República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1101774-0 B1

(22) Data do Depósito: 15/02/2011

(45) Data de Concessão: 27/10/2020

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE FIBROÍNA E MEMBRANAS DE FIBROÍNA ASSIM OBTIDAS

(51) Int.Cl.: C08L 89/00; C08H 1/00; A61K 9/52.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP.

(72) Inventor(es): MARISA MASUMI BEPPU; MARIANA AGOSTINI DE MORAES; RAQUEL FARIAS WESKA.

(57) Resumo: BLENDAS E COMPÓSITOS COMPREENDENDO FIBROÍNA E ALGINATO, PROCESSOS DE PRODUÇÃO E PRODUTOS OBTIDOS DOS MESMOS. A presente invenção se refere a blendas compreendendo uma mistura solidificada e homogênea de polímeros naturais compreendendo fibroína e alginato, bem como a compósitos compreendendo fibras de fibroína dispersas em uma matriz polimérica de origem natural. Em virtude de suas propriedades físicas e mecânicas, as blendas e compósitos da presente invenção podem ser utilizados na produção de diversos biomateriais. Processos para a produção das blendas e dos compósitos são também descritos.

Resumo da patente de invenção para: "**PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE FIBROÍNA E MEMBRANAS DE FIBROÍNA ASSIM OBTIDAS"**

A presente invenção se refere a blendas compreendendo uma mistura solidificada e homogênea de polímeros naturais compreendendo fibroína e alginato, bem como a compósitos compreendendo fibras de fibroína dispersas em uma matriz polimérica de origem natural. Em virtude de suas propriedades físicas e mecânicas, as blendas e compósitos da presente invenção podem ser utilizados na produção de diversos biomateriais. Processos para a produção das blendas e dos compósitos são também descritos.

natureza e pode ser obtida a baixo custo (Mori e Tsukada, 2000). As sedas são biopolímeros protéicos, produzidos na forma de fibras por alguns artrópodes, como o bicho-da-seda, a aranha, o escorpião e a pulga. Cada uma destas sedas tem uma seqüência de aminoácidos diferente e, portanto, possui diferentes propriedades (Altman *et al.*, 2003). Condições diferentes no processamento da seda, como o clima, ambiente, nutrição do artrópode e velocidade de formação do fio também influenciam diretamente as propriedades mecânicas do fio de seda formado (Hakimi *et al.*, 2007).

As sedas mais estudadas são as produzidas pelo bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*) e por aranhas do gênero *Nephila clavipes*. Porém, apesar da seda da aranha possuir melhores propriedades mecânicas, ela não é comercializada para a indústria têxtil ou utilizada em aplicações biomédicas devido à natureza predatória das aranhas, o que restringe sua criação em condições confinadas. Além disso, a aranha produz quantidades pequenas de seda, quando comparada com a produção do bicho-da-seda (MacIntosh *et al.*, 2008).

O casulo do bicho-da-seda é composto primariamente por sericina e fibroína. A sericina é responsável por envolver as fibras da fibroína, como uma espécie de cola. Alguns

casos de hipersensibilidade à seda já foram relatados e atribuídos à sericina, porém sabe-se que se a mesma for retirada é possível obter membranas adequadas para utilização como biomaterial (Altman *et al.*, 2003).

A estrutura química da fibroína é composta predominantemente por glicina, alanina, serina e, em menor quantidade, tirosina, sendo que a fração molar destes quatro aminoácidos representa 90% de sua estrutura (Sashina *et al.*, 2006). A fibroína apresenta uma região cristalina, com repetições dos aminoácidos em seqüência, e uma região amorfa, com a maioria dos aminoácidos residuais com uma cadeia de lados volumosos e polares, sendo mais abundantes em fibroínas de seda selvagem. As propriedades de tensão das fibras da seda dependem principalmente da estrutura cristalina, enquanto as propriedades físicas, como retenção de umidade e resistência química, dependem do estado da região amorfa (Mori e Tsukada, 2000).

A fibroína, como a maioria das proteínas, possui três tipos principais de conformações da estrutura secundária: folha-β, hélice-α e enovelamento aleatório presentes em proporções diferentes (Canevarolo Jr., 2006). As conformações do tipo hélice-α e enovelamento aleatório também são chamadas de seda I, enquanto que a conformação do tipo folha-β é denominada de seda II. A conformação do

tipo folha-β é a forma mais estável, onde as cadeias da fibroína são ligadas por pontes de hidrogênio entre os segmentos adjacentes das cadeias polipeptídicas. A estrutura β tende a interagir com outra estrutura β, por pontes de hidrogênio entre os grupos carbonila de uma com os grupos amino de outra (Nelson e Cox, 2000; Cozzone, 2002).

Os fios de fibroína são biodegradáveis e altamente cristalinos, com estrutura folha-β bem alinhada. Possuem alta resistência à tensão, boa elasticidade e resiliência. Fios de fibroína são altamente estáveis, iniciando sua degradação térmica em temperaturas acima de 150 °C (Lee *et al.*, 2005).

A fibroína tem sido utilizada em aplicações biomédicas, como sutura, desde o final do século 19, provando ser um biomaterial eficiente para este tipo de utilização (MacIntosh *et al.*, 2008). Vários pesquisadores têm investigado a fibroína como um recurso promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua biocompatibilidade, alta permeabilidade ao oxigênio e vapor d'água, biodegradabilidade, mínima reação inflamatória, possibilidade de esterilização e preparo com diferentes morfologias, alta estabilidade térmica e resistência microbiana (Um *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2003; Li *et*

al., 2002).

Existem alguns trabalhos relatando as aplicações potenciais da fibroína no campo biomédico, como pele artificial e sistemas de liberação controlada (Ki *et al.*, 2009), substrato para imobilização enzimática, lentes de contato com alta permeabilidade ao oxigênio e biosensores para a detecção de doenças (Mori e Tsukada, 2000) e cultura de células de vários tecidos, incluindo tecido ósseo, cartilaginoso e de ligamentos (Vepari e Kaplan, 2007; MacIntosh *et al.*, 2008).

Alginato

O alginato é um polissacarídeo de cadeia linear obtido da parede celular de algas marinhas marrons e bactérias, e é responsável por promover rigidez e flexibilidade às mesmas. A maioria dos alginatos é extraída de algas colhidas de seu habitat natural, uma vez que o seu cultivo é muito caro, o que inviabilizaria sua aplicação industrial (Rinaudo, 2008).

A principal fonte de extração do alginato são as algas marinhas marrons e o seu preparo envolve lavagem e maceração das algas, seguido pela extração do alginato utilizando solução de carbonato de sódio ou hidróxido de sódio. O extrato é filtrado e o alginato é isolado por precipitação através da adição de cloreto de cálcio ou

cloreto de sódio ao filtrado (Haug e Larsen, 1963; Rinaudo, 2008).

O alginato é uma mistura complexa de dois tipos de ácidos, o ácido β-D-manurônico, com conformação linear e flexível, e o ácido α-L-gulurônico, de conformação estrutural rígida. Os ácidos β-D-manurônico e α-L-gulurônico são estereoquimicamente diferentes na configuração do carbono C-5 (Qin, 2008). Dependendo da espécie da qual se extrai o alginato, do local e da época do ano, a proporção destes ácidos na cadeia do alginato é diferente, resultando em propriedades físicas distintas ao mesmo (Avella *et al.*, 2007).

Considera-se que o alginato é constituído por três tipos de blocos. Os blocos GG, contendo unidades de ácido gulurônico, os blocos MM, com unidade de ácido manurônico e os blocos GM, com unidades alternadas de ácido gulurônico e manurônico.

As propriedades físicas do alginato dependem não somente das proporções dos ácidos gulurônico e manurônico em sua cadeia, mas também das proporções relativas dos três tipos de blocos. Por exemplo, a formação de géis de alginato pela adição de íons cálcio envolve os blocos GG, portanto, quanto maior for o conteúdo de blocos GG em sua cadeia, maior será a resistência mecânica deste gel (Qin,

2008).

Os blocos dos ácidos gulurônico e manurônico podem estar arranjados de formas distintas, formando três tipos de configurações: hélice dupla para os blocos manurônicos, hélice tripla para os blocos gulurônicos na presença de sais de sódio e hélice dupla dos blocos gulurônicos na presença de sais de cálcio (Rinaudo, 2008).

O alginato é insolúvel em água à temperatura ambiente, sendo o preparo de sua solução um pouco complicado. Ele deve ser disperso em água, sob alta taxa de cisalhamento (agitação) ou com aquecimento (Oliveira, 2004). Soluções aquosas de alginato apresentam diminuição de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, podendo ser classificadas como fluido não-newtoniano. O alginato pode ser preparado em uma larga variedade de massas moleculares, variando entre 50 a 100.000 kDa (Augst *et al.*, 2006).

A viscosidade da solução de alginato diminui com o aumento de temperatura. Com relação ao pH, em pH abaixo de 5 os grupos $-COO^-$ começam a ser protonados, diminuindo a repulsão eletrostática entre eles, o que permite a formação de pontes de hidrogênio, aumento de viscosidade e, consequentemente, possibilita a formação de gel (Qin, 2008).

Devido à sua estrutura linear e elevada massa

molecular, o alginato é capaz de formar filmes resistentes e boas fibras no estado sólido (Rinaudo, 2008). O alginato possui facilidade em formar gel, sendo capaz de reter grande quantidade de água. A formação deste gel é independente da temperatura, o que faz com que este biopolímero seja utilizado na maioria das vezes sob esta forma. É um material muito utilizado como agente espessante e estabilizante em alimentos, e também na produção de adesivos, tintas, brinquedos e papéis (Oliveira, 2004).

Para a área biomédica o alginato possui algumas características vantajosas, como biocompatibilidade, não toxicidade, hidrofilicidade e capacidade de formar gel. A gelificação do alginato permite a encapsulação de várias substâncias, e quando modificado quimicamente, é utilizado na liberação controlada de proteínas que promovem a regeneração do tecido mineralizado e como carregador de células transplantadas. Porém, a sua baixa taxa de degradação constitui uma desvantagem que ainda está sendo estudada (Augst *et al.*, 2006).

O alginato de sódio vem sendo estudado para usos como matriz para suporte de culturas celulares específicas, imobilização de microorganismos, excipiente para medicamentos, material para impressão dental e curativo para ferimentos (Lee *et al.*, 2004a; Augst *et al.*, 2006;

Avella *et al.*, 2007; Qin, 2008; Ko *et al.*, 2010).

Blendas poliméricas

A palavra blenda vem do inglês "blend", que significa mistura ou combinação. Uma blenda polimérica, portanto, consiste na mistura de pelo menos dois polímeros de forma que só existam interações intermoleculares secundárias, sem a ocorrência de reações químicas (Wiebeck e Harada, 2005). Através da formação de blendas poliméricas é possível obter uma sinergia das propriedades individuais de cada material, além da possibilidade de melhorar ou controlar suas propriedades mecânicas finais devido à interação entre as estruturas químicas.

Existem duas formas tradicionais de se obter blendas poliméricas: sob temperatura suficientemente alta para fundir os polímeros sem causar degradação dos mesmos, ou dissolvendo os polímeros em um solvente comum a ambos, sendo o solvente evaporado posteriormente (Wiebeck e Harada, 2005).

Um dos principais problemas no desenvolvimento de blendas poliméricas é encontrar sistemas miscíveis. Uma blenda é dita miscível quando as moléculas poliméricas se misturam intimamente, não havendo segregação entre as moléculas, ou seja, separação de fase. O termo miscível está diretamente relacionado com a solubilidade, ou seja,

os polímeros são miscíveis quando se dissolvem mutuamente, apresentando uma única fase (Paul e Newman, 1978). Existem diversas técnicas que permitem investigar a miscibilidade entre componentes de uma blenda polimérica, como a microscopia eletrônica de varredura (escala micrométrica), a análise dinâmico-mecânica (escala nanométrica) e a espectroscopia de infravermelho (escala molecular) (Garton, 1992).

Outro termo complementar ao de miscibilidade de blendas refere-se à sua compatibilidade. Blendas são ditas compatíveis quando apresentam propriedades úteis ou satisfatórias. Portanto, blendas imiscíveis podem ser compatíveis, assim como blendas miscíveis podem ser incompatíveis. Um dos principais objetivos no estudo de blendas poliméricas é tornar compatíveis os sistemas incompatíveis, e isto pode ser feito através de modificações químicas ou do uso de aditivos (Paul e Newman, 1978; Akcelrud, 2007).

Alguns pesquisadores verificaram que as propriedades físicas de membranas de fibroína de seda podem ser melhoradas com a formação de blendas de fibroína com outros polímeros sintéticos ou naturais, como o poli(vinil álcool) (PVA_1) (Sashina *et al.*, 2007b), a celulose (Marsano *et al.*, 2008), a quitosana (Kweon *et al.*, 2001; Sashina *et al.*,

2007a) e o alginato de sódio (Lee *et al.*, 2004a), entre outros.

Membranas de fibroína de seda e queratina foram desenvolvidas por Vasconcelos *et al.* (2008), sendo a queratina dissolvida tanto em solução aquosa como em solução de ácido fórmico. Foi verificada nas blendas uma modificação nas bandas de amida da fibroína, que caracterizam sua conformação estrutural, provavelmente induzida pela adição da queratina. Isto ocorreu principalmente nas blendas com ácido fórmico, uma vez que este é capaz de induzir a cristalização da fibroína.

Yeo *et al.* (2000) estudaram blendas de PVA_1/quitosana/fibroína para aplicação na cicatrização de feridas em ratos. Eles verificaram que a cicatrização ocorreu mais rapidamente quando utilizada a blenda contendo os três componentes, seguida da blenda quitosana/fibroína, fibroína pura, blenda PVA_1/quitosana e quitosana pura. Os autores relataram a necessidade de ajuste de pH para um valor entre 5,0 e 5,5 para a obtenção das blendas estudadas.

Kweon *et al.* (2001) estudaram filmes de blendas poliméricas de fibroína de seda e quitosana, a fim de entender o efeito da relação fibroína:quitosana nas características físicas dos filmes. Eles verificaram que as

propriedades mecânicas dos filmes são melhoradas quando formadas blendas de fibroína de seda com 10 a 40% de quitosana e que a permeabilidade ao oxigênio é mais elevada em blendas contendo 40-50% de quitosana. Um estudo semelhante foi conduzido por Park *et al.* (1999), onde foram verificadas melhorias nas propriedades mecânicas e também uma tendência à cristalização, principalmente em um conteúdo de quitosana de até 30%. She *et al.* (2008) verificaram que, quanto maior o conteúdo de quitosana na blenda, maior a formação de uma estrutura mais organizada na fibroína. Isto foi atribuído ao fato de serem formadas pontes de hidrogênio entre a fibroína e a quitosana, estabilizando assim sua conformação.

Blendas de fibroína e alginato de sódio

O alginato de sódio parece ser bastante promissor como o segundo componente de blendas com fibroína de seda, pois possui grupos ativos capazes de interagir com as macromoléculas de fibroína, condição necessária para a compatibilidade dos polímeros em soluções e filmes.

Apesar das potencialidades, são encontrados poucos trabalhos sobre a obtenção de blendas de fibroína de seda com alginato de sódio na literatura, alguns exemplos são Liang e Hirabayashi, 1992, Lee *et al.*, 2004a e Roh *et al.*, 2006.

Inicialmente, Liang e Hirabayashi (1992) estudaram a interação por pontes de hidrogênio entre a fibroína e o alginato de sódio. Além de verificar o aumento da tensão de ruptura das membranas quando adicionado um conteúdo máximo de 30% de alginato na fibroína, e um aumento no alongamento das membranas quanto maior a quantidade de alginato adicionada.

Lee *et al.* (2004a) estudaram as propriedades físicas e estruturais de blendas esponjosas de fibroína de seda e alginato de sódio. O método de obtenção das blendas por estes autores foi por mistura e liofilização, obtendo assim a estrutura esponjosa. Os autores verificaram que as características estruturais da fibroína de seda nestas blendas não foram afetadas pela incorporação de alginato de sódio, além disso, foi observada separação macroscópica de fases. Entretanto as propriedades mecânicas das blendas melhoraram, uma vez que o alginato de sódio é um polissacarídeo rígido.

Blendas de alginato e fibroína obtidas por liofilização foram também descritas na publicação CN 101700244 A, de 5 de maio de 2010, onde água pura é também utilizada como solvente. Desta forma as blendas apresentam separação macroscópica de fases, um problema solucionado na presente invenção, conforme anteriormente explicado.

Em um estudo complementar, as blendas esponjosas de fibroína e alginato foram utilizadas para a cicatrização de feridas em ratos (Roh *et al.*, 2006). Foi constatado que a cicatrização utilizando as blendas fibroína/alginato, contendo 50% de cada biopolímero, foi a melhor entre as membranas utilizadas, melhor inclusive que o curativo usado clinicamente, o Nu Gauze™ (Johnson & Johnson Co.), usado como controle no estudo. A cicatrização utilizando esta blenda envolve a re-epitelização através da rápida proliferação das células epiteliais e deposição de colágeno pela proliferação de fibroblastos. A blenda de fibroína e alginato tem efeito sinérgico na cicatrização de feridas, acelerando a re-epitelização e surgindo como um material com grande potencial para ser utilizado clinicamente.

As publicações WO 2008072817 A1, de 19 de junho de 2008 e JP 11049659, de 23 de fevereiro de 1999, descrevem géis de fibroína e alginato, sendo a água utilizada como solvente. Desta forma são obtidos materiais com características físicas e mecânicas distintas dos da presente invenção. As principais diferenças da presente invenção são o uso de solução alcalina (NaOH) na dissolução do alginato e a obtenção de membranas, podendo estas serem aplicadas na regeneração de tecidos, enquanto nas referidas publicações é utilizada água como solvente, o que causa

exclusão de fases entre a fibroína e o alginato, e são feitos géis da mistura fibroína/alginato, não membranas.

Alguns aditivos químicos podem ser também incorporados a filmes poliméricos para conferir propriedades físicas e macânicas aperfeiçoadas. A utilização dos plastificantes, por exemplo, fundamenta-se na diminuição das forças intermoleculares, provocando a separação entre as macromoléculas do polímero e aumentando assim a mobilidade de suas cadeias, melhorando as propriedades mecânicas, como a flexibilidade (Zactiti, 2004). O plastificante atua como um espaçador molecular, porém algumas vezes ele pode interagir com o polímero por interações do tipo dipolo-dipolo ou do tipo pontes de hidrogênio, sendo que quanto mais forte for esta interação, menor será o espaçamento entre as cadeias do polímero e consequentemente, maior a sua dureza e rigidez. Quanto à alteração nas propriedades mecânicas, pode-se dizer que, geralmente, o uso de plastificantes provoca aumento no alongamento e diminuição na resistência tênsil e no módulo elástico (Rabello, 2000).

