

ANÁLISE REOLÓGICA DA FIBROÍNA E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MEMBRANA OBTIDA A PARTIR DO CASULO DO BICHO DA SEDA*

Ingrid Russoni de Lima¹
Mara Carolina do Carmo Paresque²
Gabriele Cristine Duarte Freitas³
Fernanda A. Sampaio da Silva⁴
Bonifácio de Oliveira Fialho⁵
Renata Antoum Simão⁶
José Adilson de Castro⁷
Gláucio Soares Fonseca⁸

Resumo

Sintetizou-se uma membrana de fibroína a partir do extrato puro da mesma proteína obtida a partir do casulo do bicho da seda. O extrato puro da fibroína do casulo do bicho da seda foi obtido comercialmente. Em seguida, obteve-se um protocolo específico onde congela-se o extrato em tubos Falcon, e a partir da liofilização, ao longo de 2 dias consecutivos, obtém-se a fibroína em estado sólido com aspecto de microcristalitos. Fez-se um aquecimento protocolar em rampa, e obteve-se um recobrimento sobre um substrato polimérico inerte. A membrana obtida é seca em estufa por 5 dias e foi caracterizada por técnicas avançadas de caracterização físico-química por DRX, MEV e AFM. Além disso, procedeu-se a análise da fibroína ainda em fase líquida de extrato puro por meio dos estudos de Reologia. Os resultados mostraram que a análise Reológica da fase líquida foi condizente com o comportamento da fibroína. O método de obtenção da membrana por liofilização mostrou-se adequado e promissor. A caracterização identificou a presença de glóbulos semi-cristalinos por DRX e morfologia padrão de topografia de superfície pelas análises de MEV e AFM. Assim, foi possível obter a membrana de fibroína.

Palavras-chave: Membrana de fibroína, liofilização, caracterização físico-química.

RHEOLOGICAL ANALYSIS OF FIBROIN AND CHARACTERISATION OF A MEMBRANE OBTAINED FROM THE SILKWORM COCOON

Abstract

A fibroin membrane was synthesized from the pure extract of the same protein obtained from the silkworm cocoon. The pure fibroin extract from the silkworm cocoon was obtained commercially. Then, a specific protocol was obtained where the extract is frozen in Falcon tubes, and from the lyophilization for 2 consecutive days, fibroin is obtained in a solid state with microcrystallite appearance. Protocol heating was carried out on a ramp, and a coating was obtained on an inert polymeric substrate. The obtained membrane is kiln dried for 5 days and was characterized by advanced techniques of physical-chemical characterization by DRX, SEM and AFM. In addition, the fibroin still in liquid phase of pure extract was analyzed by means of Rheology studies. The results showed that the rheological analysis of the liquid phase was consistent with the behavior of fibroin. The method of obtaining the membrane by lyophilization proved to be adequate and promising. The characterization identified the presence of semi-crystalline globules by XRD and standard morphology of surface topography by SEM and AFM analyses. Thus, it was possible to obtain the fibroin membrane

Keywords: Fibroin membrane, lyophilization, physical-chemical characterization.

- ¹ *Dentista, Bióloga, Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Doutora em Patologia, Pós-Doutoranda em Engenharia Metalúrgica– PNPDCAPES, PPGEM, UFF, Volta Redonda, RJ – Brasil*
- ² *Física, Doutoranda da Escola Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda, UFF, Volta Redonda, RJ-Brasil*
- ³ *Engenheira, Mestranda em Engenharia Metalúrgica UFF, Volta Redonda, RJ-Brasil*
- ⁴ *Engenheira Química, Pós Doutora em Engenharia Metalúrgica-PNPDCAPES, UFF, Volta Redonda-RJ-Brasil*
- ⁵ *Químico, Pesquisador Engenharia Metalúrgica de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ, Brasil*
- ⁶ *Física, Mestre e Doutora e professora de Engenharia Metalúrgica e Materiais (COPPE-UFRJ), Rio de Janeiro, RJ-Brasil*
- ⁷ *Engenheiro Metalúrgico, Mestre e Doutor e professor de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, UFF, Volta Redonda, RJ-Brasil*
- ⁸ *Engenheiro Químico, Mestre e Doutor e professor de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, UFF, Volta Redonda, RJ-Brasil*

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais têm sido desenvolvidos a fim de suprirem a carência de reparo específico principalmente no caso de defeitos críticos ósseos críticos onde a cicatrização no geral em condições fisiológicas ocorre com uma migração de células fibroblásticas em velocidade maior que a osteoblásticas levando uma ocupação maior de tecido conjuntivo no reparo do que formação óssea. Desta maneira, barreiras específicas biocompatíveis são usadas a fim de funcionalizar uma barreira ou anteparo em que ocorre a redução da ocupação de células fibroblásticas cedendo espaço maior de ocupação de células osteoblásticas no reparo, fornecendo assim uma condição ideal para a regeneração do tecido local por atuação das células ósseas, garantindo uma maior concentração e indutores de células osteoblásticas local.

