

Síntese e caracterização de *scaffolds* de fibroína

Synthesis and characterization of fibroin *scaffolds*

Luísa Carvalho Pereira Araújo¹, José Martins de Oliveira Júnior²,
Norberto Aranha²

¹ Graduada em Engenharia Química pela Universidade de Sorocaba – Uniso, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

² Programa de Mestrado Profissional em Processos Tecnológicos e Ambientais – Uniso, Cidade Universitária Professor Aldo Vannucchi, 15-2101,7000, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

e-mail: luisacarvalhoaraujo2@gmail.com, jose.oliveira@prof.uniso.br, norberto.aranha@prof.uniso.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo diminuir o tempo de formação de hidrogéis de fibroína utilizados na produção de *scaffolds* para aplicações na área médica e odontológica. Para a extração da fibroína foram utilizados os solventes: brometo de lítio e uma solução ternária (cloreto de cálcio + álcool etílico + água). Realizaram-se também modificações na membrana utilizada na diálise, de modo a diminuir o tempo para a formação de hidrogel e, conseqüentemente, obtenção dos *scaffolds*. A Tomografia por Transmissão de Raios-x confirmou a formação de *scaffolds* contendo 73,282% de porosidade total, sendo 73,272% de poros abertos interconectados, e densidade de conectividade entre os poros de 665,728 poros/mm³. A microscopia óptica mostrou que a estrutura dos *scaffolds* é constituída por fios com diâmetro de 24 µm. Por meio da espectroscopia infravermelho (FTIR) foi possível confirmar a presença das bandas de Amida I, II e III, características da fibroína, ao final do processo de extração. A análise de DSC apresentou dois picos endotérmicos em 60 °C e 297 °C correspondentes à liberação de água e fusão da proteína, respectivamente. As modificações realizadas na membrana, proposta neste trabalho, diminuíram significativamente o tempo para a formação de hidrogel, precursor dos *scaffolds*, ocorrendo durante os três dias de diálise.

Palavras-chave: Biomateriais. Fibroína. *Scaffolds*. Hidrogéis.

ABSTRACT

The aim of this work was to reduce the formation time of fibroin hydrogels used in the production of *scaffolds* for medical and dental applications. For the extraction of fibroin the solvents were used: lithium bromide and a ternary solution (calcium chloride + ethyl alcohol + water). Modifications were also made to the membrane used in the dialysis, in order to decrease the time for hydrogel formation and, consequently, obtaining the scaffolds. The Tomography by X-ray Transmission confirmed the *scaffolds* formation containing 73.282% total porosity, with 73.272% of open pores interconnected, and connectivity density between pores of 665,728 poros/mm³. Optical microscopy showed the structure of the *scaffolds* is made up of wires with a diameter of 24 µm. Through infrared spectroscopy (FTIR) it was possible to confirm the presence of the Amida I, II and III bands, characteristics of fibroin, at the end of the extraction process. The DSC analysis showed two endothermic peaks at 60 °C and 297 °C corresponding to the water release and protein fusion, respectively. The membrane modifications proposed in this work significantly reduced the time for hydrogel formation, precursor of the *scaffolds*, occurring during the three days of dialysis.

Keywords: Biomaterials. Fibroin. *Scaffolds*. Hydrogels.

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais abrangem um grande número de diferentes tipos de materiais que têm sido estudados ao longo de décadas. Os avanços dos materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização têm permitido a utilização de biomateriais em muitos casos [1]. Tem-se, como exemplo, a aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, visto que estes não danificam tecidos saudáveis e não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas [2].

Uma estrutura interessante para reconstituição óssea são os biomateriais na forma de *scaffolds*, que são estruturas porosas tridimensionais que servem de molde para o crescimento celular, ou seja, para a formação de um novo tecido ósseo [3]. Devem possuir um arranjo que mimetize os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual [4]. Os *scaffolds* para regeneração óssea devem atender a certos critérios para desempenhar esta função, inclusive propriedades mecânicas semelhantes às do local da reparação óssea, a biocompatibilidade e biodegradabilidade, a uma taxa compatível com a remodelação [5].

Diversos estudos [2, 3, 5, 6] tem discutido o potencial de aplicações da fibroína de seda na reconstituição tecidual, sob a forma de *scaffolds*, o que torna a fibroína um biomaterial versátil para esse tipo de aplicação. Considerando a parte estrutural dessa proteína, a mesma se compõe por duas cadeias, uma de alto e outra de baixo peso molecular (325 kDa e 25 kDa respectivamente), e suas fibras possuem entre 10 e 25 μm de diâmetro [6]. Além disso, a fibroína apresenta em seu arranjo molecular dois domínios: um amorfo, também chamado de seda I (silk I), e outro cristalino, ou seda II (silk II). Na seda I, o polipeptídeo constituído por uma hélice- α é mantido por ligações de hidrogênio. Em contrapartida, a conformação em folha- β é resultante da formação de pontes de hidrogênio entre dois ou mais polipeptídios adjacentes, resultando em uma estrutura termodinamicamente estável. Na seda II, têm-se uma série de repetições dos aminoácidos alanina e glicina, conectados por serina ou tirosina. A cadeia cristalina da fibroína contém uma estrutura secundária em folha- β , o que confere à proteína características como resistência à tração, por exemplo [7].