A utilização de aditivos (plastificantes) em polímeros vem se tornando cada vez maior, a fim de conferir boas características de processabilidade e uso final. O plastificante pode ser considerado como o principal componente de uma determinada composição polimérica, logo

após o polímero base (Zaioncz, 2004).

Em um estudo sobre membranas de fibroína e poli(vinil álcool) (PVA_1), Dai *et al.* (2002) verificaram que as membranas das blendas fibroína/PVA_1 obtidas sem a adição de glicerina apresentaram separação de fases, enquanto que as membranas contendo glicerina mostraram-se bastante homogêneas. Acredita-se que a glicerina ajudou na interação entre a fibroína e o PVA_1 devido às ligações por pontes de hidrogênio dos grupos hidroxila do PVA_1, hidroxila da glicerina e amida da fibroína. Além disso, a adição da glicerina melhorou o alongamento e a força na ruptura das membranas, pois aumentou o espaçamento entre as moléculas da fibroína e do PVA_1, tornando seu movimento mais fácil, portanto, mais elástico.

A necessidade da adição de glicerina para atuar como plastificante em membranas também foi verificada por Du *et al.* (2009), em blendas de fibroína e hidroxiapatita. As membranas contendo glicerina ficaram mais flexíveis e transparentes. As blendas também apresentaram estrutura cristalina (folha-β) induzidas pela adição da glicerina e da hidroxiapatita.

Compósitos

Compósitos são constituídos por uma fase contínua denominada matriz (pode ser metálica, cerâmica ou

polimérica) e por uma fase descontínua denominada fase dispersa (fibras contínuas, fibras picadas ou partículas). Os biocompósitos, estudados mais recentemente, são definidos como materiais compósitos, compostos por fibras naturais biodegradáveis como reforço e uma matriz polimérica que pode, ou não, ser biodegradável (Lee *et al.*, 2005).

As propriedades mecânicas de compósitos reforçados com fibras dependem fortemente das propriedades do reforço e da matriz, da carga de fibra (fração volumétrica), da orientação e comprimento das fibras e das propriedades da interface reforço/matriz. A adesão fibra-matriz em um material compósito é um dos pontos principais. Ela está diretamente relacionada à presença de grupos funcionais na superfície da fibra, orientação, cristalinidade e propriedades químicas da mesma, bem como à conformação molecular e constituição química da matriz (Levy Neto e Pardini, 2006).

As principais vantagens associadas ao uso de fibras naturais estão em sua não-toxicidade, biodegradabilidade, baixo custo e boa resistência por massa de material quando comparadas com fibras sintéticas. As fibras naturais podem ser usadas como reforços biodegradáveis a fim de melhorar suas propriedades mecânicas, controlar a biodegradabilidade

do biocompósito e também reduzir o seu peso (Lee *et al.*, 2005).

As fibras naturais são divididas em categorias, de acordo com sua origem: animais e vegetais. Fibras vegetais são compostas por celulose (frutas, sementes, folhas, madeiras), enquanto que fibras animais são compostas por proteínas, como a fibroína e a queratina (John e Thomas, 2008).

Existem diversos estudos na literatura relatando o uso de fibras vegetais em biocompósitos, como fibras de sisal, de bambu, de curauá, de coco, de juta, entre outros (Singha e Thakur, 2008; Alvarez *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Bledzki *et al.*, 2009; Corradini *et al.*, 2009; Silva e Aquino, 2008). Existem inclusive alguns artigos de revisão sobre compósitos reforçados com fibras de celulose (Mishra *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2002; John e Thomas, 2008; John e Anandjiwala, 2008). Porém estudos com fibras animais, como a fibroína, são raros.

As fibras de fibroína exibem algumas vantagens em relação às fibras vegetais, como propriedades das fibras uniformes, tipo de fibra contínua, elevada resistência mecânica, elevada cristalinidade e elevada resistência à umidade e temperatura (Han *et al.*, 2006). Devido a estas propriedades, alguns cientistas e companhias estão tentando

produzir fibroína em laboratório com a finalidade de aplicação em tecidos e cordas de alto desempenho.

Além disso, na manufatura da seda, uma grande quantidade de fios de seda fora das especificações é descartada. Estes fios de descarte, cuja composição compreende fibras de fibroína, podem ser vantajosamente empregados na utilização como reforço em biocompósitos.

As fibras de fibroína têm aproximadamente 10-25 μm de diâmetro e de um único casulo pode-se obter até 1000 m de fibras de fibroína. A purificação da fibra pode ser feita através da remoção da sericina por imersão em água fervente ou solução alcalina (Vepari e Kaplan, 2007; Plaza *et al.*, 2008).

A elevada resistência mecânica apresentada pelos fios de fibroína, aliada à sua capacidade de adesão celular, torna muito interessante sua utilização como fibra de reforço em compósitos poliméricos (Xia e Lu, 2008). Apesar disso, existem poucos estudos na literatura sobre a formação de compósitos com fios de fibroína de seda, especialmente para aplicação na área biomédica.

Existem relatos na literatura de compósitos utilizando diretamente os fios de fibroína de seda fornecidos pela fiação com polímeros sintéticos como matrizes, como a poli(ε-caprolactona) (Li *et al.*, 2008) e o poli(butileno

sucinato) (Han *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005), utilizando prensagem a quente para obtenção dos compósitos. Nestes estudos verificou-se a existência de comprimento e conteúdo máximo de fios de fibroína que pode ser adicionado a fim de obter a máxima resistência mecânica. Verificou-se que o comprimento ideal dos fios é de 12,7 a 25,4 mm (1/2 in e 1 in) com um conteúdo máximo de 35 a 50% de fios de fibroína, em massa. Os autores verificaram que, em conteúdos mais elevados, a matriz não era suficiente para cobrir estes fios, causando menor transferência de carga da matriz para a fibra, resultando na queda da resistência mecânica.

Um biocompósito para aplicações em engenharia tecidual foi preparado a partir de fibras de fibroína e poli(ácido láctico) (PLA) (Cheung *et al.*, 2008). Os biocompósitos foram obtidos por extrusão e injeção e foram utilizadas fibras curtas, de 3 a 6 mm. O tamanho e conteúdo das fibras foram os principais parâmetros que influenciaram as propriedades mecânicas do biocompósito. O biocompósito com maior resistência mecânica foi obtido quando utilizadas fibras de 5 mm e em um conteúdo mássico de 5%. Os autores consideraram os fios de fibroína ótimos candidatos para atuar como reforço no desenvolvimento de *scaffolds* (matrizes tridimensionais porosas) poliméricos.

Além das fibras, micropartículas de fibroína (5-50 μm)

provaram ser eficientes no reforço de *scaffolds* com PLA e melhoraram a proliferação celular (Lv *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007). As micropartículas eram misturadas ao PLA, em proporção de 50% em massa de cada material, e os *scaffolds* foram obtidos por liofilização. As micropartículas foram uniformemente distribuídas no *scaffold* e sua presença melhorou a adesão e crescimento de células HepG2, quando comparado com o material sem a presença das micropartículas de fibroína. Além disso, foi verificado que a presença de fibroína diminuiu a resposta inflamatória do material, melhorando suas características para aplicação na regeneração do tecido hepático.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatassem a utilização de biopolímeros como matriz em biocompósitos com fibroína de seda. Acredita-se que esta limitação esteja relacionada ao fato de que polímeros naturais não podem ser submetidos aos métodos usuais de processamento de polímeros, como a extrusão e injeção. Um dos maiores desafios ligados à biocompósitos contendo fibroína seria justamente o uso de uma matriz biopolimérica, obtendo-se um material completamente natural, biodegradável e ecologicamente correto.

Alguns documentos do estado da técnica aproximam-se da presente invenção em certos aspectos, como o emprego de

fibras de fibroína para a obtenção de materiais com propriedades mecânicas aperfeiçoadas, mas sem apresentar as vantagens oferecidas pela invenção ora descrita.

Por exemplo, no documento EP 2210971-A1, de 28 de julho de 2010 são usados fios de fibroína para a confecção de estruturas tubulares, contendo fibroína trançada na parte interna e externa do tubo, com o objetivo de reparar ligamentos. Adicionalmente, os inventores sugerem que a parte externa do tubo seja recoberta com polímeros biodegradáveis, entre eles o alginato. Este recobrimento é feito por métodos que depositam camadas nanométricas de polímero sobre os fios de fibroína. Este recobrimento pode ser feito para aumentar a proliferação celular. A principal diferença entre o material da presente invenção e o da referida publicação é que em nosso material os fios de fibroína são embebidos em uma matriz de polímero natural com o objetivo de atuar como reforço mecânico, já na referida publicação são depositadas camadas nanométricas de polímero natural em uma trança de fibroína altamente resistente, com o objetivo de melhorar compatibilidade celular.

Na publicação WO 2004/001103 A2, de 31 de dezembro de 2003 são descritas fibras de fibroína obtidas por *electrospinning*. De forma semelhante, a publicação WO

2004/090205 A2, de 21 de outubro de 2004 utiliza alginato para melhorar a viscosidade da solução de fibroína para, através de *spinning*, ser obtida a fibra. Na presente invenção é descrito um método muito mais simples, sem a necessidade de processamento adicional para a obtenção de compósitos com boa dispersão.

A publicação internacional WO 2005034852 A2, de 21 de abril de 2005, descreve a fibroína sendo utilizada como proteína secundária na confecção de coacervados de proteínas com glicosaminoglicanas para diversas aplicações médicas. Além disso, são adicionados neste material diversos agentes farmacológicos, como antibióticos e fatores de crescimento. O alginato é sugerido somente como um aditivo, sem função específica no material. Esta publicação sugere a confecção de um material completamente diferente do material preparado na presente invenção, com diferentes componentes, propriedades e aplicações.

Biomateriais

O termo biomaterial foi definido na Conferência da Sociedade Européia de Biomateriais como "qualquer substância, diferente de uma droga, ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, que pode ser usada por um período de tempo indeterminado, como um todo ou como uma parte de um sistema que trata, melhora ou

substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo" (Williams, 1987). Um conceito complementar ao de biomaterial é a definição de biocompatibilidade, que é a capacidade de um material desempenhar uma resposta apropriada em uma aplicação específica (Remes e Williams, 1992).

O desenvolvimento de um novo biomaterial envolve conhecimentos multidisciplinares como engenharia e ciência dos materiais, biotecnologia e ciências médicas. Um determinado material deve apresentar uma série de características comuns para poder ser aplicado como biomaterial. Ele deve ser biocompatível, ser bioestável, não ser tóxico, inflamatório ou carcinogênico e ter propriedades mecânicas adequadas à sua função (Ratner *et al.*, 2004).

Os biomateriais têm um papel importante na engenharia tecidual, que é a ciência que estuda ou desenvolve processos para sintetizar ou regenerar tecidos e órgãos. Na engenharia tecidual, as células são semeadas *in vitro* e aderidas em uma matriz sintética, que é implantada no paciente. À medida que a matriz se degrada, uma nova matriz natural é produzida pelo organismo, regenerando o tecido ou órgão (Nogueira, 2005).

Os polímeros biodegradáveis têm ampla aplicação na

engenharia tecidual, pois normalmente apresentam um tempo curto de duração e não é necessária sua retirada do organismo, sendo degradados por enzimas ou por hidrólise (Rodas, 2004).

O estudo de polímeros para aplicação em biomateriais vem se desenvolvendo intensamente, sendo o comportamento mecânico do material estudado crucial para determinar o sucesso ou fracasso de sua aplicação. Um dos objetivos principais da ciência dos materiais é controlar as propriedades mecânicas através de modificações na microestrutura cristalina do material. As propriedades biológicas também podem ser modificadas para realçar a especificidade de tecidos, atividade celular e biocompatibilidade (Maskarinec e Tirrell, 2005).

Além disso, o conhecimento da taxa de degradação de biomateriais utilizados como implantes é fundamental, pois a degradação do biomaterial deve coincidir com as necessidades mecânicas e fisiológicas enquanto o novo tecido biológico é formado. Estudos de degradação *in vitro* da fibroína demonstraram que esta é susceptível à degradação biológica quando exposta a enzimas proteolíticas (Monti *et al.*, 2005). A taxa de degradação de materiais derivados da fibroína está diretamente relacionada ao modo de processamento e conteúdo de conformação estável do tipo

folha-β. Já o alginato de sódio não sofre degradação enzimática no organismo e, consequentemente, sua taxa de degradação não pode ser controlada, o que constitui uma desvantagem em aplicações onde o controle da degradação é requerido. A degradação *in vivo* do alginato é um dos maiores problemas relacionados à sua aplicação como dispositivo médico, entretanto, métodos de modificação física e/ou química podem ser usados para controlar sua cinética de degradação (Augst *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004b).

A esterilização também é uma etapa fundamental no desenvolvimento de dispositivos médicos, e a funcionalidade de qualquer sistema de esterilização deve ser determinada através de sua eficácia em exterminar microrganismos, além de sua capacidade de não alterar de forma negativa as propriedades funcionais do material (Vangsness *et al.*, 2006).

Weska (2009) realizou um estudo bastante completo sobre a influência de diferentes métodos de esterilização nas características físicas, químicas e biológicas de membranas de fibroína. Os resultados mostraram que, além de serem eficientes na eliminação de microorganismos, nenhum método ocasionou a degradação das membranas ou a formação de produtos citotóxicos, provando que a fibroína pode ser

esterilizada em condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, o que é pouco comum dentre os biopolímeros. Além disso, quando utilizados etanol 70%, autoclave ou óxido de etileno as membranas tornaram-se mais estáveis e cristalinas, o que pode ser aproveitado quando se deseja uma degradação *in vivo* mais lenta.

Em um estudo sobre métodos de esterilização para soluções de alginato, Leo *et al.* (1990) comparou o efeito da autoclavagem, da radiação gama e da esterilização por óxido de etileno nas propriedades do alginato. Processos térmicos, como a autoclave, acabaram causando a clivagem das cadeias de alginato, deteriorando sua estrutura, uma vez que o alginato é um biopolímero com baixa resistência térmica. A radiação gama causou grande diminuição da viscosidade da solução, o que indica que houve a quebra de suas moléculas e conseqüente degradação. Dentre os métodos estudados, o mais adequado foi a esterilização por óxido de etileno, no entanto, alguns cuidados devem ser tomados, uma vez que o óxido de etileno pode reagir quimicamente com o material esterilizado, além de ser um gás tóxico e cancerígeno, o que leva à necessidade de um procedimento de areação subseqüente à esterilização a fim de se evitar efeitos tóxicos residuais (Weska, 2009).

Para a regeneração da pele, os biomateriais

normalmente se apresentam na forma de filmes, espumas, géis ou compósitos e devem apresentar como características fundamentais leveza, ausência de odor, impermeabilidade a microorganismos, permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, devem ser adequados ao manuseio e resistentes ao rasgo e à tração, além de serem biodegradáveis e não produzirem reações inflamatórias (Rodas, 2004; Dallan, 2005).

Existem relatos do uso de fios de fibroína por cirurgiões no recobrimento de feridas há pelo menos 3000 anos. Esforços têm sido feitos para desenvolver curativos de alto desempenho usando fibroína de seda devido à sua biocompatibilidade e efeitos cicatrizantes. A fibroína apresenta baixa resposta inflamatória quando em contato com o ferimento, enquanto que gases de algodão, comumente utilizadas, podem causar inflamação e inibir a cicatrização. Curativos a base de fibroína podem ser fabricados utilizando uma larga variedade de métodos de processamento e formas do curativo, como filmes ou esponjas (Ki *et al.*, 2009). Além disso, a fibroína possui boa permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, compatibilidade sanguínea e acelera a formação de colágeno e proliferação de fibroblastos (Kweon *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o alginato tem sido utilizado como

material para a fabricação de produtos para cicatrização úmida (*moist healing*) na forma géis, espumas e não-tecidos fibrosos que são usados para cobrir os ferimentos. O alginato pode ser usado tanto na forma seca, com o objetivo de absorver fluido da ferida, ou na forma de gel hidratado, fornecendo umidade ao ferimento seco. Em ambos os casos, a interação entre o curativo de alginato e a superfície do ferimento cria um ambiente com umidade ideal para a cicatrização, uma vez que em ambientes úmidos a migração de células epiteliais das extremidades da ferida para o seu centro é mais rápida do que quando os ferimentos são mantidos em um ambiente seco (Qin, 2008). Já existem curativos de alginato comercializado como o AlgiDERM® e o Sorbsan®, confeccionados a partir de fibras de alginato de cálcio esterilizadas (Rinaudo, 2006).

Apesar do potencial de aplicação na regeneração da pele, membranas de fibroína de seda e alginato juntos foram pouco estudadas na literatura, sendo que estes dois biopolímeros são bastante promissores para aplicações biomédicas.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

Constitui um objetivo da presente invenção fornecer blendas poliméricas sólidas compreendendo uma mistura de fibroína e alginato.

Constitui outro objetivo da invenção o fornecimento de compósitos de fibras de fibroína dispersas em uma matriz polimérica de origem natural.

Constitui mais um objetivo da presente invenção fornecer artigos médicos, compreendendo o polímero ou o compósito da presente invenção, bem como uma mistura dos mesmos.

Outro objetivo da presente invenção é fornecer um sistema para imobilização de células compreendendo a blenda polimérica ou o compósito da presente invenção, bem como uma mistura dos mesmos.

Constitui outro objetivo da presente invenção o fornecimento de sistemas de liberação controlada de princípios ativos compreendendo a blenda polimérica ou o compósito da presente invenção, bem como uma mistura dos mesmos.

Constituem mais um objetivo da presente invenção processos para a fabricação dos polímeros e blendas aqui descritos.

Constituem outro objetivo da presente invenção processos para a fabricação dos compósitos aqui descritos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras a seguir fazem parte do presente relatório e estão aqui incluídas a fim de ilustrar determinados

aspectos da invenção. O objeto da presente invenção pode ser mais bem entendido com referência a uma ou mais dessas figuras, em combinação com a descrição detalhada da modalidade preferida aqui apresentada.

A Figura 1 é uma micrografia óptica de luz transmitida da blenda alginato:fibroína na proporção mássica de 75:25 feita com alginato dissolvido em água obtido em testes preliminares.

A Figura 2 é uma fotografia da membrana da blenda alginato:fibroína na proporção mássica de 75:25 compreendendo glicerina como plastificante.

Na Figura 3 são apresentadas micrografias eletrônicas de varredura da superfície (a) e da superfície de fratura (b) das membranas da blenda (1), fibroína pura (2) e alginato puro (3).

Na Figura 4 são apresentados difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 24 h de tratamento.

Na Figura 5 são apresentados difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), sem tratamento.

Na Figura 6 são apresentados difratogramas de raios X para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c), após 2 h de tratamento.

