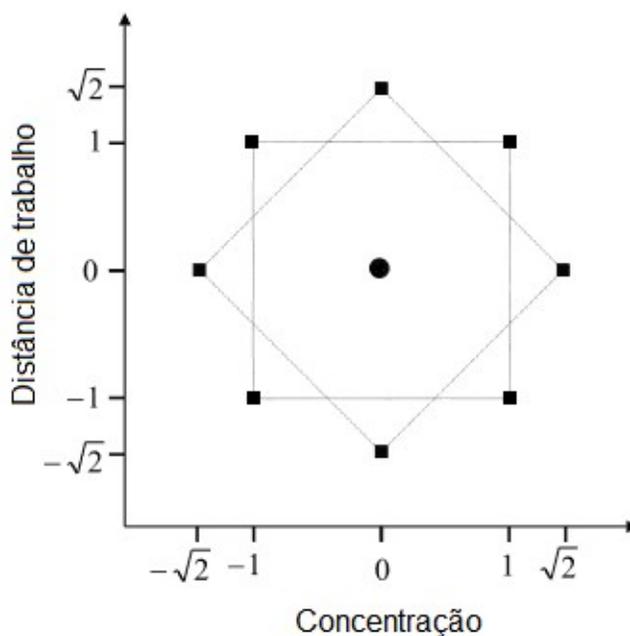
Fonte: autoria própria.

O planejamento fatorial e a análise de suas respostas foram feitos no programa Statistica® 13, com análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey empregando $p \leq 0,05$ como limite de significância.

4.10.2. Delineamento composto central

As variáveis identificadas como significativas sobre o diâmetro médio das fibras foram usadas para construir superfícies de resposta por meio de metodologia baseada no delineamento composto central. Para o colágeno foi feito ainda um planejamento fatorial do tipo estrela (Figura 6) com as duas variáveis que mais influenciaram o diâmetro médio destas fibras no planejamento fatorial 2^4 , a concentração (X1) e a distância de trabalho (X4). Neste planejamento foram estudadas as variáveis X1 e X4 em um experimento 2^2 (quatro experimentos) mais quatro experimentos em níveis abaixo e acima dos limites anteriores ($-\sqrt{2}$ e $\sqrt{2}$) e uma triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos para cada polímero.

Figura 6 – Planejamento fatorial “estrela” usado para obter as superfícies de resposta das variáveis concentração e distância de trabalho sobre o diâmetro das fibras de colágeno.



Fonte: autoria própria.

As fibras de colágeno foram produzidas com pressão de 60 psi e vazão de 12 mL h^{-1} , a $26,0 \pm 3,6 \text{ }^\circ\text{C}$ e $56 \pm 12\%$ de umidade relativa. A matriz com os experimentos feitos nesta etapa pode ser vista na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial “estrela” utilizado na avaliação dos efeitos das variáveis X1 e X4 sobre o diâmetro médio das fibras de colágeno produzidas por SB-Spinning.

N	X1	Concentração (%)	X4	Distância (cm)
1	-1	12	-1	30
2	1	15	-1	30
3	-1	12	1	40
4	1	15	1	40
5	0	13,5	0	35
6	0	13,5	0	35
7	0	13,5	0	35
8	$-\sqrt{2}$	11,4	0	35
9	$\sqrt{2}$	15,6	0	35
10	0	13,5	$-\sqrt{2}$	28
11	0	13,5	$\sqrt{2}$	42

Fonte: autoria própria.

Assim como na etapa anterior, o planejamento estrela e a análise de suas respostas, bem como as superfícies de resposta foram feitos no programa Statistica® 13 e os modelos gerados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar sua significância, seu coeficiente de determinação (R^2) e sua falta de ajuste.

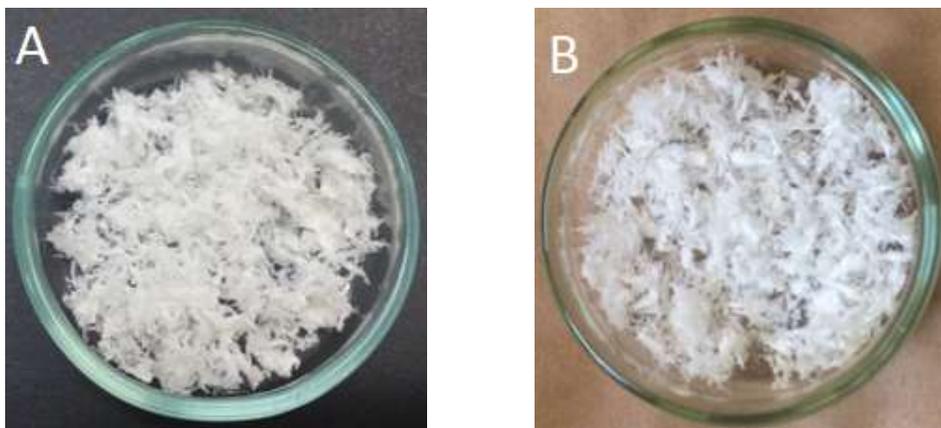
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos colágenos e gelatina

5.1.1. Colágeno de tendão bovino

O colágeno de origem bovina (Figura 7A) apresentou aparência de flocos brancos e pode ser também denominado colágeno aniônico, em função do tratamento que ele recebeu promover a desamidação de cadeias laterais de aminoácidos asparagina ou glutamina, o que resulta na formação de cargas negativas (Bet; Goissis; Lacerda, 2001) interessantes para aplicações biológicas, já que estas cargas estão diretamente relacionadas à adesão celular. Bet e colaboradores (2001) relatam que para um tratamento por 24 h, como o empregado neste caso, é esperado o aumento de 31 ± 2 cargas negativas por tropocolágeno.

Figura 7 – Colágeno bovino (A) aniônico e (B) tratado com pepsina.



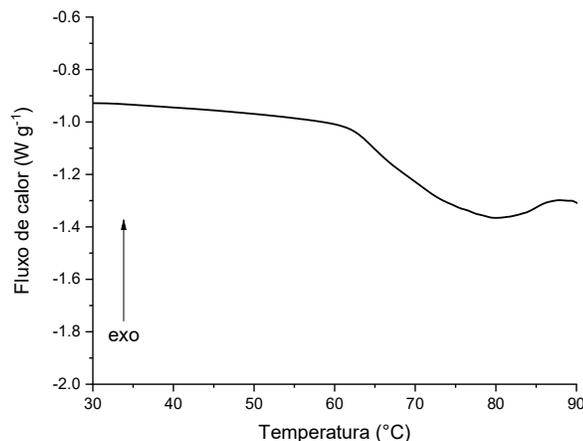
Fonte: autoria própria.

A Figura 7B apresenta o atelocolágeno, obtido após tratamento enzimático do colágeno bovino aniônico e visualmente muito semelhante a este. Ao tratar o colágeno bovino com pepsina, o objetivo era obter um material mais solúvel em solventes aquosos - em virtude da baixa solubilidade do colágeno bovino - sem perder a integridade estrutural da proteína, indicada também por sua estabilidade térmica.

Uma vez que a estabilidade térmica do colágeno é uma variável indicativa da preservação de sua estrutura nativa e de sua associação em estruturas supramoleculares com, por exemplo, outras proteínas, as curvas DSC das amostras de colágeno e de suas fontes foram usadas para avaliar as mudanças observadas, de acordo com os processamentos aos quais foram submetidos por meio da

determinação de suas temperaturas de desnaturação (T_d). A Figura 8 apresenta o perfil da curva de aquecimento para o colágeno de tendão bovino, na qual pode ser observado o evento térmico que indica sua desnaturação.

Figura 8 - Curva DSC para o colágeno de tendão bovino obtida em atmosfera de ar sintético com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.



Fonte: autoria própria.

Os valores de T_d obtidos por DSC para as diferentes amostras de colágeno e seus materiais fonte estão reunidos na Tabela 7. As amostras de colágeno de origem comercial não foram analisadas por DSC por não serem solúveis nos solventes testados.

Tabela 7 – Temperaturas de desnaturação nas amostras de colágeno e de seus materiais fonte determinadas por DSC.

Material	T_d ($^\circ\text{C}$)
Tendão bovino limpo desfiado	73
Colágeno de tendão bovino	65
Colágeno bovino enzimaticamente tratado	52 e 68
Pele de tilápia	63
Colágeno de pele de tilápia	50

Fonte: autoria própria.

Ao comparar os resultados obtidos por DSC entre as duas amostras de colágeno bovino e uma amostra do tendão utilizado para extração da proteína percebeu-se que houve sucessivas reduções na temperatura de desnaturação térmica do colágeno após os processamentos por hidrólise alcalina e com a enzima pepsina.

A redução da temperatura de desnaturação do tendão para o colágeno bovino aniônico pode estar relacionada à remoção de outras proteínas associadas ao colágeno na constituição da MEC, o que reduz a estabilidade de sua estrutura nativa. Já a redução da T_d após tratamento enzimático pode estar associada à quebra de reticulações nos domínios não helicoidais do colágeno, que também possuem um papel na estabilização da estrutura de hélice tripla (Zhang et al., 2020). Apesar desta redução na estabilidade térmica da proteína, o resultado indica de que a hidrólise alcalina ocorreu de modo controlado, pois uma amostra de colágeno completamente desnaturada, gelatina, não apresentaria tal evento térmico. Outro trabalho do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC-USP já relatou para colágenos obtidos de tendão bovino por hidrólise alcalina durante 24 h uma T_d de 59,9°C (Horn; Martins; Plepis, 2009). A diferença observada nos valores de T_d pode estar relacionada a diversos fatores, como diferenças na idade ou raça dos animais dos quais se extraiu o colágeno.

Acreditamos que devido a uma baixa homogeneização da mistura reacional a ação da pepsina sobre o colágeno ocorreu predominantemente nas regiões mais expostas e acessíveis de suas fibras, resultando em uma desnaturação térmica da proteína em duas etapas, o que explicaria a observação de dois eventos térmicos durante a análise por DSC (Tabela 7). A primeira T_d deve estar ligada à desestabilização estrutural das moléculas de colágeno cujas reticulações nos telopeptídeos foram clivadas e a segunda T_d às moléculas que não foram acessadas pela enzima e, portanto, mantiveram as reticulações presentes nas regiões N- e C-terminais da proteína.

Ao testar a solubilidade das amostras de colágeno bovino com e sem tratamento com pepsina, foi observado que a enzima não aumentou a solubilidade da proteína nos solventes testados (Tabela 8). Este fato, somado à redução d estabilidade térmica observada com o tratamento, levaram a abandonar este material nos testes seguintes.

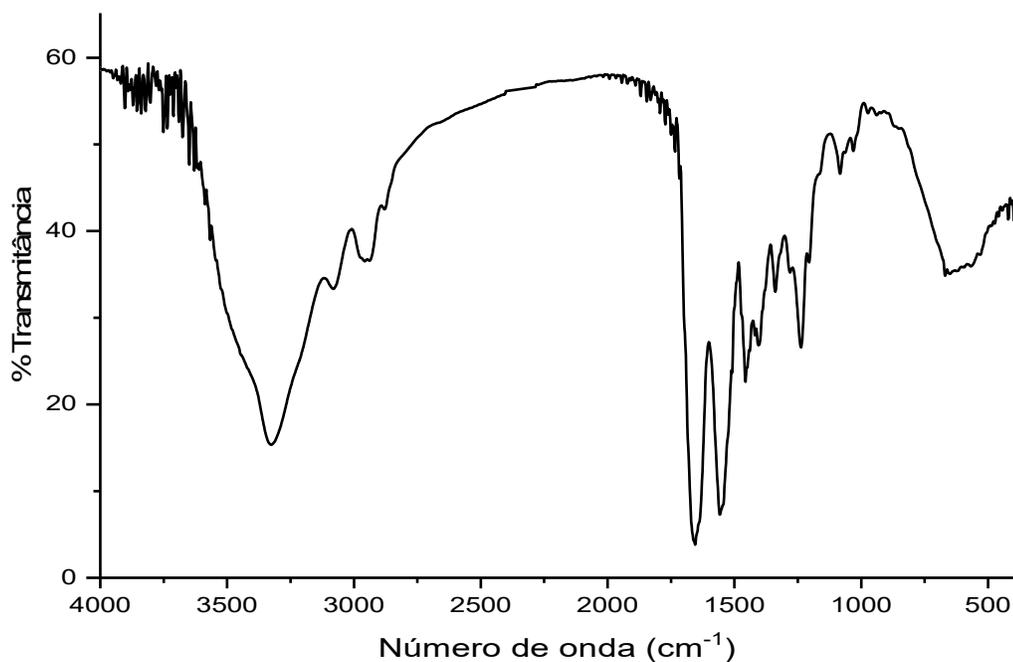
Tabela 8 – Solubilidade das amostras de colágeno em diferentes solventes.

Colágeno	Solvente	Solubilidade (%)
Bovino, grau alimentício (flocos)	HAc (pH 3,0)	< 1,0
	HAc (pH 2,0)	< 1,0
Bovino, grau alimentício (pó)	HAc (pH 3,0)	< 1,0
	HAc (pH 2,0)	< 1,0
Bovino aniônico	HAc (pH 3,0)	1,0
	HAc (pH 2,0)	2,0
Atelocolágeno	HAc (pH 3,0)	1,0
	HAc (pH 2,0)	2,0
Pele de tilápia	HAc (pH 3,0)/etanol (1:1)	1,0
	HAc (pH 3,0)/etanol (2:1)	2,0
	HAc (pH 3,0)	2,0
	HAc (pH 2,0)/etanol (2:1)	2,0
	HAc (pH 3,0)	3,0
	HAc _(aq) 90%	15

Fonte: autoria própria.

O espectro na região do infravermelho para a amostra de colágeno bovino é mostrado na Figura 9, onde podem ser vistas as bandas características desta proteína. Em 3327 cm^{-1} pode ser observada a banda de amida A, que nesta região do espectro indica estiramento N-H na presença de ligações de hidrogênio e em 2957 cm^{-1} a banda de amida B é associada a estiramentos assimétricos CH_2 . A banda de amida I (1653 cm^{-1}) indica estiramento do grupo carbonila acoplado a um grupo carboxila, a de amida II (1558 cm^{-1}) dobramento N-H e estiramento C-N e a de amida III (1238 cm^{-1}) a combinação de estiramento C-N com dobramento N-H (Sun et al., 2017)

Figura 9 - Espectro na região do infravermelho do colágeno bovino aniônico.



Fonte: autoria própria.

5.1.2. Colágeno de pele de peixe

A etapa de extração do colágeno de pele de peixe em soluções ácidas apresentou um rendimento de $90,4 \pm 7,1\%$ com relação à massa de pele de tilápia seca após tratamento com NaOH, indicando um alto rendimento da solubilização ácida. Vale ressaltar que esse rendimento cairia muito em relação à pele de tilápia *in natura*, pois uma fração significativa de seu peso é composto de água, a qual é removida após tratamento alcalino e liofilização. O colágeno apresentou coloração esbranquiçada e aspecto esponjoso (Figura 10). Durante os testes de solubilização (com soluções de ácido acético pH 3,0 a 2,0) este colágeno demonstrou como vantagens um intumescimento mais ágil em comparação com o colágeno bovino e a produção de soluções mais homogêneas.

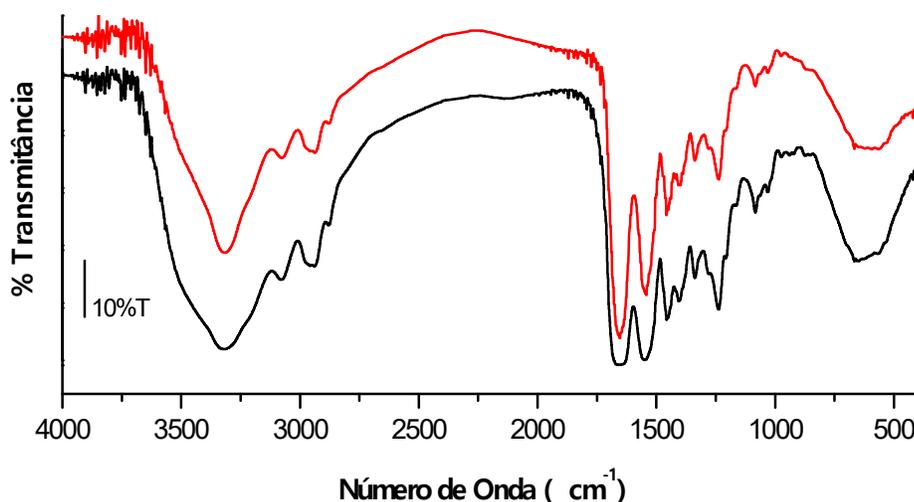
Figura 10 - Colágeno obtido de pele de peixe por solubilização ácida liofilizado.



Fonte: autoria própria.

A Figura 11 apresenta os espectros obtidos por FT-IR para o colágeno de pele de tilápia íntegro e para uma amostra deste colágeno que foi aquecida acima de 50°C (sua temperatura de desnaturação) por 12h enquanto em solução para promover a desnaturação da proteína. Por meio do aquecimento da amostra de colágeno, pretende-se obter mais uma evidência da preservação da estrutura do colágeno de peixe durante sua extração, agora por meio de FT-IR corroborando os resultados de DSC e de SDS-PAGE, apresentados na seção 5.2.

Figura 11 - Espectro FT-IR do colágeno de peixe (—) íntegro e (—) aquecido acima de 50°C.



Fonte: autoria própria.

As bandas características do colágeno e da gelatina (Seção 5.1.4), já descritas para o colágeno de tendão bovino também foram encontradas nas duas amostras e estão organizadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Bandas encontradas nas amostras de colágeno de peixe por FT-IR.

	Amida A	Amida B	Amida I	Amida II	Amida III
	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)
Colágeno íntegro	3319	2938	1659	1551	1238
Colágeno aquecido	3314	2938	1653	1541	1238

Fonte: autoria própria.

Além das bandas citadas na Tabela 9, uma banda em 1456 ou 1458 cm⁻¹, para o colágeno íntegro e o aquecido, respectivamente, pode ser observada e se refere a vibrações do tipo dobramento de CH₂. Esta banda pode ser usada no cálculo da razão entre as absorvâncias da banda de amida III e a sua (A₁₂₃₈/A₁₄₅₆), resultando em um valor que indica a preservação da hélice tripla do colágeno (Muyonga; Cole; Duodu, 2004). Quanto mais próximo de 1,0 for o valor desta razão, mais preservada deve estar a hélice tripla, e para as amostras analisadas a razão foi de 0,98 para o colágeno íntegro e de 0,91 para a amostra aquecida, o que serve como evidência da preservação da estrutura nativa do colágeno após sua extração.

A preservação da hélice tripla do colágeno de pele de tilápia foi confirmada também pela análise por DSC, na qual foi determinada a T_d de 50,3°C. A pele de tilápia tratada com NaOH apresentou T_d de 63°C, superior a temperatura da transição observada para o colágeno. Assim como no tendão bovino, essa maior estabilidade do colágeno em matrizes complexas deve estar relacionada à sua associação com outras proteínas em estruturas quaternárias estabilizadas por diversas interações.

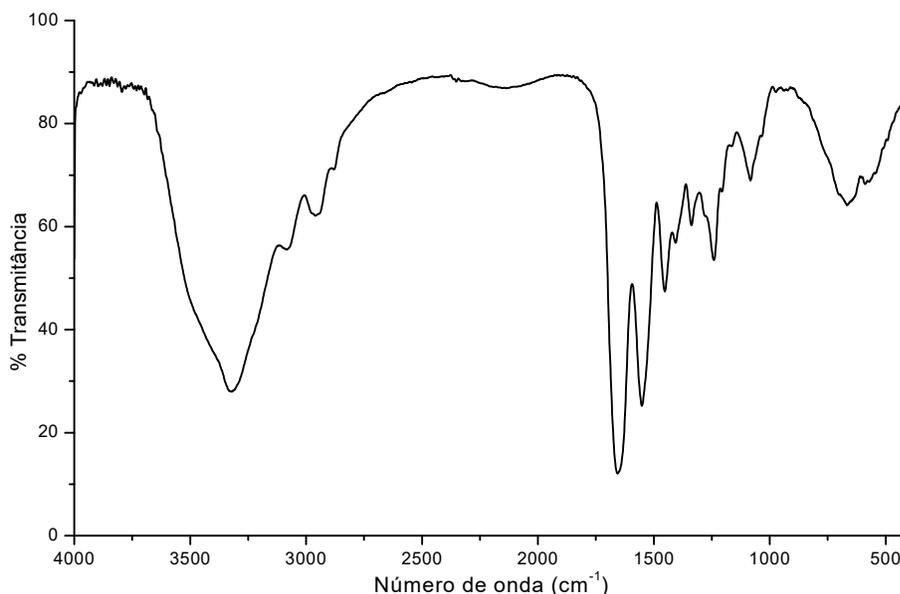
5.1.3. Colágeno bovino grau alimentício

As duas amostras de colágeno grau alimentício não se mostraram solúveis nas soluções testadas (Tabela 8), gerando suspensões em todas as concentrações avaliadas e, portanto, não foram caracterizados por DSC ou FT-IR e foram eliminadas dos testes de fiação. Estes materiais foram caracterizados por Wolf e colaboradores (Wolf; Sobral; Telis, 2009), que afirmam que após tratamento da pele bovina, ocorre a trituração e separação por tamanho, gerando o pó na fração de menor tamanho e os flocos como partículas mais grossas. Os autores relataram valores máximos de solubilidade em soluções a 2% nos valores de 52,5% para a amostra em pó (pH 2,0) e de 11% (pH 3,0) para a amostra em fibras, corroborando com estes resultados.

5.1.4. Gelatina

A Figura 12 apresenta o espectro obtido por FT-IR para a gelatina. As bandas características do colágeno, encontradas nos colágenos bovino e de peixe também foram encontradas no espectro da gelatina. Em 3320 e 2958 cm^{-1} estão, respectivamente, as bandas de amida A e B, enquanto as bandas de amida I, II e III são observadas em 1657, 1552 e 1240 cm^{-1} , respectivamente. A razão A_{1240}/A_{1452} para a gelatina foi de 0,88 e, portanto, ainda menor que o valor observado para o colágeno de peixe após aquecimento, mostrando que a degradação da hélice tripla na gelatina é ainda mais intensa que a obtida pelo aquecimento do colágeno de peixe nas condições estudadas. Isto pode ser explicado pelo fato dos processos de produção da gelatina tipo A usar soluções de ácidos fortes como os ácidos clorídrico e sulfúrico, além de aquecimento na faixa de 50 a 60°C ou próximo à temperatura de ebulição dessas soluções, em alguns casos (Gelatin Manufacturers Institute of America, 2012).

Figura 12 - Espectro no infravermelho da gelatina.



Fonte: autoria própria.

A gelatina também foi caracterizada por eletroforese em gel (Figura 13, Seção 5.2), o que permitiu perceber que embora nesta proteína ainda haja resíduos de cadeias alfa com massas molares próximas às das cadeias α_1 e α_2 do colágeno de peixe, este polímero é caracterizado por uma distribuição ampla de massas molares, devido à fragmentação do colágeno durante seu processamento para produção da gelatina.

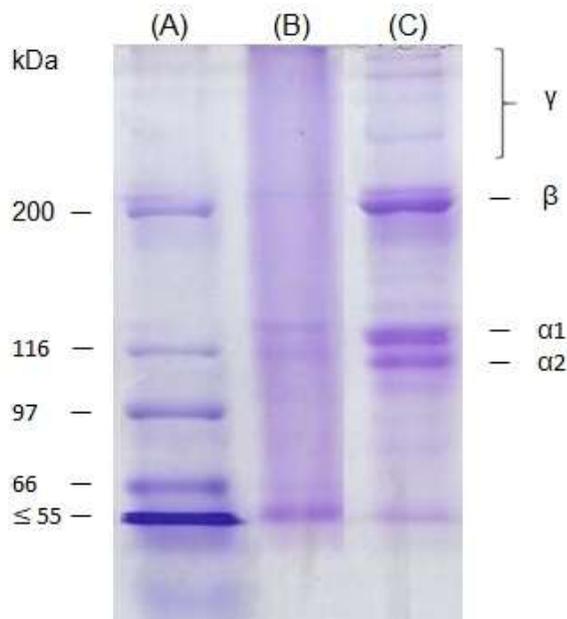
5.2. Seleção da amostra de colágeno

Nos solventes em que a solubilidade dos colágenos bovino e de peixe foram testados (ácido acético (pH 3,0)/etanol 1:1 (v/v), ácido acético (pH 3,0)/etanol 2:1 (v/v), ácido acético (pH 2,0)/etanol 2:1(v/v), ácido acético (pH 3,0) e ácido acético (pH 2,0)) a solubilidade máxima obtida foi a 3% (em massa) para o colágeno de peixe e 2% para o colágeno bovino, ambos com as soluções de menor pH. Vale destacar ainda que o colágeno bovino produziu soluções viscosas com grumos que dificultaram sua passagem pela agulha de fiação. Devido às vantagens do colágeno de peixe em relação a solubilidade e homogeneidade das soluções, este foi o colágeno escolhido para os testes de fiação.

A maior solubilidade observada para o colágeno de peixe deve estar relacionada ao menor teor de hidroxiprolina na proteína em comparação com amostras bovinas, conforme observaram alguns autores (Sun et al., 2017; Yamada et al., 2014; Yamamoto et al., 2015). Contudo, o próprio processo de extração de colágeno, feito por dissolução em soluções ácidas diluídas da pele de peixe tratada, contribui para tal propriedade. O procedimento usado produz o que na literatura é denominado de colágeno solúvel em ácido.

Buscando caracterizar a amostra de colágeno de peixe, fonte escolhida para os testes de fiação, a proteína foi caracterizada por SDS-PAGE para elucidação do perfil de distribuição de massas molares de suas proteínas. O gel obtido (Figura 13) apresenta as bandas α_2 e α_1 , uma intensa banda β e diversas bandas menos intensas denominadas de γ . As bandas α referem-se às hélices- α de colágeno isoladas e sua relação determinada por densitometria foi de 2,05, o que sugere o trímero ($(\alpha_1)_2\alpha_2$), evidência da extração de colágeno tipo I. As bandas β e γ se referem a dímeros e trímeros não dissociados de hélices- α , respectivamente (Hofman et al., 2012; Sun et al., 2017).