A extração da fibroína envolve basicamente três etapas: 1) separação da fibroína de outras proteínas, particularmente da sericina que envolve os fios de fibroína; 2) dissolução da fibroína; e 3) diálise. A solução obtida ao final deste processo é então gelificada formando, após sua liofilização, uma estrutura porosa e resistente mecanicamente [8, 9, 10]. Há na literatura diversos trabalhos que utilizam processos diferentes para separar a fibroína de outras proteínas existentes na formação do fio da seda. Para esta etapa alguns autores utilizam o aquecimento sob pressão a 120 °C em autoclave [11,12], outros realizam uma lavagem em solução salina [4, 7]. Assim, a etapa para a dissolução da fibroína, por sua vez, pode ser realizada por diferentes soluções como relatado por ROCKWOOD *et al.* (2011) [13].

Visto que a fibroína pode ser obtida por diferentes métodos, este trabalho tem como objetivo propor uma modificação na etapa de diálise, utilizando membranas com cut-off maior e submetendo-as a um tratamento prévio de lavagem, de modo a diminuir o tempo para a formação de *scaffolds*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O método utilizado para extração da fibroína seguiu o protocolo descrito por ROCKWOOD *et al.* (2011) [13], o qual se divide em três etapas: diluição, diálise e centrifugação.

2.1 Diluição

Para a extração da fibroína foram cortados 5g de casulos do bicho da seda *Bombyx mori*, e pesados 4,24g de Na_2CO_3 . Diluiu-se o carbonato em um béquer de 2L contendo água ultrapura, sob agitação constante. Imergiram-se os casulos nesta solução, em aquecimento até a fervura, durante 35 min. Esta fase envolve a remoção de sericina e outras proteínas presentes em torno dos fios de fibroína, que são solúveis por meio de aquecimento em solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) [14]. As fibras obtidas foram imersas em um béquer de 2L com água ultrapura, por 20 min (repetindo-se 3 vezes a lavagem), e colocadas em seguida em placa de Petri e levadas à estufa por 24h, com temperatura de 50°C.

2.1.1 Solvente ternário

As fibras foram lavadas em solução aquosa de Na_2CO_3 0,5% (m/v). Preparou-se a solução ternária salina para diluição, em um béquer de 1L sob agitação constante, onde 60g de cloreto de cálcio dihidratado foram dissolvidos em 44,14ml de água ultrapura e depois adicionados 47,60ml de álcool etílico. Aguardou-se até que o sal se dissolvesse totalmente na solução. Num béquer de 1L foram adicionados 50ml da solução ternária $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (proporção 1:2:6 molar) [15] para cada 5g de fibras de seda obtidas na etapa anterior. O béquer contendo a mistura foi imerso em equipamento para banho-maria QUIMIS®, numa temperatura de 85°C durante aproximadamente 20 min. A solução resultante tornou-se inteiramente líquida, um pouco viscosa e de aspecto amarelado.

2.1.2 Solvente 9,3 M Brometo de Lítio (LiBr)

De acordo com a molaridade referida (9,3 M), foram adicionados 40,38g de LiBr em 50ml de água ultrapura, para preparo da solução. A quantidade de LiBr e água variam com a quantidade experimental necessária. A proporção segundo a literatura é de 1g de fibra de fibroína seca para 4ml de 9,3 M LiBr [16], então, para 5g de fibras iniciais adicionam-se 20ml de solvente. Como a solução de brometo de lítio tem um maior poder de dissolução da fibroína, logo imersas nesta solução, as fibras se decompõem rapidamente. A mistura já totalmente líquida é deixada em agitação constante à 60°C, por 4h. Ao final se obtém uma solução pouco viscosa e levemente amarelada.

2.2 Diálise

A diálise é uma etapa importante do processo e para este trabalho utilizou-se uma membrana de celulose MWCO 12.000 Da, da marca Sigma.

O processo de diálise, é fundamental para a remoção do sal ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou LiBr) e outras impurezas contidas na solução de fibroína. Também considerada a etapa crítica, já que pode ocasionar a passagem do sal como também da fibroína para fora da membrana, por isso essa fase merece atenção. No caso do solvente ternário, o álcool se evapora no processo de diluição.

2.2.1 Membrana sem tratamento

No primeiro teste a membrana foi utilizada sem tratamento prévio, ou seja, a membrana foi apenas lavada em água destilada e em seguida preenchida com a solução de fibroína. Para cada 15cm de membrana, aproximadamente, inseriu-se 12ml de solução de fibroína. Imersa-se, cada tubo de diálise, em béqueres com 1L de água ultrapura, sob agitação magnética constante. A água do béquer foi trocada após 1h. Trocou-se novamente após 8 horas, totalizando 6 trocas de água durante as 48h seguintes. Ao final do processo obtém-se uma solução de fibroína pouco viscosa.