A Figura 7 apresenta espectros de infravermelho para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c).

A Figura 8 apresenta o perfil típico de tensão *versus* deformação para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c). Esta figura não se refere à média dos valores de tensão e deformação apresentados por todas as amostras analisadas, e sim ao perfil apresentado por uma amostra específica, que representasse bem o conjunto de amostras.

A Figura 9 mostra termogramas de calorimetria exploratória diferencial para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c). São mostradas somente as curvas referentes ao segundo aquecimento realizado em cada amostra (temperatura ambiente a 500 °C). Também vale ressaltar que os valores de DSC (mW) foram normalizados dividindo-os pela massa inicial em cada análise. Isto é feito para que se tenha uma dimensão mais real da intensidade dos picos apresentados.

A Figura 10 é o gráfico representando as curvas termogravimétricas das membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c).

A Figura 11 é o gráfico representando as curvas de massa residual diferencial para as membranas de fibroína (a), blenda (b) e alginato (c).

A Figura 12 apresenta curvas termodinamicomecânicas da

membrana da blenda, representadas pelo módulo de armazenamento (a), módulo de perda (b) e tanδ (c).

A Figura 13 é uma representação da viabilidade celular das membranas de fibroína, blenda e alginato.

A Figura 14 é um histograma de viabilidade celular das membranas da blenda para o extrato não diluído.

Na Figura 15 são mostradas fotografias e micrografias (MEV) das membranas de compósito com 20% (a), 40% (b) e 60% de fios de fibroína (c).

A Figura 16 mostra o perfil típico de força em ensaio de tração em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda para as membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

A Figura 17 é uma representação esquemática e fotografias das amostras utilizadas para o teste de propagação do rasgo.

A Figura 18 mostra o perfil típico de força em ensaio de propagação do rasgo em compósitos de alginato de sódio reforçados com fios de fibroína de seda para as membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

A Figura 19 apresenta termogramas de DSC para as membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c)

e 60% de fios de fibroína (d).

A Figura 20 é o gráfico das curvas termogravimétricas das membranas de alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

A Figura 21 é o gráfico das curvas de massa residual diferencial para as membranas alginato (a) e compósitos com 20% (b), 40% (c) e 60% de fios de fibroína (d).

A Figura 22 é uma representação gráfica da viabilidade celular das membranas de alginato e dos diferentes tipos de compósitos.

Na Figura 23 encontra-se um histograma de viabilidade celular das membranas do compósito para o extrato não diluído.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere, em uma modalidade, a uma mistura polímeros naturais, compreendendo fibroína e alginato, possuindo propriedades físicas e mecânicas conjugadas dos dois polímeros. Tais misturas poliméricas são também conhecidas como blendas e são formadas devido a interações eletrostáticas entre seus constituintes, sem a ocorrência de reações químicas entre os mesmos. As interações secundárias entre as moléculas de alginato e fibroína resultam em uma organização macromolecular onde as moléculas de fibroína são organizadas na forma de glóbulos

microscópicos, distribuídos homogeneamente em uma matriz polimérica de alginato.

Particularmente, a presente invenção descreve a mistura de polímeros conforme acima caracterizados obtidos sob forma sólida e homogênea, proporcionando melhor maleabilidade para a formação de diversos materiais, preferivelmente membranas.

Mais particularmente, a presente invenção descreve blendas poliméricas compreendendo uma mistura de alginato e fibroína, onde a proporção de alginato pode variar de 1 a 99%, mais preferivelmente de 20 a 80% e mais preferivelmente de 25 a 75% em massa.

Mais particularmente, a presente invenção descreve blendas poliméricas compreendendo uma mistura de alginato e fibroína, onde a proporção de fibroína varia de 1 a 99%, preferivelmente de 20 a 80% e mais preferivelmente de 25 a 75% em massa.

Em particular, a presente invenção descreve blendas poliméricas compreendendo uma mistura de alginato e fibroína, conforme descrita nas modalidades acima, compreendendo ainda um plastificante. Exemplos de plastificantes que podem ser utilizados para a obtenção dos polímeros da presente invenção podem ser selecionados do grupo consistindo em plastificantes baseados em ftalatos,

plastificantes adípicos, plastificantes trimelitatos, plastificantes maleatos, plastificantes sebacatos, plastificantes benzoatos, óleos vegetais, sulfonamidas, fosfatos, glicolenos, plastificantes poliméricos, glicerina e outros existentes no estado da técnica.

Em outra modalidade, a presente invenção se refere a compósitos compreendendo fibras de fibroína dispersas em uma matriz polimérica de origem natural. Particularmente, a matriz polimérica de origem natural pode ser uma matriz de carboidrato, proteína ou graxa, como ácido algínico, alginato, quitina, quitosana, ácido hialurônico, celulose, colágeno, queratina, gelatina, cutina, suberina, entre outros, ou uma mistura dos mesmos. Preferivelmente, a matriz utilizada é alginato.

Mais particularmente, o alginato utilizado nas diversas modalidades da presente invenção é selecionado do grupo compreendendo alginato de sódio, alginato de potássio, alginato de cálcio, alginato de lítio, alginato de amônio ou outros sais inorgânicos.

Mais particularmente, os compósitos da presente invenção compreendem entre 1 e 99% de fios de fibroína, preferivelmente entre 20 e 80%, mais preferivelmente entre 20 e 60% em massa.

Mais preferivelmente, os fios ou fibras de fibroína

utilizados para a obtenção dos compósitos da presente invenção são distribuídos uniformemente na matriz polimérica.

Particularmente, as blendas e compósitos da presente invenção são estáveis em soluções aquosas. Mais particularmente, as blendas e compósitos da presente invenção não apresentam citotoxidade.

Em outra modalidade, a presente invenção se refere a biomateriais, como artigos médicos, compreendendo as blendas poliméricas e compósitos ora descritos, bem como misturas dos mesmos. Particularmente, os artigos médicos podem ser selecionados do grupo compreendendo próteses, implantes, curativos, lentes e aparelhos e instrumentos odontológicos e cirúrgicos.

Particularmente, a presente invenção se refere a sistemas de imobilização celular compreendendo as blendas poliméricas e compósitos ora descritos, bem como misturas dos mesmos.

Particularmente, a presente invenção se refere a sistemas de liberação controlada de princípios ativos compreendendo as blendas poliméricas e compósitos aqui descritos, bem como misturas dos mesmos. Particularmente, os sistemas de liberação controlada da presente invenção podem compreender um princípio ativo selecionado do grupo

consistindo em fármaco, cosmético, perfume, pigmento, alvejante, higienizador, nutriente e gases.

A presente invenção refere-se ainda aos processos de obtenção de blendas poliméricas presentemente descritas. Preferivelmente, o processo presentemente descrito compreende as etapas de:

- preparar uma solução de alginato e uma base inorgânica forte;
- adicionar um plastificante à solução de alginato e base;
- adicionar uma solução de fibroína à solução de alginato e plastificante; e
- evaporar o solvente do sistema.

A presente invenção se refere também a processos para a produção dos compósitos ora descritos. Preferivelmente o referido processo compreende as etapas de:

- preparar uma solução de alginato e uma base inorgânica forte;
- adicionar um plastificante à solução de alginato e base;
- cortar fibras de fibroína uniformemente;
- adicionar as fibras de fibroína à solução de alginato de sódio e plastificante em base; e
- evaporar o solvente do sistema.

Particularmente, a solução de base forte utilizada em ambos os processos possui um pH de 7 a 14, preferivelmente de 8 a 13, mais preferivelmente de 9 a 11. Mais particularmente, a solução de base forte utilizada é uma solução de NaOH, KOH e LiOH, ou qualquer outra solução de base inorgânica forte.

Particularmente as soluções de alginato e fibroína de ambos os processos são utilizadas em uma razão de alginato:fibroína de 1:99 a 99:1 em massa, preferivelmente de 20:80 a 80:20 e mais preferivelmente de 20:75 a 75:25 em massa.

Particularmente, o plastificante é adicionado em uma razão de 0,5:1 a 1:0,5 em relação à massa do polímero total, preferivelmente de 0,75:1, mais preferivelmente de 1:1. Mais particularmente, os plastificantes que podem ser utilizados nos processos de obtenção dos polímeros da presente invenção podem ser selecionados do grupo consistindo em plastificantes baseados em ftalatos, plastificantes adípicos, plastificantes trimelitatos, plastificantes maleatos, plastificantes sebacatos, plastificantes benzoatos, óleos vegetais, sulfonamidas, fosfatos, glicolenos, plastificantes poliméricos, glicerina e outros existentes no estado da técnica.

Particularmente, os processos da presente invenção

compreendem uma etapa de estabilização das blendas e compósitos. Preferivelmente etapa de estabilização compreende o contato do material formado com uma solução de ácido inorgânico forte em um solvente orgânico. Mais preferivelmente, o ácido inorgânico forte é selecionado do grupo compreendendo ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido perclórico e ácido sulfúrico. Mais preferivelmente, o solvente orgânico é selecionado do grupo compreendendo alcoóis e cetonas de 1 a 5 carbonos ou uma mistura dos mesmos. Mais preferivelmente, o solvente orgânico utilizado é selecionado do grupo compreendendo metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, *terc*-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, isopentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-3-butanol, propanona, butanona, butadiona e pentanona.

Preferivelmente, o material formado nos processos presentemente descritos fica em contato com a solução estabilizadora de 2 a 24 horas.

EXEMPLOS

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

Preparo das soluções de fibroína e alginato

Solução de fibroína

Inicialmente foi necessário fazer a remoção da sericina dos casulos do bicho-da-seda. Cada 50 g de casulos foram lavados em 600 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 1 g/L, durante 30 min, em banho termostatizado, à temperatura de 85 °C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, os fios de fibroína obtidos foram lavados com água destilada em abundância. Os fios foram secos a temperatura ambiente por 24 a 48 h (Li *et al.*, 2002).

Os fios secos e livres de sericina foram moídos em moinho de rotor tipo ciclone (TE-651/2, Tecnal) até fração passante na peneira mesh nº 10 (partícula com 2 mm de diâmetro) para facilitar sua dissolução. Para cada 5 g de fios moídos foram adicionados 100 mL de solução ternária de cloreto de cálcio, etanol e água ($CaCl_2$:CH_3CH_2OH:H_2O 1:2:8 molar) e a suspensão obtida foi mantida a 85 °C em banho termostatizado até dissolução completa dos fios da seda por, no máximo, 1 h e 30 min (Um *et al.*, 2001).

A solução salina de fibroína a 5% (m/v) foi dialisada em água destilada por 3 dias, a 10 °C, para a remoção do cálcio presente na solução. A água da diálise foi trocada a cada 24 h, na proporção volumétrica solução de fibroína:água de 1:15 (Nogueira, 2005). Ao final da diálise

obteve-se uma solução a 2,5% m/v, que foi diluída em água destilada até a concentração final de 2%.

Solução de alginato

O alginato de sódio foi dissolvido em NaOH 0,1 M a fim de se obter uma solução em concentração de 2% m/v. A solução foi deixada em repouso por 4 dias e agitada no último dia para completa dissolução. A solução obtida era homogênea e sem partes insolúveis (Paiva, 2009).

Preparo das blendas de fibroína de seda e alginato

Foram testadas diversas formulações para as blendas até serem obtidas membranas adequadas mecanicamente (manuseáveis) e sem separação macroscópica de fases. A Tabela 1, a seguir, mostra um resumo das membranas de blendas obtidas em testes preliminares e suas características.

Tabela 1: Resumo dos testes preliminares de formação da blenda.

Blendas	**Propriedades observadas**
Fibroína com alginato de sódio dissolvido em H_2O – formação da blenda sob agitação de 800 rpm	Gelificação da solução de fibroína devido à alta taxa de cisalhamento (Matsumoto *et al.*, 2008)
Fibroína com alginato de sódio dissolvido em H_2O – formação da blenda sob	Dificuldade de homogeneização, membrana quebradiça e formação de fibrilas em todas as

agitação de 200 rpm	proporções testadas
Fibroína com alginato de sódio dissolvido em H_2O com glicerina como plastificante (200 rpm)	Dificuldade de homogeneização, aumento da formação de fibrilas (Figura 1)
Fibroína com alginato de sódio dissolvido em NaOH (200 rpm)	Membranas muito quebradiças, de difícil manuseio e com formação de fibrilas
Fibroína com alginato de sódio dissolvido em NaOH com glicerina como plastificante (200 rpm)	Em proporções de fibroína acima de 50% foi observada formação de fibrilas. Membrana com 25% de fibroína apresentou melhores propriedades e foi escolhida para demais análises no decorrer do trabalho

Verifica-se através das observações mostradas na Tabela 1 que as blendas confeccionadas com alginato de sódio dissolvido em água apresentaram dificuldade de homogeneização (a fibroína formava uma película sobre a camada de alginato) e formação de fibrilas em todas as proporções testadas. A figura 1 apresenta a micrografia óptica de luz transmitida das blendas obtidas a partir das soluções aquosas puras.

Quando utilizado o alginato de sódio dissolvido em NaOH era visível a boa interação entre os biopolímeros. Isto ocorre porque em valores de pH básicos, as interações

fibroína-fibroína são enfraquecidas, havendo predominância de conformação seda I, com sítios ativos mais expostos (Du *et al.*, 2009), o que favorece sua interação com as moléculas do alginato. Quando utilizado o alginato dissolvido em água, a mistura fibroína-alginato apresenta valor de pH que favorece a interação fibroína-fibroína, com isso, a interação fibroína-alginato é prejudicada, fato confirmado pela dificuldade de mistura observada nos experimentos e pela formação de fibrilas de fibroína devido à elevada interação entre suas moléculas.

A influência do pH na interação entre as moléculas de fibroína pode ser confirmada pelo fato de que, baixando o pH de uma solução aquosa de fibroína (pH = 7) a solução começa a ficar gradualmente mais viscosa e turva, até atingir o ponto em que a interação fibroína-fibroína é tão forte que a solução gelifica (pH = 5) (Kim *et al.*, 2004). Neste estágio tem-se uma estrutura sólida, com predominância de conformação estável (seda II).

As membranas confeccionadas com o alginato dissolvido em NaOH, embora possuindo características aperfeiçoadas frente àquelas obtidas pela solução de alginato em água pura, mostraram-se bastante quebradiças, com baixa resistência mecânica, rompendo até mesmo no manuseio. Além disso, quando utilizada quantidade de fibroína acima de 50%

era observada a formação de fibrilas devido à separação de fases, muito semelhante às obtidas nas membranas das blendas com alginato dissolvido em água destilada.

Desta maneira, a adição de um plastificante nas membranas é fundamental para a obtenção de membranas possíveis de serem manuseadas. O plastificante utilizado nos exemplos da presente invenção foi a glicerina.

A membrana alginato:fibroína 75:25 adicionada de glicerina era homogênea, sem indícios de separação de fases e maleável, como se pode perceber na Figura 2. Portanto, esta blenda foi escolhida para o estudo e realização de todas as análises apresentadas.

Para o preparo das blendas foi primeiramente adicionada glicerina na solução de alginato a 2%. A mistura foi agitada em agitador magnético por aproximadamente 10 minutos, para permitir a homogeneização da glicerina no alginato. Após, a solução de fibroína a 2% foi lentamente adicionada à mistura de alginato com glicerina, em agitador magnético a 200 rpm, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A solubilização das fases foi instantânea, não havendo dificuldade de homogeneização. Para a obtenção das membranas, 55 mL da blenda foram vertidos em placa de poliestireno (d = 14 cm) e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente.

Foram testadas diferentes proporções alginato:fibroína como 25:75, 50:50 e 75:25, em massa, respectivamente. A membrana da blenda que apresentou melhores propriedades continha 25% de solução de fibroína e 75% de solução de alginato, mais a glicerina adicionada ao alginato, sendo que todas as caracterizações apresentadas nesta descrição se referem a esta blenda.

Também foram feitas membranas dos componentes puros (55 mL de solução 2% em placas de poliestireno de 14 cm de diâmetro) para ser possível uma comparação entre estes e a blenda, sendo que a membrana de alginato sempre continha a mesma quantidade mássica de glicerina que a blenda. Isto foi feito para que as comparações fossem feitas entre: membrana de fibroína, membrana de alginato + glicerina, denominada somente como "alginato" e membrana da blenda contendo 25% de fibroína e 75% de alginato + glicerina, denominada como "blenda".

A quantidade de glicerina presente nas membranas de alginato e da blenda foi fixada em uma relação 1:1 massa seca total de biopolímero:massa de glicerina PA.

Tratamento das membranas

Verificou-se que as membranas de alginato, de fibroína e da blenda eram solubilizadas quando imersas em água. A fim de tornar estas membranas mais estáveis foi feito um

estudo para verificar qual o melhor tratamento a ser utilizado, sendo que o tratamento deveria estabilizar tanto a fibroína quanto o alginato.

Foram feitos testes utilizando três diferentes soluções. Pedaços de aproximadamente 2 cm de diâmetro das membranas de fibroína, alginato e da blenda foram imersas em 100 mL em cada uma das soluções teste por 24 horas e imersas em 100 mL de água ultra pura por mais 24 h. Após este tempo foi observado se a membrana permanecia com sua estrutura íntegra ou se haviam pontos de solubilização. Os resultados dos tratamentos utilizados são apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Resultados dos testes de estabilização das membranas.

	Solução de tratamento		
Membrana	Etanol 70%	H_2SO_4 0,1 M em etanol 50%	$CaCl_2$ 5%
Fibroína	Íntegra	Íntegra	Íntegra
Alginato	Solúvel	Íntegra	Íntegra
Blenda	Parcialmente solúvel	Íntegra	Parcialmente solúvel

Portanto, após os testes realizados, verificou-se que o H_2SO_4 0,1 M em etanol 50% foi o melhor tratamento, estabilizando todas as membranas testadas. Este tratamento foi escolhido como padrão para as membranas utilizadas no

decorrer deste trabalho.

A solução de etanol 70% mostrou-se adequada para o tratamento das membranas de fibroína e da blenda, porém não foi capaz de estabilizar a membrana de alginato, que necessita da presença de íons para sua reticulação. Já a solução de cloreto de cálcio estabilizou tanto a membrana de fibroína quanto a membrana de alginato, porém a membrana da blenda mostrou-se solúvel. Isto deve ter ocorrido devido a alguma competição dos íons cálcio para reticular o alginato e desta maneira, as possíveis ligações da blenda entre a fibroína e o alginato foram enfraquecidas, desestabilizando sua estrutura e permitindo a solubilização da membrana.

Apesar do melhor resultado de estabilidade em água no tratamento com H_2SO_4 0,1 M em etanol 50%, observou-se perda de glicerina na blenda. Uma solução para o problema foi a adição de glicerina à solução de tratamento na mesma quantidade presente na membrana. Desta maneira ocorreu uma menor transferência de massa de glicerina da membrana para o meio, uma vez que o meio continha moléculas do plastificante.