Figura 13 – Eletroforese em gel dos padrões de massa molar (A), da gelatina (B) e do colágeno de peixe (C).



Fonte: autoria própria.

A partir dos valores dos fatores de retenção (distância das bandas no gel) das proteínas do padrão de massas molares conhecidas foi construída uma reta a partir da qual foram determinadas as massas molares médias das bandas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno de peixe: 131 ± 1 e 118 ± 2 kDa, respectivamente. Embora seja tipicamente atribuída ao tropocolágeno uma massa molar de 300 kDa, estes valores um pouco acima de 100 kDa para cada cadeia α são muito semelhantes aos reportados na literatura para amostras de colágeno tipo I extraído de pele de tilápia, como os valores de 132 e 119 kDa, respectivamente referentes às cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (Zhou et al., 2016).

5.3. Caracterização reológica das soluções

Para escolha dos solventes empregados na solubilização do colágeno foram comparadas propriedades como a temperatura de ebulição (T_e) e a pressão de vapor (P_v) de solventes já empregados na produção de fibras de colágeno e gelatina por eletrofiação (Tabelas 1 e 2), cujos valores estão listados na Tabela 10. Contudo, em busca de solventes benignos para uso nesta aplicação, a segurança também foi considerada nessa seleção, baseando-se na análise de riscos como a inflamabilidade e a toxicidade.

Tabela 10 – Propriedades físico-químicas de diferentes solventes.

Solvente	T_e (°C)	P_v (kPa)
DMSO	189	0,08 (25°C)
Ácido acético	118	2,1 (25°C)
Ácido fórmico	101	5,7 (25°C)
Água	100	3,2 (25°C)
Etanol	78	7,9 (25°C)
Acetato de etila	77	12 (25°C)
THF	74	7,1 (20°C)
Clorofórmio	61	26 (25°C)
HFP	59	21 (22°C)
HCl	51	4,7 (25°C)

Fonte: PubChem (National Institutes of Health, 2017)

A alta volatilidade e a facilidade de solubilizar o colágeno do HFP resultaram no grande número de pesquisas que podem ser encontradas com este solvente na produção de fibras de colágeno e gelatina por eletrofiação. Em contrapartida, este solvente apresenta riscos à saúde do usuário, custo elevado, além dos riscos à estrutura nativa do colágeno já mencionados anteriormente. Portanto, para definir o solvente a ser empregado neste estudo, a T_e e a P_v foram as propriedades definidas para serem comparados, já que estas medidas indicam a facilidade com a qual um solvente se volatiliza

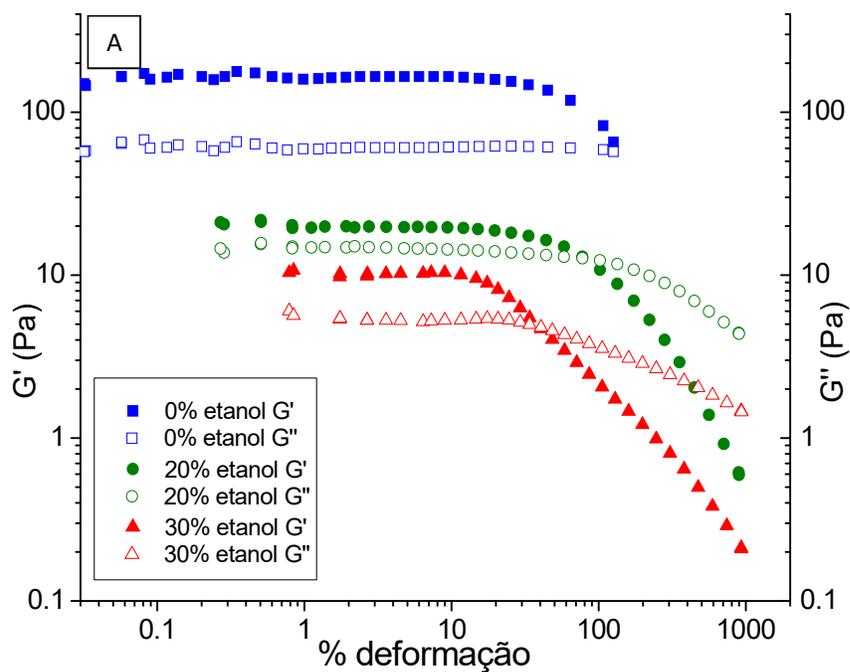
Por apresentar maior T_e e menor P_v dentre todos os solventes elencados, o DMSO foi o primeiro solvente desconsiderado para este fim. O clorofórmio, o THF e o ácido clorídrico foram descartados em virtude de seus riscos químicos, a toxicidade aguda de ambos e a suspeita de causar câncer do primeiro. Em algumas situações foi testado o emprego de aquecimento do ar usado na fiação ou da atmosfera do equipamento de produção das fibras e, portanto, o acetato de etila também foi desconsiderado para uso como solvente por ser altamente inflamável, um risco potencializado em processamentos que usam calor. Deste modo, restaram o etanol, a água e os ácidos fórmico e acético para testar como solventes para os polímeros testados.

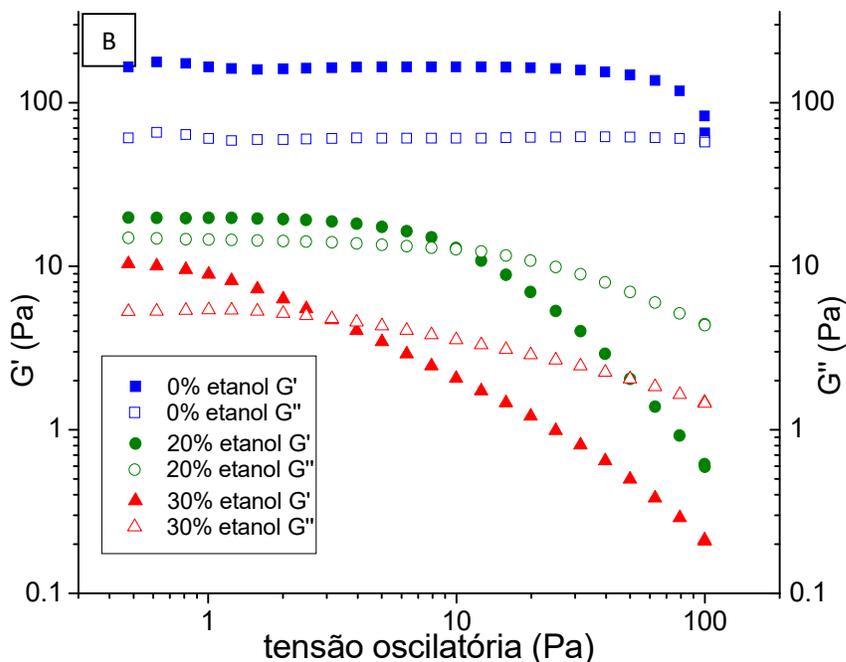
5.3.1. Efeitos do etanol sobre soluções de colágeno em ácido acético

As primeiras soluções de colágeno de pele de tilápia testadas foram solubilizadas a 2,0 % em soluções diluídas de ácido acético (pH 3,0) com etanol (0, 20 ou 30 % em volume no solvente), visando aumentar a taxa de evaporação do solvente durante a fiação. Contudo, altas concentrações de etanol na composição do solvente (acima de 30%) provocavam a precipitação do colágeno, o que motivou o estudo reológico de soluções de colágeno com diferentes concentrações deste álcool, na tentativa de avaliar a viabilidade do uso de etanol.

Inicialmente foram avaliados os módulos elástico e viscoso (G' e G'' , respectivamente) em função da deformação e da tensão oscilatória (Figura 14). A região viscoelástica linear foi definida como 2%, valor empregado nas medidas de viscosidade complexa em função da temperatura. Todo material viscoelástico apresenta uma resposta a tensões que está entre a de um sólido elástico e a de um líquido viscoso e a análise reológica de soluções poliméricas ou polímeros fundidos permite caracterizar o perfil de deformação de um material e correlacionar este comportamento com sua composição e estrutura, por exemplo.

Figura 14 - Módulos G' e G'' em função da deformação (A) e da tensão oscilatória (B) para amostras de colágeno de peixe (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol.





Fonte: autoria própria.

Os valores de deformação ao fim da região viscoelástica linear (RVL), do módulo elástico nesta deformação crítica (G'_{RVL}), do ponto de fluxo (T_f , deformação na qual $G'=G''$) e seu correspondente módulo (G_f) e do fator de perda ($\tan\delta$) para as soluções com diferentes teores de etanol são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores dos parâmetros extraídos do ensaio oscilatório para as amostras de colágeno de peixe (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.

	0% etanol	20% etanol	30% etanol
RVL (%)	7,69 ± 6,67 ^a	25,91 ± 0,50 ^b	11,66 ± 0,26 ^a
G'_{RVL} (Pa)	230,6 ± 69,4 ^a	17,87 ± 0,82 ^b	10,35 ± 1,00 ^b
T_f (%)	123,0 ± 21,0 ^a	80,79 ± 7,13 ^b	40,41 ± 0,73 ^c
G_f (Pa)	61,9 ± 11,4 ^a	12,53 ± 0,20 ^b	4,58 ± 0,20 ^b
$\tan\delta$	0,29 ± 0,07 ^a	0,76 ± 0,04 ^b	0,51 ± 0,03 ^c

Fonte: autoria própria. Valores com a mesma letra sobrescrita (a-c) não são significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

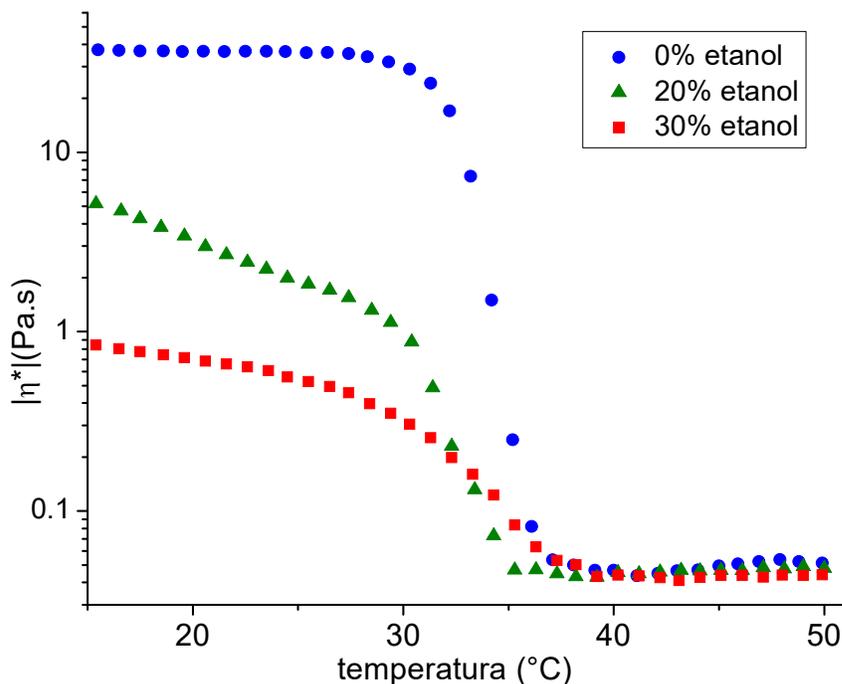
Para todas as concentrações de etanol foi observado um perfil típico de materiais com comportamento de fluidos predominantemente sólidos, isto é, com $G' > G''$, caso em que as deformações ocorridas mediante uma tensão são mais elásticas que viscosas, evidente também pelas medidas de $\tan\delta$. O fator de perda

($\tan\delta$) é calculado pela relação G''/G' ao fim da RVL e está relacionado com a habilidade de um material amortecer uma tensão. Como para todas as amostras $\tan\delta < 1$, estas são consideradas fluidos predominantemente elásticos. Mas é possível notar também que a adição de etanol aumenta o valor de $\tan\delta$, o que indica que a predominância de G' sobre G'' está diminuindo, isto é, está ocorrendo um aumento do caráter de líquido viscoso nas soluções de colágeno.

A adição de etanol na faixa de 20% aumentou a deformação da solução de colágeno frente a aplicação de uma tensão, visível pelo aumento da RVL, contudo, este efeito foi perdido com o aumento da concentração do solvente testado. Esta capacidade do etanol de enfraquecer as interações nas redes poliméricas do colágeno foi observada novamente ao comparar os valores de G'_{RVL} , T_f e G_f , das amostras com diferentes concentrações do álcool. Todas estas variáveis foram significativamente reduzidas com a adição de etanol e estes parâmetros indicam, respectivamente, a tensão aplicada para que se perca a relação linear entre tensão e deformação (efeito relacionado a mudanças não reversíveis na microestrutura dos fluidos), a tensão a partir da qual ocorre uma inversão do comportamento das soluções, passando a ser predominantemente o de um líquido viscoso e a deformação dos fluidos no momento desta inversão do perfil de comportamento reológico. De modo geral, a perda de estabilidade do fluido com adição de etanol indica que o solvente deve estar reduzindo interações intermoleculares que estabilizam a proteína em solução.

O estudo da viscosidade complexa ($|\eta^*|$) em função da temperatura (Figura 15) permite observar alterações na capacidade das soluções de resistir ao escoamento sob cisalhamento e na desnaturação do colágeno em decorrência da adição de etanol.

Figura 15 - Viscosidade complexa para as soluções de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol em função da temperatura.



Fonte: autoria própria.

A primeira evidência de desestabilização do colágeno pelo etanol é a redução gradativa de viscosidade entre 15 e 30°C em oposição à amostra sem o álcool, que apresenta viscosidade constante neste intervalo. Os valores de T_d e viscosidade complexa a 20°C ($|\eta^*|_{20^\circ\text{C}}$) estão na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de T_d e viscosidade a 20°C para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.

	0% etanol	20% etanol	30% etanol
T_d (°C)	34,5 ± 0,3 ^a	31,5 ± 0,3 ^b	35,1 ± 0,5 ^a
$ \eta^* _{20^\circ\text{C}}$ (Pa s)	44,1 ± 8,4 ^a	3,17 ± 0,03 ^b	0,70 ± 0,01 ^b

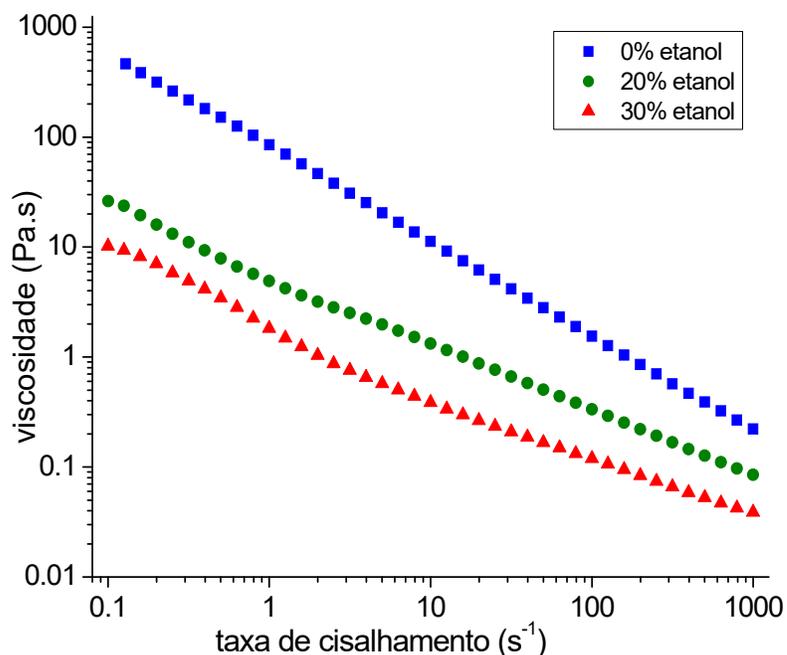
Fonte: autoria própria. Valores com a mesma letra sobrescrita (a-b) não são significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

As reduções drásticas de viscosidade com adições de etanol evidenciadas pelos dados da Tabela 12 são mais um indício da desestabilização do colágeno, pois este efeito é comumente resultado de reduções de massa molar, por exemplo, por despolimerização ou da redução na formação de emaranhados, evento resultante da redução de interações intermoleculares na macromolécula. Por outro lado, as mudanças de T_d com a adição de etanol não se mostraram constantes, apresentando

uma redução significativa no valor a 20% de etanol e se mantendo inalterado com 30% de etanol. Corroborando estes resultados, Gopinath et al. (2014) relataram que a baixas temperaturas (5°C) concentrações de até 40% (v/v) de etanol não afetaram a estabilidade da hélice tripla do colágeno, contudo, a temperaturas próximas de 34°C sua estrutura se tornou altamente instável termodinamicamente na presença do solvente.

Os perfis de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para estas soluções são mostrados na Figura 16. Assim como nos ensaios reológicos anteriores, a observação das curvas de viscosidade revela uma redução da viscosidade com o aumento da concentração de etanol.

Figura 16 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes concentrações de etanol.



Fonte: autoria própria.

Para quantificar as mudanças observadas as curvas foram ajustadas ao modelo da Lei das Potências, de Ostwald-de-Waele (Equação 1), onde k é o índice de consistência do fluido, n é o índice de comportamento do fluido, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento e τ a tensão cisalhante.

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Os valores de k , n e da viscosidade a 1 Hz (η_{1Hz}) estão na Tabela 13, sendo k diretamente relacionado com a viscosidade da solução e o valor de n usado para classificar o tipo de comportamento observado para o fluido.

Tabela 13 – Valores de k , n e viscosidade a 1,0 Hz para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético com diferentes teores de etanol.

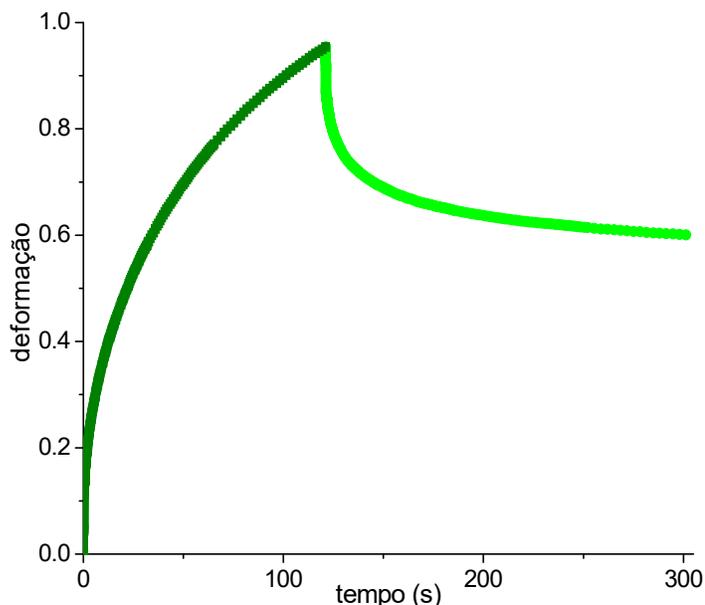
	0% etanol	20% etanol	30% etanol
k (Pa s)	$92,0 \pm 8,7^a$	$5,07 \pm 0,28^b$	$1,48 \pm 0,24^b$
n	0,1091	0,4043	0,4906
η_{1Hz} (Pa s)	$90,8 \pm 6,7^a$	$4,91 \pm 0,14^b$	$2,35 \pm 0,47^b$

Fonte: autoria própria. Valores com a mesma letra sobrescrita (a-b) não são significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

A redução na resistência ao escoamento perceptível na Figura 16 se mostrou confirmada pela redução nos valores de k e η_{1Hz} com a adição de etanol. Todas as amostras demonstraram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), o que significa que estes materiais apresentam redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, comportamento típico de soluções poliméricas ou polímeros fundidos. Pode-se notar para n que seu valor aumentou com a adição de etanol, aproximando mais o comportamento das amostras ao de um fluido newtoniano.

Os ensaios de recuperação, representados pelo gráfico da amostra com 20% de etanol pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Gráfico de recuperação em função do tempo para a solução de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com 20% de etanol.



Fonte: autoria própria.

Durante estes ensaios uma tensão constante é aplicada e a deformação é medida até que esta seja cessada, verificando então a recuperação da deformação pelo material. Os valores de deformação máxima ($D_{m\acute{a}x}$) e taxa de recuperação (T_r) para as diferentes amostras estão na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores de $D_{m\acute{a}x}$ e T_r para as amostras de colágeno de pele de tilápia (2,0 %) em ácido acético pH 3,0 com diferentes teores de etanol.

	0% etanol	20% etanol	30% etanol
$D_{m\acute{a}x}$	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,98 \pm 0,04^b$	$11,2 \pm 0,3^c$
T_r (%)	$54,8 \pm 11,6^a$	$37,3 \pm 0,5^a$	$2,48 \pm 0,18^b$

Fonte: autoria própria. Valores com a mesma letra sobrescrita (a-c) não são significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Os ensaios mostraram a obtenção de um material mais facilmente deformável e com menor recuperação da deformação com a adição do etanol. Este resultado vai de encontro aos resultados de $\tan \delta$, que apontam para um aumento do módulo viscoso em relação ao elástico com a adição do álcool.

Todos estes resultados indicaram que a adição de etanol afeta fortemente as propriedades reológicas das soluções de colágeno em ácido acético (pH 3,0), reduzindo suas interações intermoleculares, temperatura de desnaturação, recuperação viscoelástica e viscosidade. As propriedades reológicas das soluções

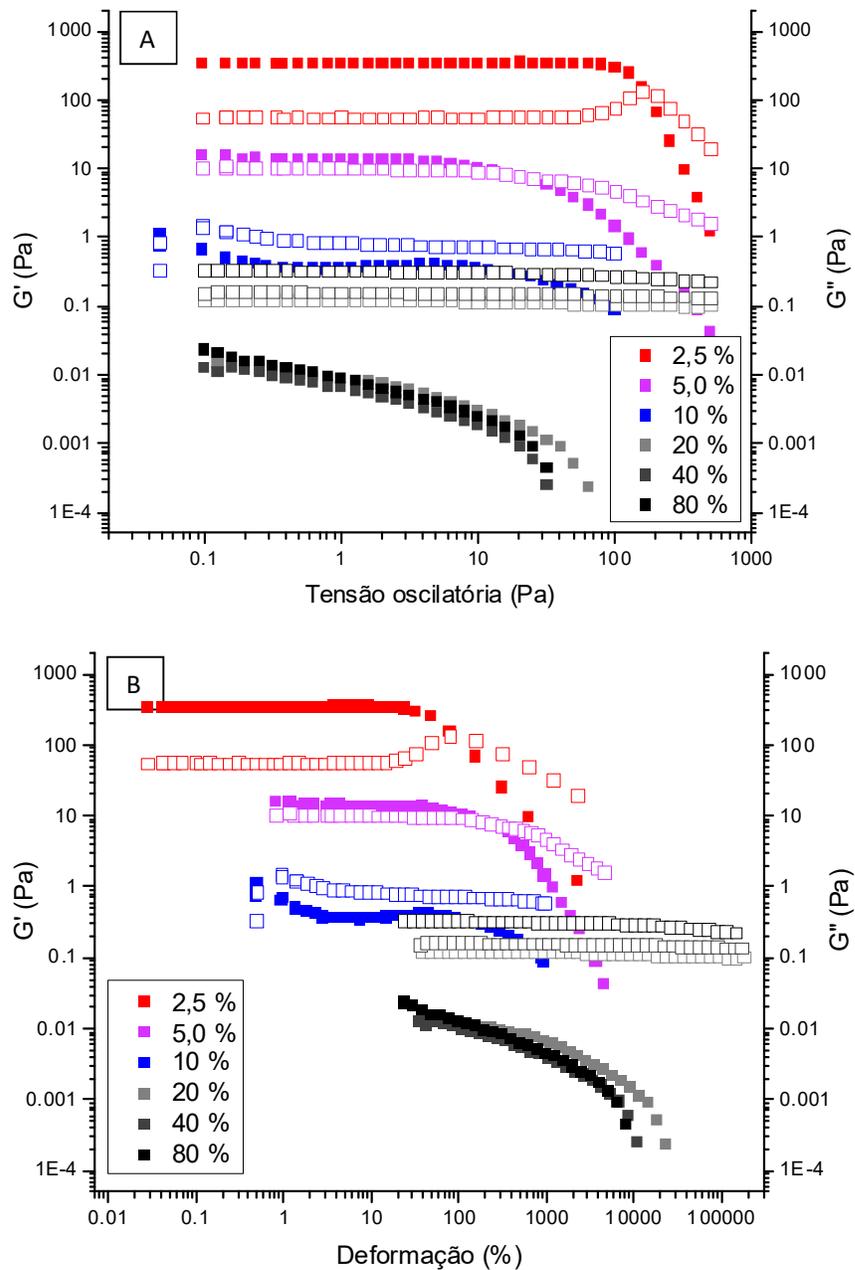
poliméricas afetam diretamente sua capacidade de produzir fibras, portanto, o uso de etanol para este fim pode contribuir para a obtenção de fibras por SB-Spinning, já que além de sua maior volatilidade em comparação à água e ao ácido acético, este solvente parece diminuir as interações entre as cadeias de polímero, resultando em soluções mais facilmente deformáveis e fluidas, facilitando o fornecimento da solução através da agulha e a formação dos jatos que devem resultar nas fibras ultrafinas. Contudo, seu uso deve ser limitado a concentrações de até 30% na solubilização de colágeno, visando preservar suas propriedades e a homogeneidade de suas soluções.

5.3.2. Efeitos da acidez sobre soluções de colágeno e gelatina em HAc

Ao testar a fiação por SB-Spinning de soluções de colágeno e gelatina com diversos solventes (Seção 5.4), dentre eles ácido fórmico (98%), ácido acético (pH 2,0 ou 3,0, com ou sem etanol), além de água e água/etanol exclusivamente para gelatina - todos sem sucesso na obtenção de fibras - percebeu-se que algumas soluções apresentavam certas vantagens durante a fiação no que se refere à facilidade de transferência da seringa para a agulha e na formação de jatos estáveis.