2.2.2 Membrana com tratamento

Em um segundo teste, a membrana foi tratada previamente, sendo inicialmente lavada em água corrente durante 3 a 4 horas. Logo, esta foi transferida para uma solução de 0,3% (m/v) de sulfeto de sódio a 80°C por 1 minuto e lavada em água corrente a 60°C durante 2 minutos. Na etapa seguinte a membrana foi acidificada com uma solução de ácido sulfúrico a 0,2% (v/v) e enxaguada com água quente para remoção do ácido. Por fim, foi armazenada em recipiente com água ultrapura a temperatura ambiente.

A diálise seguiu o mesmo procedimento descrito no item 2.2.1 acima sendo que, neste caso, no segundo dia de diálise é possível observar a formação de um corpo sólido denominado hidrogel [17, 18]. Durante esta diálise a solução restante tornou-se mais viscosa, formando um gel.

2.3 Centrifugação

A solução de fibroína obtida na etapa 2.2.1 foi colocada em tubos falcon de 60ml, os quais foram transferidos para uma centrífuga Thermo SCIENTIFIC®, modelo Sorvale ST 16R Centrifuge, sob rotação de 11.000 RPM durante 30 minutos. Após esse tempo formou-se um precipitado que é removido dos tubos. A solução é novamente centrifugada nas mesmas condições, resultando num total de 1h de centrifugação. Nesta segunda etapa praticamente não foi observada a formação de precipitado no fundo dos frascos. Caso haja a formação de precipitado uma nova centrifugação é realizada para garantir a pureza final da solução de fibroína. Se não for utilizada logo em seguida, a solução é armazenada em geladeira a temperatura na faixa de 5 a 10°C.

No caso de diálise com membrana tratada (item 2.2.2), forma-se ao final do processo um hidrogel imerso em um gel no interior da membrana. O hidrogel é retirado, lavado rapidamente com água destilada para retirar o excesso de gel na sua superfície, e transferido para geladeira para posterior congelamento e liofilização. O gel restante é submetido ao mesmo processo de centrifugação e armazenagem descrito acima.

2.4 Concentração de fibroína na solução

Mediu-se o valor das massas em todas as etapas do procedimento, aplicou-se a fórmula do “Título”, também conhecida como “Porcentagem em massa de uma solução”, à qual se refere à relação entre a massa do soluto (m_1) e a massa da solução (m), segundo a equação:

$$\tau = \frac{m_1}{m} \cdot 100\% \quad (1)$$

2.5 Obtenção de scaffolds

As amostras foram armazenadas na forma de gel e hidrogel em moldes, no congelador a -4°C por 48h. Em seguida os moldes foram transferidos para o biofreezer à -80°C durante 4 dias. Após esse período as amostras congeladas foram liofilizadas, permanecendo por 48h a uma temperatura de -50°C . Em seguida as amostras foram retiradas do liofilizador, analisadas visualmente e com o auxílio de microscópio óptico.

2.6 Caracterização

As amostras foram caracterizadas em um Tomógrafo por Transmissão de Raios-X com resolução de $19,5\ \mu\text{m}$, num equipamento da Bruker microCT, modelo SkyScan 1174, utilizando tensão de 29 KV, corrente de $661\ \mu\text{A}$ e filtro de Alumínio com $0,25\ \text{mm}$ de espessura; espectroscopia na região do infravermelho - FTIR, utilizando um espectrofotômetro de transformada de Fourier da Perkin Elmer, modelo Spectrum 65; e calorimetria diferencial de varredura utilizando um DSC-60, marca Shimadzu.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em função das variações no processo de síntese, obtiveram-se resultados diferenciados quanto a formação de solução, hidrogel e gel de fibroína.

A utilização de membrana de diálise sem tratamento prévio (apenas com lavagem em água destilada) resultou numa solução de fibroína ao final da diálise. A obtenção de hidrogel a partir dessa solução requer um tempo de diálise maior (5 a 10 dias), de modo a elevar a viscosidade da solução e provocar a cristalização das cadeias de fibroína. Este acaba sendo um processo mais demorado e de custo um pouco mais elevado.

A formação de hidrogel ocorre, com maior facilidade e rapidez (três dias), quando se utiliza a membrana tratada segundo as etapas descritas no item 2.2.2 acima. Este resultado se deve ao aumento no tamanho dos poros da membrana devido ao tratamento recebido. Isto acelera a retirada do sal presente na solução aumentando a quantidade de água em contato com as cadeias da fibroína no interior da membrana. A água, segundo a literatura, favorece a cristalização das cadeias de fibroína com a formação de folhas β [19].

O tamanho dos poros da membrana é um ponto importante na formação do hidrogel. Geralmente, o que se reporta na literatura é a utilização de membranas de $3.500\ \text{Da}$, que é suficientemente permeável para permitir que os sais e a água permeiem livremente pela sua parede, mantendo no interior da membrana as cadeias curtas e longas de fibroína [10].