Caracterizações

Microscopia óptica

Após secas, as membranas da blenda foram analisadas em

microscópio óptico E-200 (Nikon) a fim de verificar a ocorrência de separação de fases macroscópica na superfície das mesmas. Após as membranas terem sido obtidas por evaporação do solvente, as mesmas foram cortadas em pedaços com aproximadamente 1 cm de diâmetro, em regiões que apresentavam separação de fases e então analisadas no microscópio óptico.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica consiste na varredura da superfície da amostra através de um feixe de elétrons e permite verificar a morfologia e superfície das membranas. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura da marca LEO 440i, com corrente de 50 pA e tensão de 10 kV. Após terem sido secas a temperatura ambiente, as membranas de alginato, fibroína e da blenda foram congeladas com nitrogênio líquido, fraturadas, liofilizadas por 24 h e recobertas com ouro para realização da microscopia.

As membranas dos componentes puros (fibroína e alginato) apresentaram morfologia típica de membranas densas poliméricas, com fratura densa e homogênea. As irregularidades apresentadas na superfície da membrana de alginato devem-se à remoção dos cristais formados na superfície da membrana devido ao NaOH utilizado na solução de alginato.

Foi observado que a blenda apresentou a formação de estruturas globulares em toda sua superfície e também no interior da membrana. Estas estruturas apresentaram formato esférico bastante regular, com tamanho variando de 10 a 1 μm de diâmetro, aproximadamente.

A figura 3 apresenta as micrografias obtidas por MEV para as membranas de fibroína, blenda e alginato.

Difração de raios X (DRX)

Os dados do difratograma podem ser correlacionados para calcular as distâncias interplanares médias entre as cadeias poliméricas, utilizando a Lei de Bragg (Equação 1):

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot sen\theta \quad (1)$$

onde: λ é o comprimento de onda do feixe de raios X, 1,54 Å e d é a distância interplanar (Å).

Verifica-se na Figura 4 que tanto a membrana de fibroína como a membrana de alginato apresentaram halos de cristalinidade típicos. A fibroína apresentou halos em 2θ = 14°, 16,8°, 18,5° e 20°, sendo os dois últimos de menor intensidade. Estes halos estão associados à estrutura seda II, mais organizada e cristalina, e correspondem às distâncias interplanares de 6,32, 5,27, 4,79 e 4,43 Å, respectivamente (Li *et al.*, 2002; Freddi *et al.*, 1997). Já o alginato apresentou halos característicos de sua estrutura em 2θ = 13,7°, 16,7° e 20,7°, correspondendo a

6,45, 5,30 e 4,28 Å, respectivamente (Lee *et al.*, 2004a; Xiao *et al.*, 2001).

A membrana da blenda apresentou difratograma completamente amorfo. Isto indica que a formação da blenda e de suas estruturas globulares se dá de maneira amorfa, ou seja, as estruturas cristalinas dos dois biopolímeros não interagem uma com a outra e as interações intermoleculares ocorrem somente na região amorfa. Mesmo após tratamento em H_2SO_4 e etanol, que serviriam para aumentar o nível organizacional e, consequentemente, a cristalinidade dos biopolímeros, a estrutura amorfa da blenda permanece inalterada. Este perfil confirma o fato de que a formação dos glóbulos na blenda ocorre com conformação estrutural seda I e para que isto ocorra é fundamental a presença de um componente hidrofílico, como é o caso do alginato (Jin e Kaplan, 2003).

Também foram feitos os difratogramas das membranas sem tratamento para estabilização, a fim de verificar se suas estruturas previamente ao tratamento realmente estavam amorfas e após 2 horas de tratamento, para verificar possíveis alterações na membrana de alginato, já que a mesma apresentou-se solúvel neste tempo de tratamento (Figuras 5 e 6).

Conforme apresentado na Figura 5, verifica-se que a

fibroína apresentou-se completamente amorfa sem a presença de halos de cristalinidade, conforme esperado, uma vez que não foi realizado tratamento para tornar esta membrana mais cristalina. Os difratogramas do alginato e da blenda apresentaram halo pouco pronunciado em $2\theta = 21°$, com perfil típico de substâncias amorfas.

Nas membranas tratadas com H_2SO_4 0,1M em etanol 50% por 2 horas (Figura 6) o alginato apresenta difratograma de material bastante amorfo, principalmente se compararmos com o difratograma do alginato tratado por 24 horas (Figura 5). Isto confirma o fato de que em 2 horas de tratamento as cadeias do alginato ainda não estão organizadas de maneira a ter-se um material estável e insolúvel em água. Acredita-se que este tempo de estabilização mais elevado do alginato não aconteça devido a barreiras difusionais, mas sim ao tempo necessário para que ocorra o rearranjo estrutural das cadeias do alginato de forma mais estável e cristalina.

Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

Para o caso da fibroína, a localização das bandas de amida permite identificar a conformação da estrutura secundária da mesma. Foi utilizado o equipamento MB 102, da Bomem, com acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, na faixa de 650 a 4000 cm^{-1}. Através do uso do acessório ATR, buscou-se dados da superfície da

membrana, como bandas de absorção que indicassem a interação entre os materiais estudados.

A espectroscopia de infravermelho fornece informações a respeito da conformação molecular da fibroína de seda, com bandas de absorção específicas associadas aos grupamentos amida das proteínas. As bandas de amida I, II e III são atribuídas ao estiramento C=O, à deformação N-H e ao dobramento O-C-N, respectivamente (Weska, 2009). A tabela a seguir apresenta os comprimentos de onda das bandas de amida I, II e III que podem ser associados às conformações seda I (enovelamento aleatório ou hélice-α) ou seda II (folha-β).

Tabela 3: Bandas de amida e comprimentos de onda das conformações seda I e seda II da fibroína.

	Número de onda (cm^{-1})	
	Seda I	**Seda II**
Amida I	1660	1630
Amida II	1540	1515
Amida III	1230	1260

A Figura 7 apresenta o espectro de infravermelho obtido para as membranas de fibroína, blenda e alginato.

Tabela 4: Principais picos obtidos nas membranas de fibroína, blenda e alginato.

Fibroína	Blenda	Alginato	Atribuição
-	1731,9	1731,9	Estiramento C=O
1616,2	1622,0	1635,5	Sobreposição Amida I e estiramento -COO- assimétrico
1508,2	1521,7	-	Amida II
1228,5	1236,2	1238,2	Sobreposição Amida III e estiramento C-O
-	1080,0	1076,2	Estiramento O-H
-	1029,9	1027,9	Estiramento O-H
-	927,7	927,7	Vibração C-O

Analisando a Tabela 4, verifica-se que a membrana de fibroína pura apresentou espectro com predominância de estrutura folha-β (seda II), com picos das bandas de amida I e II localizados em 1616,2 e 1508,2 cm^{-1}, respectivamente. Já a banda de amida III apresentou pico em 1228,5 cm^{-1}, atribuído à conformação seda I.

A membrana da blenda apresentou espectro semelhante ao espectro da membrana de alginato. Ainda assim foi possível detectar a presença dos picos das bandas de amida I, II e III, que foram deslocados para valores de número de onda ligeiramente superiores aos da membrana de fibroína pura. A membrana da blenda também apresentou predominância de conformação seda II, porém o deslocamento dos picos seria

um indicativo de uma estrutura mais amorfa, seda I.

Nos números de onda referentes às bandas de amida I e III ocorre a sobreposição dos picos com estiramentos característicos do alginato, o que pode ocasionar erros na avaliação do espectro da blenda. Porém, a banda de amida II é claramente visualizada no espectro da blenda em 1521,7 cm^{-1}, região onde não há qualquer pico de absorção da membrana de alginato.

A membrana de alginato apresentou pico na região de 1710-1740 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C=O, em 1238,2 cm^{-1} ao estiramento C-O e em 1027,9 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação O-H (Paiva, 2009), sendo que este pico é bastante pronunciado principalmente devido à presença da glicerina, que fornece um aumento na quantidade de ligações O-H presentes. A membrana de alginato apresentou espectro de acordo com a literatura (Caykara *et al.*, 2005), onde os autores estudaram a interação de blendas de alginato de sódio e poli(óxido de etileno).

A presença de dois picos na região de 1100 a 1000 cm^{-1} é atribuída à deformação OH e está diretamente associada com a presença de ácido algínico livre na membrana. Esta banda pode ser associada às ligações por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares do alginato, sendo mais pronunciada com o aumento da concentração de ácido

sulfúrico, utilizado para transformar o alginato em ácido algínico livre, insolúvel em água (Huang *et al.*, 2000).

Intumescimento em água

As membranas da blenda foram cortadas em pedaços de 2,5 cm de diâmetro e mantidas em ambiente com umidade relativa de 50% por 48 h, tempo necessário para atingir o equilíbrio. Sua espessura foi medida imediatamente antes da realização do teste em micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo), com precisão de 0,001 mm.

As amostras foram então pesadas (m_i), imersas em 100 mL de água destilada e pesadas em períodos pré-determinados de tempo até o equilíbrio (m_f). Foram montadas as curvas cinéticas de intumescimento das amostras e verificado o grau de intumescimento final das membranas. A espessura das membranas após o teste de intumescimento também foi medida.

O grau de intumescimento foi determinado em função da massa inicial e final da amostra pela Equação 2:

$$GI = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \cdot 100\% \qquad (2)$$

onde: GI é o grau de intumescimento.

m_f é a massa final úmida (g)

m_i é a massa inicial seca (g)

A Tabela a seguir apresenta os resultados do grau de

intumescimento para as membranas de fibroína, alginato e da blenda.

Tabela 5: Grau de intumescimento das membranas de fibroína, blenda e alginato.

	Grau de Intumescimento (%)*
Fibroína	59,53 ± 5,34
Blenda	220,94 ± 13,21
Alginato	310,61 ± 6,34

* Média ± desvio médio (n=3).

Verifica-se que a membrana de fibroína apresenta intumescimento bastante baixo quando comparada com a membrana de alginato, e que a membrana da blenda apresentou comportamento intermediário entre as duas. O valor do grau de intumescimento apresentado pela membrana de alginato está bastante superior ao encontrado na literatura (em torno de 80%), porém neste estudo os autores fazem a reticulação do alginato com solução de $CaCl_2$ (Remunanlopez e Bodmeier, 1997). Este resultado indica que o tratamento do alginato em H_2SO_4 0,1 M em etanol 50 % é capaz de estabilizar suas cadeias, porém não exerce influência sobre a força coesiva das moléculas do alginato, permitindo um intumescimento elevado quando comparado com outras maneiras de estabilização. O grau de intumescimento do alginato de

sódio é influenciado pela extensão da reticulação. Menor intumescimento está associado à maior grau de reticulação, pois a reticulação diminui a quantidade de sítios hidrofílicos disponíveis. Variando fatores como tipo de reticulante, concentração do reticulante e tempo de reticulação, tem-se diferentes valores de intumescimento e também de permeabilidade ao vapor d'água (Remunanlopez e Bodmeier, 1997; Furuyama Lima *et al.*, 2007).

O grau de intumescimento está diretamente ligado à mobilidade das cadeias poliméricas. As moléculas do polímero retêm água, afastando suas cadeias e, consequentemente, aumentando sua mobilidade. Sabe-se também que a água é um ótimo plastificante para alguns polímeros, e isto está relacionado à capacidade de retenção de água. Quanto mais água o polímero é capaz de reter (maior grau de intumescimento), maior será o afastamento molecular e maior o efeito plastificante da água (Rabello, 2000; Olivas e Barbosa-Canovas, 2008).

O alginato de sódio é um polissacarídeo altamente hidrofílico devido aos grupos carboxila e hidroxila presentes em sua estrutura, que conferem um intumescimento significativo quando a membrana de alginato é imersa em água (Kalyani *et al.*, 2008).

Já a fibroína possui em sua estrutura aminoácidos

hidrofóbicos e, após o tratamento realizado com o H_2SO_4, se encontra em uma forma altamente estável e organizada. A estrutura folha-β não permite o intumescimento e afastamento molecular, fato confirmado pela baixa plastificação pela água das membranas de fibroína quando comparadas com as membranas de alginato.

Uma propriedade das membranas que está diretamente relacionada com o grau de intumescimento é a espessura. Com a retenção de água pela membrana, a mesma acaba inchando e isto pode ser quantificado através da relação entre a espessura inicial e final da membrana. A tabela a seguir apresenta os valores de espessura das membranas de fibroína, da blenda e de alginato.

Tabela 6: Relação de espessura das membranas da blenda em teste de intumescimento em água.

	Espessura Inicial* (e_i) (mm)	**Espessura Final* (e_f) (mm)**	**Relação (e_f/e_i)****
Fibroína	0,024 ± 0,002	0,032 ± 0,005	1,336 ± 0,193
Blenda	0,033 ± 0,001	0,105 ± 0,005	3,180 ± 0,019
Alginato	0,031 ±	0,145 ±	4,674 ± 0,144

	0,004	0,016	

* Média ± desvio médio (n=5).

** Média ± desvio médio (n=3).

Verifica-se que a blenda teve comportamento intermediário na relação de espessura, mais voltada para o alginato, uma vez que este biopolímero está presente em maior proporção na blenda. O aumento de espessura da membrana de alginato foi aproximadamente 4 vezes maior que o da membrana de fibroína, o que confirma os resultados obtidos em relação ao grau de intumescimento das mesmas.

Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada de acordo com ASTM E 96/E 96M (2005). O aparato utilizado consiste em um recipiente de acrílico de 500 mL (célula 1), hermeticamente fechado, no interior do qual é colocada outra célula de acrílico (célula 2), com volume interno de 30 mL e abertura de 15,20 cm^2 (área de permeação), na qual é fixada a membrana a ser permeada. No interior da célula 1 é colocada solução saturada de NaCl, a fim de manter o ambiente com umidade relativa de 75%, e no interior da célula 2 é colocado cloreto de cálcio anidro granulado, material dessecante. A célula 2 foi pesada a cada 12 h por 5 dias, sendo o aparato acondicionado à temperatura

ambiente. O aumento de massa da célula 2 com o tempo corresponde à taxa de permeabilidade da membrana ao vapor d'água. Previamente à realização do teste as membranas foram acondicionadas por 48 h em ambiente com 50% de umidade relativa. Ao final do teste foi medida a espessura das membranas em micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo), com precisão de 0,001 mm.

Os dados de ganho de massa com o tempo foram ajustados a uma reta, sendo o coeficiente linear desta reta a taxa de variação de massa do sistema. As Equações 3 e 4 apresentam o cálculo para a transmissão de vapor d'água e a permeabilidade ao vapor d'água das membranas, respectivamente.

$$TVA = \frac{\left(G/t\right)}{A} \qquad (3)$$

$$PVA = \frac{\left(G/t\right) \cdot e}{A \cdot \Delta p} \qquad (4)$$

onde: TVA é o coeficiente de transmissão do vapor d'água (g/m².dia)

PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (g.mm/m².dia.kPa)

G/t é a taxa de variação de massa do sistema (g/dia)

e é a espessura da membrana (mm)

A é a área permeada da membrana (m²)

Δp é a diferença de pressão parcial do vapor d'água dos lados da membrana (kPa)

A Tabela 7 apresenta os valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água apresentados pelas membranas de fibroína, da blenda e de alginato.

Tabela 7: Valores de transmissão de vapor d'água, espessura e permeabilidade ao vapor d'água das membranas da blenda.

	TVA* (g/m².dia)	**Espessura**** (mm)	**PVA*** (g.mm/m².dia.kPa)
Fibroína	158,95 ± 23,51	0,041 ± 0,002	2,70 ± 0,27
Blenda	307,89 ± 17,89	0,038 ± 0,003	4,89 ± 0,15
Alginato	366,31 ± 5,26	0,034 ± 0,004	5,20 ± 0,46

*Média ± desvio médio (n=3).

**Média ± desvio padrão (n=10).

A transmissão de vapor d'água é um fator importante a ser observado em membranas para uso como curativos. Os curativos devem evitar a evaporação elevada dos fluidos corpóreos e ao mesmo tempo devem manter o ambiente da ferida com umidade adequada (Dallan, 2005). Os valores de transmissão de vapor d'água apresentados pelas membranas estudadas ficaram dentro da faixa de curativos utilizados comercialmente (de 76 a 9360 g/m².dia) (Wu *et al.*, 1995), o que indicaria uma possível utilização destas membranas como

curativos.

O alginato apresentou os maiores valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água, sendo que estes valores encontram-se de acordo com a literatura (Remunanlopez e Bodmeier, 1997). A transmissão e a permeabilidade ao vapor d'água podem ser controladas alterando-se o processo de reticulação do alginato. Membranas mais reticuladas implicam em menores valores de transmissão e permeabilidade ao vapor d'água. Também se sabe que a adição de plastificantes nas membranas diminui a força das ligações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros, aumentando a permeabilidade ao vapor d'água (Olivas e Barbosa-Canovas, 2008). É importante lembrar que a membrana de alginato e a membrana da blenda possuem glicerina adicionada à sua estrutura, que pode ter ocasionado um aumento nos valores de TVA e PVA obtidos.

Ângulo de contato

Quando um líquido é colocado sobre uma superfície sólida pode ocorrer o seu espalhamento na superfície ou ele irá formar uma gota esférica. O ângulo formado mostra o grau de interação entre os dois materiais, indicando a molhabilidade da superfície. O critério para a molhabilidade implica em que o ângulo de contato (θ) seja menor que 90° (Levy Neto e Pardini, 2006). As medidas de

ângulo de contato foram realizadas em goniômetro da marca Tantec. Foi utilizada água destilada como líquido para formação da gota e as medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C e umidade relativa de 50%. A leitura do ângulo de contato entre a gota d'água e a superfície das membranas foi realizada 15 segundos após a deposição da gota. Foram realizadas, no mínimo, dez medidas do ângulo de contato para cada membrana, sendo analisadas as membranas de fibroína, blenda e alginato.

A medida do ângulo de contato fornece informações a respeito da hidrofilicidade do material. Superfícies mais hidrofílicas apresentam menores valores do ângulo de contato (Cai *et al.*, 2002). A hidrofilicidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e o crescimento das células são diretamente influenciados pela molhabilidade das superfícies, uma vez que a maior parte das células prefere ancorar em superfícies hidrofílicas (Esposito *et al.*, 2007).

Tabela 8: Valores médios de ângulo de contato para as diferentes membranas.

	Ângulo de contato*
Fibroína	81° ± 3°

Blenda	72° ± 2°
Alginato	59° ± 3°

* Média ± desvio padrão (n=10).