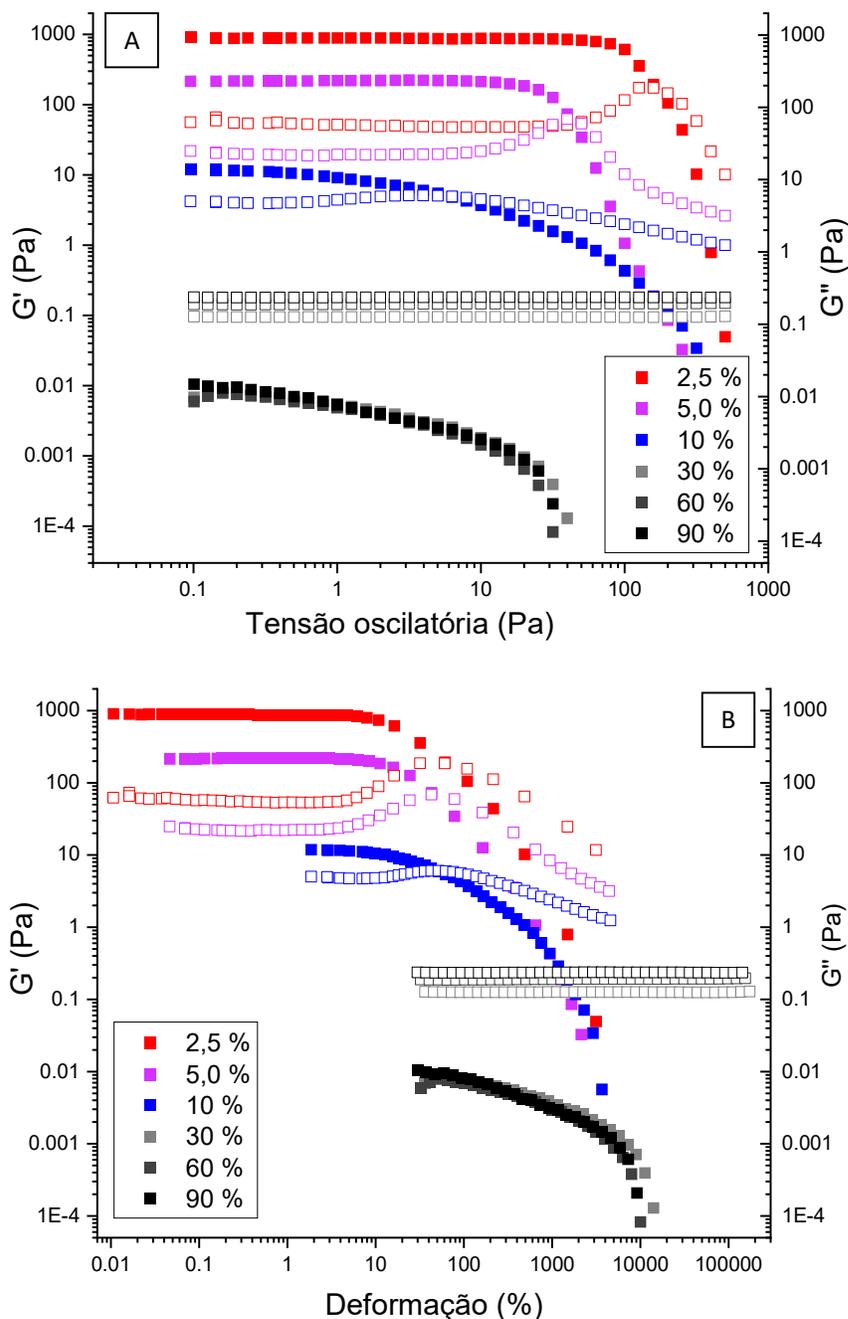
As soluções de gelatina em água e em água/etanol, por exemplo, apresentaram a dificuldade de gelificar em temperatura ambiente, impossibilitando sua transferência até a agulha. Já ao comparar as soluções de ácido acético a pH 2,0 ou 3,0 com a solução de ácido fórmico 98% notou-se que com o aumento da acidez das soluções havia um ganho de fluidez e da homogeneidade das soluções, o que resultava em uma maior facilidade de transporte até a agulha e na estabilização dos jatos. Como a literatura reporta uma possível degradação da gelatina em ácido fórmico com o passar do tempo (Ki et al., 2005), decidiu-se por avaliar os efeitos da acidez do solvente sobre as propriedades reológicas das soluções de colágeno e gelatina empregando soluções aquosas de ácido acético. Inicialmente os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram avaliados em função da deformação e da tensão oscilatória e são mostrados nas Figuras 18 e 19, para o colágeno e a gelatina, respectivamente.

Figura 18 - Módulos G' (■) e G'' (□) em função da tensão oscilatória (A) e da deformação (B) para amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.



Fonte: autoria própria.

Figura 19 - Módulos G' (■) e G'' (□) em função da tensão oscilatória (A) e da deformação (B) para amostras de gelatina (5,0 %) em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.



Fonte: autoria própria.

Com o aumento da concentração de HAc foi observada a transição de materiais predominantemente elásticos ($G' > G''$), isto é, com comportamento mais próximo ao de sólidos, para materiais com o comportamento típico de líquidos, ou seja, predominantemente viscosos ($G'' > G'$) para ambos os polímeros. Este efeito foi acompanhado de uma brusca redução nos valores dos módulos e do estreitamento

da RVL com o aumento da acidez, sobretudo para as amostras com 30% de HAc ou mais, culminando com o desaparecimento da RVL nas amostras de colágeno e gelatina com 80 e 90% de ácido acético, respectivamente. Estes resultados são todos indícios da redução nas interações intermoleculares e dos emaranhamentos envolvendo as moléculas destas proteínas. Os valores dos parâmetros obtidos pela análise destas curvas para as amostras com 2,5 a 10% de HAc estão reunidos na Tabela 15. Como as demais amostras apresentaram RVL muito estreitas ou inexistentes nas faixas de tensão estudadas e seus valores diferem muito pouco entre si, optou-se por focar a atenção nas amostras menos ácidas neste ensaio.

Tabela 15 – Valores dos parâmetros extraídos dos ensaios oscilatórios para as amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de ácido acético.

	HAc (%)	RVL (%)	G' _{RVL} (Pa)	tanδ	τ _f (%)	G _f (Pa)
Colágeno	2,5	12,2 ± 5,8	293 ± 80	0,20 ± 0,04	95 ± 16	111 ± 29
	5,0	31,8 ± 3,5	11,1 ± 2,5	0,77 ± 0,05	137 ± 72	7,6 ± 0,5
	10	54,7 ± 6,1	0,73 ± 0,03	2,3 ± 0,3	-	-
Gelatina	2,5	2,21 ± 0,13	815 ± 83	0,062 ± 0,005	58 ± 3	191 ± 23
	5,0	2,86 ± 0,63	219 ± 30	0,100 ± 0,004	43,4 ± 1,9	74,0 ± 8,4
	10	8,05 ± 0,82	8,84 ± 1,82	0,425 ± 0,010	54,1 ± 5,4	4,9 ± 1,0

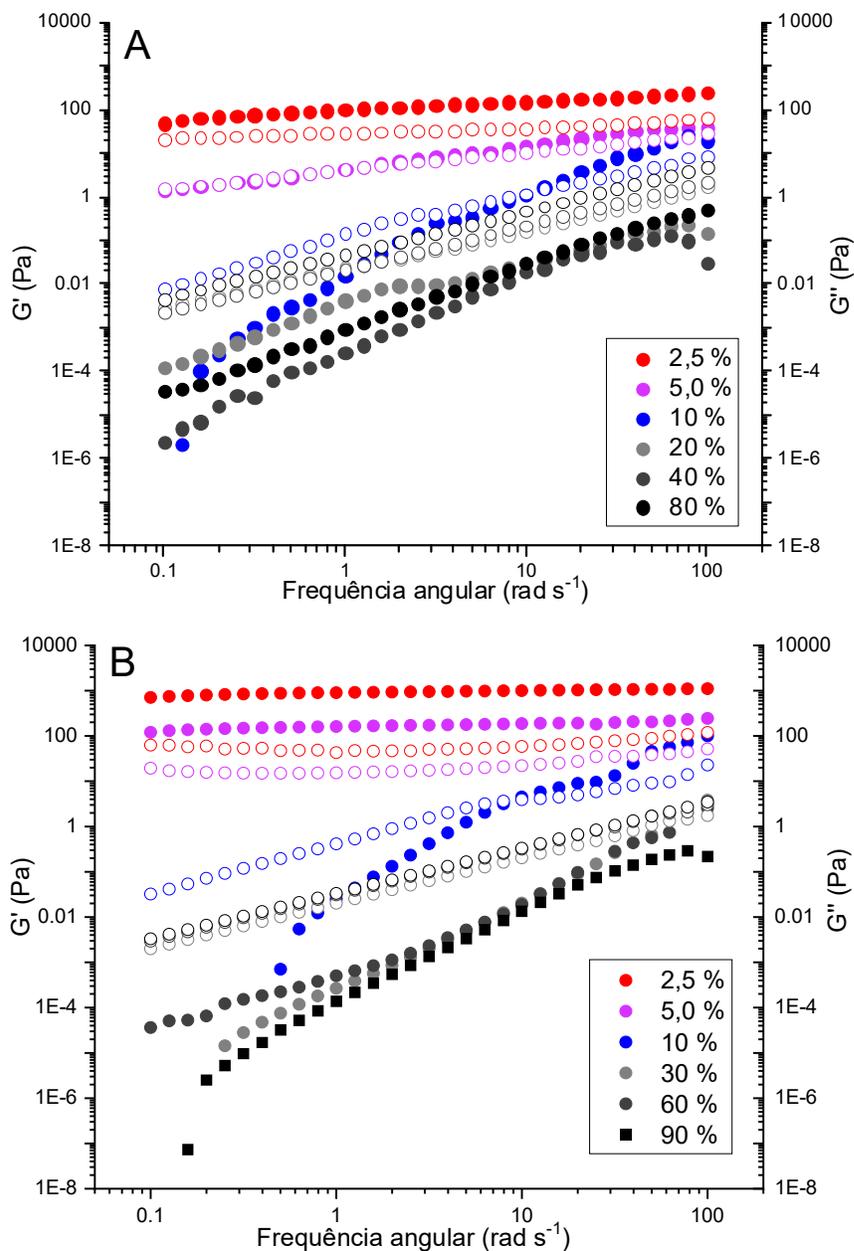
Fonte: autoria própria.

Para todas as amostras com exceção do colágeno em 10% de HAc o fator de perda tanδ (G''/G' ao fim da RVL) foi menor que 1, indicando o comportamento de um fluido elástico para as amostras menos ácidas. Contudo, é possível notar que a acidificação destas soluções leva a aumentos gradativos deste parâmetro, como já indicado anteriormente pela mudança do comportamento mais elástico das soluções menos ácidas para um comportamento típico de líquidos. A acidificação das soluções leva ainda a aumentos nos valores de deformação ao fim da RVL com reduções de seu módulo elástico, G'_{RVL}, resultados associados a uma redução da força dos géis (Naji-Tabasi; Razavi, 2017) formados por estas soluções.

A caracterização reológica em função da frequência de oscilação é uma boa ferramenta para determinar se um fluido se comporta como uma solução concentrada, diluída ou como um gel, pois a variação desta frequência permite analisar as amostras sob deformações com diferentes tempos de relaxamento. A Fig.

20 apresenta os módulos G' e G'' em função da frequência angular para as amostras de colágeno e gelatina com diferentes concentrações de HAc.

Figura 20 - Módulos G' (●) e G'' (○) em função da frequência angular de oscilação para amostras de (A) colágeno de pele de tilápia 3,0 % e (B) gelatina 5,0 % em soluções com diferentes concentrações de ácido acético.



Fonte: autoria própria.

Os gráficos em função da frequência permitem a classificação das soluções por meio da determinação do ponto de entrecruzamento entre os módulos G' e G''

(Lai; Li; Li, 2008). Para tanto, os valores de frequência onde há a inversão dos módulos, indicando a transição de um material mais líquido para um material mais elástico são indicados na Tabela 16.

Tabela 16 – Classificação das amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de HAc pelos resultados dos ensaios de frequência de oscilação.

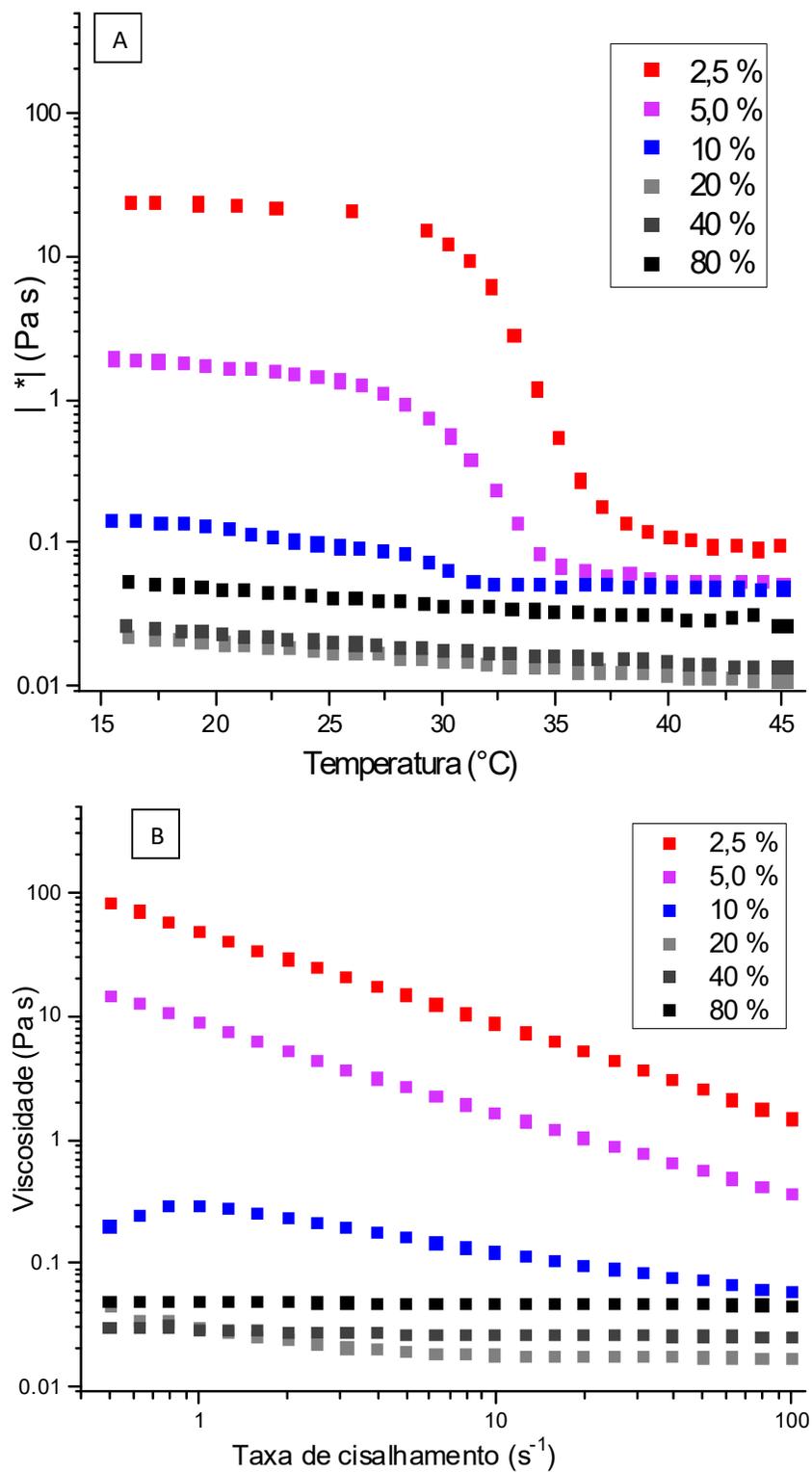
	HAc (%)	$G' = G''$ (rad s ⁻¹)	Classificação
Colágeno	2,5	< 0.1	Gel
	5,0	1,1 ± 0,2	Solução concentrada
	10	1,3 ± 0,1	Solução concentrada
	20	> 100	Solução diluída
	40	> 100	Solução diluída
	80	> 100	Solução diluída
Gelatina	2,5	< 0.1	Gel
	5,0	< 0.1	Gel
	10	9.18 ± 1.72	Solução concentrada
	30	71 ± 10	Solução concentrada
	60	> 100	Solução diluída
	90	> 100	Solução diluída

Fonte: autoria própria.

As amostras de colágeno em 2,5% de HAc e as amostras de gelatina com 2,5 ou 5,0% do ácido se comportaram como géis ($G' > G''$ para toda a faixa de frequência analisada), enquanto as amostras com 5,0 e 10% para o colágeno e 10 e 30% para a gelatina apresentaram um perfil de soluções concentradas, isto é, com a inversão de G' e G'' na faixa de frequência de oscilação analisada. As demais amostras foram classificadas como soluções diluídas, pois para estas $G'' > G'$ durante toda a análise, isto é, se comportam tipicamente como líquidos independente das mudanças no tempo de relaxamento das medidas. Estes resultados corroboram a hipótese de o ácido acético estar atuando na redução das interações intermoleculares e emaranhamentos nas soluções, pois aumentos na sua concentração levam a mudanças semelhantes às observadas com a diluição de soluções poliméricas.

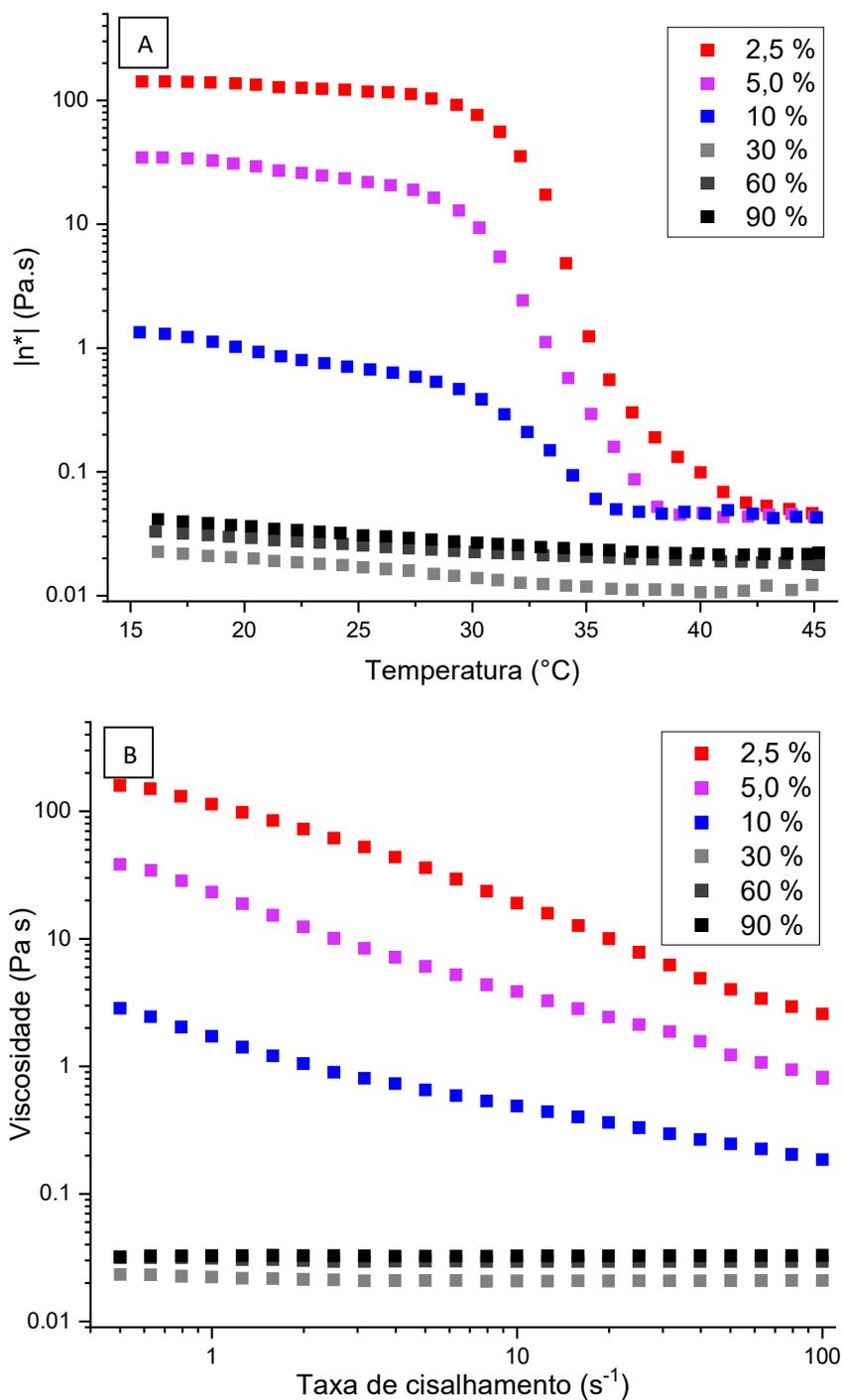
As Figuras 21 e 22 apresentam os gráficos de viscosidade complexa ($|\eta^*|$) em função da temperatura e da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as soluções de colágeno e gelatina, respectivamente.

Figura 21 – Viscosidade para as soluções de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) em diferentes concentrações de ácido acético em função (A) da temperatura e (B) da taxa de cisalhamento.



Fonte: autoria própria.

Figura 22 – Viscosidade para as soluções de gelatina (5,0 %) com diferentes concentrações de ácido acético em função (A) da temperatura e (B) da taxa de cisalhamento.



Fonte: autoria própria.

As curvas em função da taxa de cisalhamento foram ajustadas ao modelo de Lei das Potências, de Ostwald-de-Waele (Equação 1) e os valores de viscosidade complexa a 20°C ($\eta^*_{20^\circ\text{C}}$), k e n , bem como de T_d estão listados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de k , n e viscosidade complexa a 20°C para as amostras de colágeno de pele de tilápia (3,0 %) e gelatina (5,0 %) em função da concentração de ácido acético.

	HAc (%)	Td (°C)	$\eta^*_{20^\circ\text{C}}$ (Pa s)	k (Pa s)	n
Colágeno	2,5	33,6 ± 0,2	21,1 ± 1,9	49,6 ± 1,3	0,240
	5,0	32,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	7,31 ± 0,09	0,349
	10	30,0 ± 0,6	0,125 ± 0,005	0,28 ± 0,02	0,668
	20	-	0,0196 ± 0,0001	0,019 ± 0,001	0,973
	40	-	0,0232 ± 0,0002	0,0282 ± 0,0001	0,978
	80	-	0,049 ± 0,002	0,057 ± 0,001	0,956
Gelatina	2,5	34,1	139±8	79,9±6,0	0,3036
	5,0	31,9 ± 0,6	27,1±3,5	19,7±1,6	0,2915
	10	34,3 ± 0,1	1,00±0,11	1,12±0,26	0,6050
	30	-	0,020±0,001	0,0216±0,0004	0,9946
	60	-	0,029±0,001	0,0298±0,0007	0,9982
	90	-	0,037±0,001	0,0342±0,0009	0,9981

Fonte: autoria própria.

Embora também denominada T_d (temperatura de desnaturação), esta medida obtida por reologia está mais ligada a quebra de ligações de hidrogênio e outras interações que podem até levar à formação de cadeias com organização aleatória do que ao rompimento de ligações cruzadas que ocorre nas análises por DSC (Jeevithan et al., 2014; Lewandowska; Szulc; Sionkowska, 2021), o que permite que se observe este tipo de evento térmico mesmo para amostras de gelatina. Assim como observado para a adição de etanol, o aumento da acidez dos solventes (de 2,5 a 10% de HAc) estudados levou à redução na T_d para as duas proteínas, com uma recuperação do valor inicial pela amostra de gelatina em 10% de ácido acético. Com soluções mais ácidas este comportamento de redução da viscosidade com o aquecimento sequer é observado, o que pode indicar que nestas concentrações de HAc, interações como ligações de hidrogênio já tenham sido todas (ou em sua maioria) suprimidas pelas interações do polímero com o solvente.

Os valores de $\eta^*_{20^\circ\text{C}}$ e k diminuíram com o aumento da acidez até a concentração de 20% para ambos os polímeros. Acima dessa concentração os

valores de $\eta^*_{20^\circ\text{C}}$ e k voltaram a aumentar, embora com diferenças muito menores que as observadas entre as amostras menos ácidas. A redução dos valores de $\eta^*_{20^\circ\text{C}}$ e k observada entre as amostras com 2,5 e 10% de HAc pode estar relacionada a uma completa eliminação das estruturas terciárias do colágeno e da destruição das porções helicoidais da gelatina em virtude da elevada concentração de ácido. Já o aumento de $\eta^*_{20^\circ\text{C}}$ e k a partir de 40% pode ser explicado pela maior viscosidade do HAc (1,12 cP) em relação à água (1,002 cP). Uma vez que as interações intermoleculares entre as moléculas de colágeno ou gelatina não são mais as interações preponderantes, a resistência do fluido em escoar tende a ser consequência do solvente empregado, explicando o efeito observado. Por fim, é possível notar pelos valores de n que com o aumento da acidez as soluções caracteristicamente pseudoplásticas ($n < 1$) passam a ter um comportamento mais próximo ao de um fluido newtoniano ($n = 1$), uma confirmação da supressão das interações intermoleculares destes polímeros.

Este conjunto de ensaios evidenciou a importante influência da acidez dos solventes sobre as propriedades reológicas das soluções de colágeno e gelatina. A classificação destas soluções por ensaios de frequência permitiu afirmar que as soluções de colágeno e gelatina com a partir de, respectivamente, 20 ou 60 % de HAc devem ser soluções mais indicadas para processamentos nos quais se requer uma alta fluência da amostra, como nas técnicas de produção de fibras ultrafinas, nas quais uma solução precisa ser fornecida por meio de injeção em uma fina agulha.