Neste trabalho foram utilizadas membranas com cu-off de $12.000\ \text{Da}$ que, juntamente com seu tratamento químico prévio, acelera o processo de diálise fazendo com que as cadeias mais curtas de fibroína sejam retiradas com maior rapidez. Isto resulta em uma maior concentração de cadeias longas de fibroína no interior da membrana reduzindo, deste modo, o tempo para a formação dos *scaffolds*.

A síntese com brometo de lítio formou apenas solução de fibroína ao final de três dias de diálise. Nesta extração com o brometo de lítio ($9,3\ \text{M}$), o processo foi o mesmo que o realizado com o solvente ternário ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$; 1:2:6 molar) [20]. Este resultado se deve ao maior poder de dissolução do brometo de lítio. Segundo a literatura [10] a dissolução da fibroína em soluções salinas depende da concentração de sal e aumenta na seguinte ordem: a) para ânions: sulfato < citrato < tartarato < acetato < cloreto < nitrito < brometo < iodeto < tiocianato < dicloroacetato; b) para cátions: $\text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Li}^+ < \text{Zn}^{2+}$.

A solução de LiBr utilizada nas mesmas condições de processo (temperatura e tempo) que a solução ternária, faz com que ocorra uma maior quebra das cadeias da proteína. Isto resulta, ao final do processo de dissolução, em um maior número de cadeias mais curtas de fibroína. Esta solução, dialisada agora com membranas de $12.000\ \text{Da}$ e previamente tratadas quimicamente contém, provavelmente, uma menor concentração de cadeias da proteína com tamanho suficiente para formação do hidrogel, o que justificaria o resultado obtido.

3.1 Concentração de fibroína na solução

A determinação da concentração de fibroína foi realizada apenas para a massa da solução liofilizada, onde se obteve o soluto puro, no caso a fibroína pura, que representou $m_1 = 4,40605\ \text{g}$, e a massa da solução final de fibroína, que indica a massa da solução ($m = 48,1887\ \text{g}$). Sendo assim, a concentração de fibroína na solução equivale a $9,1433\%$. O resultado apresenta-se próximo ao relatado na literatura, que é de 10% [18]. Porém, o

resultado não obteria 10% devido à perda de massa, que envolve a remoção de outra proteína, sericina, contida nos casulos.

3.2 Microscopia óptica

As amostras de géis e hidrogéis foram coletadas e transferidas para moldes. Após liofilização, avaliou-se a conformação estrutural dos *scaffolds*. Notou-se que estes obtidos a partir dos géis ao serem visualizados em microscópio óptico, apresentavam uma estrutura pouco porosa e com fibras desconexas e quebradiças, como mostra a Figura 1. Os *scaffolds* dos hidrogéis formaram matrizes porosas que analisados no microscópio óptico (Fig. 2-c) apresentam-se como um emaranhado de fios de fibroína, com cadeias extensas. Os fios possuem diâmetro médio de 24 μm , correspondendo a faixa relatada na literatura [18] que varia de 10 a 25 μm .

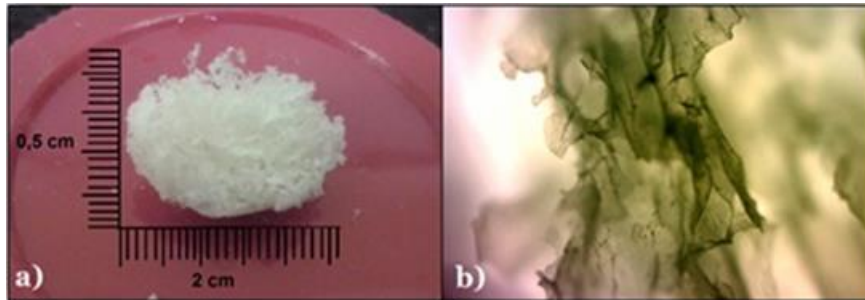


Figura 1: a) Scaffold a partir de gel de fibroína e b) Visualização microscópica do scaffold, aumento 100x.

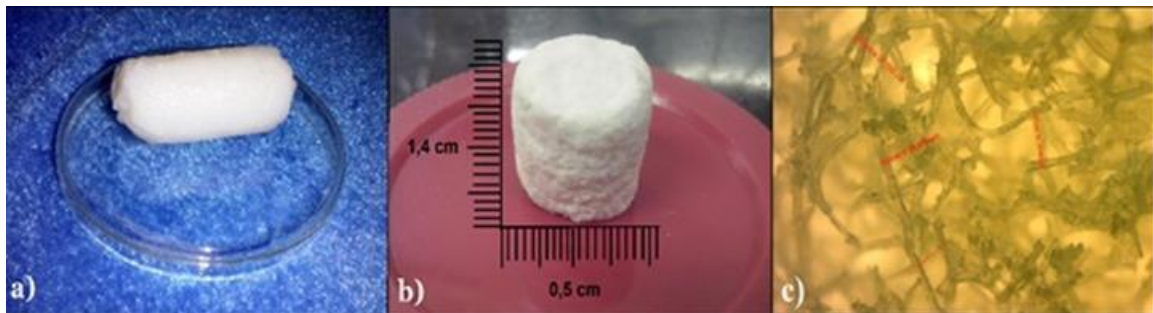


Figura 2: a) Hidrogel; b) Scaffold a partir de hidrogel liofilizado e c) fios de fibroína contidos no scaffold, aumento 100x.