Verifica-se pela tabela acima que a membrana de fibroína apresenta maior valor para o ângulo de contato quando comparada com as demais membranas. O alginato apresenta ângulo de contato menor, indicando maior hidrofilicidade quando comparado com a fibroína. Se compararmos as proporções de cada um dos componentes na blenda verifica-se que, para o ângulo de contato, ela foi mais fortemente influenciada pela fibroína, contrariamente ao esperado.

O valor do ângulo de contato da membrana de fibroína está de acordo com o encontrado na literatura para membranas de fibroína tratadas por imersão em metanol, onde o valor encontrado foi de 81° ± 2° (Jin *et al.*, 2004). Para as membranas de alginato o valor do ângulo de contato também ficou próximo da literatura, que apresentou ângulo de contato de 66° ± 1° (Xie *et al.*, 2010). Porém, não é possível comparar diretamente os valores de ângulo de contato das membranas obtidas neste trabalho com as existentes na literatura, uma vez que o tratamento para estabilização das membranas aqui proposto é diferente dos

métodos usuais, que utilizam íons multivalentes para reticular o alginato.

Ensaios de resistência à tração

Foram feitos testes mecânicos de resistência à tração em texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD) com célula de carga de 50 kg. As membranas tratadas e secas à temperatura ambiente foram cortadas com dimensões de 7 x 2,5 cm² e colocadas por 48 h em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio, a fim de manter o ambiente com 50% de umidade relativa.

Para a realização do teste de resistência à tração, a distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de realização do teste de 10 mm/s. O ensaio foi realizado em 8 amostras de cada tipo de membrana e sua média calculada. A espessura das membranas foi medida previamente à realização do teste utilizando micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo).

A tensão de ruptura e o percentual de alongamento das membranas foram calculados de acordo com as Equações 5 e 6:

$$\text{Tensão ruptura} = \frac{F}{A} = \frac{F}{e \cdot L} = \frac{F}{e \cdot 25} \qquad (5)$$

$$\% \text{ Alongamento} = \frac{d}{H} \cdot 100 = \frac{d}{50} \cdot 100 \qquad (6)$$

onde: F é a força na ruptura (N)

e é a espessura média da amostra (mm)

L é a largura da amostra (mm)

d é a distância percorrida pelas garras (mm)

H é a altura da amostra entre as garras (mm)

A tabela a seguir apresenta os resultados do teste mecânico de tração realizado nas membranas obtidas.

Tabela 9: Resultados do teste de resistência à tração das membranas de fibroína, blenda e alginato, após 2 e 24 h de tratamento.

	Tensão de Ruptura* **(MPa)**	**Alongamento*** **(%)**
Após 2 h de tratamento		
Fibroína	52,02 ± 12,90	1,89 ±0,41
Blenda	66,70 ± 1,37	4,29 ± 1,08
Alginato	75,01 ± 1,45	4,83 ± 1,94
Após 24 de tratamento		
Fibroína	52,62 ± 10,79	1,81 ±0,61
Blenda	73,00 ± 11,70	3,46 ± 0,92
Alginato	95,70 ± 6,14	7,73 ± 2,23

* Média ± desvio padrão (n=8).

Pelos resultados do teste mecânico verifica-se que a incorporação de alginato na fibroína melhorou sua resistência à tração devido ao alginato ser um biopolímero resistente. Além disso, o alongamento das membranas teve um

aumento bastante significativo, quando comparado com a membrana de fibroína pura.

O aumento do tempo de tratamento não teve influência significativa na membrana de fibroína, isto pode ser justificado se considerarmos que a membrana de fibroína já tem sua estrutura totalmente estabilizada em 2 h de tratamento em solução de H_2SO_4 0,1M em etanol 50%. Com o aumento do tempo de tratamento das membranas verificou-se um aumento elevado da tensão de ruptura das membranas da blenda e, principalmente, da membrana de alginato. Isto confirma a hipótese de que 2 h de tratamento não é o suficiente para cristalizar a estrutura molecular do alginato de sódio. Quanto maior a tensão de ruptura da membrana, mais cristalina ela está e, portanto, mais estáveis e organizadas estão suas cadeias.

A Figura 8 apresenta o perfil típico de tensão *versus* deformação da membrana da blenda e de seus componentes. Esta figura não se refere à média dos valores de tensão e deformação apresentados por todas as amostras analisadas, e sim ao perfil apresentado por uma amostra específica, que representasse bem o conjunto de amostras.

A membrana de fibroína, além de não apresentar escoamento, apresenta tensão na ruptura bastante inferior às demais membranas, mostrando o seu comportamento frágil.

A membrana de fibroína não apresenta indício de deformação plástica quando submetida ao teste de tração, rompendo sem que haja diminuição da largura da amostra. Já a membrana de alginato apresentou comportamento plástico, com escoamento moderado. Os valores de deformação e tensão na ruptura da membrana de alginato foram bastante superiores aos da membrana de fibroína. Para a membrana da blenda tem-se comportamento semelhante à membrana de alginato, porém com alongamento inferior.

Análises térmicas

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foi utilizado o equipamento DSC-50 da marca Shimadzu. Inicialmente foi realizado aquecimento da amostra até 150 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A amostra foi mantida a esta temperatura por 10 min e então foi resfriada até atingir a temperatura ambiente. Este primeiro aquecimento foi feito para apagar o histórico térmico da amostra. Foi então realizado o segundo aquecimento, desde a temperatura ambiente até 500 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Somente os dados do segundo aquecimento foram considerados na análise do gráfico.

As amostras analisadas por DSC foram secas por evaporação do solvente à temperatura ambiente (*ca.* 25 °C) e armazenadas em condições ambiente até a realização da

análise, sendo previamente realizada a estabilização das membranas.

A membrana de alginato apresentou um pico endotérmico de fusão em 185,1 °C. Este pico também é apresentado na blenda, porém em temperatura mais elevada (191,2 °C), possivelmente devido à incorporação da fibroína, que é termicamente mais estável. A membrana de fibroína apresentou pico endotérmico em 286,9 °C devido à sua degradação térmica (Freddi *et al.*, 1999), fato confirmado pela curva termogravimétrica da fibroína (Figura 22), sendo que este pico também está presente na membrana da blenda, porém em uma temperatura 2 °C menor.

Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria permite medir a variação da massa em função da temperatura e, assim, verificar o comportamento e estabilidade das membranas. As membranas analisadas foram secas a temperatura ambiente, após tratamento em H_2SO_4 0,1 M em etanol 50%. Foi utilizado o termogravímetro TGA-50 Shimadzu, com faixa de temperatura de 25 a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e vazão de nitrogênio de 50 mL/min.

A partir da análise termogravimétrica (Figura 10) verifica-se que a fibroína apresenta a maior estabilidade térmica. A blenda iniciou degradação em um valor

intermediário entre a fibroína e o alginato, porém mais próxima ao alginato, tendo em vista que a quantidade deste na blenda é de 75% em massa. A perda de massa no alginato na região de 190-290 °C é atribuída ao rompimento das ligações da matriz polimérica e à formação de resíduos carbonáceos (Siddaramaiah *et al.*, 2008).

Para visualização dos picos de degradação das membranas, foram feitos gráficos da derivada da curva termogravimétrica, conforme mostrado na Figura 11. Os valores foram normalizados com os valores das massas iniciais, para poder ser feita a comparação entre as intensidades dos picos de perda de massa.

A membrana da blenda apresentou perfil semelhante ao alginato, porém observa-se a presença de um pico de degradação em 305,5 °C devido à contribuição da fibroína. A membrana de fibroína pura apresenta maior estabilidade térmica, iniciando sua degradação térmica em 313,7 °C, enquanto que o alginato tem perda de massa em 222,1 °C.

A membrana da blenda apresentou picos de degradação térmica dos dois componentes, porém a temperatura destes picos foi deslocada para valores intermediários, o que indica a semi-miscibilidade destes componentes.

Análise dinâmico-mecânica (DMA)

Foi realizada a análise dinâmico-mecânica das

membranas dos componentes puros e da blenda para verificar a miscibilidade entre os biopolímeros, caracterizada pela presença de uma única temperatura de transição vítrea (T_g). Esta análise permite obter informações sobre separação de fases entre os componentes em escala nanométrica.

Foi utilizado analisador dinâmico-mecânico 2980, da TA Instruments. As membranas foram cortadas em pedaços de 10 mm de largura e 30 mm de altura. Foi feita a medida da espessura de cada amostra utilizando micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo).

A análise foi realizada em ambiente controlado com 55% de umidade relativa e a 23°C. Inicialmente, a amostra foi resfriada com nitrogênio liquido até -65 °C e mantida a esta temperatura por 5 minutos, para estabilização do material. A amostra foi então aquecida até 250°C, a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min. Utilizou-se força de 0,5 N, frequência de 1 Hz e amplitude de 5 µm.

Os resultados de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e amortecimento (tan δ) são mostrados na Figura 12 para as membranas da blenda.

Devido à degradação do alginato não foi possível verificar a Tg da fibroína presente na blenda, pois o alginato iniciou sua degradação em temperatura inferior à temperatura de transição vítrea da fibroína. Entretanto,

pode ser observado que o pico referente à Tg do alginato da membrana da blenda (Tg = 19,66 °C) foi deslocado para valores ligeiramente superiores quando comparado com a Tg da membrana de alginato puro (Tg = 15,30 °C) (figura não mostrada). Isto indicaria uma semi-miscibilidade entre os componentes da blenda, fato este, já indicado pelo processo de separação de fases observado pelo MEV.

Citotoxicidade indireta

O teste de citotoxicidade é realizado para a pré-seleção de materiais que futuramente poderão ser submetidos a ensaios *in vivo* para utilização como biomateriais. Este teste prevê a compatibilidade das amostras com células específicas.

Para a avaliação da citotoxicidade das blendas e dos compósitos desenvolvidos neste trabalho foi seguida a norma ISO - 10993-5 (2009). As células utilizadas para realização do teste foram células de ovário de Hamster chinês (CHO-k1), mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL, todos da marca Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab) em incubadora úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO_2, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área

de cultura) na placa de cultura (Corning) de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Sigma) em solução tampão fosfato pH 7,4.

As membranas foram esterilizadas por exposição à lâmpada ultra violeta do fluxo laminar, da Germ-Free classe II, por 30 minutos de cada lado da membrana. Em cada membrana foi adicionado meio de cultura RPMI 1640 na proporção de 1 cm^2/mL, sendo o conjunto mantido a 37 °C por 48 horas em banho termostatizado com agitação constante. Os extratos foram então diluídos de 100 a 6,25 % (v/v) em meio de cultura RPMI 1640 para realização do teste de viabilidade celular. Como controle negativo foi preparado um extrato de polietileno de alta densidade (PEAD); e como controle positivo, foi preparado uma solução de fenol a 0,5% v/v de meio de cultura.

Para verificar a viabilidade das células, foram colocados 50 µL do extrato em suas diluições e 50 µL da suspensão de CHO-k1 com 3000 células em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. A placa foi mantida por 72 horas em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS (corante supravital de composto tetrazólico, da marca Promega)/PMS (agente acoplador de elétrons, da Sigma), na proporção de 20:1 e incubação por 2 horas. Após

este período, as placas foram analisadas em espectrofotômetro ELISA a 490 nm. A viabilidade celular foi determinada pela Equação 7.

$$VC(\%) = \left(\frac{DOamostra}{DOcontrole}\right) \cdot 100\% \quad (7)$$

onde: VC é a viabilidade celular (%)

DOamostra é a densidade óptica da amostra

DOcontrole é a densidade óptica do controle

O Índice de Citotoxicidade - IC_{50}, concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados do teste de citotoxicidade para as membranas de fibroína, blenda e alginato em todas as diluições analisadas e o histograma de viabilidade celular para o extrato não diluído, respectivamente.

Nenhuma das membranas causou redução da viabilidade celular para valores inferiores ao IC_{50}. A viabilidade celular manteve-se entre 90% e 100% pelo uso de todos os extratos das membranas analisadas, e de acordo com norma ISO 10993-5 (2009), elas podem ser consideradas não citotóxicas. A membrana de alginato, em concentração de extrato igual a 100%, apresentou uma pequena queda na viabilidade celular, ficando em torno de 90%. A membrana de

fibroína apresentou viabilidade celular comparável ao controle negativo em todas as concentrações de extrato analisadas. Já a membrana da blenda teve comportamento intermediário entre a fibroína e o alginato.

Preparo dos compósitos

Com o objetivo de obter um material com resistência mecânica aperfeiçoada, foram realizados testes incorporando fios de fibroína em soluções de alginato.

Foram preparados compósitos utilizando fios de fibroína tipo Gregia 20/22 6A. Estes fios foram cortados manualmente em pedaços de aproximadamente 1 cm e misturados com auxílio de bastão de vidro em solução de alginato de sódio 2% dissolvido em NaOH 0,1 M, contendo glicerina. A mistura foi espalhada em placas de poliestireno de 14 cm de diâmetro e o solvente evaporado à temperatura ambiente. Após seco, o compósito foi tratado por imersão em 150 mL de solução de H_2SO_4 0,1 M em etanol 50% por 24 h para estabilizar a camada de alginato presente no compósito. Após o tratamento, o compósito foi lavado com água ultra pura em abundância, até pH 6, e foi seco à temperatura ambiente. Para fins práticos, não foram testados outros tamanhos de fios. Foi variada somente a proporção destes fios no compósito e avaliada sua influência na interação matriz-fibra e nas propriedades térmicas e mecânicas.

Alguns exemplos de compósitos preparados de acordo com os métodos aqui descritos encontram-se na Figura 15.

A quantidade de alginato foi fixada em 55 mL de solução 2 %, ou seja, 1,1 g de alginato de sódio em cada membrana de compósito. Nesta solução foram adicionadas 1,1 g de glicerina PA. A massa de fios de fibroína foi variada em 20, 40 e 60 % em relação à massa de alginato em cada membrana. Não foram testadas quantidades acima de 60 % de fios, pois nestas proporções o volume de alginato é insuficiente para cobrir e unir os fios de fibroína.

Caracterizações

Para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura, intumescimento em água, permeabilidade ao vapor d'água, resistência à tração, DSC, TGA e citotoxidade indireta foram utilizados os mesmos métodos e aparelhagens acima descritos para os ensaios realizados com as blendas.

Microscopia eletrônica de varredura

O compósito contendo 20% de fios apresentou matriz de alginato contínua, sendo todos os fios cobertos pelo alginato, estando bem dispersos no mesmo. Nos compósitos com 40% de fios, observa-se maior quantidade de fios na matriz. O alginato continuou apresentando matriz contínua, unindo os fios, porém verifica-se que alguns fios estavam soltos sobre a matriz, não estando totalmente cobertos pelo

alginato. Já nos compósitos com 60% de fios, verifica-se a presença de diversas camadas alginato/fios de fibroína. O alginato não conseguiu cobrir totalmente os fios, havendo espaços vazios, como se fossem poros no compósito. Ainda assim os fios se mantiveram bem unidos no compósito, não havendo descolamento quando observados a olho nu.

Intumescimento em água

A tabela a seguir apresenta o grau de intumescimento dos diferentes compósitos. O intumescimento ocorreu principalmente no primeiro minuto em que a membrana entrou em contato com a água, sendo praticamente estabilizado nos primeiros 15 minutos de imersão para todas as membranas.

Tabela 10: Grau de intumescimento da membrana de alginato e dos diferentes compósitos.

	Grau de Intumescimento (%)*
Fios de fibroína	58,74 ± 11,73
Alginato	310,61 ± 6,34
Compósito com 20% de fios	218,42 ± 7,33
Compósito com 40% de fios	167,80 ± 5,92
Compósito com 60% de fios	153,76 ± 4,50

* Média ± desvio médio (n=3).

Pode ser observado que a membrana de alginato sem incorporação de fios de fibroína apresentou maior

intumescimento, com aumento de 310% de sua massa quando em contato com a água. Observa-se também que a presença dos fios de fibroína no compósito não exerce influência positiva no grau de intumescimento. Os fios de fibroína são altamente cristalinos e hidrofóbicos, portanto não absorvem água como a matriz de alginato, que é hidrofílica. Desta maneira, o intumescimento ocorre predominantemente na matriz de alginato. A presença de fios altamente cristalinos acaba, de fato, diminuindo o intumescimento, pois inibe a absorção de água pelas moléculas de alginato na interface com os fios.

É importante observar que os fios de fibroína utilizados na fabricação dos compósitos apresentaram intumescimento semelhante ao da membrana de fibroína após tratamento para estabilização. Além disso, verifica-se que o grau de intumescimento de cada um dos compósitos é proporcional às frações mássicas de alginato e fibroína nos mesmos.

A Tabela 11 apresenta os valores de espessura dos compósitos. Não foi possível medir a espessura antes e após o intumescimento dos fios de fibroína por estes serem muito pequenos, impossibilitando a medida.

Tabela 11: Relação de espessura das membranas de compósitos em teste de intumescimento em água.

	Espessura Inicial* (e_i) (mm)	Espessura Final* (e_f) (mm)	Relação (e_f/e_i)**
Alginato	0,031 ± 0,004	0,145 ± 0,016	4,674 ± 0,144
Compósito 20% fios	0,127 ± 0,005	0,176 ± 0,014	1,385 ± 0,078
Compósito 40% fios	0,221 ± 0,016	0,317 ± 0,010	1,440 ± 0,070
Compósito 60% fios	0,419 ± 0,054	0,427 ± 0,038	1,024 ± 0,045

* Média ± desvio médio (n=5).

** Média ± desvio médio (n=3).

A medida da espessura para os compósitos com fios de fibroína acaba sendo uma medida subjetiva. A espessura medida realmente é a espessura dos fios que estão inseridos no compósito e não da matriz de alginato. Este fato é confirmado ainda ao compararmos os valores de espessura inicial e final dos compósitos com os do alginato puro. O alginato apresenta um aumento de espessura de aproximadamente 4,5 vezes, enquanto que para os compósitos, independente da quantidade de fios, este valor fica em torno de 1. Não se tem um aumento significativo na

espessura medida no compósito, pois a espessura medida é a do fio, e o inchamento ocorre na matriz de alginato, que está unindo estes fios em seus interstícios.

Permeabilidade ao vapor d'água

Os valores obtidos para a transmissão e a permeabilidade ao vapor d'água dos compósitos são mostrados na Tabela 12. Como a espessura é levada em consideração no cálculo da permeabilidade, e é diretamente proporcional à mesma, quanto maior a espessura, maior a PVA. Isto justifica os elevados valores de PVA encontrados quando é considerada a espessura do compósito no cálculo. Conforme mencionado na discussão da análise de intumescimento em água, a espessura medida nos compósitos é a espessura dos fios de fibroína, e não da matriz de alginato propriamente dita, o que pode ocasionar erros ao analisarmos a PVA.