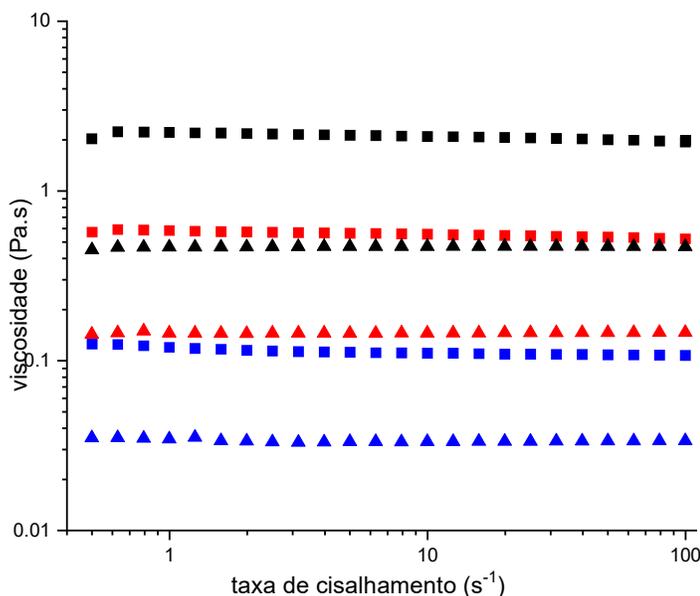
Por fim, embora os efeitos do etanol tenham se assemelhado em muitos pontos aos efeitos do ácido acético sobre as propriedades reológicas destas soluções, aumentos no teor de etanol levaram à precipitação do colágeno, conforme mencionado anteriormente. Por outro lado, o aumento da acidez das soluções não só contribuiu para o aumento da fluidez das soluções como aumentou a solubilidade dos polímeros, o que levou a escolha do ácido acético 90% como o solvente usado para produção das fibras.

5.3.3. Efeitos da concentração sobre soluções de colágeno e gelatina em ácido acético 90%

Tendo encontrado um solvente que permite a solubilização de concentrações maiores do colágeno, os efeitos da concentração desta proteína e da gelatina sobre a fluidez de suas soluções foram testados. Os perfis de viscosidade em

função da taxa de cisalhamento para as soluções de colágeno de pele de tilápia e de gelatina em HAc 90% são mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Viscosidade das soluções de colágeno (■) e gelatina (▲) a (■/▲) 5, (■/▲) 10 e (■/▲) 15% em HAc 90%.



Fonte: autoria própria.

A análise das curvas da Figura 23 revela que o aumento na concentração dos polímeros aumenta a viscosidade das soluções, o que é esperado em função do aumento na probabilidade de formação de emaranhamentos com o aumento do número de macromoléculas em solução. Fica evidente também que a viscosidade das soluções de colágeno é sempre maior que a das soluções com a mesma concentração de gelatina, o que pode estar relacionado a interações mais fortes entre o solvente com colágeno que com a gelatina, já que nesta concentração de ácido a formação de emaranhados e interações intermoleculares nas proteínas é esperado que ocorra em menor magnitude que as interações dos polímeros com o solvente (Seção 5.3.2). As curvas de viscosidade foram ajustadas ao modelo de Lei das Potências (Equação 1) e os valores de k e n são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Valores de k , n e $\eta_{1\text{Hz}}$ para as amostras de colágeno e gelatina em HAc 90%.

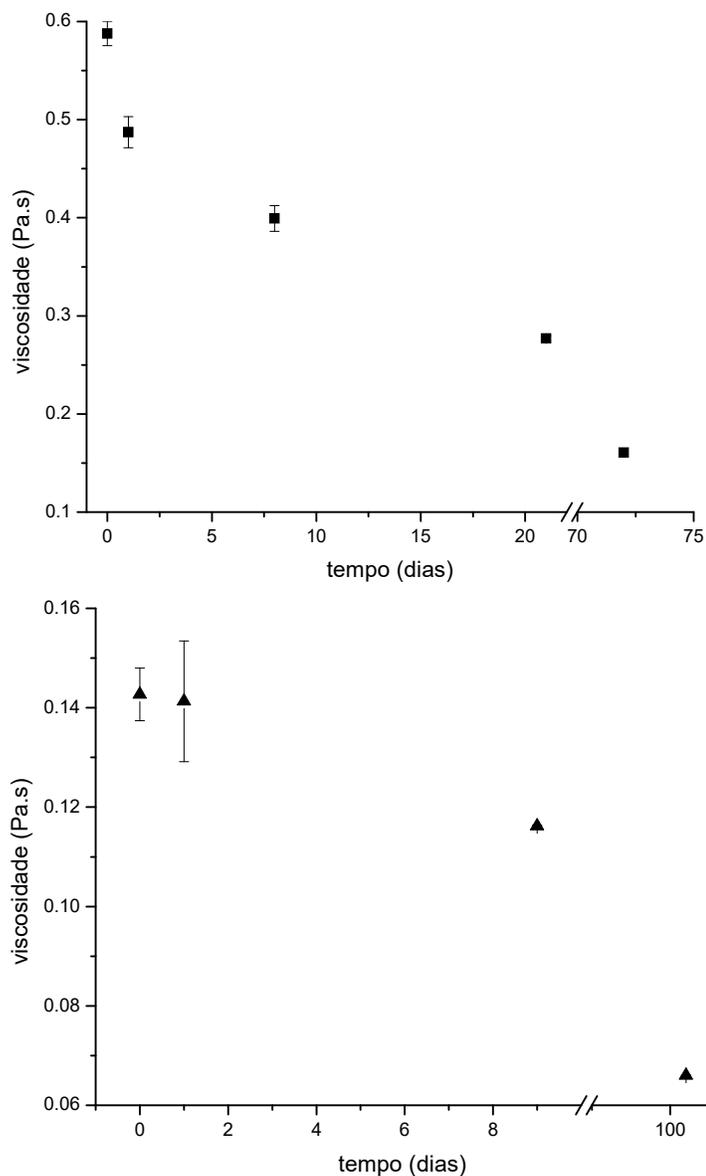
	Concentração (%)	k (Pa s)	n
Gelatina	5	$0,033 \pm 0,001$	1,00
	10	$0,149 \pm 0,004$	0,995
	15	$0,532 \pm 0,018$	0,974
Colágeno	5	$0,123 \pm 0,014$	0,964
	10	$0,808 \pm 0,039$	0,911
	15	$2,38 \pm 0,01$	0,953

Fonte: autoria própria.

A análise dos dados da Tabela 18 confirma a redução de viscosidade com a redução da concentração dos polímeros observada pelas curvas, já que a diluição destas soluções também levou a reduções nos valores de k . Além disso, é possível observar que todas as amostras apresentaram perfil muito próximo ao de fluidos newtonianos ($n=1$), isto é, indicando que estas soluções praticamente não apresentam variação de viscosidade em função da taxa de cisalhamento.

Preocupado com os possíveis efeitos de degradação a longo prazo destas soluções, a estabilidade dos polímeros em solução foi avaliada acompanhando a variação da viscosidade em função do tempo e é apresentada na Figura 24. Amostras com 10% de colágeno ou gelatina foram armazenadas a 4°C e após equilíbrio térmico com a temperatura ambiente suas viscosidades foram medidas, usando o valor de viscosidade a 1 s^{-1} de taxa de cisalhamento para construção dos gráficos a seguir.

Figura 24 - Viscosidade em função do tempo de estoque a 4°C para as amostras a 10% em HAc 90% de (■) colágeno e (▲) gelatina.



Fonte: autoria própria.

A Figura 24 evidencia que os polímeros apresentaram redução da viscosidade em função do tempo de estoque, com reduções mais severas sendo observadas para o colágeno, o qual apresenta perda de estabilidade já após um dia de estoque. Ki et al. (2005) reportaram efeito similar para soluções de gelatina em ácido fórmico, o que relacionaram a uma degradação do polímero. Reduções de viscosidade podem estar ligados, por exemplo, à supressão de interações, à diluição ou à redução da massa molar, o que aconteceria por despolimerização das macromoléculas. De todo modo, buscando minimizar os efeitos observados com o

estoque destes polímeros em solução de HAc 90% se estabeleceu o protocolo de preparar as soluções usadas para produção das fibras na noite anterior à SB-Spinning com o uso já pela manhã, limitando seu tempo de estoque ao período de 18h desde o início da solubilização das proteínas.

5.4. Fiação por sopro em solução

Embora parte dos desafios encontrados na produção de fibras de colágeno e gelatina por SB-Spinning tenham sido reportados nas Seções 5.2 e 5.3 ao justificar o colágeno e o solvente escolhidos para este fim, as diferenças de solubilidade, homogeneidade e propriedades reológicas das soluções não foram os únicos fatores considerados para excluir algumas soluções. Em vista da diversidade de parâmetros envolvidos neste processamento, dentre os quais, solvente, tipo e concentração do polímero, condições de processamento como vazão da solução polimérica, pressão e distância de trabalho, temperatura do gás usado, dentre outros, várias condições de fiação foram testadas com soluções que viriam a ser desconsideradas posteriormente para as amostras de gelatina (Tabela 19).

Tabela 19 – Testes de fiação por sopro em solução feitos com as soluções de gelatina.

Solvente	Concentração (%)	Vazão (mL/h)	Pressão (psi)	Distância (cm)	Desfecho
Água	4, 6, 8, 10	18, 36	30, 60	20	Solução gelifica e não fia
Água/etanol (9:1)	4, 8, 10, 12	12, 18, 30, 36	30, 45, 60	20	Solução gelifica e não fia mesmo com ar a 32°C
Água/etanol (1:1)	15	1,2 a 6	30, 50, 60, 70	20, 25, 30	Não fia
Ácido fórmico	10	1,8 a 7,2	30, 60, 90	15, 25	Não fia
HAc/água (9:1)	15	18, 36	30, 60	20	Solvente volatiliza parcialmente e não fia
HAc/água (9:1)	10, 15	3,6 a 10,8	30	25	Produz fibras
HAc/água (9:1)	5	3,6 a 10,8	30	25	Não fia

Fonte: autoria própria.

As primeiras soluções de gelatina testadas quanto à sua capacidade de fiação por SB-Spinning foram as soluções aquosas, com concentrações de 4, 6, 8 e 10%, a uma distância de trabalho de 20 cm e valores de pressão de 30 ou 60 psi, com vazões de 18 ou 36 mL h⁻¹. Em todas as condições testadas não foi possível obter fibras de gelatina e a primeira dificuldade encontrada com estas soluções foi sua gelificação ao resfriar abaixo de 37°C, já que nestes casos o fornecimento de solução era interrompido, uma vez que o aumento na força do gel em virtude da gelificação da gelatina impedia o movimento do êmbolo pela bomba de injeção.

Quando testada enquanto fluida, todas as amostras resultaram na formação de gotículas de solução, indicando uma baixa volatilização do solvente. Zhang et al. (2009) reportaram a eletrofiação de soluções aquosas com 30 a 40% de gelatina (25 kDa) por meio do uso de um sistema aquecido de fiação, no qual todo o ambiente da câmara de fiação era aquecido a 35-50°C. Estes autores podem ter tido sucesso na fiação principalmente em virtude da temperatura empregada, uma vez que nestas condições, tanto a fluidez da gelatina quanto uma mais fácil volatilização do solvente podem estar sendo alcançadas.

Já as soluções de gelatina em água/etanol (9:1 v/v) foram testadas nas concentrações de 4, 8, 10 e 12%, com distância de trabalho de 20 cm, a valores de pressão de 30, 45 ou 60 psi e vazão de 12, 18, 30 ou 36 mL h⁻¹. Em todas as condições testadas também não foi possível obter fibras. Assim como para as soluções aquosas, as dificuldades encontradas para estas soluções foram a gelificação da gelatina e a dificuldade em volatilizar o solvente. Li e colaboradores (2006) produziram fibras de gelatina por eletrofiação empregando este solvente com uso de um sistema de aquecimento. Um sistema de aquecimento de ar foi testado na tentativa de melhorar a volatilização do solvente, contudo, apesar de na saída da agulha o ar pressurizado alcançar 32°C, com sua expansão a temperatura do gás era reduzida rapidamente, de modo a não alterar os resultados obtidos com estas soluções.

Buscando melhorar a volatilização do solvente durante a fiação, foi testada uma solução com 15% de gelatina em um solvente com mais etanol, usando água/etanol (1:1 v/v) com distâncias de trabalho de 20, 25 ou 30 cm a valores de pressão de 30, 50, 60 ou 70 psi e taxas de alimentação de 1,2 a 6 mL h⁻¹ (1,2; 1,5; 1,8; 2,4; 3,6 e 6,0). A adição de etanol em maior concentração facilitou o manuseio da solução, reduzindo o aumento de viscosidade com o resfriamento da solução devido

à gelificação. Porém, mesmo com a maior concentração de etanol, para todas as condições testadas também não foi possível obter fibras de gelatina.

Ki et al. (2005) reportaram a eletrofiação de gelatina usando ácido fórmico como solvente em um estudo onde indicam, inclusive, a capacidade deste solvente de impedir a gelificação da gelatina como uma vantagem no seu uso, uma vez que facilita sua manipulação sem a necessidade de aquecimento da solução. Contudo, este solvente pode levar à degradação de soluções do polímero, conforme já mencionado anteriormente na Seção 5.3.3. Portanto, uma solução 10% de gelatina em ácido fórmico foi testada com distância de trabalho de 15 ou 25 cm, a valores de pressão de 30, 60 ou 90 psi e taxas de alimentação de 1,8; 3,6; 5,4 ou 7,2 mL h⁻¹. Em nenhuma das condições testadas obteve-se fibras de gelatina. Após estoque das soluções por 10 dias a 4°C os testes foram repetidos para investigar se a possível degradação ocasionada pelo ácido fórmico afetaria sua capacidade de produzir fibras, porém, tal teste também não resultou na obtenção de fibras de gelatina.

Uma solução 15% de gelatina em ácido acético/água (9:1 v/v) foi testada com distância de trabalho de 20 cm, a valores de pressão de 30 ou 60 psi e taxas de alimentação de 18 ou 36 mL h⁻¹. Em nenhuma das condições testadas foi possível obter fibras de gelatina, contudo, notou-se a deposição de uma solução mais viscosa no coletor durante os testes, o que poderia indicar uma concentração da solução durante os testes e, portanto, uma volatilização parcial do solvente. Os testes foram repetidos com uma distância de trabalho de 25 cm, a pressão de 30 psi e vazão de 3,6; 7,2 ou 10,8 mL h⁻¹ e nessas condições de maior distância de trabalho e menores vazões foi possível obter fibras, embora eventualmente houvesse variações no jato de solução polimérica. As mesmas condições foram testadas para amostras com 5 e 10% de colágeno, resultando em formação de fibras no caso da amostra com 10% do polímero. Detalhes sobre as fibras obtidas com estas soluções são apresentados na Seção 5.4.2.

Os resultados obtidos na fiação da gelatina indicaram que para produzir fibras ultrafinas por fiação por sopro em solução são necessárias soluções concentradas, portanto, uma maior solubilidade é uma propriedade fundamental para a aplicação aqui estudada. Embora o colágeno de peixe tenha sido o que apresentou melhores resultados de solubilidade e que resultou em soluções mais homogêneas, uma amostra de colágeno de tendão bovino tratado com pepsina também foi testada

antes da extração do colágeno de peixe e os resultados dos testes de fiação por SB-Spinning são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Testes de fiação por sopro em solução feitos com as soluções de colágeno.

Colágeno	Solvente	Concentração (%)	Vazão (mL/h)	Pressão (psi)	Distância (cm)	Desfecho
CBE	HAc _{aq(3,0)} /etanol (1:1)	1,0	2, 5, 10, 20	20, 30, 60	25	Jato instável, com grumos
CP	HAc _{aq(3,0)} /etanol (2:1)	0,5 a 2,0	3,6 a 20	30, 45, 60	25	Jato instável, não fia
CP	HAc (pH 2,0)	3	2 a 9,6	30, 60	25	Não fia
CP	HAc 90%	5	3,6 e 7,2	10	25	Não fia
CP	HAc 90%	15	3,6 a 10,8	10, 20	25	Muito viscosa, não fia
CP	HAc 90%	10	0,5 a 7,2	10	10 a 30	Produz fibras

Fonte: autoria própria. CBE – colágeno bovino enzimaticamente tratado com pepsina; CP – colágeno de peixe extraído por solubilização ácida. HAc_{aq(3,0)} – soluções aquosas de ácido acético a pH 3,0;

Inicialmente soluções de colágeno bovino tratadas com pepsina foram testadas na produção de fibras por SB-Spinning, contudo, devido à falta de homogeneidade das soluções, jatos instáveis eram obtidos em virtude de grumos presentes nestas soluções impossibilitarem um fornecimento ininterrupto e uniforme da solução polimérica.

Em seguida, soluções com 0,5; 1 e 2% de colágeno de peixe solubilizados em ácido acético (pH 3,0)/etanol 2:1(v/v) foram testadas em diversas condições também sem sucesso na obtenção de fibras. Percebeu-se então que a solubilidade baixa do colágeno nessas soluções poderia ser uma limitação, motivo pelo qual se decidiu usar solventes sem etanol (já que o álcool leva a precipitação de colágeno em concentrações acima de 2%).

Após falhar em obter fibras com uma solução de colágeno de peixe a 3% em ácido acético (pH 2,0) testada em diversas condições de vazão e pressão, decidiu-se diminuir a concentração de água usada nos solventes, aumentando a acidez das soluções, uma vez que os resultados da Seção 5.3.2 indicaram um aumento da fluidez das soluções de colágeno e gelatina com o aumento da concentração de ácido acético, levando inclusive a uma transição de soluções com comportamento característico de géis para soluções com caráter de soluções poliméricas diluídas.

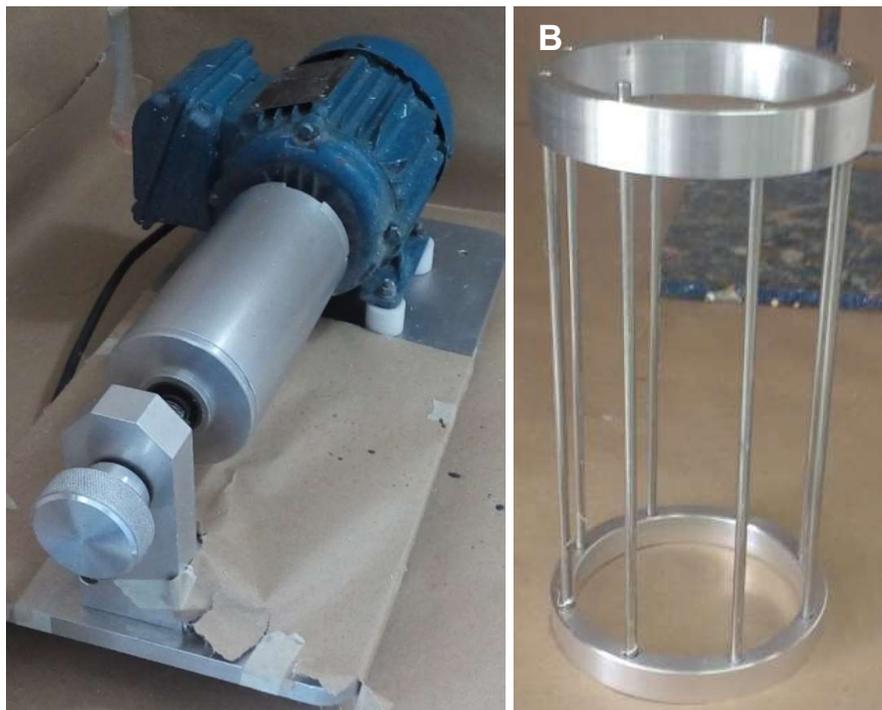
Soluções de colágeno a 5 e 15% em ácido acético 90% foram então testadas com distância de trabalho de 25 cm, a diversos valores de pressão e vazão. Ambas as amostras não produziram fibras, no entanto, para a amostra mais diluída não ocorreu a volatilização do solvente, enquanto a amostra mais concentrada apresentou dificuldade de formar um jato estável que projetasse o polímero devido à sua alta viscosidade.

Uma outra solução de colágeno em HAc 90%, com concentração de 10% foi então testada com pressões de 10 psi, vazão de 0,5 a 7,2 mL h⁻¹ e distância de 10 a 30 cm do coletor. Esta solução resultou na formação de jatos parcialmente estáveis, porém com formação de fibras e mais detalhes sobre suas características podem ser encontradas na Seção 5.4.3.

5.4.1. Seleção do coletor para deposição das fibras

Uma grande vantagem da fiação por sopro em solução sobre a eletrofiação é sua versatilidade na deposição das fibras que produz, pois por não necessitar depositar estas fibras sobre um coletor carregado eletricamente, teoricamente permite sua deposição sobre qualquer superfície. Dois tipos de coletor comumente usados nas técnicas de produção de fibras ultrafinas são apresentados na Figura 25, o coletor do tipo cilíndrico (Figura 25A) e o coletor cilíndrico com hastes (Figura 25B), ambos coletores que podem ter sua rotação controlada por um motor ao qual podem ser acoplados.

Figura 25 – Coletores dos tipos (A) cilíndrico e (B) cilíndrico com hastes para deposição das fibras ultrafinas produzidas por SB-Spinning. Em azul pode ser visto o motor que controla sua rotação.



Fonte: autoria própria.

O primeiro coletor testado foi o do tipo cilíndrico, o mais comumente empregado na produção de fibras ultrafinas. A manta obtida com este coletor, bem como as fibras espalhadas que se formam fora do mesmo podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre um coletor do tipo cilíndrico.



Fonte: autoria própria.

Conforme pode ser observado na Figura 26, embora as fibras se depositem sobre este coletor, há um grande volume de fibras que se formam logo atrás do

mesmo e por todas as superfícies da câmara onde são fiadas as soluções. Visando aumentar a produtividade das fibras por meio da redução do espalhamento das fibras o coletor composto por hastes foi testado e as fibras coletadas com este podem ser observadas na Figura 27.

Figura 27 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre um coletor cilíndrico com hastes.



Fonte: autoria própria.

Embora a formação de fibras fora do coletor tenha sido reduzida substancialmente com o uso do coletor com hastes, uma grande dificuldade observada após fiação neste tipo de coletor diz respeito à remoção das fibras, pois estas se encontram diretamente fixas sobre as hastes, o que leva à destruição das mantas quando se tenta armazená-las. Então o coletor da Figura 28 foi testado, visando facilitar a remoção das fibras após sua deposição sobre a folha de alumínio.

Figura 28 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre hastes revestidas com alumínio.



Fonte: autoria própria.

O coletor da Figura 28 foi testado fixo a uma placa de isopor com uma cavidade ao fundo, a qual deveria atuar redirecionando o fluxo das fibras para a folha

de alumínio, aumentando sua deposição e, portanto, o rendimento da fiação. Contudo, como pode ser visto na Figura 29, o isopor de fato ajudou a redirecionar o jato das fibras, porém, não sobre a folha de alumínio entre as hastes, mas sim, para a formação de fibras sobre o isopor que se estendiam para fora da cavidade.

Figura 29 – Fibras de gelatina depositadas por SB-Spinning sobre hastes revestidas com alumínio, com destaque para a formação de fibras atrás do coletor.



Fonte: autoria própria.

O coletor com isopor ao fundo permitiu um ganho considerável no aproveitamento das fibras de gelatina produzidas por SB-Spinning, permitindo produzir mantas como a mostrada na Figura 30.

Figura 30 - Manta de gelatina produzida por SB-Spinning usando um isopor ao fundo do coletor.



Fonte: autoria própria.

Embora o coletor com isopor tenha levado ao maior rendimento durante a fiação por sopro de soluções de gelatina, a caracterização de fibras quanto a seu

diâmetro por MEV é facilitada quando sua deposição ocorre sobre alguma superfície plana, como folhas de alumínio ou papel manteiga.

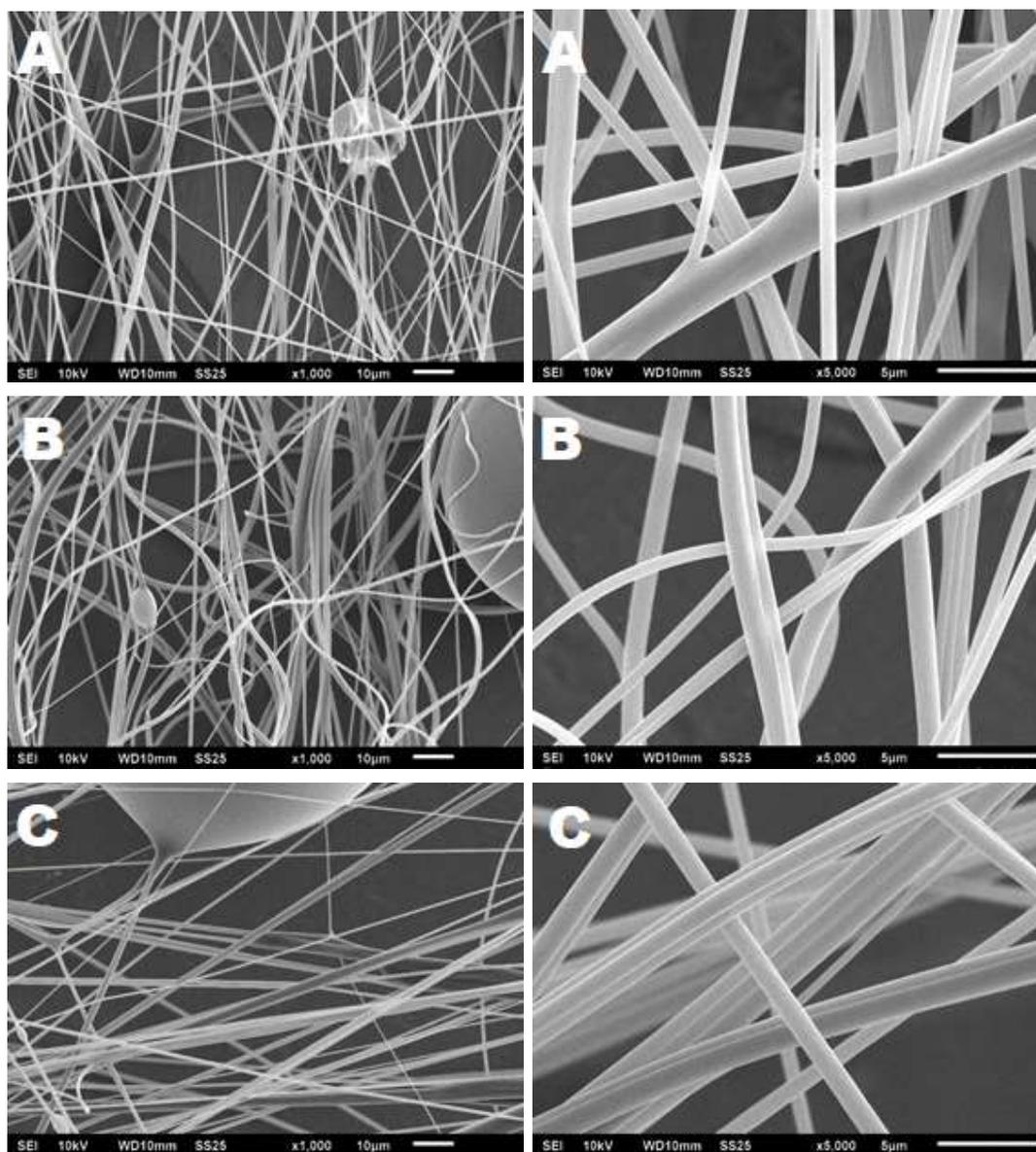
Tendo em vista a necessidade de caracterizar estas fibras por microscopia eletrônica de varredura para determinação de seus diâmetros médios, distribuição de diâmetro e orientação, algumas superfícies foram testadas para a deposição das fibras de colágeno e gelatina usando o coletor cilíndrico, o coletor que apresentou maior deposição sobre as folhas de alumínio. As superfícies testadas além das folhas de alumínio foram papel manteiga e celulose bacteriana (cedidas pelo Prof. Hernane da Silva Barud, da Universidade de Araraquara - UNIARA). Ao observar que sobre o papel manteiga e a celulose bacteriana a deposição das fibras proteicas ultrafinas foi muito limitada, decidiu-se por seguir usando o papel alumínio como material de recobrimento para o coletor cilíndrico sob rotação.