3.3 Tomografia de Raios-X

Além da técnica da microscopia óptica utilizou-se também a Tomografia por Transmissão de Raios-X para analisar os *scaffolds* de hidrogel, com a qual se pôde analisar a estrutura da amostra representada pela Figura 3. Nesta figura é possível observar claramente a obtenção de um material poroso, bem como a interconectividade entre seus poros.

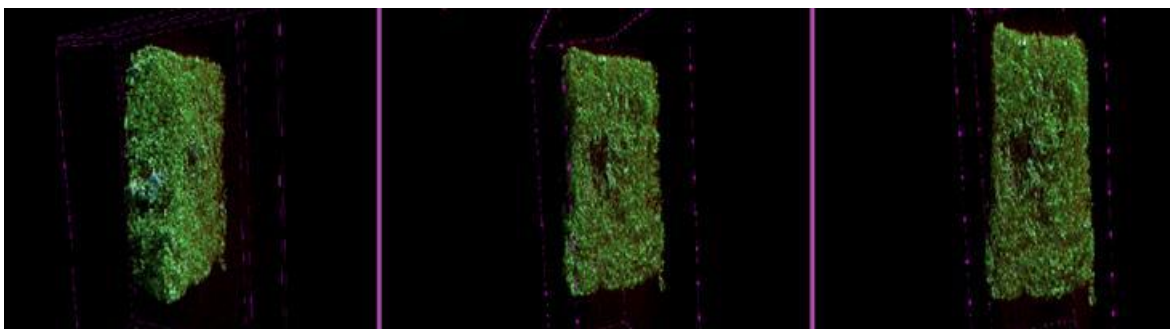


Figura 3: Tomografia de raios-X em três ângulos diferentes do scaffold obtido a partir do hidrogel.

Esta amostra com 10,034 mm^3 e área superficial de 30,534 mm^2 , apresentou 73,282% de porosidade total, sendo 73,272% de poros abertos interconectados. A densidade de conectividade entre os poros foi de

665,728 poros/mm³. A quantidade de poros fechados (não conectados) correspondeu a 0,037% do volume total da amostra, valor este que pode ser desprezado comparando-se com a porcentagem de poros abertos. Na superfície da amostra, com uma área de 32,727 mm², foi observada a presença de poros fechados correspondendo a um total de 0,297 mm².

Estes valores são importantes, pois a proliferação celular no interior do *scaffold* para a formação de novo tecido ósseo só ocorrerá se os poros, desde a superfície da amostra até seu interior, forem abertos e interconectados. Portanto, os resultados obtidos para o *scaffold* de hidrogel produzido neste trabalho indicam que este material apresenta condições, do ponto de vista estrutural, para ser utilizado em restaurações ósseas.

3.4 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta muito versátil e útil para informar sobre as estruturas de proteínas, obtida da análise da banda de amida I que ocorre na região de 1.700-1.600 cm⁻¹. Esta banda é bastante complexa, pois envolve estruturas secundárias (α -hélice, folhas β , voltas β e irregulares), e está relacionada principalmente com o estiramento C = O. A amida II corresponde a deformação angular no plano do grupo N-H (60%) e pelo estiramento C-N (40%). A banda referente a esta amida aparece em torno de 1.550 cm⁻¹. A amida III, cuja banda pode ser observada na região de 1.230-1.300 cm⁻¹, resulta da combinação das vibrações de estiramento do N – C e de flexão do grupo C = O, e está relacionada à conformação de folha- β [19].

A Figura 4 mostra o espectro infravermelho da fibroína que foi liofilizada. Neste, pode-se observar a presença das bandas características desta proteína. Têm-se claramente as três bandas referentes aos grupos amida, correspondentes à amida I em 1.643 cm⁻¹, amida II em 1.518 cm⁻¹ e amida III em 1.234 cm⁻¹.