Por isso, os valores aqui discutidos dirão respeito à TVA, que não considera a espessura do filme em seu cálculo e sim apenas o ganho de massa em função do tempo e a área de permeação da membrana.

Tabela 12: Valores de transmissão e de permeabilidade ao vapor d'água das membranas dos compósitos.

	TVA* (g/m².dia)	**Espessura**** (mm)	**PVA*** (g.mm/m².dia.kPa)

	TVA* **(g/m².dia)**	**Espessura**** **(mm)**	**PVA*** **(g.mm/m².dia.kPa)**
Alginato	366,31 ± 5,26	0,034 ± 0,004	5,20 ± 0,46
Compósito 20%	323,16 ± 22,12	0,147 ± 0,015	20,07 ± 1,58
Compósito 40%	358,95 ± 36,33	0,268 ± 0,028	40,98 ± 10,13
Compósito 60%	643,68 ± 28,65	0,464 ± 0,078	125,70 ± 11,77

*Média ± desvio médio (n=3).

**Média ± desvio padrão (n=10).

No compósito contendo 20% de fios de fibroína verifica-se uma diminuição da TVA. Isto acontece justamente devido à presença dos fios, que possuem baixa permeabilidade. Neste compósito praticamente todos os fios estão incorporados na matriz, não havendo espaços sem matriz (fato confirmado pelas micrografias de MEV). Com isso, a presença de fios diminui a área em que ocorre a permeação, o que justifica a diminuição no valor da TVA. Nos compósitos com 40% de fios o comportamento é semelhante, porém, ao mesmo tempo em que aumenta a quantidade de fios, diminuindo a área para permeação,

ocorre a presença de alguns pequenos poros em pontos onde a camada de alginato não foi suficiente para unir os fios presentes. Já nos compósitos com 60% de fios, a alta transmissão de vapor d'água é justificada pela presença de poros maiores que permitem a passagem do vapor d'água. Estes poros são bem visualizados pelo MEV (Figura 15c), onde pode ser observado que a quantidade de alginato não é suficiente para unir todos os fios de fibroína.

Estes valores de transmissão de vapor d'água estão de acordo com a faixa de valores de curativos comerciais (76-9360 g/m².dia), encontrados na literatura (Wu *et al.*, 1995). Além disso, como veremos a seguir, as propriedades mecânicas destas membranas de compósitos são bastante adequadas para aplicação em curativos, principalmente devido à sua maleabilidade e resistência ao rasgo.

Testes mecânicos

Tensão de ruptura

Os resultados de relação de espessura também podem ser usados para relacionar as medidas de espessura com as baixas tensões de ruptura nos compósitos. A ruptura ocorre na matriz de alginato, que está unindo os fios, e a espessura medida (que entra no cálculo da tensão de ruptura) é a espessura das camadas de fios. Desta maneira, serão mostrados aqui os valores de força na ruptura, bem

como a espessura média medida em cada tipo de membrana de compósito e a sua tensão de ruptura, para que estes valores possam ser correlacionados e melhor compreendidos.

A Tabela 13 apresenta os resultados do teste mecânico de tração realizado nos compósitos.

Tabela 13: Valores de força na ruptura, espessura e tensão na ruptura dos compósitos analisados.

	Força na ruptura* (N)	**Espessura* (mm)**	**Tensão na ruptura* (MPa)**
Alginato	73,043 ± 9,830	0,032 ± 0,005	94,262 ± 12,143
Compósito 20% fios	53,278 ± 2,023	0,138 ± 0,007	15,085 ± 0,753
Compósito 40% fios	118,289 ± 16,469	0,233 ± 0,012	19,831 ± 2,334
Compósito 60% fios	179,936 ± 36,723	0,488 ± 0,018	14,549 ± 2,728

* Média ± desvio padrão (n=8).

Pelos valores apresentados na Tabela 13 pode-se verificar que a força necessária para romper a camada de alginato nos compósitos aumenta com o aumento da quantidade de fios nos mesmos, caracterizando o efeito de reforço dos

fios na matriz. Com exceção do compósito contendo 20% de fios de fibroína, os demais apresentaram valores de força na ruptura bastante superior à força necessária para romper a membrana de alginato sem fios de reforço.

A Figura 16 apresenta o comportamento típico de compósitos de alginato com fios de fibroína e também da membrana de alginato puro. A figura apresentada não se refere à média dos diversos ensaios de tração realizados, pois a quantidade de dados é muito elevada, inviabilizando os cálculos de média em cada ponto, mesmo com o uso de ferramenta computacional. Portanto, foram escolhidos testes de amostras que representassem bem cada um dos tipos de membranas analisadas.

A membrana de alginato apresentou pequeno escoamento e alongamento moderado. Este perfil é diminuído com a adição de fibras de fibroína como reforço no alginato. Porém, quando adicionados 40 e 60% de fios de fibroína no compósito a força na ruptura da matriz é aumentada significativamente. Após a ruptura da matriz das membranas de compósitos, observa-se a presença de diversos picos, referentes ao descolamento das fibras da matriz.

Todos os compósitos reforçados com fios de fibroína apresentaram o fenômeno denominado *fiber bridging*, onde a fibra não rompe durante o ensaio e forma uma ponte entre as

partes fraturadas da matriz. Quando a camada de alginato é rompida, ela continua sendo unida pelos fios de fibroína. Estes fios são tracionados e arrancados da matriz pouco a pouco, o que justifica o perfil apresentado pelos compósitos após a ruptura da matriz. Ainda assim, ao final do teste puderam-se observar diversos pontos onde a fibra continua a formar a ponte entre as partes fraturadas.

Resistência à propagação do rasgo

Observou-se que as membranas de compósitos com fios de fibroína apresentavam boa flexibilidade e elevada resistência ao rasgo. Desta maneira procurou-se realizar testes que demonstrassem adequadamente estas propriedades do compósito. O teste mais adequado é o de propagação do rasgo, conforme ASTM D1938-08, melhor descrito abaixo.

Foram feitos testes mecânicos de resistência à propagação do rasgo em texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD) com célula de carga de 50 kg. As membranas tratadas e secas à temperatura ambiente foram cortadas com dimensões de 7 x 2,5 cm^2 e colocadas por 48 h em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio, a fim de manter o ambiente com 50% de umidade relativa.

Para o teste de resistência à propagação do rasgo, as membranas dos compósitos foram cortadas conforme mostrado

na Figura 17. Cada ponta do compósito foi fixada em uma garra e quando iniciado o teste a garra superior era levantada, rasgando a membrana por toda sua extensão. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de realização do teste de 4,16 mm/s (250 mm/min).

Para cada tipo de membrana foram feitas 8 replicatas, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados. Para o cálculo da força de resistência à propagação do rasgo dos compósitos foi inicialmente calculada a média de todas as forças registradas pelo equipamento para cada amostra, desconsiderando as porções inicial e final da curva. Após foi calculada a média das 8 repetições realizadas.

Tabela 14: Valores de força de resistência à propagação do rasgo dos compósitos.

	Força* (N)
Compósito 20% fios	1,542 ± 0,322
Compósito 40% fios	3,354 ± 0,601
Compósito 60% fios	7,629 ± 1,077

* Média ± desvio padrão (n=8).

Não está mostrado na tabela acima o valor de força de

resistência à propagação do rasgo da membrana de alginato, pois a força necessária para rasgar membranas densas, em geral, é mínima. O teste foi realizado com membranas densas de alginato e também de fibroína, porém a força necessária para rasgar estas membranas é tão pequena que sequer é detectada pelo equipamento, ficando sempre em torno do zero. Isto confirma que a incorporação de fios de fibroína em membranas de biopolímeros atua não só como carga, mas também como reforço, uma vez que as propriedades mecânicas como a tensão de ruptura e resistência à propagação do rasgo são aumentadas consideravelmente.

A Figura 18 apresenta o perfil típico apresentado pelas amostras no ensaio de propagação do rasgo. Foi observado que quanto maior a quantidade de fios de fibroína presente no compósito, maior era a força necessária para rasgar o mesmo.

Análises térmicas

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 19 apresenta os gráficos de DSC para as membranas de alginato e dos compósitos. São mostradas somente as curvas referentes ao segundo aquecimento realizado em cada amostra. Os valores foram normalizados em função da massa inicial em cada análise.

Verifica-se na Figura 19 que o alginato apresentou

pico endotérmico em 185 °C. Este pico está associado à degradação térmica do alginato, confirmado pela análise termogravimétrica, e deslocou-se para valores ligeiramente superiores com a incorporação dos fios de fibroína, devido à maior estabilidade térmica dos mesmos.

Observa-se nas membranas dos compósitos a presença de picos endotérmicos em temperaturas na faixa de 315 a 320 °C, que correspondem à degradação térmica de fios de fibroína com orientação bem definida (Freddi *et al.*, 1999). A intensidade destes picos é aumentada com o aumento da quantidade de fios de fibroína no compósito.

Termogravimetria (TGA)

As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas de massa residual e massa residual diferencial para as membranas dos compósitos, respectivamente.

Verifica-se a presença de duas inflexões na curva termogravimétrica para as membranas dos compósitos. Estas inflexões são mais bem visualizadas analisando o gráfico da derivada da curva, sendo que este foi normalizado com os valores das massas iniciais, para poder ser feita a comparação entre as intensidades dos picos de perda de massa.

A membrana de alginato apresentou apenas um pico de perda de massa em 226 °C, atribuído à degradação térmica do

alginato e à formação de resíduos carbonáceos (Siddaramaiah *et al.*, 2008).

A decomposição térmica da fibroína é influenciada pelas propriedades morfológicas e físicas da amostra, sendo o grau de orientação molecular um dos parâmetros mais importantes (Freddi *et al.*, 1999). Fibras bem orientadas decompõem em temperaturas acima de 300 °C, materiais com estrutura cristalina folha-β decompõem-se na faixa de 290-295 °C, enquanto que a decomposição da fibroína de seda com estrutura amorfa ocorre em temperaturas menores que 290°C (Nogueira, 2005).

Com a incorporação dos fios de fibroína nos compósitos, surge um novo pico, em 338 °C, referente à degradação térmica dos fios de fibroína. Este pico mostra-se de acordo com a literatura, uma vez que a degradação dos fios de fibroína, de conformação folha-β, ocorre em temperaturas acima de 300 °C.

Com o aumento da quantidade de fios de fibroína nos compósitos, a intensidade do pico relacionado à degradação da fibroína aumenta e o pico relacionado à matriz de alginato tem sua intensidade reduzida gradualmente. Isto ocorre, pois a quantidade mássica de alginato nos compósitos é diminuída, portanto sua influência é menos pronunciada do que na membrana de alginato puro.

Citotoxicidade indireta

As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados do teste de citotoxicidade realizado para as membranas dos compósitos desenvolvidos neste trabalho em todas as diluições do extrato estudadas e histograma de viabilidade celular para o extrato não diluído, respectivamente.

Pode ser observado que nenhuma das amostras analisadas resultou em redução de 50% da população de células. Porém, quando utilizada concentração do extrato de 100% houve uma queda na viabilidade celular para valores entre 70% (compósito com 20% fios), sendo considerado citotóxico, pois está no limite do recomendado na ISO 10993-5 (2009), e 90% (alginato puro).

Um fator que pode influenciar a citotoxicidade dos compósitos é a sericina presente nos fios de fibroína utilizados. Como estes fios não passaram pelo processo de remoção da sericina habitualmente realizado no laboratório pode-se esperar que eles tenham um conteúdo residual de sericina maior, o que teria ocasionado a queda da viabilidade celular.

Outro fator seria o tratamento utilizado nas membranas utilizando H_2SO_4. Caso haja algum traço residual de ácido nas membranas, este causa uma diminuição no pH do extrato e pode ocasionar a morte das células. A fim de evitar que

isto acontecesse, após o tratamento por 24 h em H_2SO_4 0,1M em etanol 50%, os compósitos e a membrana de alginato puro foram exaustivamente lavados com água destilada e imersos em água ultra pura por diversos dias, antes da realização do teste de citotoxicidade. Esta água foi trocada 2 vezes por dia e considerou-se satisfatório quando o pH da água atingiu um valor de aproximadamente 6.

Além disso, deve-se considerar que o alginato resulta em menor viabilidade celular que a fibroína e, no compósito com 20% de fios de fibroína, por exemplo, sua quantidade mássica é elevada (80%). Com o aumento da quantidade mássica de fios de fibroína e conseqüente diminuição de alginato, ocorre o aumento da viabilidade celular justamente pela presença do alginato ser menos pronunciada.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de membranas de fibroína **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) preparar uma solução de alginato e uma base inorgânica forte:

- o alginato ser selecionado do grupo compreendendo alginato de sódio, alginato de potássio, alginato de lítio e alginato de amônio, preferencialmente alginato de sódio;
- a solução de base forte ser selecionado do grupo compreendendo NaOH, KOH, e LiOH, preferencialmente NaOH, com pH entre 9 e 11;
- dissolver alginato de sódio em NaOH 0,1 M obtendo uma solução em concentração de 2% m/v, repousar a solução preferencialmente por 4 dias e agitar;

b) adicionar um plastificante à solução obtida em (a):

- os plastificantes são selecionados do grupo compreendendo plastificantes baseados em ftalatos, plastificantes adípicos, plastificantes trimelitatos, plastificantes maleatos, plastificantes sebacatos, plastificantes benzoatos, óleos vegetais, sulfonamidas, fosfatos, glicolenos, plastificantes poliméricos e glicerina, preferencialmente glicerina;
- adicionar o plastificante em uma razão de 0,5:1 a 1:0,5 em relação à massa do alginato, preferencialmente de 1:1;
- homogeneizar por 10 minutos;

c) obtenção de blendas ou compósitos:

- para obtenção de blendas adicionar a solução de fibroína a 2% lentamente à mistura de obtida em (b), em agitador magnético a 200 rpm, à temperatura ambiente, por 15 minutos;

- para obtenção de compósitos cortar fibras de fibroína uniformemente de pelo menos 1 cm e adicionar à solução obtida em (b) na faixa de proporção em massa entre 20 e 60% em massa;

d) obtenção de membranas:

d.1) evaporar o solvente dos produtos obtidos em (c) em temperatura ambiente;

e) estabilização das membranas:

- imersão das membranas em uma solução de ácido inorgânico forte 0,1 M em um solvente orgânico 50% de 2 a 24 horas;
- o ácido inorgânico forte é selecionado do grupo compreendendo ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido perclórico e ácido sulfúrico, preferencialmente ácido sulfúrico; e
- o solvente orgânico é selecionado do grupo compreendendo alcoóis e cetonas de 1 a 5 carbonos, preferencialmente selecionado do grupo compreendendo metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, terc-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, isopentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-3-butanol, propanona, butanona, butadiona e pentanona.

2. Membranas de fibroína **caracterizado por** ser obtido de acordo com o processo descrito na reivindicação 1 e ser amorfa, compreender grau de intumescimento na faixa de 220,94 ± 13,21, espessura após intumescimento na faixa 0,105 ± 0,005, estruturas globulares regulares com tamanho variando de 10 a 1 µm de diâmetro e compreendem entre 20 e 80% de fibroína em massa.