5.4.2. Fibras ultrafinas de gelatina

As fibras produzidas com a solução contendo 15% de gelatina em ácido acético 90% com uma distância de trabalho de 25 cm, pressão de 30 psi e vazão de 3,6; 7,2 ou 10,8 mL h⁻¹ foram caracterizadas por MEV e as imagens obtidas são mostradas na Figura 31.

Embora as fibras obtidas tenham se mostrado regulares e sem a formação de *beads* em meio às fibras, algumas gotas de polímero podem ser observadas, o que pode ter ocorrido em função da instabilidade do jato de solução formado durante a produção das fibras. Além disso, as fibras de gelatina se formaram com direções aleatórias, sem um eixo preferencial de deposição que indique o alinhamento das fibras. Normalmente aplicações que exigem uma orientação preferencial das fibras usam altas velocidades de rotação (acima de 1000 rpm) para obter fibras com algum grau de anisotropia, propriedade esta que pode ser reforçada com maiores velocidades de rotação (Sensini et al., 2021).

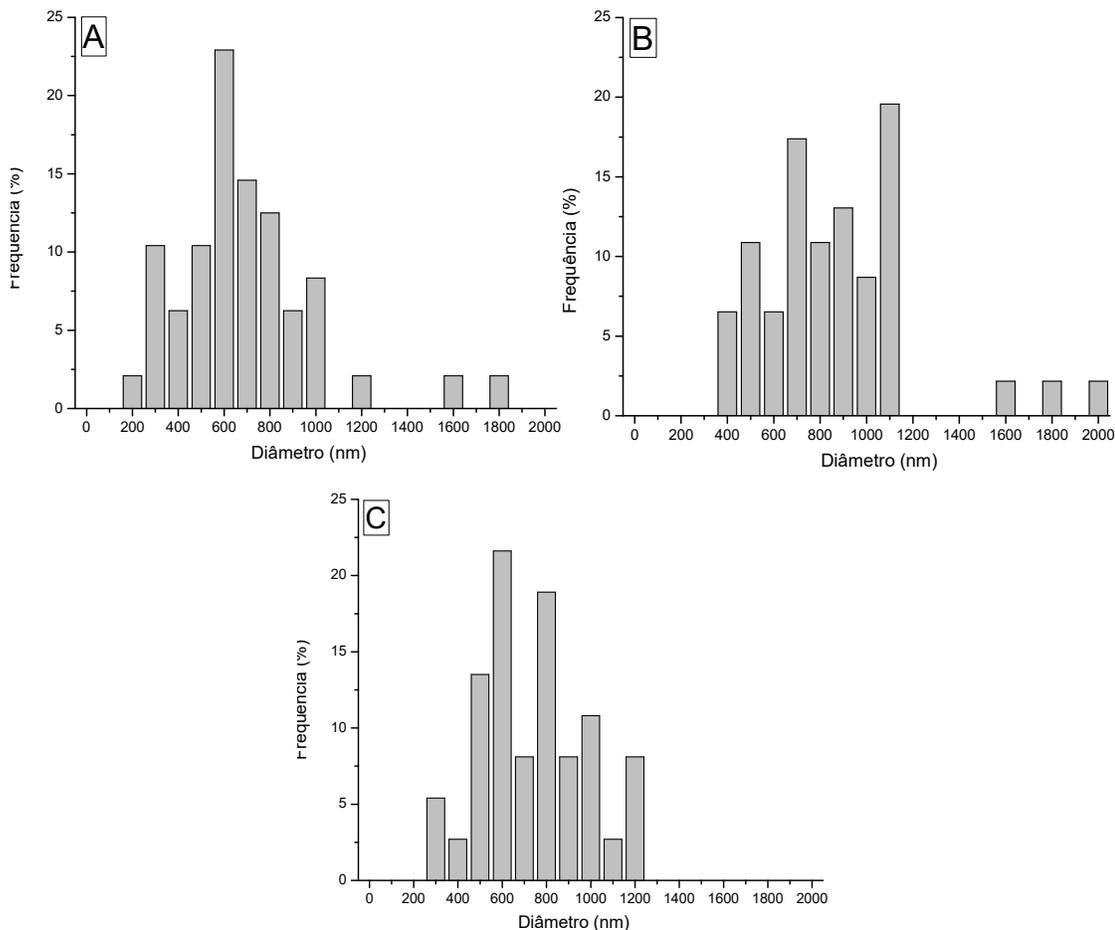
Figura 31 - Fibras de gelatina (15% em HAc 90%) a (A) 3,6 mL h⁻¹, (B) 7,2 mL h⁻¹ e (C) 10,8 mL h⁻¹.



Fonte: autoria própria.

Os diâmetros das fibras ultrafinas de gelatina foram medidos com uso de um software de tratamento de imagens (ImageJ) e um gráfico de distribuição foi construído para cada amostra (Figura 32). Os diâmetros médios calculados para as fibras produzidas a 3,6; 7,2 e 10,8 mL h⁻¹ foram, respectivamente, 740 ± 299 nm, 909 ± 326 nm e 814 ± 278 nm.

Figura 32 - Gráficos de distribuição de diâmetro das fibras de gelatina (15% em HAc 90%) obtidas a (A) 3,6 mL h⁻¹, (B) 7,2 mL h⁻¹ e (C) 10,8 mL h⁻¹.

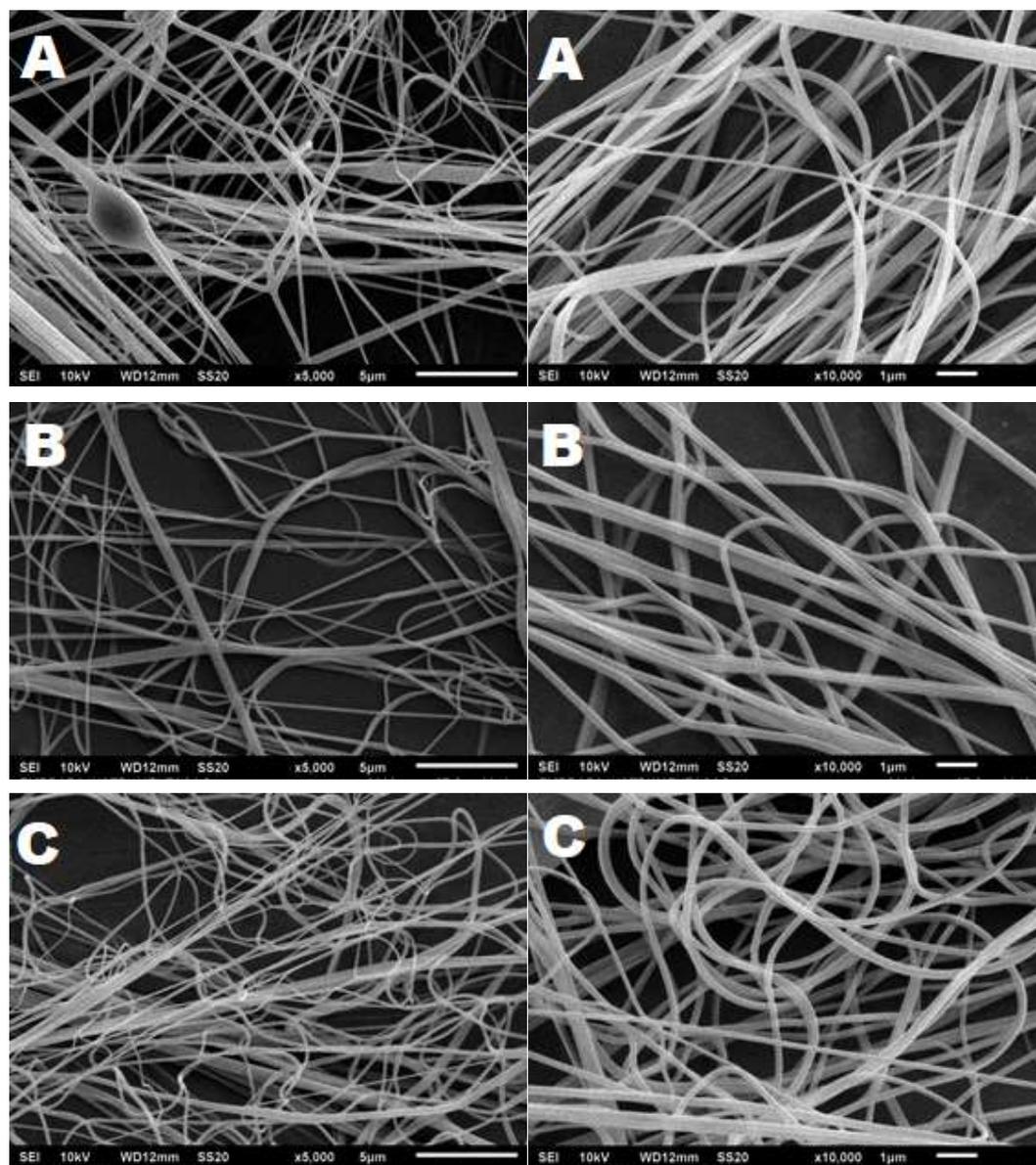


Fonte: autoria própria.

Embora o diâmetro médio destas amostras tenha sido próximo, é possível observar que amostras com diâmetros mais variados foram obtidas a menores vazões para esta concentração do polímero.

Visando a redução do diâmetro das fibras soluções de gelatina a 5 e 10% (HAc 90%) foram também testadas com distância de trabalho de 25 cm, pressão de 30 psi e taxas de alimentação de 3,6; 7,2 e 10,8 mL h⁻¹. As amostras mais diluídas não produziram fibras em nenhuma das condições testadas. As fibras obtidas com a solução de gelatina a 10% podem ser observadas na Figura 33.

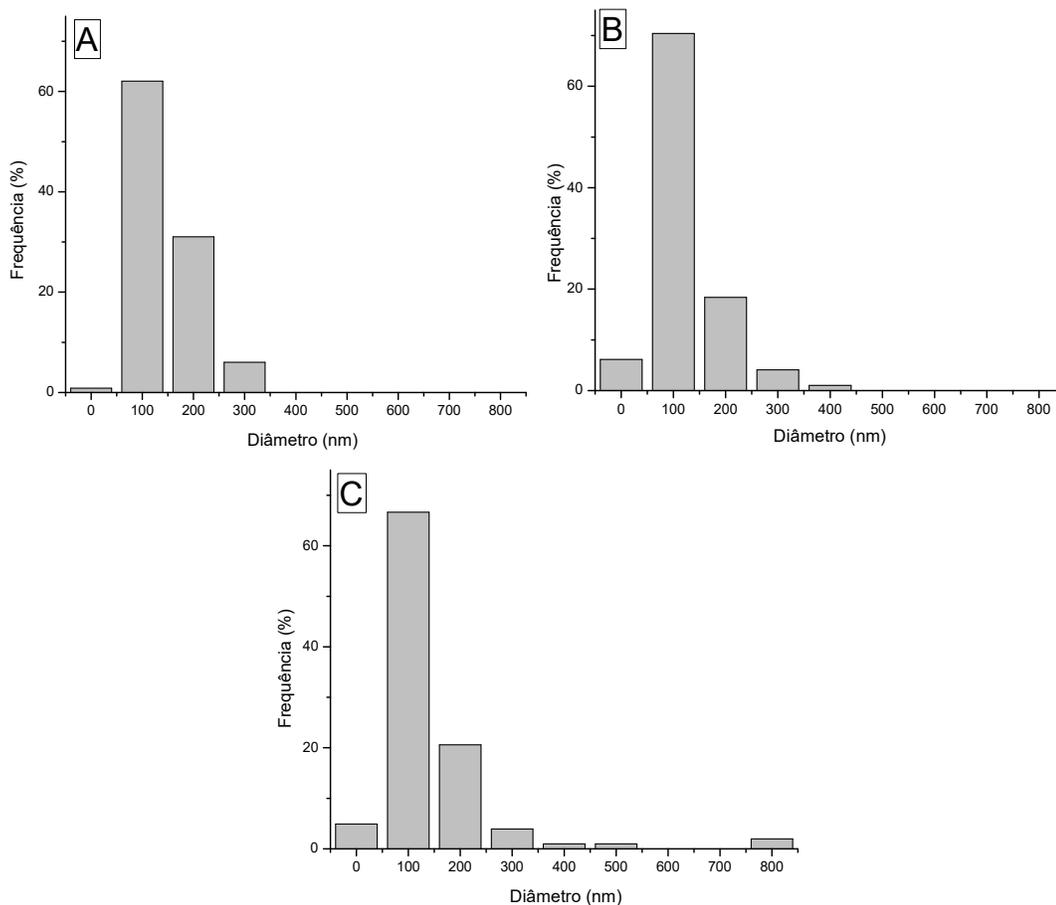
Figura 33 - Imagens obtidas por MEV das fibras de gelatina (10% em HAc 90%) a (A) 3,6 mL h⁻¹, (B) 7,2 mL h⁻¹ e (C) 10,8 mL h⁻¹.



Fonte: autoria própria.

Foram medidos os diâmetros das fibras e um gráfico de distribuição foi construído para cada amostra (Figura 34). Os diâmetros médios calculados para as fibras produzidas a 3,6; 7,2 e 10,8 mL h⁻¹ foram, respectivamente, 192 ± 56 nm, 175 ± 64 nm e 196 ± 113 nm. As amostras analisadas por MEV revelaram fibras regulares e com a presença de poucas esferas, o que pode indicar um ganho de estabilidade do jato polimérico com a redução da concentração de polímero.

Figura 34 - Gráficos de distribuição de diâmetro das fibras de gelatina (10% em HAc 90%) obtidas a (A) 3,6 mL h⁻¹, (B) 7,2 mL h⁻¹ e (C) 10,8 mL h⁻¹.



Fonte: autoria própria.

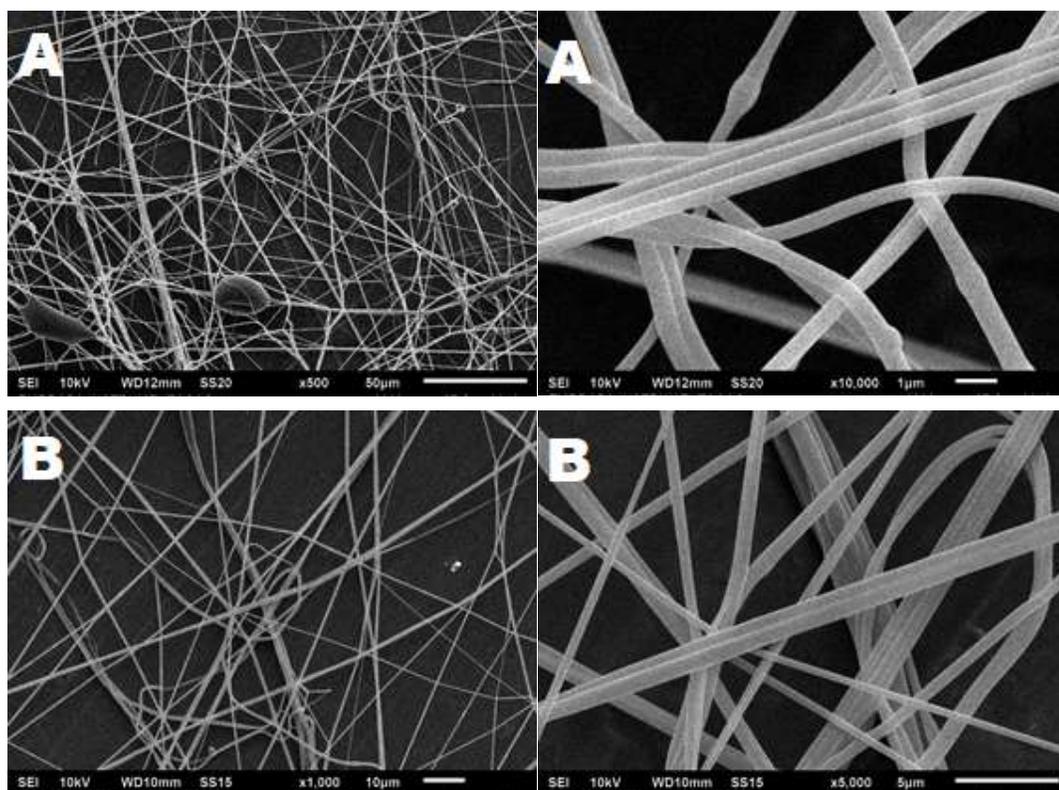
Os gráficos da Figura 34 evidenciam que aumentos na vazão da solução polimérica levam ao aparecimento de fibras de maior diâmetro (a partir de 400 nm). Uma considerável redução no diâmetro das fibras foi obtida apenas pela redução na concentração para 10% e, embora a amostra a 5% de gelatina não tenha produzido fibras, outras soluções com concentração entre 5 e 10% podem ser testadas na tentativa de reduzir ainda mais o diâmetro das fibras.

Para todas as soluções e vazões testadas as fibras obtidas apresentaram orientação aleatória, no entanto, as amostras de gelatina a 10% resultaram em fibras apresentando curvas e menos tensionadas quando comparadas com as amostras a 15% de gelatina. Além disso, a redução da concentração de gelatina diminuiu significativamente o diâmetro das fibras.

5.4.3. Fibras ultrafinas de colágeno

Soluções contendo 10% de colágeno de pele de tilápia em ácido acético 90% foram testadas com distância de trabalho de 20 cm, a 10 psi de pressão e com vazão de 3 ou 6 mL h⁻¹. As fibras produzidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e as imagens obtidas são mostradas na Figura 35.

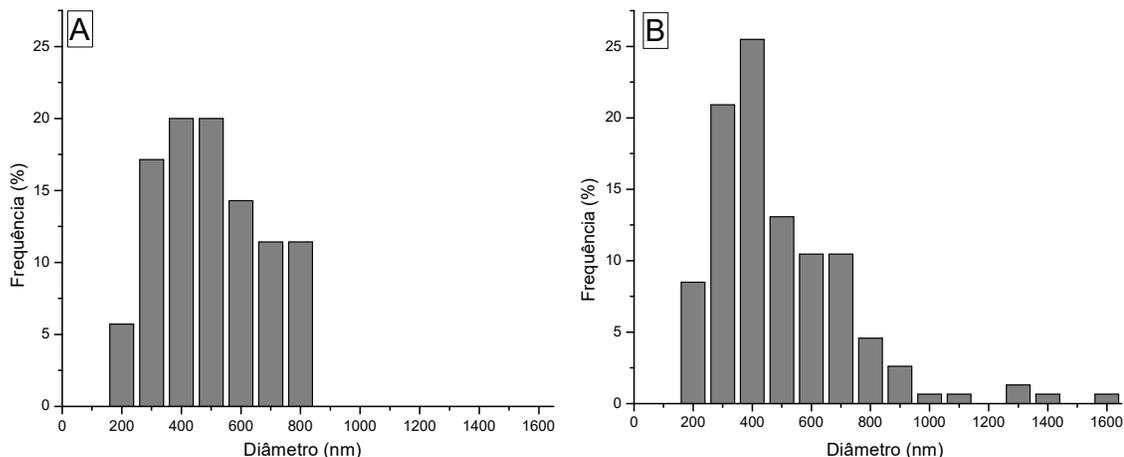
Figura 35 - Imagens obtidas por MEV das fibras de colágeno de pele de tilápia (10% em HAc 90%) a (A) 3 mL h⁻¹ e (B) 6 mL h⁻¹.



Fonte: autoria própria.

O diâmetro médio das fibras de colágeno foi de 543 ± 242 nm para a amostra fiada a vazão de 6 mL h⁻¹ e de 542 ± 185 nm para a amostra produzida a 3 mL h⁻¹. Nesse caso, apesar de a vazão não ter impactado no diâmetro médio das fibras, as mantas produzidas com maior vazão apresentaram fibras com maiores diâmetros, entre 900 e 1600 nm (Figura 36).

Figura 36 - Gráficos de distribuição do diâmetro das fibras de colágeno de pele de tilápia (10% em HAc 90%) obtidas a (A) 3 mL h⁻¹ e (B) 6 mL h⁻¹.



Fonte: autoria própria.

A principal dificuldade encontrada com as fibras de colágeno está relacionada a sua coleta, pois estas tendem a se espalhar pela cabine de fiação, se acumulando sobre o coletor ainda com mais dificuldade que as amostras de gelatina (Seção 5.4.1). Testes com os mesmos coletores testados para a gelatina foram feitos sem melhoras na coleta da mante de colágeno, portanto, assim como no caso da gelatina, o coletor do cilíndrico revestido com folhas de alumínio foi usado, já que este facilita sua caracterização por MEV.

5.4.4. Fibras ultrafinas de colágeno/PEO

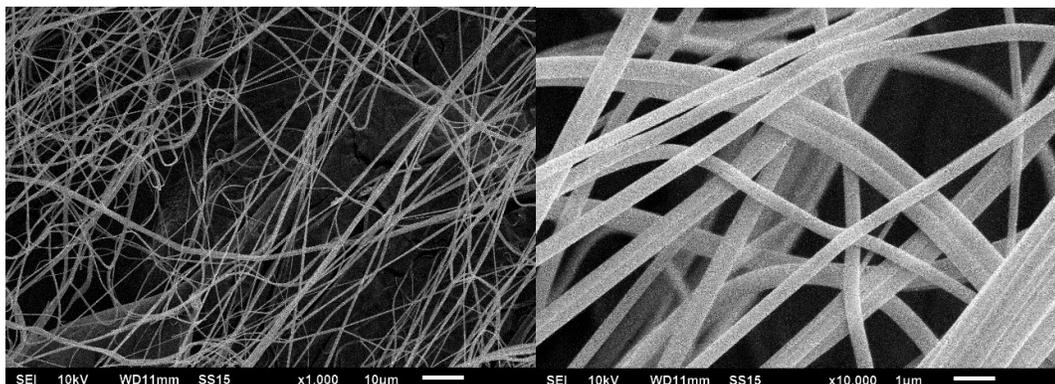
Buscando avaliar a possibilidade de produzir fibras de blendas de colágeno com polímeros sintéticos, foi testada a capacidade uma blenda colágeno/PEO de produzir fibras de por SB-Spinning com soluções a 2% (9:1 massa/massa), 3,5% (9:1 massa/massa) e 6,5% (9:1 massa/massa) em ácido acético 90%. Os testes foram feitos com uma vazão de 3,6 ou 6,0 mL h⁻¹, pressão de 10 ou 30 psi e a uma distância de 20 ou 25 cm do coletor.

O PEO foi escolhido por ser um polímero empregado na produção de biomateriais e por ser hidrofílico, permitindo assim sua solubilidade nos mesmos solventes que os usados para o colágeno.

A solução mais diluída (2,0%) não produziu fibras, enquanto a solução com 3,5% de polímeros produziu algumas poucas fibras espalhadas pela capela, mas sem depositar sobre o coletor. A solução de 6,5%, no entanto, resultou em fibras em todas as condições testadas, produzindo jatos mais estáveis a 10 psi de pressão e

3,6 mL h⁻¹ de vazão. As fibras produzidas nestas condições a 25 cm de distância do coletor são demonstradas na Figura 37.

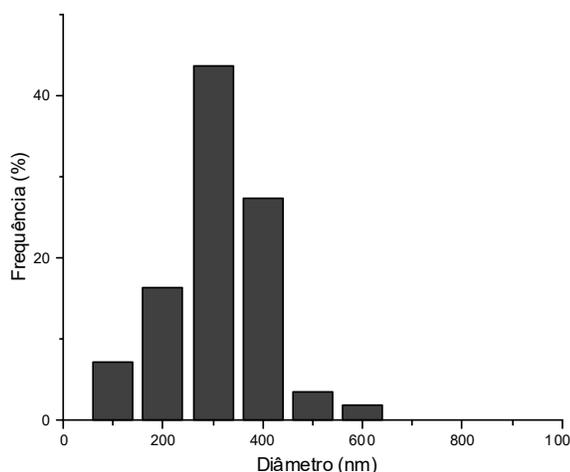
Figura 37 – Imagens obtidas por MEV das fibras de uma blenda CP/PEO (9:1) produzida com uma solução 6,5% em HAc 90%.



Fonte: autoria própria.

A adição de uma pequena quantidade do polímero sintético (10%) permitiu a obtenção de fibras com menor concentração de polímero. O gráfico com a distribuição de diâmetro das fibras é apresentado na Figura 38. O diâmetro médio destas fibras foi de 359 ± 99 nm, o que indica que a combinação com o polímero sintético levou a uma redução do diâmetro médio das fibras de colágeno, o que pode ser resultado das interações entre os dois polímeros ou influência da menor concentração da solução.