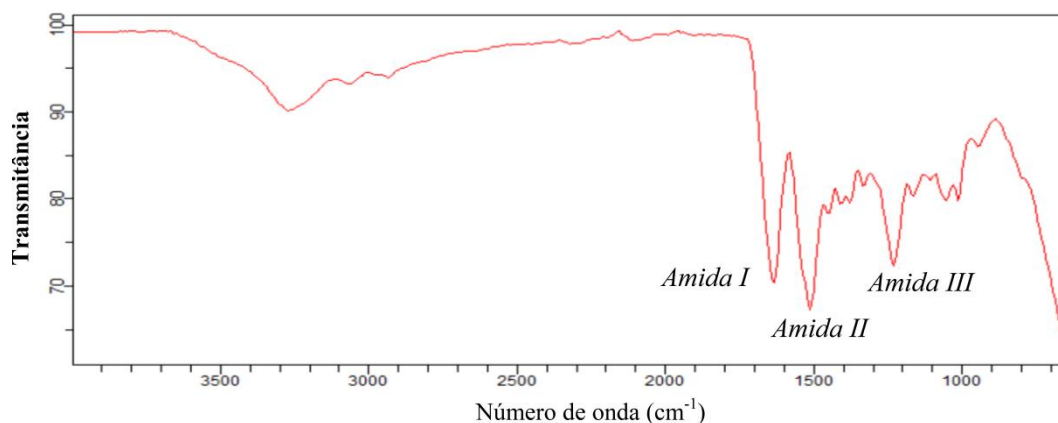


Figura 4: Espectro infravermelho da fibroína liofilizada, com a presença das bandas características referentes aos grupos amida I, II e III. [2, 7]

Os espectros das amostras obtidas com a solução de 9,3 M LiBr e com o solvente ternário são apresentados na Figura 5. O espectro referente ao *scaffold* obtido via solução ternária (Figura 5B) apresentou-se semelhante ao da Figura 4, onde se observa claramente a presença das três bandas referentes às amidas I, II e III, respectivamente em 1.683 cm⁻¹, 1.558 cm⁻¹ e 1.249 cm⁻¹.

A amostra de fibroína obtida via solução de brometo de lítio (Figura 5A), apresentou a banda referente à amida I um pouco deslocada, em 1.708 cm⁻¹. A banda da amida III, um pouco mais intensa, está presente em 1.249 cm⁻¹. No espectro a banda da amida II está presente em 1560 cm⁻¹, porém, não se observa claramente esta banda como nos demais espectros. Esta diferença deve-se provavelmente ao fato do LiBr ser um solvente mais agressivo do que a mistura ternária, o que provocaria maior alteração na estrutura da cadeia da proteína.

3.5 Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A análise DSC foi realizada em amostras com 2 mg, de gel e hidrogel de fibroína, cujas curvas são apresentadas nas Figuras 6 e 7. As duas amostras exibem curvas semelhantes, sendo que o primeiro pico endotérmico observado para as duas amostras, ocorre em 60°C e correspondente ao início da evaporação da água. Fora este pico devido à água, as amostras não apresentaram qualquer outra transição térmica até a temperatura de 280°C, resultado considerado importante para um biomaterial, pois demonstra que até essa faixa de tempera-

tura não ocorre decomposição do material. Estes corroboram com os estudos relatados na literatura que mostram a decomposição de biopolímeros entre 280° C e 300° C, aproximadamente [9, 21].

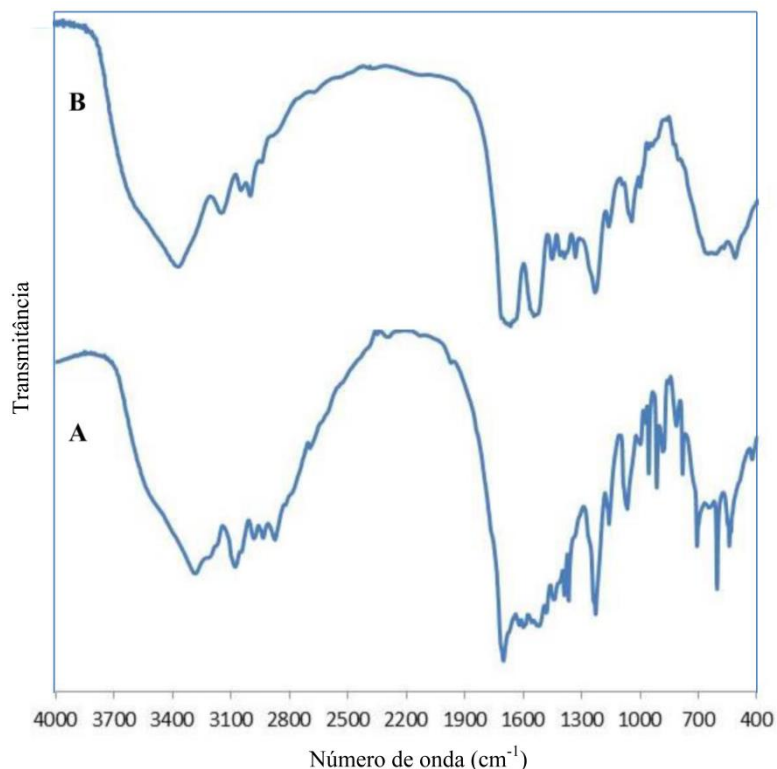


Figura 5: Espectro de Infravermelho para amostras de *scaffolds* utilizando-se A) solvente 9,3 M BrLi e B) solvente ternário. (n° de scans: 64, resolução: 4).