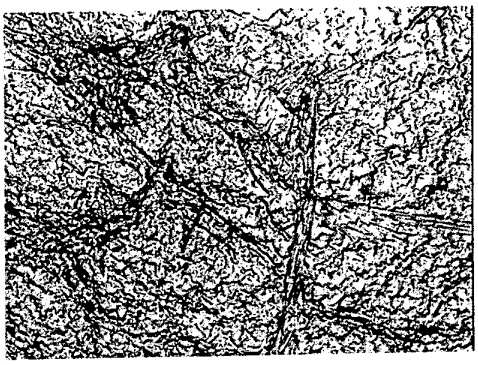


Figura 1

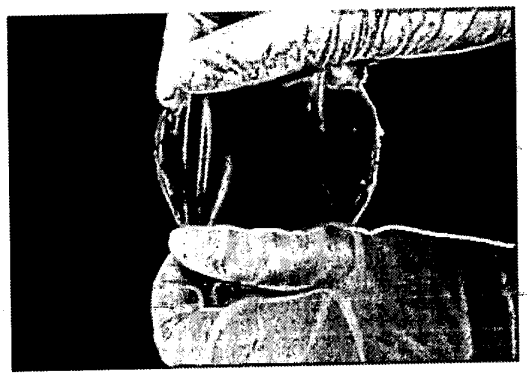


Figura 2

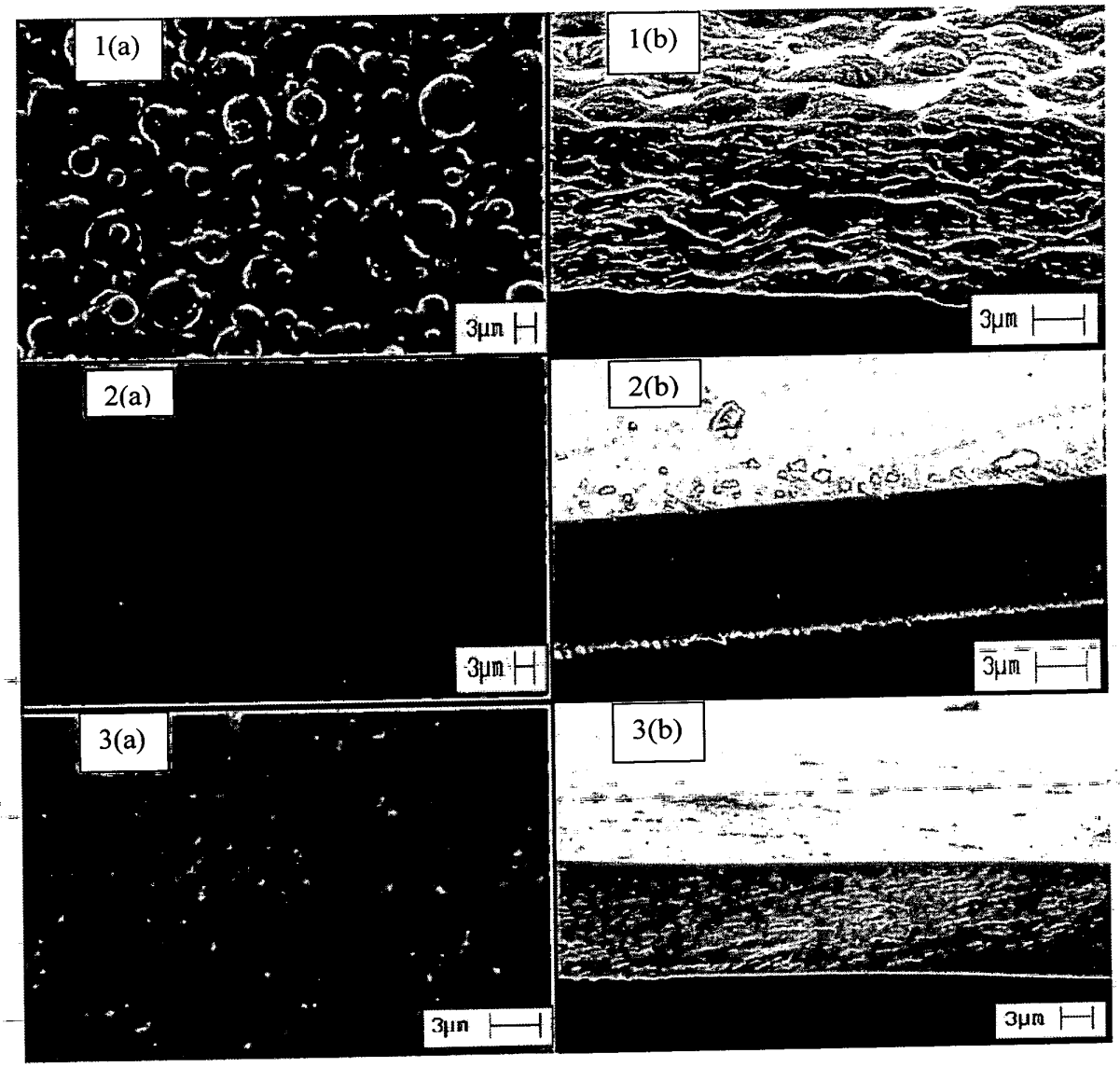


Figura 3

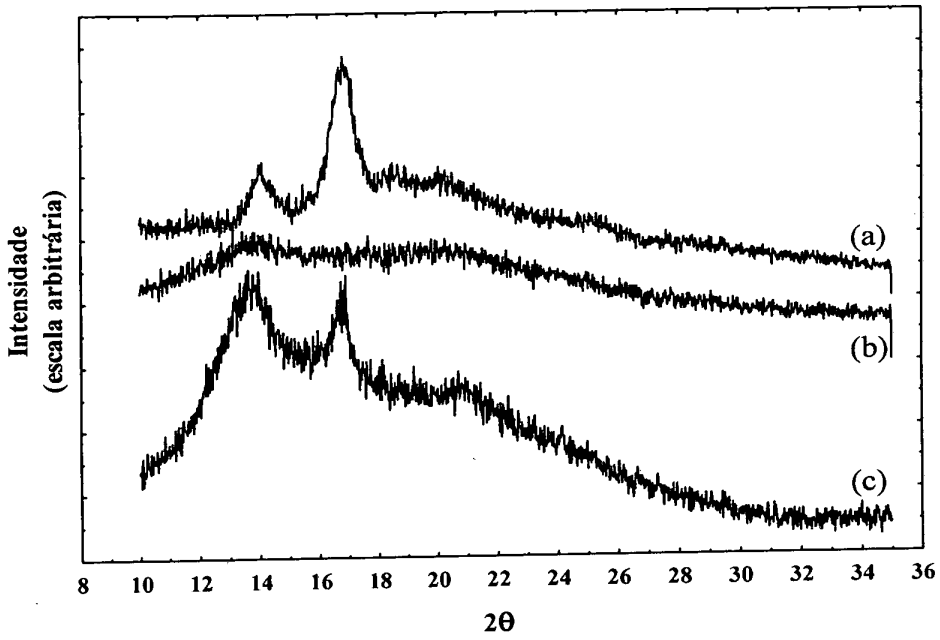


Figura 4

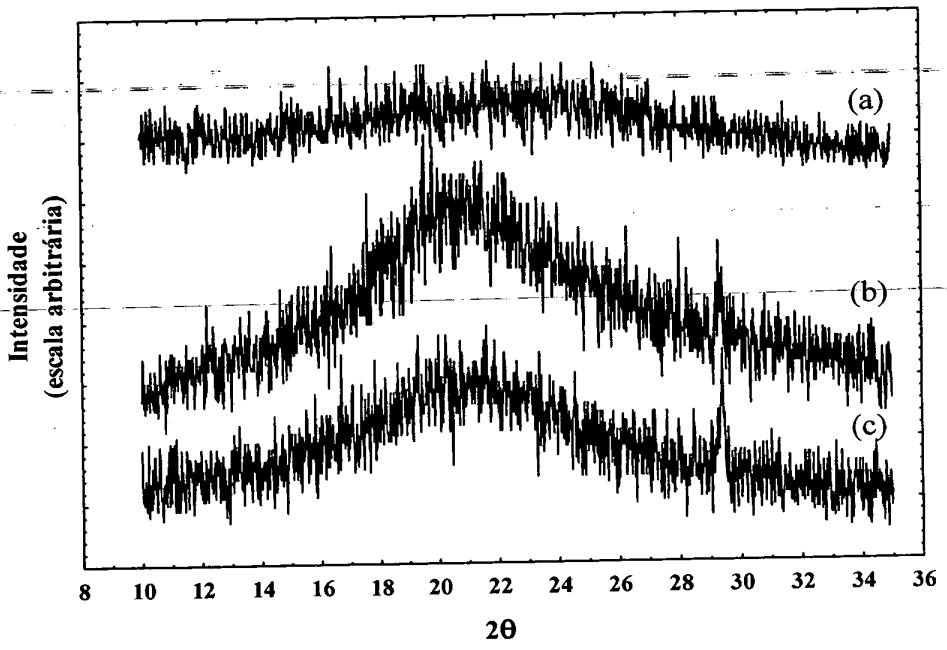


Figura 5

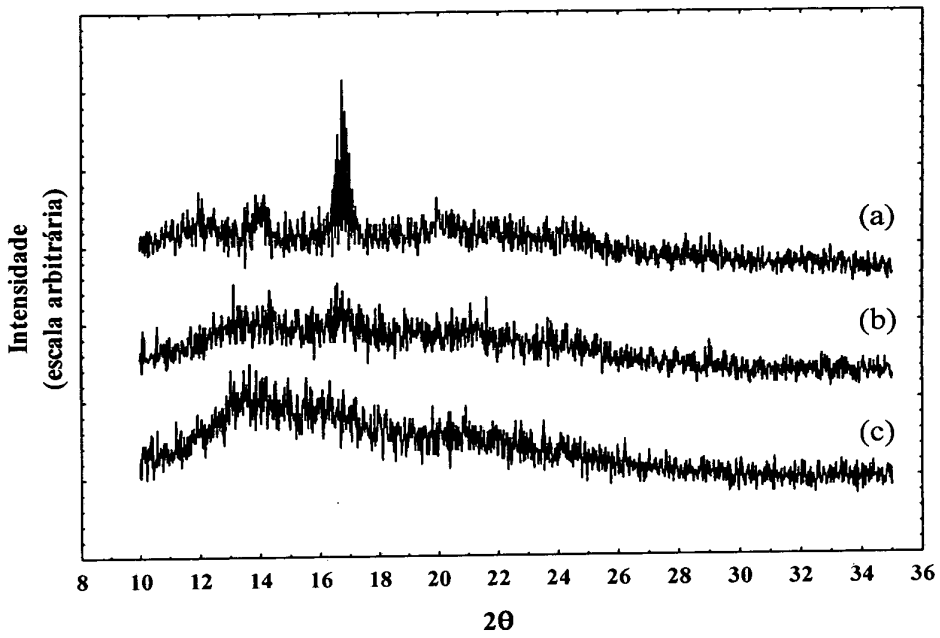


Figura 6

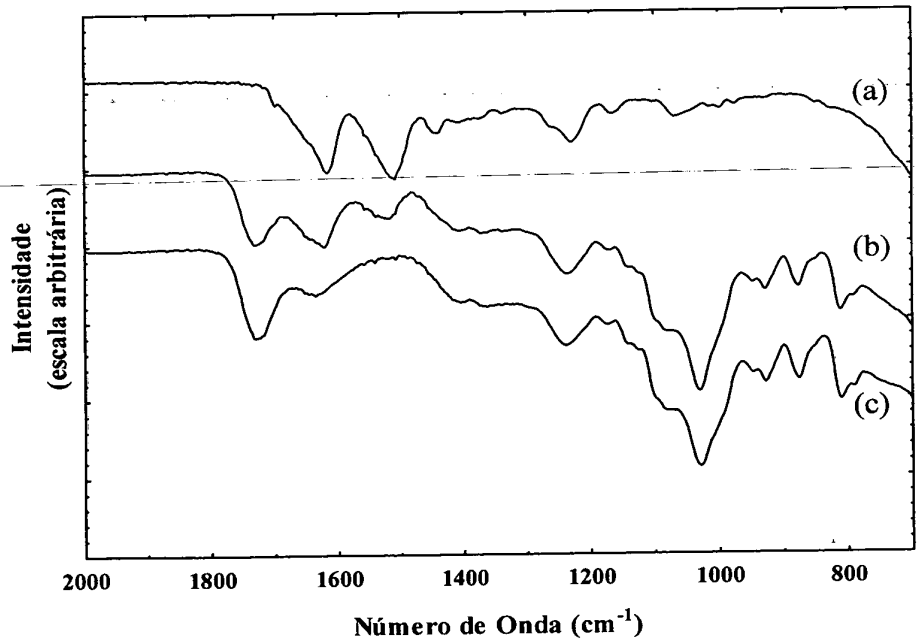


Figura 7

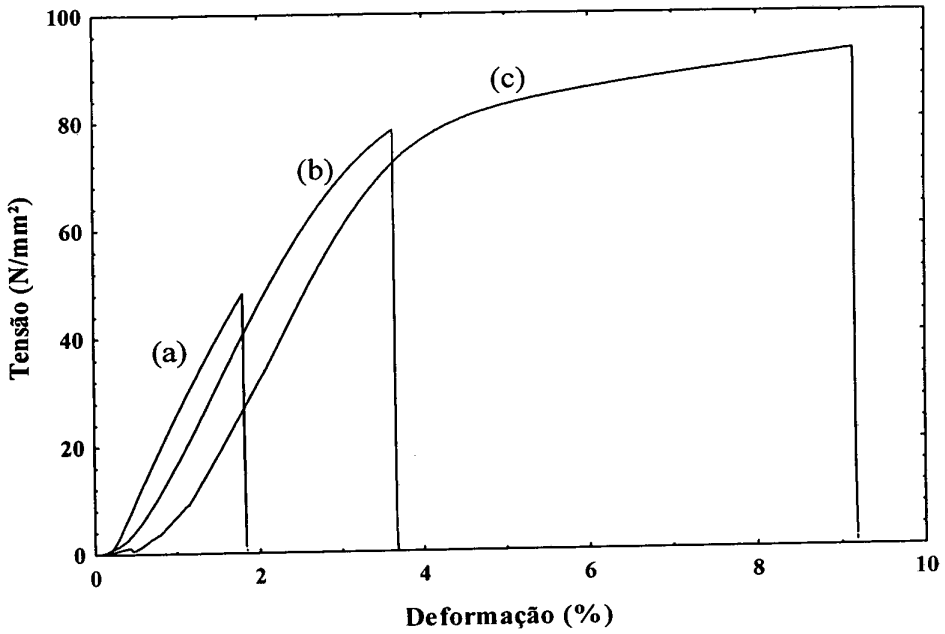


Figura 8

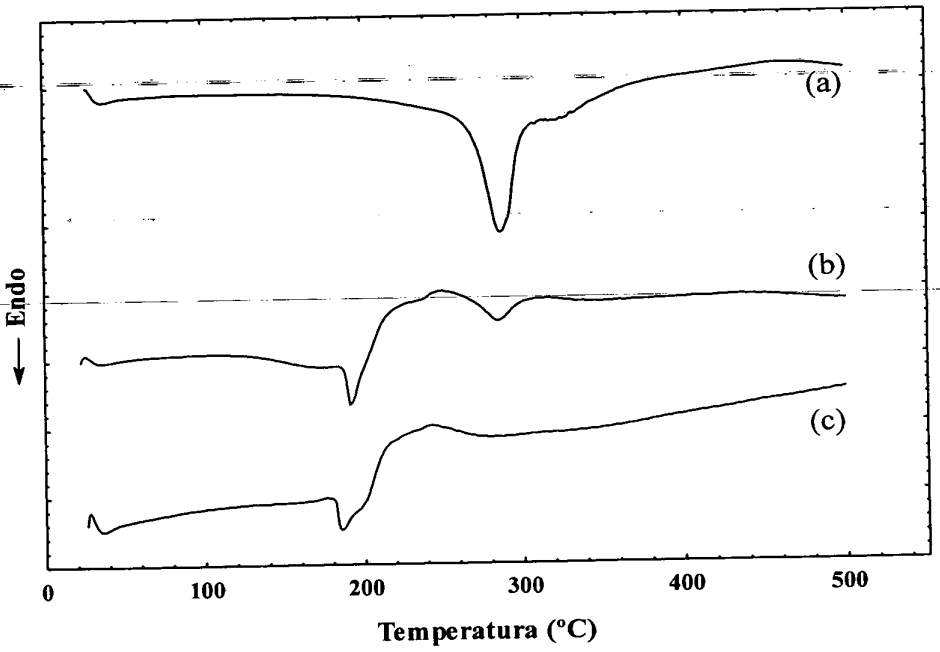


Figura 9

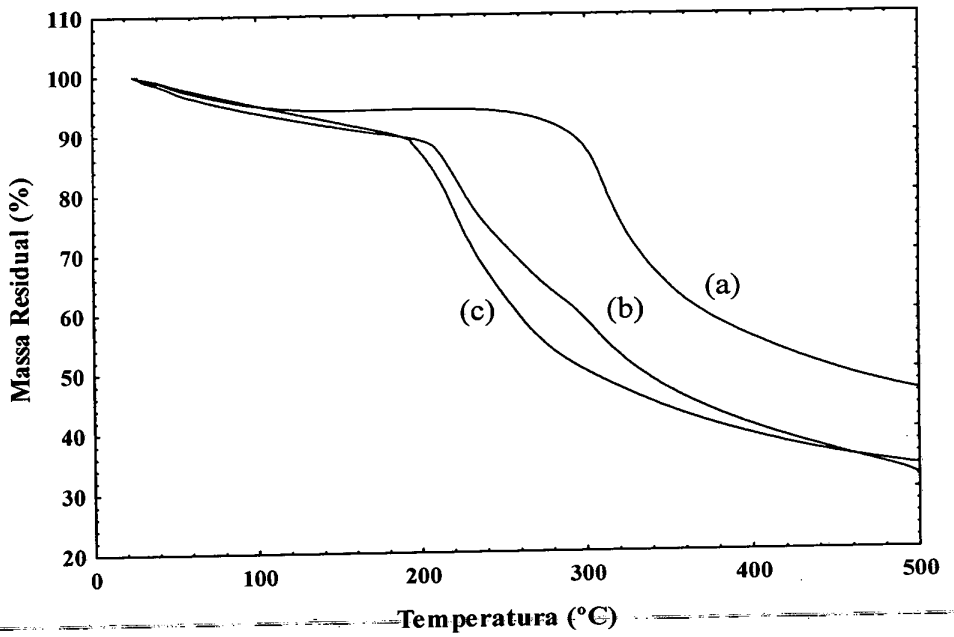


Figura 10

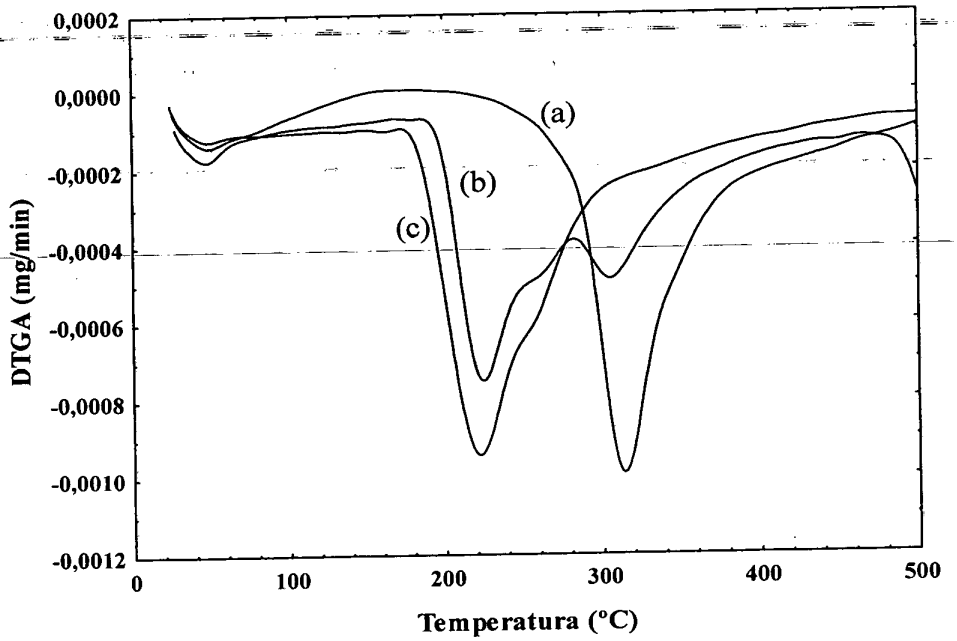


Figura 11

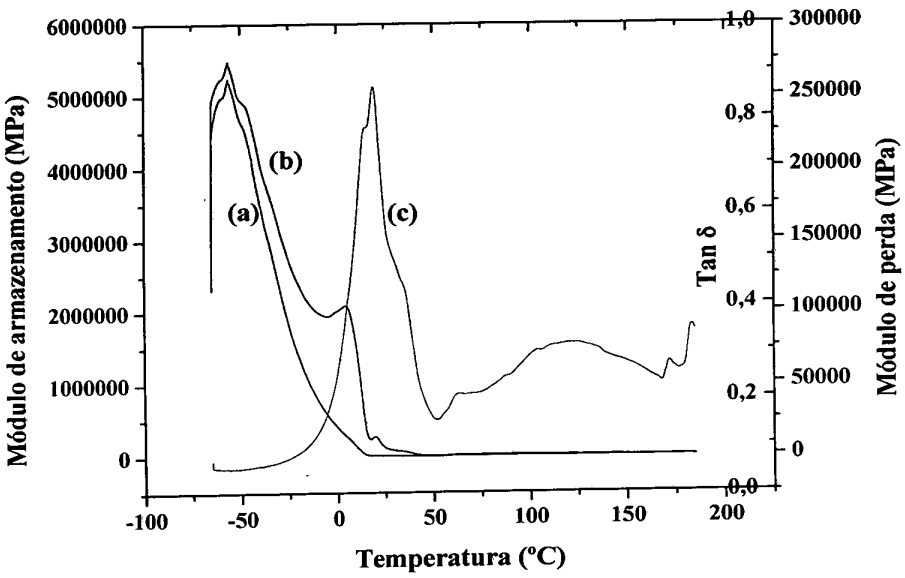