Figura 38 - Gráfico de distribuição de diâmetro das fibras de colágeno de pele de tilápia/PEO (9:1).



Fonte: autoria própria.

A tendência de redução do diâmetro das fibras com a redução da concentração da solução polimérica já foi observada para fibras de colágeno de frango obtidas por eletrofiação de soluções em HFP, com uma redução do diâmetro médio

das fibras de 1,75 μm para 110 nm ao reduzir a concentração das soluções de 6,25 para 2% (Matthews; Boland, 2003). Resultado semelhante foi reportado para as fibras de gelatina reportadas na Seção 5.4.2, onde uma redução de 15 para 10% na concentração da proteína diminuiu o diâmetro médio das fibras de 740 para 192 nm a uma vazão de 3,6 mL h⁻¹.

Além de resultar na redução de diâmetro médio, a blenda de colágeno com PEO levou a produção de fibras em uma faixa mais restrita de diâmetros, entre 100 e 600 nm, o que corrobora a percepção de que a formação de blends pode ser uma opção viável na obtenção de fibras de colágeno mais uniformes e de menor diâmetro. Assim como observado para as fibras ultrafinas de gelatina e de colágeno, a orientação das fibras nesta manta foi aleatória, sem alinhamento preferencial em nenhuma direção.

5.5. Design experimental para otimização do diâmetro das fibras

Ao perceber a influência de parâmetros como a vazão e a concentração sobre a morfologia e o diâmetro das fibras produzidas, decidiu-se analisar a influência dos parâmetros de produção sobre a morfologia das fibras de colágeno e gelatina. Dentre os parâmetros que potencialmente afetam o diâmetro das fibras podem ainda ser citados a pressão do gás usado, a distância de trabalho, o solvente usado, além da umidade relativa e temperatura durante o processamento dos polímeros.

Uma ferramenta que pode auxiliar na compreensão dos parâmetros que mais afetam o diâmetro das fibras produzidas por SB-Spinning e que permite ainda a otimização desta medida com a necessidade de um número reduzido de experimentos é o planejamento fatorial (Parize et al., 2016). Por meio desta ferramenta é possível fazer uma triagem das variáveis mais relevantes para uma variável resposta, conhecer as interações entre estas variáveis e refinar o modelo representativo das relações entre as variáveis estudadas, permitindo inclusive a construção de superfícies de respostas, gráficos que relacionam as diversas variáveis estudadas à resposta avaliada (Breitkreitz; Souza; Poppi, 2014).

O primeiro passo na construção destas estratégias analíticas envolve definir quais variáveis serão estudadas e quais seus valores limites. Como no caso em questão não é possível variar o solvente empregado e há uma grande dificuldade em controlar a temperatura e a umidade relativa durante o processamento por SB-

Spinning, as variáveis escolhidas (Tabela 4) para se estudar foram a concentração do polímero em solução (X1), a vazão destas soluções (X2), a pressão do ar (X3) usada e a distância de trabalho (X4).

Já a escolha dos valores limite para as variáveis estudadas no planejamento fatorial envolveu estudar em quais condições era possível produzir fibras controlando cada variável independentemente das demais. Para exemplificar, temos a seguinte situação: soluções com concentração menores que 12% (valor definido como o nível -1 para a variável X1) produziam fibras, porém, devido a menor viscosidade destas soluções, em valores de pressão de 60 psi (valor de nível +1 para a variável X3) ou maiores, sua vazão (variável X2) não podia mais ser controlada pela bomba de injeção quando esta variável era definida no nível -1 (6 mL h^{-1}), sendo então fornecida a vazões maiores que a programada na bomba de injeção pela própria diferença de pressão entre o gás usado e a pressão atmosférica, que forçava a solução polimérica através da agulha.

Os valores da média e mediana, bem como a diferença entre estas duas medidas para o diâmetro das fibras de colágeno e gelatina produzidas nas condições estabelecidas na Tabela 5 podem ser encontradas na Tabela 21. Para indicar a distribuição do diâmetro destas fibras, além do valor do quinto decil (mediana) são apresentados os valores do primeiro e do nono decis (10° e o 90° percentis, respectivamente), da média, do desvio padrão, do coeficiente de variação e do número de fibras medidas em cada condição nas Tabelas A1 e A2 para a gelatina e o colágeno, respectivamente.

Tabela 21 – Valores da média, mediana e da diferença entre estas duas medidas para o diâmetro de fibras de gelatina e colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.

N	Gelatina			Colágeno		
	Média (nm)	Mediana (nm)	Diferença (%)	Média (nm)	Mediana (nm)	Diferença (%)
1	375,14	371,98	0,84	523,03	502,39	3,94
2	632,96	650,55	-2,78	747,25	706,50	5,45
3	385,06	300,41	21,98	465,33	460,67	1,00
4	702,19	676,20	3,70	620,00	540,59	12,81
5	335,63	329,44	1,84	406,95	382,67	5,97

N	Gelatina			Colágeno		
	Média (nm)	Mediana (nm)	Diferença (%)	Média (nm)	Mediana (nm)	Diferença (%)
6	593,60	552,74	6,88	575,97	537,60	6,66
7	304,61	275,68	9,50	462,22	423,59	8,36
8	508,18	490,53	3,47	539,07	513,27	4,79
9	355,65	344,57	3,12	438,45	411,15	6,23
10	660,47	618,44	6,36	773,72	717,48	7,27
11	317,18	293,06	7,61	483,22	466,12	3,54
12	617,42	575,43	6,80	738,99	705,65	4,51
13	386,07	342,14	11,38	579,49	532,83	8,05
14	547,11	480,70	12,14	726,16	617,80	14,92
15	254,32	254,53	-0,08	551,15	499,80	9,32
16	564,11	505,08	10,46	707,92	617,80	12,73
17	421,76	397,41	5,77	420,40	399,86	4,88
18	493,81	475,87	3,63	426,72	393,90	7,69
19	417,77	410,33	1,78	428,39	410,21	4,24

Fonte: autoria própria.

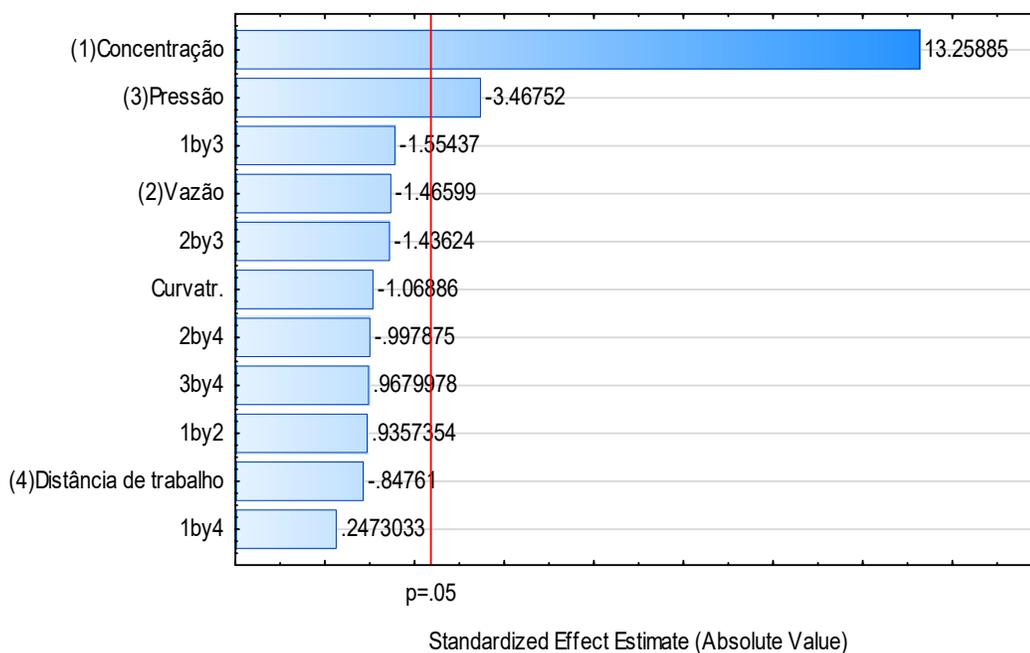
Normalmente um único valor de variável resposta é determinado para cada experimento em um planejamento fatorial, contudo, neste caso, a variável resposta que se busca estudar é medida a partir de um conjunto de fibras, pois uma mesma condição de fiação resultará em uma manta composta de fibras cujo diâmetro seguirá uma distribuição de valores. Para se certificar de que o valor médio do diâmetro destas fibras é representativo de cada condição testada a mediana destas medidas também foi calculada e comparada com o valor das médias. Pode-se notar que para a grande maioria das amostras a diferença entre as duas medidas é menor que 10% e que nos casos onde esta diferença é maior, não ultrapassa 22%. Isto indica que as mantas produzidas apresentam uma distribuição normal de diâmetros quase simétrica, com uma pequena tendência de distorção para a direita (isto é, para valores maiores); com exceção de duas amostras de gelatina que apresentaram diferenças negativas,

portanto, com mediana maior que a média e, portanto, levemente deslocadas para valores menores de diâmetro. A partir destes resultados se mostra viável usar o valor médio dos diâmetros como a variável resposta representativa do diâmetro das fibras no planejamento fatorial.

5.5.1. Planejamento Fatorial 2⁴

A análise do diagrama de Pareto obtido para as fibras de gelatina (Figura 39) confirma a expectativa baseada nos resultados da Seção 5.4.2 de que a concentração fosse uma variável estatisticamente significativa sobre o diâmetro médio destas fibras - sendo a variável que mais afeta esta medida - assim como a pressão, já que para ambas $p > 0,05$. Embora ambas as variáveis tenham afetado significativamente a variável resposta, a concentração apresentou valor positivo e a pressão valor negativo do efeito estimado, o que significa que enquanto maiores valores de concentração aumentam o diâmetro médio das fibras de gelatina, aumentos da pressão reduzem o diâmetro médio destas fibras, relações semelhantes às reportadas por Monsores et al. (2022) para fibras de polietileno produzidas por SB-Spinning.

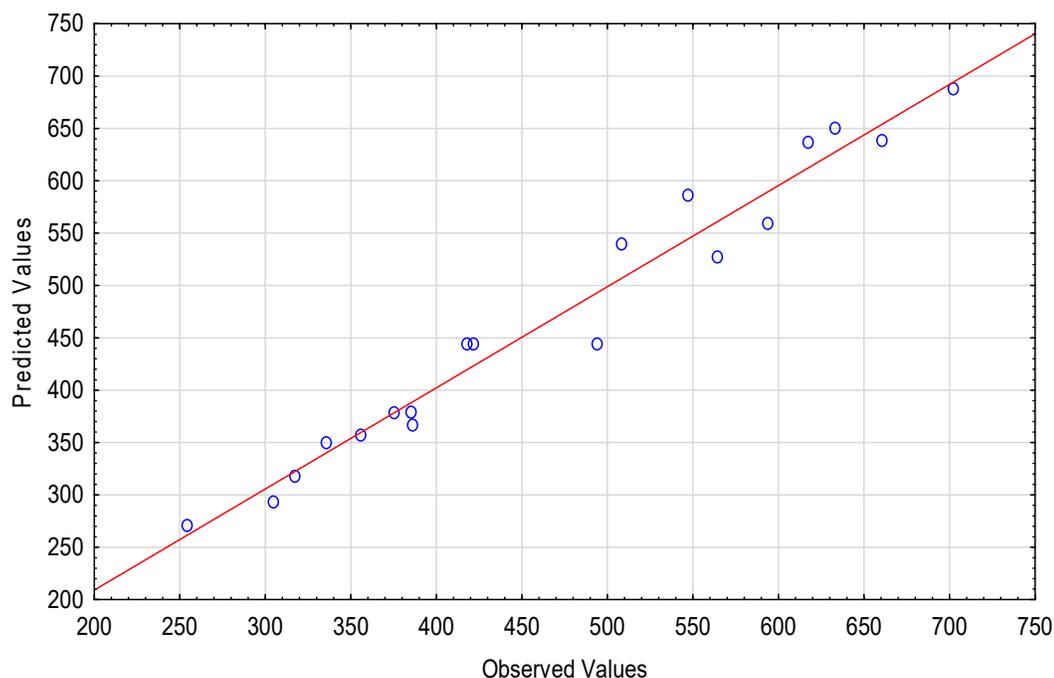
Figura 39 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial 2⁴ do diâmetro médio das fibras de gelatina.



Fonte: autoria própria.

Por outro lado, a vazão e a distância de trabalho não se mostraram estatisticamente significativas sobre a variável resposta nos intervalos analisados, assim como a curvatura. Este último resultado indica que um modelo linear é capaz de representar a relação entre as variáveis estudadas sem falta de ajuste (Breitkreitz; Souza; Poppi, 2014), indício corroborado pela análise do gráfico de valores observados contra valores preditos (Figura 40).

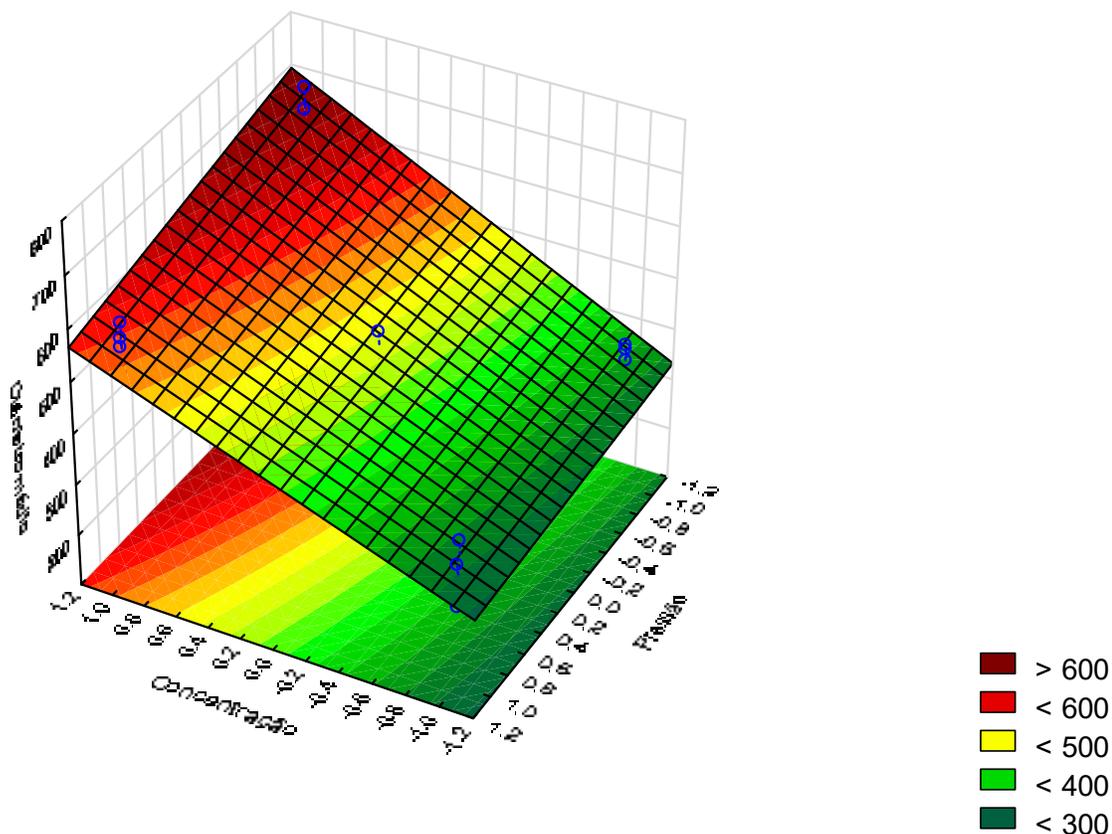
Figura 40 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para os resultados do planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de gelatina.



Fonte: autoria própria.

A partir do modelo gerado podemos construir a superfície de resposta para o diâmetro médio das fibras de gelatina em função da concentração e pressão, as duas variáveis estatisticamente significativas (Figura 41).

Figura 41 – Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de gelatina em função das variáveis significativas.



Fonte: autoria própria.

As superfícies de resposta do diâmetro em função da concentração ou da pressão em relação às demais variáveis podem ser encontradas nas Figuras A1 e A2, respectivamente.

Ao usar o modelo gerado para otimizar a variável resposta dentro dos intervalos testados, buscou-se minimizar o diâmetro médio das fibras de gelatina. Como condição ótima foram indicados os valores de -1, +1, +1 e +1 para as variáveis X1, X2, X3 e X4, respectivamente, isto é, na condição de menor concentração e maiores vazão, pressão e distância de trabalho, com um valor previsto de 270,74 nm. Ao produzir fibras de gelatina por SB-Spinning nessas condições em triplicata foram obtidos os diâmetros reportados na Tabela 22.

Tabela 22 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de gelatina produzidas por SB-Spinning nas condições ótimas.

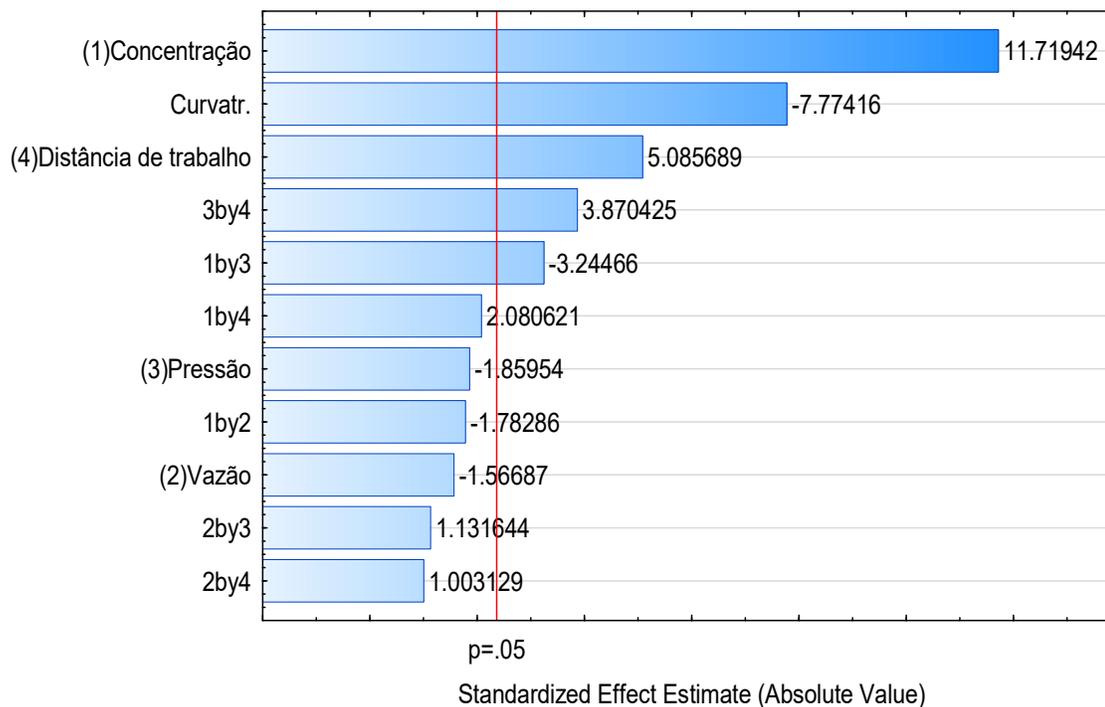
Amostra	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
1	122,9	164,9	265,8	186,2	74,0	39,7	91
2	115,2	169,3	279,4	187,0	68,9	36,8	171
3	117,3	167,3	292,7	191,5	80,4	42,0	135
Média	-	-	-	188,2	2,9	1,5	3

Fonte: autoria própria. P10, P50 e P90 são o 1°, 5° e 9° decis, respectivamente; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; n - número de fibras medidas.

O valor real do diâmetro médio determinado após fiação nas condições otimizadas foi 30% menor que o previsto, o que pode ser interpretado como um indício das limitações na previsibilidade do modelo; provável resultado da falta de controle sobre variáveis que também podem afetar significativamente o processamento dos polímeros, como a temperatura e a umidade relativa. Para ilustrar este ponto, as amostras fiadas durante o planejamento fatorial da gelatina foram produzidas a temperatura média de $25,6 \pm 2,4$ °C e $46 \pm 14\%$ de umidade relativa, enquanto as amostras otimizadas foram produzidas a $27,7 \pm 0,7$ °C e $62 \pm 2\%$ de umidade relativa.

No caso do colágeno, o diagrama de Pareto obtido para suas fibras (Figura 42) também confirma a expectativa baseada nos resultados obtidos para as fibras de gelatina de que a concentração fosse estatisticamente significativa sobre o diâmetro médio de suas fibras, sendo também a variável que mais afeta esta medida. A distância de trabalho, a curvatura e as interações entre duas variáveis $X1 \times X3$ e $X3 \times X4$ também foram significativas, já que para todas estas $p > 0,05$.

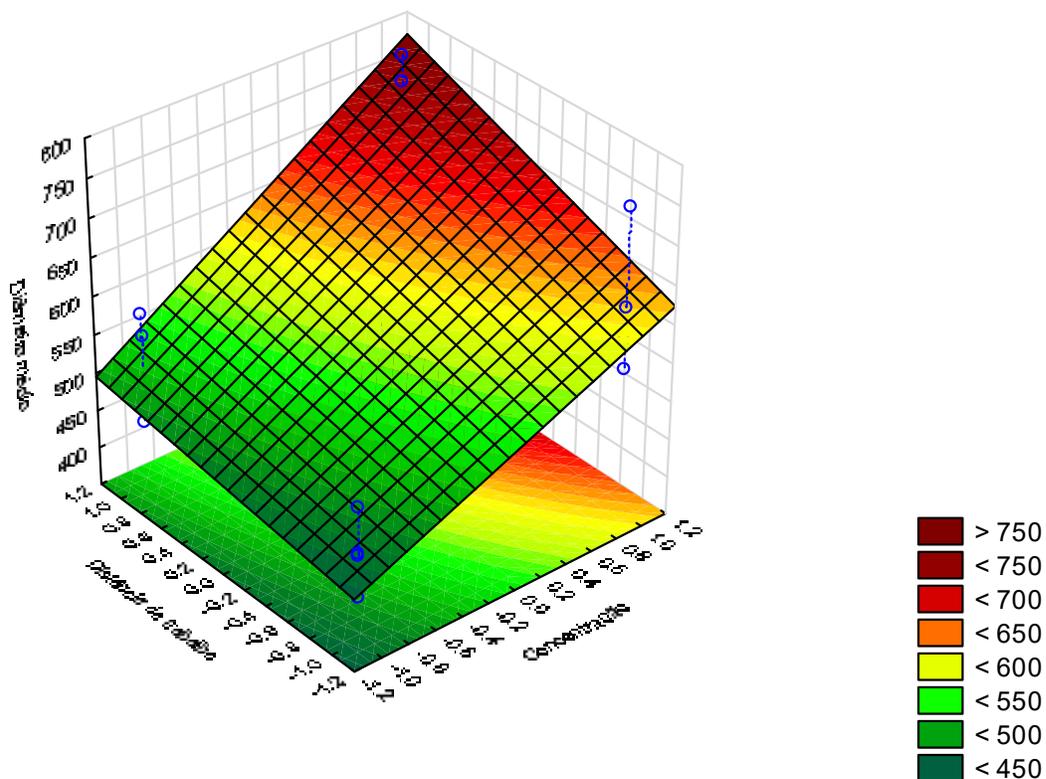
Figura 42 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de colágeno.



Fonte: autoria própria.

As duas variáveis independentes que afetam significativamente a variável resposta, concentração e distância de trabalho apresentaram valores positivos de efeito estimado, o que significa que quanto maiores seus valores, maior será o diâmetro médio das fibras de colágeno. Por outro lado, a pressão e a vazão não se mostraram estatisticamente significativas sobre a variável resposta nos intervalos analisados e apresentaram valores negativos de efeito estimado. A superfície de resposta gerada para as variáveis significativas pode servir dentro do intervalo avaliado e, portanto, pode ser vista na Figura 43.

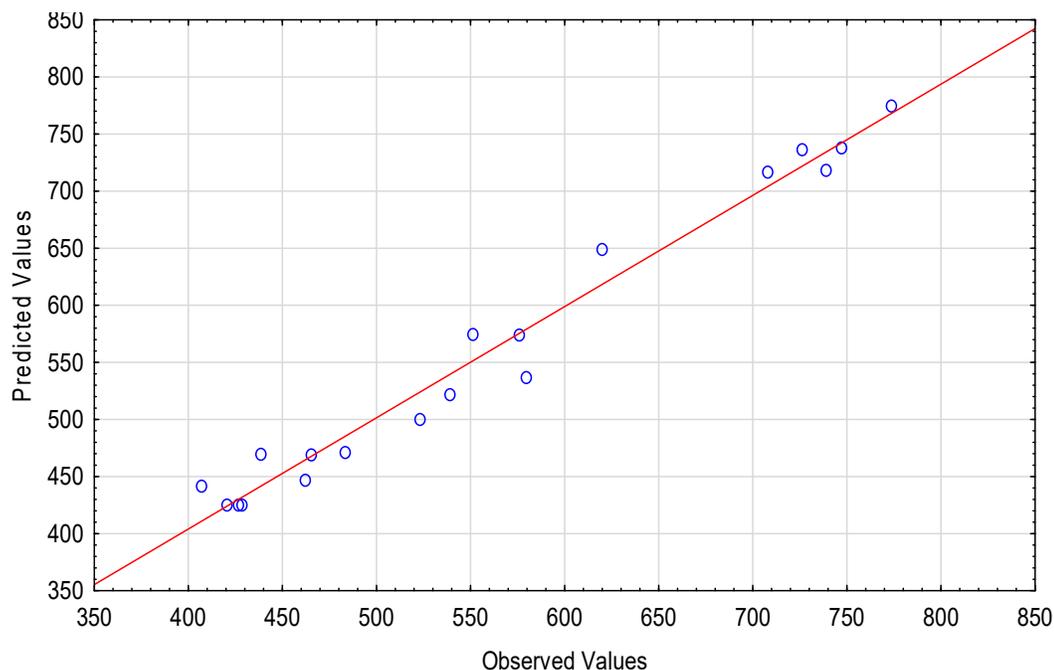
Figura 43 – Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de colágeno em função das variáveis significativas.