Um segundo pico endotérmico é observado em 297° C, que corresponde ao ponto de fusão da fibroína [19]. Este sinal aparece mais intenso no DSC do *scaffold* obtido a partir do hidrogel, provavelmente devido a maior concentração de fibroína presente nesta estrutura. O comportamento de decomposição ocorrido nessas amostras são semelhantes aos observados em materiais de seda não orientados com estrutura de folha β [21, 22]. A formação dessas estruturas de folha β são importantes pois servem como ligações cruzadas, estabilizando as moléculas de fibroína [9].

Os resultados de DSC, assim como os espectros infravermelho, são importantes, pois confirmam a presença da fibroína ao final do processo de extração e nos *scaffolds*.

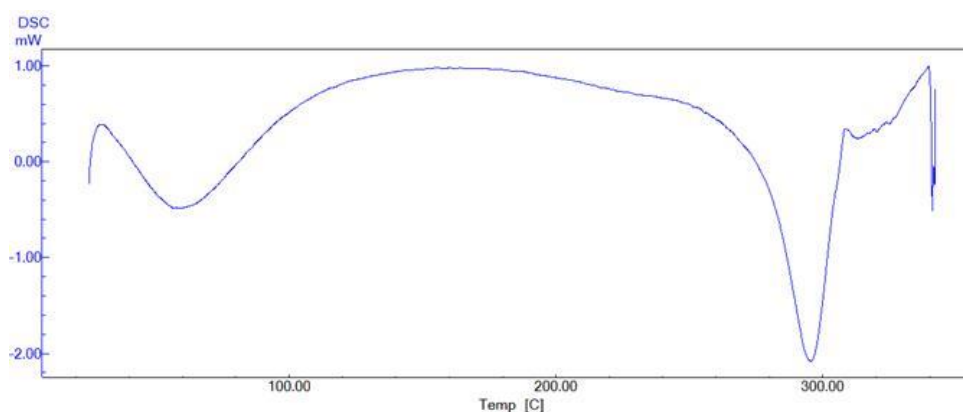


Figura 6: Curva DSC obtida para a amostra de hidrogel de fibroína (taxa de aquecimento de 10°C /min, nitrogênio atm).

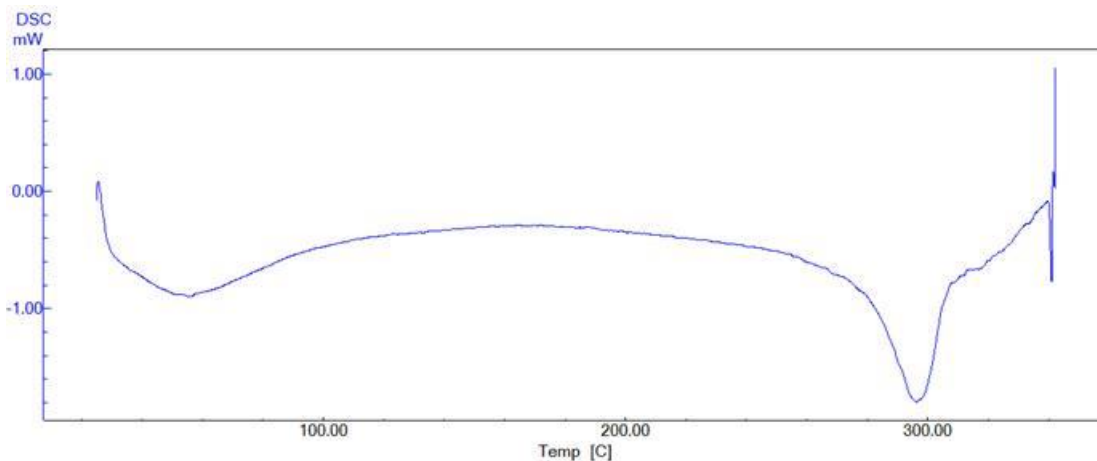


Figura 7: Curva DSC obtida para a amostra de gel de fibroína (taxa de aquecimento de 10°C /min, nitrogênio atm).

4. CONCLUSÕES

A proposta do trabalho em produzir *scaffolds* em um menor tempo foi atingida, onde se conseguiu um produto final com alto grau de porosidade e reprodutibilidade do processo. Os resultados mostraram a viabilidade em utilizar membranas, com poros maiores e submetidas a um tratamento químico prévio, na formação de *scaffolds* de fibroína. O emprego dessas membranas permitiu a formação de gel e de hidrogel durante a diálise em apenas três dias, tempo este bem menor do que o relatado na literatura. O mesmo resultado, porém, não se repetiu quando a solução ternária é substituída pelo brometo de lítio, o qual inviabiliza a gelificação da solução de fibroína durante sua diálise. Este resultado se deve ao fato deste reagente apresentar maior poder de dissolução das fibras, em comparação com o solvente ternário utilizado no trabalho.