Figura 12

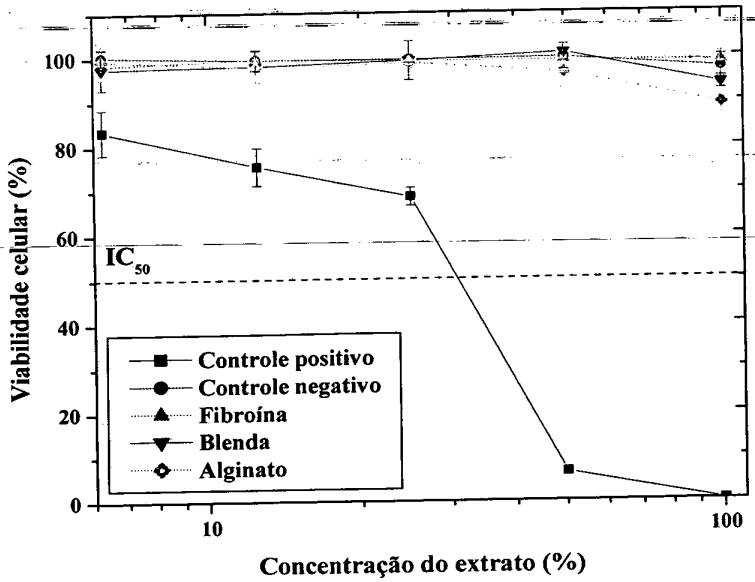


Figura 13

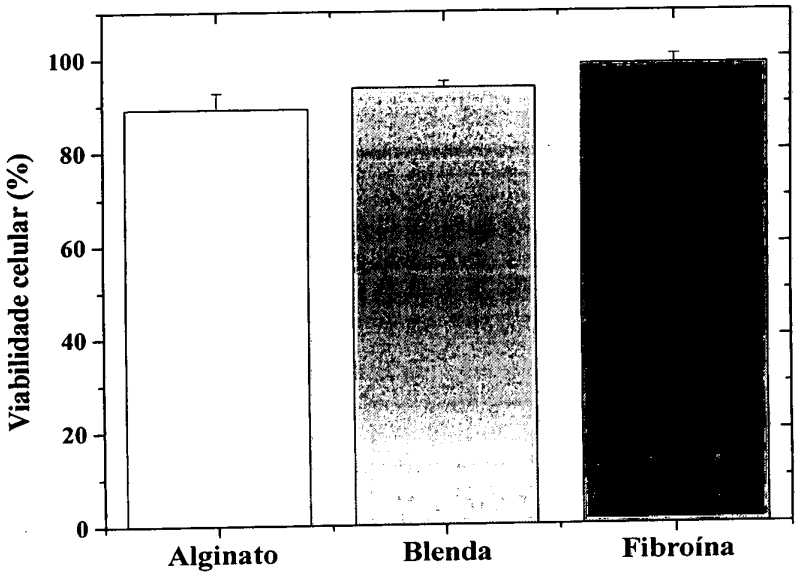


Figura 14

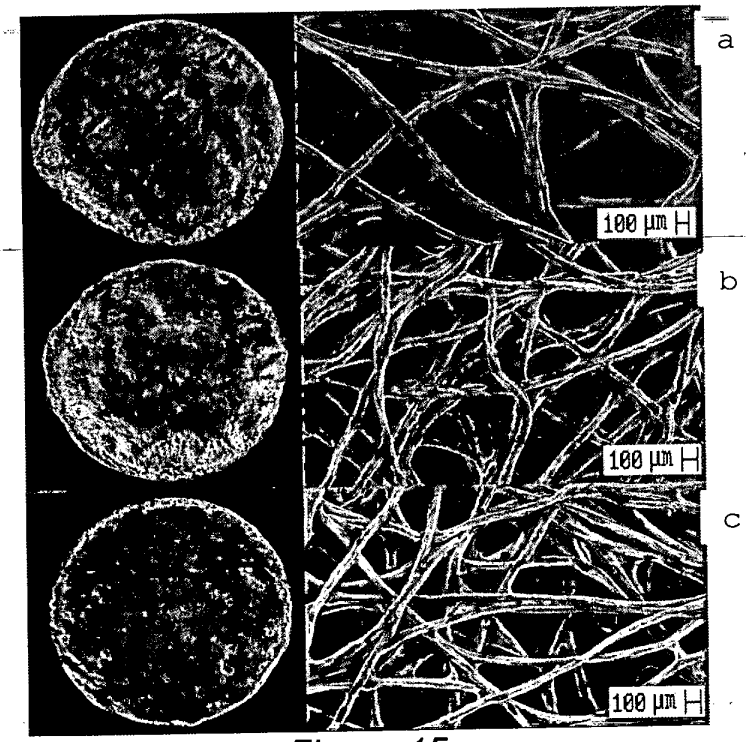


Figura 15

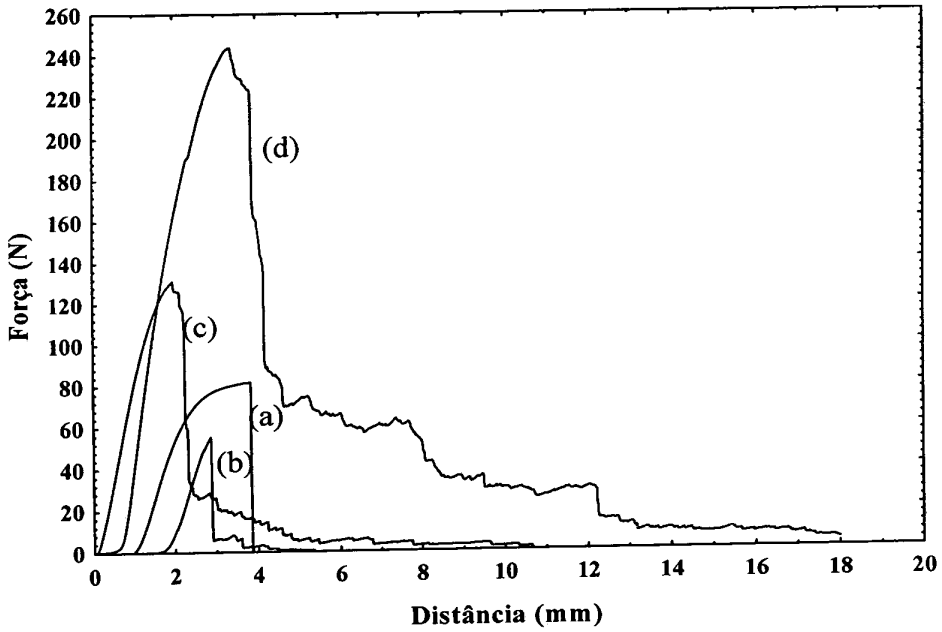


Figura 16

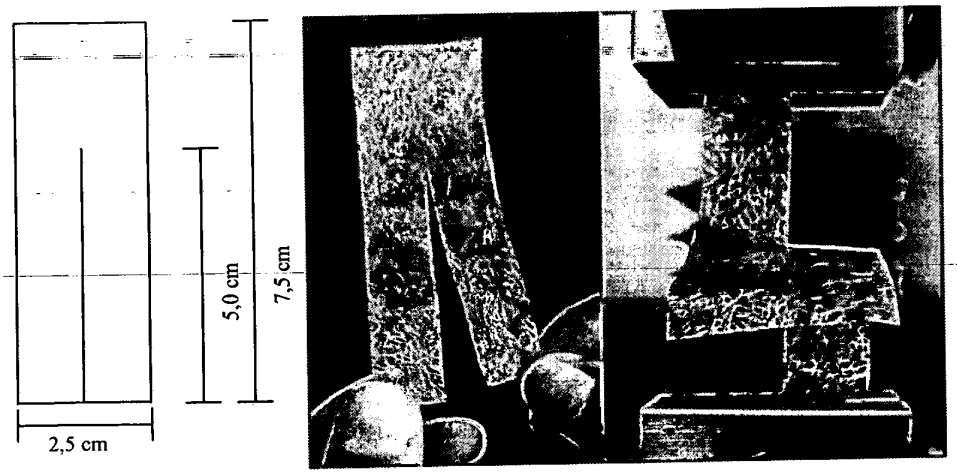


Figura 17

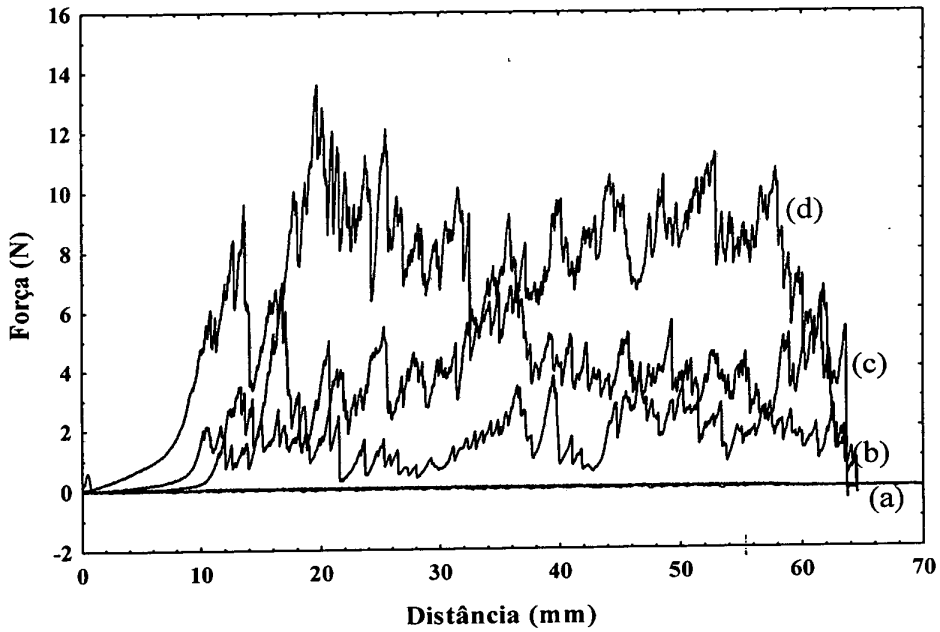


Figura 18

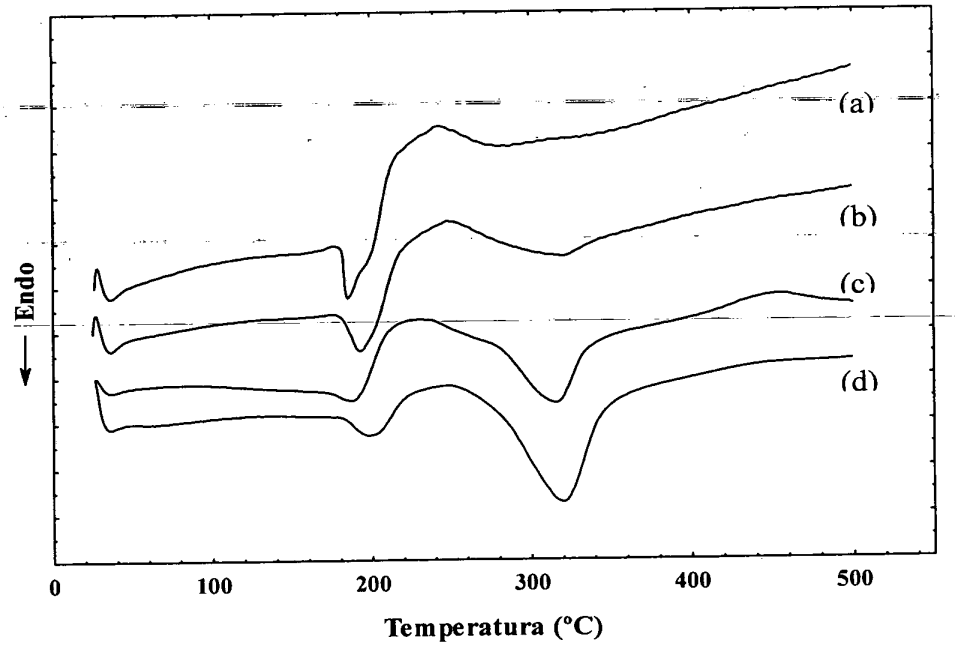


Figura 19

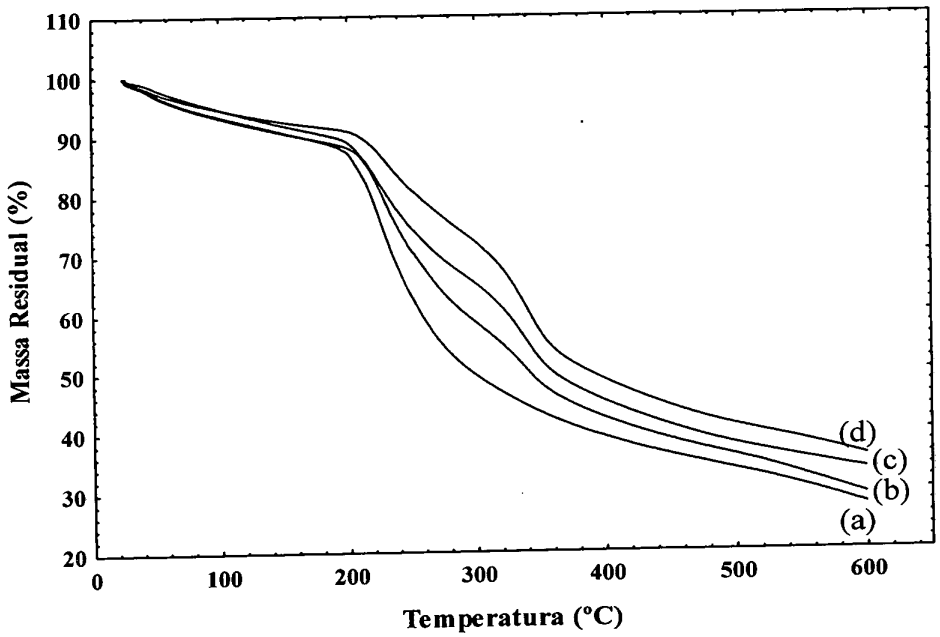


Figura 20

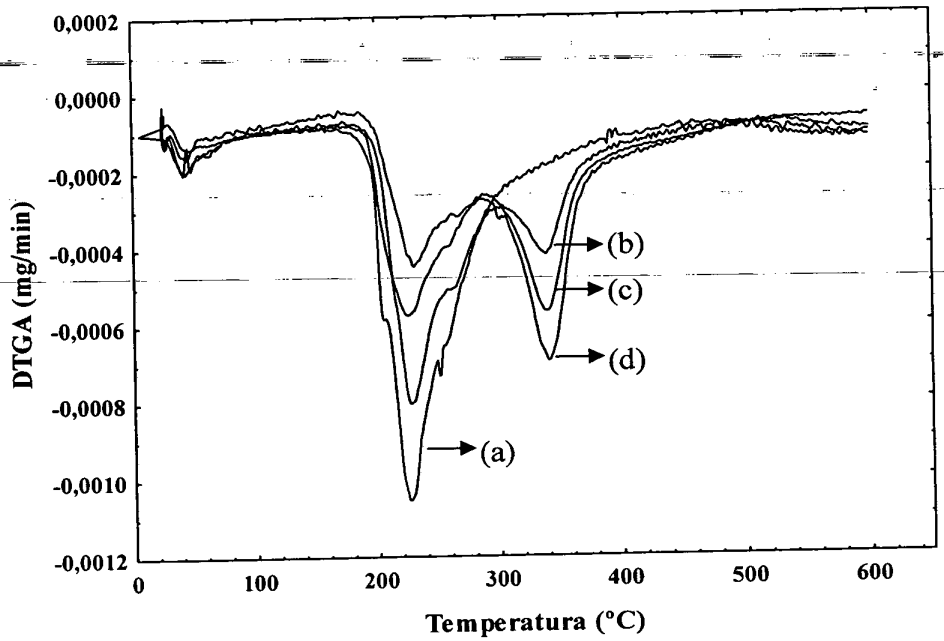


Figura 21

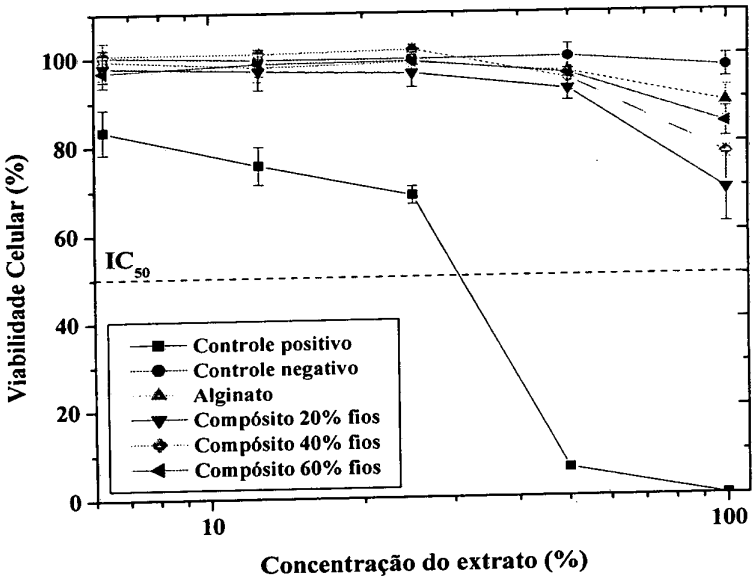


Figura 22

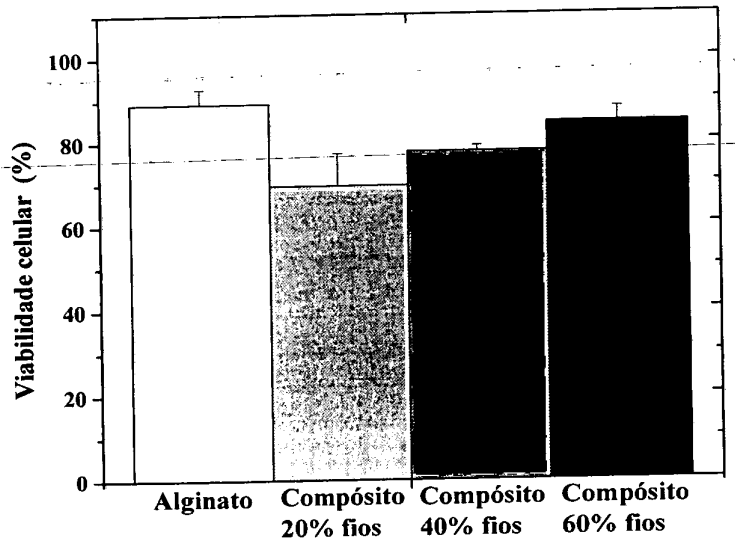


Figura 23