Fonte: autoria própria.

Como a curvatura se mostrou significativa, optou-se por construir um delineamento composto central para a partir deste construir um modelo quadrático capaz de representar a relação entre as variáveis estudadas, embora a análise do gráfico de valores observados contra valores preditos (Figura 44) indique uma boa capacidade de predição do modelo construído com estes dados.

Figura 44 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para os resultados do planejamento fatorial 2⁴ do diâmetro médio das fibras de colágeno.



Fonte: autoria própria.

5.5.2. Delineamento composto central

As variáveis X2 e X3 (não significativas estatisticamente sobre a variável resposta) foram definidas em seus níveis +1 para o planejamento estrela em virtude de seus valores de efeito estimado serem negativos. Os diâmetros das fibras de colágeno produzidas por SB-Spinning nas condições do planejamento fatorial estrela (Tabela 6) são reportados na Tabela 23.

Tabela 23 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.

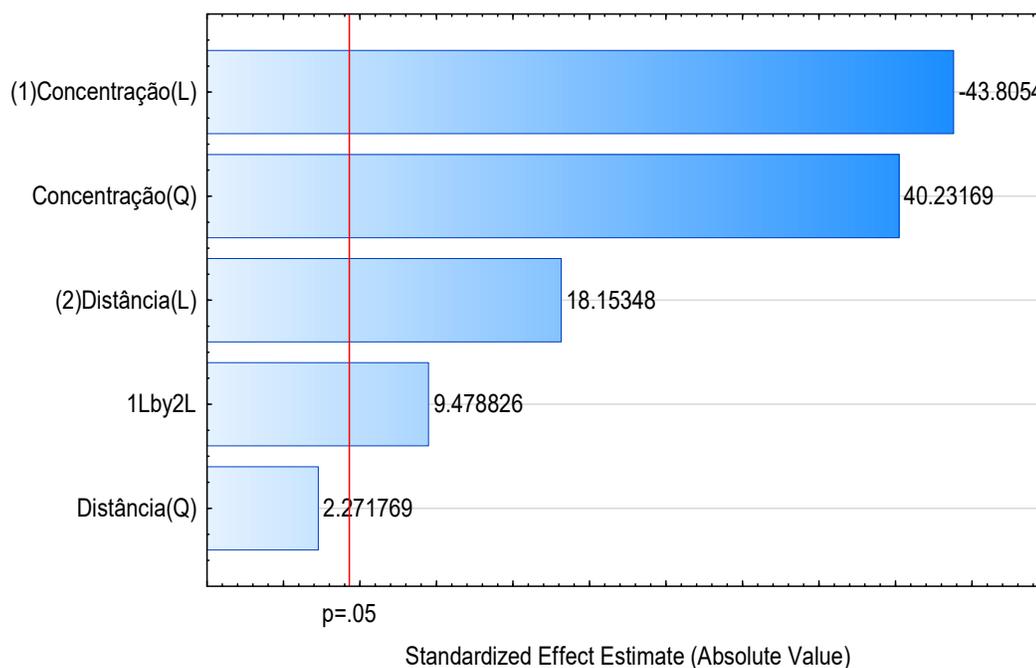
N	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
1	313,6	423,6	680,9	462,2	182,7	39,5	102
2	343,1	513,3	752,9	539,1	184,2	34,2	79
3	336,9	499,8	820,9	551,1	233,9	42,4	74
4	454,2	617,8	1037,5	707,9	290,7	41,1	85
5	291,9	399,9	578,5	420,4	125,2	29,8	100
6	279,7	393,9	611,3	426,7	158,3	37,1	98
7	294,3	410,2	588,7	428,4	131,1	30,6	104

N	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
8	462,2	683,0	1079,5	770,6	438,5	56,9	104
9	145,4	219,3	325,5	236,1	98,9	41,9	201
10	230,5	331,8	595,4	383,3	178,5	46,6	164
11	189,1	303,3	605,6	354,1	190,7	53,9	147

Fonte: autoria própria. P10, P50 e P90 são o 1°, 5° e 9° decis, respetivamente; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação.

O diagrama de Pareto obtido para o planejamento estrela do diâmetro médio das fibras de colágeno é mostrado na Figura 45.

Figura 45 – Diagrama de Pareto obtido para os resultados do planejamento fatorial estrela do diâmetro médio das fibras de colágeno.

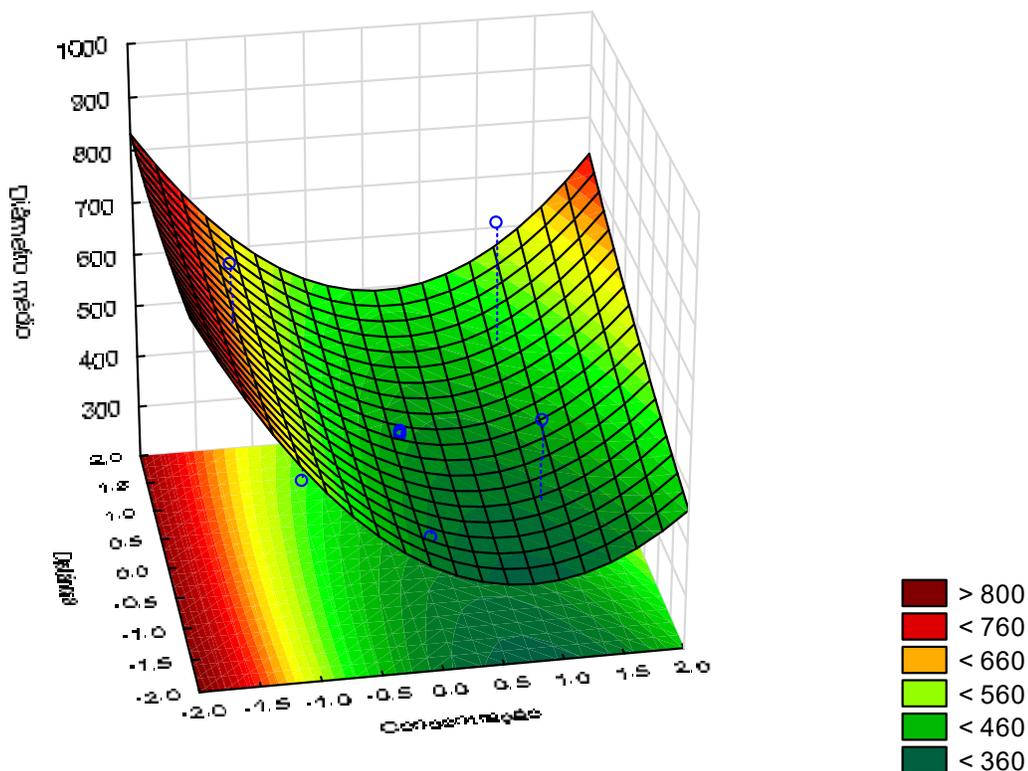


Fonte: autoria própria.

Novamente a concentração foi a variável que mais afetou o diâmetro médio das fibras, com efeito linear e quadrático estatisticamente significativos, assim como já observado anteriormente para fibras de PLA produzidas por SB-Spinning (Wojasiński; Pilarek; Ciach, 2014). Para a distância foi observado apenas um efeito linear significativo sobre a variável resposta. Além disso o fator que representa a interação entre as variáveis $X_1 \times X_4$ foi também significativo ($p > 0,05$). A partir do modelo quadrático gerado pudemos construir uma superfície de resposta para o

diâmetro médio das fibras de colágeno em função da concentração e distância de trabalho (Figura 46).

Figura 46– Gráfico de superfície de resposta para os resultados do planejamento fatorial estrela do diâmetro médio das fibras de colágeno.



Fonte: autoria própria.

Ao empregar este modelo quadrático para minimizar o diâmetro médio das fibras de colágeno foram indicados os valores de +0,71 e -1,41 para as variáveis X1 e X4, respectivamente, como condição ótima, com um valor previsto de 364,52 nm; as variáveis X2 e X3 foram definidas em seus níveis +1 em virtude de seus valores de efeito estimado serem negativos. Ao produzir as fibras de colágeno por SB-Spinning nessas condições em triplicata foram obtidos os diâmetros reportados na Tabela 24.

Tabela 24 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por SB-Spinning nas condições ótimas.

Amostra	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
1	211,6	281,2	427,3	305,9	97,0	31,7	83
2	221,0	307,6	488,9	337,1	123,1	36,5	91
3	177,8	280,8	415,2	295,6	115,3	39,0	74
Média	-	-	-	312,9	21,6	6,9	3

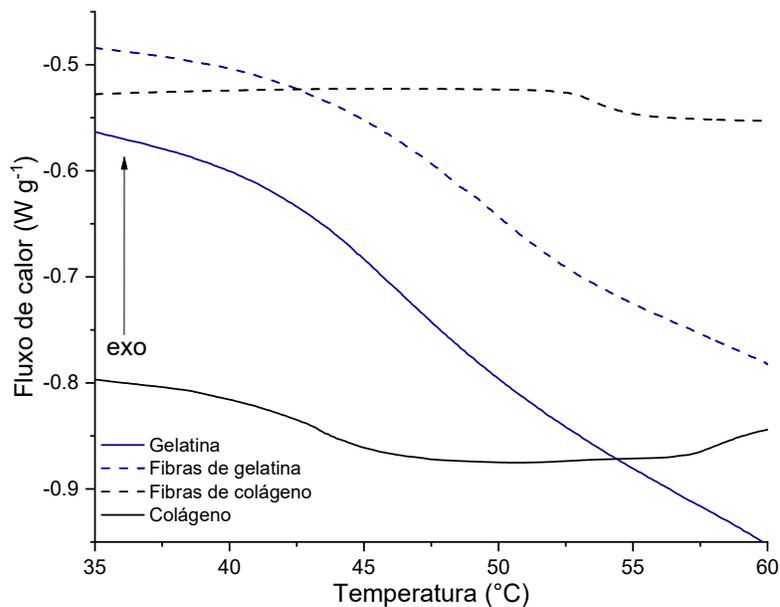
Fonte: autoria própria. P10, P50 e P90 são o 1°, 5° e 9° decis, respectivamente; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; n - número de fibras medidas.

O valor do diâmetro médio das fibras de colágeno produzidas nas condições otimizadas foi 14% menor que o previsto, o que novamente pode ser interpretado como indicativo das limitações na previsibilidade do modelo. Contudo, vale destacar que neste caso o erro foi menor que o observado para a otimização das fibras de gelatina. O efeito da falta de controle sobre a temperatura e a umidade relativa pode ter novamente contribuído para estas divergências entre o valor previsto e o observado, já que as amostras fiadas durante o planejamento fatorial estrela do colágeno foram produzidas a temperatura média de $26,0 \pm 3,6$ °C e $56 \pm 12\%$ de umidade relativa, enquanto as amostras otimizadas foram produzidas a $26,0 \pm 0,4$ °C e $74 \pm 5\%$ de umidade relativa.

5.6. Caracterização das fibras ultrafinas de colágeno e gelatina

As curvas DSC das fibras de gelatina e colágeno produzidas por SB-Spinning e de seus materiais prévios ao processamento, a gelatina tipo A e o colágeno tipo I de pele de tilápia são mostradas na Figura 47. As curvas para as amostras de gelatina e suas fibras não apresentam eventos térmicos que indiquem a desnaturação térmica destas proteínas, enquanto o colágeno e suas fibras ultrafinas apresentam eventos endotérmicos que indicam T_d nos valores de 42 e 54°C, respectivamente. O valor de T_d do colágeno de peixe foi menor do que o valor determinado na etapa de seleção dos materiais, o que pode ser resultado de uma variação em virtude de sazonalidades por se tratar de um produto de origem natural e esta amostra foi obtida de animais diferentes dos usados no início da pesquisa, mas também por degradação com o longo tempo de estoque, cerca de dois anos.

Figura 47 - Curvas DSC para o colágeno de peixe, gelatina e suas fibras produzidas por SB-Spinning obtidas em atmosfera de ar sintético com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

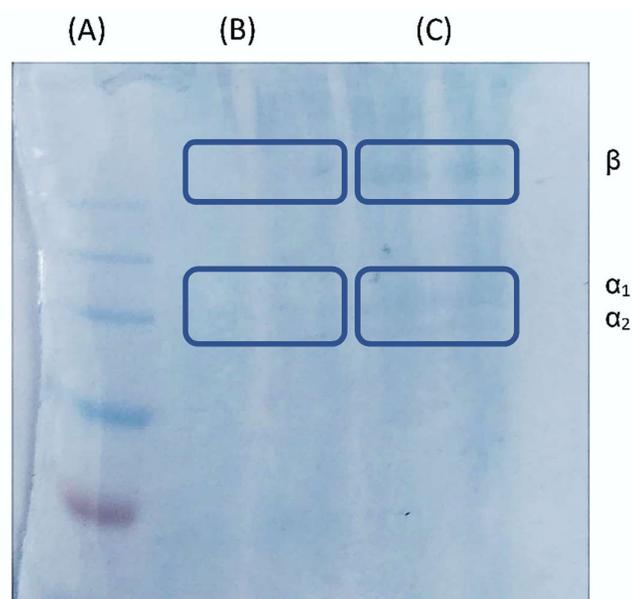


Fonte: autoria própria.

Vale ressaltar o indício de preservação da estrutura do colágeno após processamento indicado pela desnaturação térmica observada por estas análises para as fibras ultrafinas de colágeno. O uso de solventes benignos preparados pouco tempo antes de seu processamento visando evitar os eventos reportados na Seção 5.3.3 de redução da viscosidade em função do tempo de estoque de soluções dos polímeros em ácido acético 90% pode ter levado a esse resultado.

Para confirmar a preservação da estrutura nativa do colágeno as fibras de colágeno e gelatina foram caracterizadas por eletroforese em gel e as bandas obtidas podem ser visualizadas na Figura 48.

Figura 48 – Eletroforese em gel dos padrões de massa molar (A) e das fibras de gelatina (B) e de colágeno (C) produzidas por SB-Spinning. Em destaque são mostradas as bandas discretas, porém visíveis apenas nas fibras de colágeno.



Fonte: autoria própria.

O gel obtido para as amostras de colágeno apresentou bandas α_2 , α_1 e β com uma intensidade muito menor que a observada para as amostras previamente ao processamento por fiação por sopro em solução. Embora tenha apresentado estas bandas discretas o gel ainda se mostrou diferente do obtida para as fibras de gelatina, o que indica que apenas uma degradação parcial do colágeno pode ter ocorrido, corroborando a identificação de T_d para estas amostras.

6. CONCLUSÃO

Após obter colágeno do tipo I de diferentes fontes, caracterizar estes materiais e selecionar a fonte e os solventes mais indicados para produção de soluções fiáveis por fiação por sopro em solução, fibras ultrafinas de colágeno e de gelatina puderam ser produzidas. Enquanto o colágeno de pele de tilápia foi selecionado sobretudo por sua melhor solubilidade, o solvente benigno escolhido foi a solução aquosa de ácido acético (90%).

Para guiar o processo de definição de solventes, polímeros e concentração foi muito útil o uso da reologia, a qual permitiu conhecer mais sobre os efeitos de cada modificação nas soluções de fiação. Quanto às fibras produzidas, para conhecer os efeitos da concentração dos polímeros e de parâmetros do processamento sobre suas dimensões o planejamento fatorial se mostrou uma ferramenta analítica interessante, que não apenas permite identificar as variáveis mais relevantes, como também otimizar processos e representar graficamente as relações entre os parâmetros estudados e a variável resposta.

Por fim, foi possível obter evidências da preservação da estrutura nativa do colágeno por meio dos resultados de DSC e SDS-PAGE, embora outros testes ainda podem ser feitos, os quais estão indicados na seção seguinte. Esta preservação parcial da hélice tripla nas fibras de colágeno mostra que estas fibras diferem das obtidas com as soluções de gelatina, indicando que o ácido acético é capaz de preservar, ainda que parcialmente, a estrutura nativa do colágeno durante a produção de fibras ultrafinas por fiação por sopro em solução.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Infelizmente as restrições sanitárias necessárias ao combate da pandemia de SARS-CoV-2 vividas durante parte significativa dos anos de 2020 e 2021 afetaram o funcionamento normal das instituições de pesquisa envolvidas nesta pesquisa, a USP de São Carlos e a Embrapa Instrumentação, o que atrasou muitas das etapas previstas para esta pesquisa e ainda impossibilitou a execução de algumas destas, como a caracterização por microscopias de força atômica (AFM) ou eletrônica de transmissão (TEM) para confirmação visual da preservação dos padrões de banda d nas fibras de colágeno processadas por fiação por sopro em solução, a caracterização das mantas de colágeno quanto a sua solubilidade em água e os ensaios de citotoxicidade, adesão e proliferação celular.

Portanto, em função das promissoras aplicações vislumbradas com estes materiais se incentiva fortemente que outras caracterizações sejam feitas nestes materiais como forma de conhecer mais suas propriedades e confirmar sua estabilidade em meios aquosos; e caso necessário, estudar métodos seguros e efetivos de promover sua reticulação.

De acordo com os resultados nestes testes pode ser encorajador o desenvolvimento de testes em modelos animais de regeneração tecidual visando futuras aplicação na área de curativos avançados e de biomateriais para preenchimento cutâneo.

8. REFERÊNCIAS

- ALDANA, A. A.; ABRAHAM, G. A. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 523, n. 2, p. 441-453, May 2017.
- ARAFAT, M. T.; TRONCI, G.; YIN, J.; WOOD, D. J.; RUSSELL, S. J. Biomimetic wet-stable fibres via wet spinning and diacid-based crosslinking of collagen triple helices. **Polymer**, Oxford, v. 77, p. 102-112, Oct. 2015.
- BAHRIA, H. Electrospinning of collagen: Formation of biomedical scaffold. **Advance Research in Textile Engineering**, Irving, v. 2, n. 2, 1017, 2017.
- BAIGUERA, S.; GAUDIO, C. D.; LUCATELLI, E.; KUEVDA, E.; BOIERI, M.; MAZZANTI, B.; BIANCO, A.; MACCHIARINI, P. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. **Biomaterials**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 1205-1214, Jan. 2014.
- BARNES, C. P.; SELL, S. A.; BOLAND, E. D.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, n. 14, p. 1413-1433, Dec. 2007.
- BARNES, C. P.; SELL, S. A.; KNAPP, D. C.; WALPOTH, B. H.; BRAND, D. D.; BOWLIN, G. L. Preliminary investigation of electrospun collagen and polydioxanone for vascular tissue engineering applications. **International Journal of Electrospun Nanofibers and Applications**, Shanghai, v. 1, n. 1, p. 73-87, Jan./Jun. 2015.
- BARRIENTOS, I. J. H.; PALADINO, E.; SZABÓ, P.; BROZIO, S.; HALL, P. J.; OSEGHALE, C. I.; PASSARELLI, M. K.; MOUG, S. J.; BLACK, R. A.; WILSON, C. J.; ZELKÓ, R.; LAMPROU, D. A. Electrospun collagen-based nanofibres: A sustainable material for improved antibiotic utilisation in tissue engineering applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 531, n. 1, p. 67-79, Oct. 2017.
- BARROS, J. C.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. S.; MONTE, P. M.; SILVA, T L.; SOUZA, A. L. F. Hexafluoroisopropanol (HFIP, CAS No 920-66-1). **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 12, n. 5, p. 1343-1341, 2020.
- BARROSO, R. M.; MUÑOZ, A. E. P.; CAI, J. **Social and economic performance of tilapia farming in Brazil**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture, 2019. Circular No. 1181. 56 p.
- BENJAKUL, S.; KITTIPHATTANABAWON, P. Gelatin. *In*: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. **Encyclopedia of Food Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 121-127.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 4, p. 1074-1079, 2001.
- BOLAND, E. D.; MATTHEWS, J. A.; PAWLOWSKI, K. J.; SIMPSON, D. G.; WNEK, G. E.; BOWLIN, G. L. Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. **Frontiers in Bioscience**, Manhasset, v. 9, n. 2, 1422-1432, May 2004.
- BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 564-573, junho 2014.
- CAMPIGLIO, C. E.; NEGRINI, N. C.; FARÈ, S.; DRAGHI, L. Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds. **Materials**, Basel, v. 12, n. 15, 2476, Aug. 2019.
- CHAKRAPANI, V. Y.; GNANAMANI, A.; GIRIDEV, V. R.; MADHUSOOTHANAN, M.; SEKARAN, G. Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 125, n. 4, p. 3221-3227, Aug. 2012.

- CHEN, H.; ZHANG, H.; SHEN, Y.; DAI, X.; WANG, X.; DENG, K.; LONG, X.; LIU, L.; ZHANG, X.; LI, Y.; XU, T. Instant *in-situ* tissue repair by biodegradable PLA/gelatin nanofibrous membrane using a 3D printed handheld electrospinning device. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 9, 684105, July 2021.
- CHEN, L.; QIANG, T.; CHEN, X.; REN, W.; ZHANG, H. J. Tough and biodegradable gelatin-based film via the synergistic effect of multi-cross-linking. **ACS Applied Polymer Materials**, Washington, v. 4, n. 1, p. 357-368, 2022.
- CHEN, Z. G.; WANG, P. W.; WEI, B.; MO, X. M.; CUI, F. Z. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 372-382, Feb. 2010.
- DADOL, G. C.; KILIC, A.; TIJING, L. D.; LIM, K. J. A.; CABATINGAN, L. K.; TAN, N. P. B.; STOJANOVSKA, E.; POLAT, Y. Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications. **Materials Today Communications**, Amsterdam, v. 25, 101656, Dec. 2020.
- DARISTOTLE, J. L.; BEHRENS, A. M.; SANDLER, A. D.; KOFINAS, P. A review of the fundamental principles and applications of solution blow spinning. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 8, n. 51, p. 34951, 34963, 2016.
- DEFRATES, K. G.; MOORE, R.; BORGESI, J.; LIN, G.; MULDERIG, T.; BEACHLEY, V.; HU, X. Protein-based fiber materials in medicine: a review. **Nanomaterials**, Basel, v. 8, n. 7, 457, Jun. 2018.
- DONG, C.; LV, Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. **Polymers**, Basel, v. 8, n. 2, 42, Feb. 2016.
- ELAMPARITHI, A.; PUNNOOSE, A. M.; KURUVILLA, S. Electrospun type 1 collagen matrices preserving native ultrastructure using benign binary solvent for cardiac tissue engineering. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, London, v. 44, n. 5, p. 1318-1325, 2016.
- FENG, B.; TU, H.; YUAN, H.; PENG, H.; ZHANG, Y. Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. **Biomacromolecules**, Washington, v. 13, n. 12, p. 3917-3925, 2012.
- FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa**. São Paulo: Paz e Terra, 1996. 144 p.
- GAO, Y.; XIANG, H.-F.; WANG, X.-X.; YAN, K.; LIU, Q.; LI, X.; LIU, R.-Q.; YU, M.; LONG, Y.-Z. A portable solution blow spinning device for minimally invasive surgery hemostasis. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 387, 124052, 2020.
- GAO, Y.; ZHANG, J.; SU, Y.; WANG, H.; WANG, X.; HUANG, L.; YU, M.; RAMAKRISHNA, S.; LONG, Y. Recent progress and challenges in solution blow spinning. **Materials Horizons**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 426-446, 2021.
- GELATIN MANUFACTURERS INSTITUTE OF AMERICA. **Gelatin Handbook**. USA: GMIA, 2012. 26 p. Disponível em: https://nitta-gelatin.com/wp-content/uploads/2018/02/GMIA_Gelatin-Handbook.pdf. Acesso em: 01 abr. 2022.
- GOPINATH, A.; REDDY, S. M. M.; MADHAN, B.; SHANMGUAM, G.; RAO, J. R. Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen. **European Biophysics Journal**, New York, v. 43, n. 12, p. 643-652, 2014.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Gelatin market size, share & trends analysis report by raw material (pig skin, bovine hides, cattle bones), by function (thickener, stabilizer, gelling agent), by application, by region, and segment forecasts, 2020 – 2027**. San Francisco: Grand View Research, 2020. Disponível em:

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gelatin-market-analysis#>. Acesso em: 23 mar. 2022.

GREENHALGH, R. D.; AMBLER, W. S.; QUINN, S. J.; MEDEIROS, E. S.; ANDERSON, M.; GORE, B.; MENNER, A.; BISMARCK, A.; LI, X.; TIRELLI, N.; BLAKER, J. J. Hybrid sol-gel inorganic/gelatin porous fibres via solution blow spinning. **Journal of Materials Science**, New York, v. 52, p. 9066-9081, 2017.

HANANI, Z. A. N. Gelatin. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 191-195.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Tradução de André Krümel Portella. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 520 p.

HLAING, T. T.; COMPSTON, J. E. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. **Annals of Clinical Biochemistry**, Thousand Oaks, v. 51, n. 2, p. 189-202, Mar. 2014.

HOFMAN, K.; TUCKER, N.; STANGER, J.; STAIGER, M.; MARSHALL, S.; HALL, B. Effects of the molecular format of collagen on characteristics of electrospun fibres. **Journal of Materials Science**, New York, v. 47, p. 1148-1155, 2012.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.

HSIEH, D.-J.; PERIASAMY, S. Protocols for accelerated production and purification of collagen scaffold and atelocollagen from animal tissues. **BioTechniques**, London, v. 69, n. 3, p. 220-225, Sep. 2020.

HUANG, L.; NAGAPUDI, K.; APKARIAN, R. P.; CHAIKOF, E. L. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, Abingdon, v. 12, n. 9, p. 979-993, 2001.

JEEVITHAN, E.; BAO, B.; BU, Y.; ZHOU, Y.; ZHAO, Q.; WU, W. Type II Collagen and gelatin from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) cartilage: Isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 7, p. 3852-3873, 2014.

JIA, C.; LI, L.; SONG, J.; LI, Z.; WU, H. Mass production of ultrafine fibers by a versatile solution blow spinning method. **Accounts of Materials Research**, Washington, v. 2, n. 6, p. 432-446, 2021.

JIANG, T.; KAI, D.; LIU, S.; HUANG, X.; HENG, S.; ZHAO, J.; CHAN, B. Q. Y.; LOH, X. J.; ZHU, Y.; MAO, C.; ZHENG, L. Mechanically cartilage-mimicking poly(PCL-PTHF urethane)/collagen nanofibers induce chondrogenesis by blocking NF-kappa B signaling pathway. **Biomaterials**, Oxford, v. 178, p. 281-292, Sep. 2018.