As técnicas de FTIR e DSC confirmaram a presença de fibroína ao final da extração, com as variações de processo utilizadas. O *scaffold* do hidrogel liofilizado apresentou-se totalmente poroso, com poros interconectados desde a sua superfície, que pôde ser visualizado pela Tomografia por Transmissão de Raios-X. A análise por microscopia óptica mostrou que esta estrutura é composta por fios com diâmetro médio de 24 μm . Os *scaffolds* obtidos a partir do gel liofilizado aparentaram-se menos porosos, com fibras desconectadas, e mecanicamente mais frágeis devido a presença de cadeias mais curtas de fibroína.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC. À Fapesp pelo apoio financeiro. À Uniso pela disponibilidade dos laboratórios para a síntese e caracterização das amostras.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] KIM U.J., PARK J., KIM H.J., *et al.*, “Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin”, *Biomaterials*, v. 26, pp 2775–2785, 2005.
- [2] OLADEJI O., IGE, LASISI E. U., SUNDAY A., *Review Article Natural Products: A Minefield of Biomaterials*, *ISRN Materials Science*, Article ID 983062, p. 20, 2012.
- [3] LIU, X., MA, P.X., “Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Ann. Biomed. Eng.*, v.32, n.3, pp.477-486, 2004.
- [4] RINA N., HYOUNG-JOON J., DAVID L. K., “Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin”, *Biomacromolecules*, v.5, pp 718-726, 2004.
- [5] HUTMACHER D.W., SCHANTZ J.T., LAM C.X.F., *et al.*, “State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective”, *J. Tissue Eng. Regen. M.*, v.1, n.4, pp 245–260, 2007.
- [6] ALTMAN, G. H., HORAN, R. L., BRAMONO, D. S., *et al.*, “Biological and biomechanical assessment of a long-term bioresorbable silk-derived surgical mesh in an abdominal body wall defect model”, *Journal of the American College of Surgeons*, v.205, pp S53–S54, 2007.
- [7] KIM U.J., PARK J., KIM H.J., *et al.*, “Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin”, *Biomaterials*, v.26, pp 2775–2785, 2005.

- [8] YU Q., HUI W., KAI W., *et al.*, “A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures”, *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, pp 2-21, 2017.
- [9] KIM M. H., PARK W. H., “Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility”, *International Journal of Nanomedicine*, v.11, pp. 2967-2978, 2016.
- [10] SASHINA, E. S., BOCHEK, A. M., NOVOSELOV, N. P., *et al.*, “Structure and Solubility of Natural Silk Fibroin”, *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 79, n. 6, pp 869–876, 2006.
- [11] NAMRATHA S., ROOPINI K. D., NANDAN M., *et al.*, “Extraction & characterization of sericin and its immobilization on hydroxylapatite nanoparticles for tissue engineering applications”, *International Journal of ChemTech Research*, v.7, n. 5, pp 2117-2124, 2015.
- [12] PORNANONG, A., SORADA, K., TITPAWAN, N., *et al.*, “The Effect of Sericin from Various Extraction Methods on Cell Viability and Collagen Production”, *International Journal of Molecular Sciences*, v.11, pp 2200-221, 2010.
- [13] ROCKWOOD N. D., PREDA R. C., YÜCEL T., *et al.*, “Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin”, *Nature Protocols*, v.6, n.10, pp 1612, 2011.
- [14] VASCONCELOS, A. J. C., *Protein matrices for wound dressings*, Tese de D.Sc., Uminho, Minho, Portugal, 2010.
- [15] KAVICZ, M. H., *Preparação e caracterização de membranas obtidas a partir de fibroína de seda e poli (álcool vinílico)*, Tese de M.Sc., USP, São Carlos, Brasil, 2013.
- [16] TRAIAN, V. C., ZEKE, Z., DAMIEN G. H., *et al.*, “Bombyx mori Silk Fibroin Membranes as Potential Substrata for Epithelial Constructs Used in the Management of Ocular Surface Disorders”, *Tissue Engineering*, part A, v.14, n.7, 2008.
- [17] FERREIRA, A. V. F., *Incorporation of Elastase Inhibitor in Silk Fibroin Nanoparticles for Transdermal Delivery*, Tese de D.Sc., Uminho, Minho, Portugal, 2013.
- [18] BEXIGA, N. M., *Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloreto de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes*, Tese de M.Sc., USP, São Paulo, Brasil, 2014.
- [19] MORAES, M. A., NOGUEIRA, G. M., WESKA, R. F., BEPPU, M. M., “Obtenção e caracterização de blendas de fibroína de seda e quitosana”, In: *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Foz do Iguaçu, PR, Outubro, 2009.
- [20] BEPPU, M. M., SILVA, F. M., “Síntese e caracterização de hidrogéis de fibroína da seda com aditivos”, <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/53252/sintese-e-caracterizacao-de-hidrogéis-de-fibroína-da-seda-com-aditivos/>. Acessado em julho de 2017.
- [21] FREDDI, G., PESINA, G., TSUKADA, M., “Swelling and dissolution of silk fibroin. (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide”, *Int J Biol Macromol*, v. 24, n.2-3, pp 251, 1999.
- [22] UM, I. C., KWEON, J. Y., PARK, Y. H., *et al.*, “Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid”, *Int J Biol Macromol*, v.29, n.2, pp 91-97, 2001.