KHAN, M. K. R.; HASSAN, M. N. Solution Blow Spinning (SBS): A promising spinning system for submicron/nanofibre production. **Textile & Leather Review**, Donji Laduc, v. 4, n. 3, p. 181-200, 2021.

KI, C. S.; BAEK, D. H.; GANG, K. D.; LEE, K. H.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. **Polymer**, Oxford, v. 46, n. 14, p. 5094-5102, 2005.

KITTIPHATTANABAWON, P.; NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*). **Journal of Chemistry**, London, v. 2015, 482354, 2015.

KO, C.-H.; SHIE, M.-Y.; LIN, J.-H.; CHEN, Y.-W.; YAO, C.-H.; CHEN, Y.-S. Biodegradable bisvinyl sulfonemethyl-crosslinked gelatin conduit promotes regeneration after peripheral nerve injury in adult rats. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, 17489, 2017.

KOLÁČNÁ, L.; BAKEŠOVÁ, J.; VARGA, F.; KOŠŤÁKOVÁ, E.; PLÁNKA, L.; NEČAS, A.; LUKÁŠ, D.; AMLER, E.; PELOUCH, V. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. **Physiological Research**, Prague, v. 56 (S1), p. S51-S60, 2007.

KOLBASOV, A.; SINHA-RAY, S.; JOIJODE, A.; HASSAN, M. A.; BROWN, D.; MAZE, B.; POURDEYHIMI, B.; YARIN, A. L. Industrial-scale solution blowing of soy protein nanofibers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 55, n. 1, p. 323-333, 2016.

KUMAR, A.; SINHA-RAY, S. A review on biopolymer-based fibers via electrospinning and solution blowing and their applications. **Fibers**, Basel, v. 6, n. 3, 45, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Berlin, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, G.; LI, Y.; LI, G. Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 285-291, 2008.

LAKSHMINARAYANAN, R.; SRIDHAR, R.; LOH, X. J.; NANDHAKUMAR, M.; BARATHI, V. A.; KALAIPRIYA, M.; KWAN, J. L.; LIU, S. P.; BEUERMAN, R. W.; RAMAKRISHNA, S. Interaction of gelatin with polyenes modulates antifungal activity and biocompatibility of electrospun fiber mats. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 9, n. 1, p. 2439-2458, 2014.

LEWANDOWSKA, K.; SZULC, M.; SIONKOWSKA, A. Effect of solvent on the hydrodynamic properties of collagen. **Polymers**, Basel, v. 13, n. 21, 3626, Nov. 2021.

LI, J.; HE, A.; ZHENG, J.; HAN, C. C. Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 7, p. 2243-2247, 2006

LIU, F.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BILBAO-SAINZ, C.; WOODS, R.; CHIOU, B.-S.; WOOD, D.; WILLIAMS, T.; YOKOYAMA, W.; GLENN, G. M.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Solution blow spinning of food-grade gelatin nanofibers. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 82, n. 6, p. 1402-1411, June 2017.

LIU, F.; SARICAUGLU, F. T.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BRIDGES, D. F.; TAKEOKA, G. R.; WU, V. C. H.; CHIOU, B.-S.; WOOD, D. F.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Antimicrobial carvacrol in solution blow-spun fish-skin gelatin nanofibers. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 83, n. 4, p. 984-991, Apr. 2018a.

LIU, F.; SARICAUGLU, F. T.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BRIDGES, D. F.; TAKEOKA, G. R.; WU, V. C. H.; CHIOU, B.-S.; WOOD, D. F.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Preparation of fish skin gelatin-based nanofibers incorporating cinnamaldehyde by solution blow spinning. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 2, 618, 2018b.

LIVERANI, L.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R. Nanofiber composites in bone tissue engineering. *In*: RAMALINGAM, M.; RAMAKRISHNA, S. **Nanofiber Composites for Biomedical Applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017. p. 301-323.

LONGO, R.; CATAURO, M.; SORRENTINO, A.; GUADAGNO, L. Thermal and mechanical characterization of complex electrospun systems based on polycaprolactone and gelatin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 147, p. 5391-5399, 2022.

LU, W. P.; GUO, Y. Electrospinning of collagen and its derivatives for biomedical applications. *In*: LIN, T. **Novel aspects of nanofibers**. Londres: IntechOpen, 2018. p. 39-65.

LUO, X.; GUO, Z.; HE, P.; CHEN, T.; LI, L.; DING, S.; LI, H. Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers crosslinked by common agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 113, p. 476-486, 2018.

MAHBOOB, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n. 7, p. 4296-4305, July 2015.

MATTHEWS, J. A.; BOLAND, E. D. Electrospinning of collagen type II: a feasibility study. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, London, v. 18, p. 125-134, Mar. 2003.

MATTHEWS, J. A.; WNEK, G. E.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Electrospinning of collagen nanofibers. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 2, p. 232-238, 2002.

MEDEIROS, Eliton Souto. **Solution Blow Spinning**. Int. Cl. D01D 5/098; D01D 7/00; D04H 3/02 US 8641960 B1. Depósito: 29 set. 2009.

MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C. Solution blow spinning: a new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 113, n. 4, p. 2322-2330, 2009.

MESCHER, A. **Junqueira's basic histology**: text and atlas. 13. ed. New York: McGraw-Hill, 2013. 544 p.

MONSORES, K. G. C.; SILVA, A. O.; OLIVEIRA, S. S.'A.; WEBER, R. P.; DIAS, M. L. Production of nanofibers from solution blow spinning (SBS). **Journal of Materials Research and Technology**, Amsterdam, v. 16, p. 1824-1831, Jan./Feb. 2022.

MUYONGA, J. H.; COLE, C.G.B.; DUODU, K.G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 325-332, July 2004.

NAJI-TABASI, S.; RAZAVI, S. M. A. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L.) seed gum: Part III - Steady and dynamic shear rheology. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 67, p. 243-250, June 2017.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **National Center for Biotechnology Information Pubchem**. Maryland, 2017. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 07 ago. 2017.

NOOR, N. Q. I. M.; RAZALI, R. S.; ISMAIL, N. K.; RAMLI, R. A.; RAZALI, U. H. M.; BAHAUDDIN, A. R.; ZAHARUDIN, N.; ROZZAMRI, A.; BAKAR, J.; SHAARANI, S. M. Application of green technology in gelatin extraction: A review. **Processes**, Basel, v. 9, n. 12, 2227, 2021.

OLIVEIRA, J.; BRICHI, G. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G. M.; MEDEIROS, E. S. Effect of solvent on the physical and morphological properties of poly(lactic acid) nanofibers obtained by solution blow spinning. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, London, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

PANZAVOLTA, S.; GIOFFRÈ, M.; FOCARETE, M. L.; GUALANDI, C.; FORONI, L.; BIGI, A. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 1702-1709, Apr. 2011.

PARIZE, D. D. S.; FOSCHINI, M. M.; OLIVEIRA, J. E.; KLAMCZYNSKI, A. P.; GLENN, G. M.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Solution blow spinning: parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly(lactic acid)/dimethyl carbonate solutions. **Journal of Materials Science**, New York, v. 51, p. 4627-4638, 2016.

PINTO, J. R. M.; RIBEIRO, M. G. T. C.; MACHADO, A. A. S. C. O desafio na escolha dos solventes em síntese – o *workup* como exemplo. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 8, p. 971-982, ago. 2019.

- POLK, S.; SORI, N.; THAYER, N.; KEMPER, N.; MAGHDOURI-WHITE, Y.; BULYSHEVA, A. A.; FRANCIS, M. P. Pneumatspinning of collagen microfibers from benign solvents. **Biofabrication**, Bristol, v. 10, n. 4, 045004, 2018.
- RATANAVARAPORN, J.; RANGKUPAN, R.; JEERATAWATCHAI, H.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 47, n. 4, p. 431-438, 2010.
- RICARD-BLUM, S.; RUGGIERO, F.; VAN DER REST, M. The collagen superfamily. *In*: BRINCKMANN, J., NOTBOHM, H., MÜLLER, P. K. **Collagen. Topics in Current Chemistry**, v. 247. Berlin: Springer, 2005. p. 35-84.
- RUJITANAROJ, P.; PIMPHA, N.; SUPAPHOL, P. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. **Polymer**, Oxford, v. 49, n. 21, p. 4723-4732, 2008.
- RÝGLOVÁ, Š.; BRAUN, M.; SUCHÝ, T. Collagen and its modifications - Crucial Aspects with concern to its processing and analysis. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 302, n. 6, 1600460, June 2017.
- SAADAT, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASKARI, G. Antibacterial and antioxidant gelatin nanofiber scaffold containing ethanol extract of pomegranate peel: design, characterization and *in vitro* assay. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 14, p. 935-944, 2021.
- SALVATORE, L.; GALLO, N.; NATALI, M. L.; CAMPA, L.; LUNETTI, P.; MADAGHIELE, M.; BLASI, F. S.; CORALLO, A.; CAPOBIANCO, L. SANINNO, A. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 113, 110963, Aug. 2020.
- SANTOS, A. M. C.; MEDEIROS, E. L. G.; BLAKER, J. J.; MEDEIROS, E. S. Aqueous solution blow spinning of poly(vinyl alcohol) micro- and nanofibers. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 176, p. 122-126, 2016.
- SANTOS, D. M.; CORREA, D. S.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Advances in functional polymer nanofibers: From spinning fabrication techniques to recent biomedical applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 12, n. 41, p. 45673-45701, 2020.
- SELL, S. A.; MCCLURE, M. J.; GARG, K.; WOLFE, P. S.; BOWLIN, G. L. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 61, n. 12, p. 1007-1019, 2009.
- SENSINI, A.; SANTARE, M. H.; EICHENLAUB, E.; BLOOM, E.; GOTTI, C.; ZUCHELLI, A.; CRISTOFOLINI, L. Tuning the structure of nylon 6,6 electrospun bundles to mimic the mechanical performance of tendon fascicles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 9, 626433, Apr. 2021.
- SIDDIQUI, Y. D.; ARIEF, E. M.; YUSOFF, A.; HAMID, S. S. A.; NORANI, T. Y.; ABDULLAH, M. Y. S. Extraction, purification and physical characterization of collagen from body wall of sea cucumber *Bohadschia bivitatta*. **Health and the Environment Journal**, Kota Bharu, v. 4, n. 2, p. 53-65, 2013.
- SILVA, T. H.; MOREIRA-SILVA, J.; MARQUES, A. L. P.; DOMINGUES, A.; BAYON, Y.; REIS, R. L. Marine origin collagens and its potential applications. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 12, p. 5881-5901, Dec. 2014.
- SISSON, K.; ZHANG, C.; FARACH-CARSON, M. C.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, n. 7, p. 1675-1680, July 2009.

SONG, J.-H.; KIM, H.-E.; KIM, H.-W. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Dordrecht, v. 19, p. 95-102, 2008.

STOJANOVSKA, E.; CANBAY, E.; PAMPAL, E. S.; CALISIR, M. D.; AGMA, O.; POLAT, Y.; SIMSEK, R.; GUNDOGDU, N. A. S.; AKGUL, Y., KILIC, A. A review on non-electro nanofibre spinning techniques. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, n. 87, p. 83783-83801, 2016.

SUN, L.; HOU, H.; LI, B.; ZHANG, Y. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 99, p. 8-14, June 2017.

TRONCI, G.; KANUPARTI, R. S.; ARAFAT, M. T.; YIN, J.; WOOD, D. J.; RUSSELL, S. J.; Wet-spinnability and crosslinked fibre properties of two collagen polypeptides with varied molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 81, p. 112-120, Nov. 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. e-Disciplinas: **A deficiência da vitamina C e a molécula do colágeno no escorbuto**. São Paulo, 2022. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5580959/mod_resource/content/2/ESCORBUTO%20-%20Cap%C3%ADtulo-03.indd.pdf. Acesso em: 27 mar. 2022.

VILCHES, J. L.; SOUZA-FILHO, M. S. M.; ROSA, M. F.; SANCHES, A. O.; MALMONGE, J. A. Fabrication of fish gelatin microfibrinous mats by solution blow spinning. **Materials Research**, São Carlos, v. 22, n. S1, e20190158, 2019.

WANG, X.; DING, B.; YU, J.; YANG, J. Large-scale fabrication of two-dimensional spider-web-like gelatin nano-nets *via* electro-netting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 345-352, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, W.; YUAN, J.; SHEN, J. Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 59, p. 30-34, 2016.

WOJASIŃSKI, M.; PILAREK, M.; CIACH, T. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-lactic acid) materials for biomedical engineering. **Polish Journal of Chemical Technology**, Warsaw, v. 16, n. 2, p. 43-50, June 2014.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1886-1894, Oct. 2009.

XUE, J.; FENG, B.; ZHENG, R.; LU, Y.; ZHOU, G.; LIU, W.; CAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, W. J. Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone. **Biomaterials**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 2624-2631, Apr. 2013.

XUE, J.; WU, T.; DAI, Y.; XIA, Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 2019.

YAMADA, S.; YAMAMOTO, K.; IKEDA, T.; YANAGIGUCHI, K.; HAYASHI, Y. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. **BioMed Research International**, London, v. 2014, 302932, 2014.

YAMAMOTO, K.; IGAWA, K.; SUGIMOTO, K.; YOSHIZAWA, Y.; YANAGIGUCHI, K.; IKEDA, T.; YAMADA, S.; HAYASHI, Y. Biological safety of fish (tilapia) collagen. **BioMed Research International**, London, v. 2014, 630757, 2014.

YAMAMOTO, K.; YOSHIZAWA, Y.; YANAGIGUCHI, K.; IKEDA, T.; YAMADA, S.; HAYASHI, Y. The characterization of fish (Tilapia) collagen sponge as a biomaterial. **International Journal of Polymer Science**, London, v. 2015, 957385, 2015.

- YAN, M.; QIN, S.; LI, J. Study on the self-assembly property of type I collagen prepared from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin by different extraction methods. **International Journal of Food Science and Technology**, Hoboken, v. 50, n. 9, p. 2088-2096, Sept. 2015.
- ZEUGOLIS, D. I.; KHEW, S. T.; YEW, E. S. Y.; EKAPUTRA, A. K.; TONG, Y. W.; YUNG, L.-Y. L.; HUTMACHER, D. W.; SHEPPARD, C.; RAGHUNATH, M. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres: Just an expensive way to make gelatin? **Biomaterials**, Oxford, v. 29, n. 15, p. 2293-2305, May 2008.
- ZHANG, S.; HUANG, Y.; YANG, X.; MEI, F.; MA, Q.; CHEN, G.; RYU, S.; DENG, X. Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 90, n. 3, p. 671-679, 2009.
- ZHANG, X.; ZU, S.; SHEN, L.; LI, G. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. **Journal of Leather Science and Engineering**, London, v. 2, 19, 2020.
- ZHOU, T.; WANG, N.; XUE, Y.; DING, T.; LIU, X.; MO, X.; SUN, J. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 143, p. 415-422, 2016.
- ZINE, R.; SINHA, M. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/collagen/graphene oxide scaffolds for wound coverage. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 80, p. 129-134, 2017.

9. ANEXOS

Tabela A1 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de gelatina produzidas por fiação por sopro em solução.

N	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
1	221,62	371,98	525,20	375,14	119,81	31,9	44
2	320,86	650,55	919,39	632,96	217,69	34,4	62
3	213,96	300,41	577,89	385,06	256,78	66,7	61
4	406,40	676,20	921,95	702,19	309,61	44,1	69
5	215,47	329,44	479,86	335,63	112,80	33,6	62
6	376,16	552,74	803,48	593,60	281,64	47,4	83
7	183,24	275,68	454,33	304,61	106,94	35,1	88
8	332,59	490,53	722,96	508,18	174,58	34,4	74
9	227,69	344,57	511,11	355,65	123,73	34,8	59
10	397,85	618,44	891,53	660,47	272,84	41,3	60
11	220,17	293,06	433,21	317,18	109,57	34,5	49
12	409,74	575,43	850,70	617,42	203,34	32,9	105
13	262,47	342,14	622,20	386,07	154,16	39,9	65
14	351,60	480,70	894,27	547,11	214,56	39,2	54
15	151,48	254,53	330,73	254,32	73,63	29,0	80
16	295,31	505,08	921,39	564,11	267,89	47,5	67
17	247,24	397,41	588,78	421,76	131,23	31,1	67
18	267,16	475,87	698,69	493,81	196,18	39,7	53
19	261,04	410,33	572,66	417,77	128,93	30,9	81

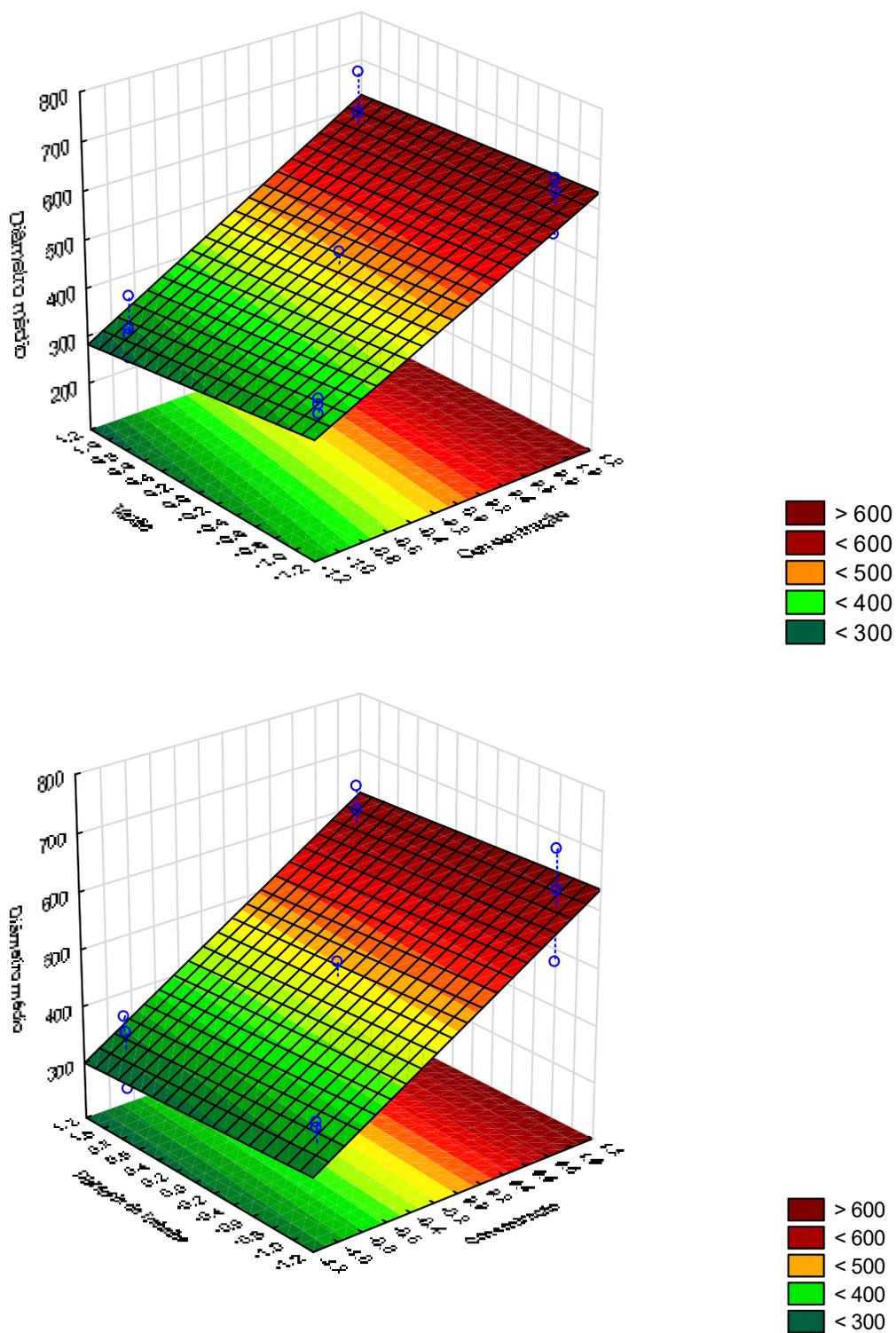
Fonte: autoria própria. P10, P50 e P90 são o 1º, 5º e 9º decis, respetivamente; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; n - número de fibras medidas.

Tabela A2 – Valores dos percentis, média, desvio padrão e coeficiente de variação para o diâmetro de fibras de colágeno produzidas por fiação por sopro em solução.

N	P10 (nm)	P50 (nm)	P90 (nm)	Média (nm)	DP (nm)	CV (%)	n
1	330,45	502,39	687,98	523,03	201,77	38,6	71
2	486,71	706,50	1050,59	747,25	239,54	32,1	82
3	287,97	460,67	643,71	465,33	142,23	30,6	65
4	363,23	540,59	901,36	620,00	317,73	51,2	78
5	279,90	382,67	573,68	406,95	126,38	31,1	74
6	389,36	537,60	726,13	575,97	237,97	41,3	79
7	313,60	423,59	680,86	462,22	182,74	39,5	102
8	343,14	513,27	752,91	539,07	184,17	34,2	79
9	289,02	411,15	558,50	438,45	207,54	47,3	85
10	471,67	717,48	1123,26	773,72	261,37	33,8	80
11	346,42	466,12	623,32	483,22	163,33	33,8	62
12	475,42	705,65	997,75	738,99	228,73	31,0	75
13	385,73	532,83	809,90	579,49	185,03	31,9	71
14	399,41	617,80	1049,54	726,16	397,07	54,7	63
15	336,92	499,80	820,95	551,15	233,86	42,4	74
16	454,22	617,80	1037,49	707,92	290,74	41,1	85
17	291,94	399,86	578,50	420,40	125,23	29,8	100
18	279,75	393,90	611,26	426,72	158,29	37,1	98
19	294,27	410,21	588,75	428,39	131,10	30,6	104

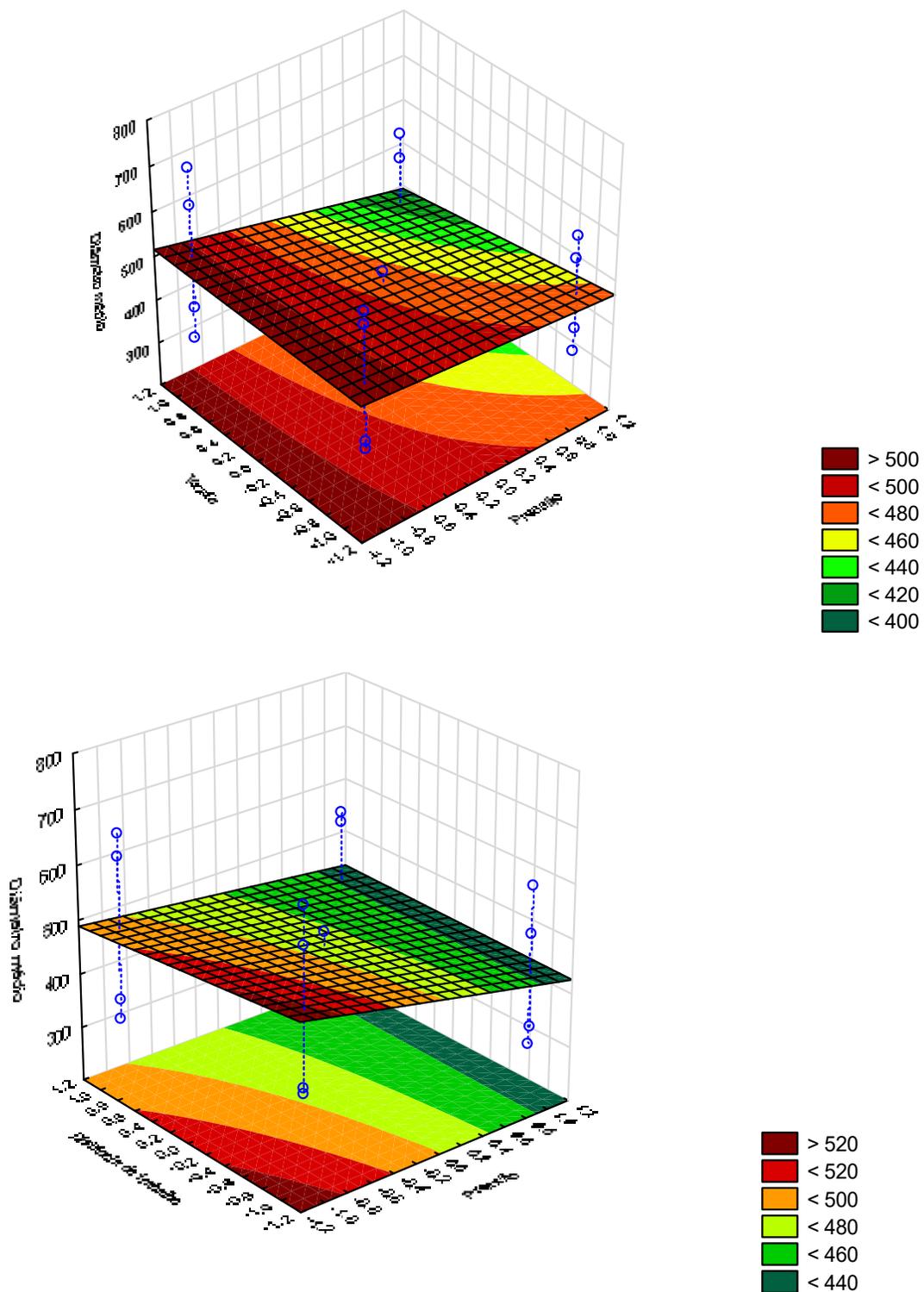
Fonte: autoria própria. P10, P50 e P90 são o 1°, 5° e 9° decis, respectivamente; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; n - número de fibras medidas.

Figura A1 – Superfície de resposta para o planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de gelatina envolvendo a concentração em função das variáveis não significativas estatisticamente.



Fonte: autoria própria.

Figura A2 – Superfície de resposta para o planejamento fatorial 2^4 do diâmetro médio das fibras de gelatina envolvendo a pressão em função das variáveis não significativas estatisticamente.



Fonte: autoria própria.