Neste caso, membranas para regeneração tecidual guiada são desenvolvidas e algumas propriedades devem ser consideradas como a resistência mecânica, biocompatibilidade, e neste caso houve a necessidade de garantir uma superfície recoberta por um material biológico com possibilidade de biocompatibilidade. Escolheu-se a fibroína por este principal motivo, entretanto algumas peculiaridades dessa proteína também são interessantes. Fibroína quando dispostas na forma de fio da seda correspondem a um dos materiais biológicos que apresentam a melhor resistência mecânica em menor diâmetro possível com fios chegando a escala nano. Além disso, a fibroína é termicamente estável, altamente cristalina, flexível, resistente à tração, além de ser insolúvel em água e na maior parte dos solventes orgânicos, garantindo assim, uma barreira biológica ideal à regeneração tecidual guiada (RTG).

A fibroína é secretada na seção posterior da glândula do bicho-da-seda e estocada até atingir uma concentração de 30% (m/v). Esta região é chamada de região intermediária do casulo. Nesta região outra proteína também é secretada (a serina). A fibroína e a serina se conformam na região anterior da glândula sem se misturar e são fiadas em ar para formar o casulo [1]. Há uma combinação de forças de cisalhamento, desidratação, variação de pH e íons potássio e cobre estão envolvidos na síntese da fibra de seda. Há uma transformação da seda solúvel em água e em fibras insolúveis entretanto os pesquisadores ainda vem estudando a fisiologia exata desse fenômeno [2]. Assim, devido a diversas propriedades interessantes da fibroína, é que o interesse por esta proteína vêm crescendo em ampla escala. Pode-se observar na Figura 1 a proteína fibroína vista em 3D obtida do casulo do bicho da seda (figura 1) [3].

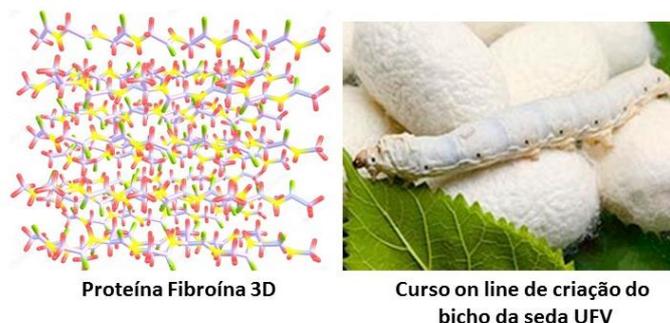


Figura 1: Visão da proteína fibroína a partir da modelagem 3D obtida do casulo do bicho da seda [3]

Considerando o grande potencial desse material, partiu-se de um protocolo inovador a partir da proteína fibroína extraída do casulo do bicho da seda obtido comercialmente. Fez-se diversas análises da reologia do extrato puro usando um Reômetro, avaliando a viscosidade da fase líquida. A partir dessa etapa desenvolveu-se um protocolo inovador no nosso laboratório de obtenção pelo método reverso por meio de liofilização descrita adiante. A partir desse momento, obteve-se uma membrana de fibroína onde a mesma foi caracterizada por análises de caracterização físico-química como DRX, MEV, Raman e AFM.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1- Material e Métodos

2.1.1- Obtenção do extrato

A fibroína usada neste trabalho a princípio foi usada comercialmente a fim de obter um padrão ideal de membrana. Algumas metodologias de extração da fibroína a partir do casulo do bicho da seda vem sendo apresentada na Literatura. A partir desse extrato, foi feito os estudos de reologia desse extrato puro, e, em seguida desenvolveu-se um protocolo inovador e totalmente desenvolvido em nosso laboratório onde obteve-se a proteína na consistência sólida e na forma de cristais a partir do processo de liofilização pelo método reverso.

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes. Sendo assim obtém-se o extrato da fibroína obtida do casulo de seda, sendo que no nosso caso foi obtido comercialmente. Congela-se em tubos Falcon a parte líquida por mais de 1 dia. Em seguida, tira-se imediatamente e leva-se ao liofilizador por 2 dias consecutivos. Obtém-se assim, a proteína seca na forma de cristais e de aspecto pré-pastosa.

O protocolo foi desenvolvido por 3 meses até obter os ajustes ideais, onde a proteína é inserida em um substrato polimérico inerte por meio de aspersão e pincelamento. Em seguida, o sanduíche proteína mais substrato é aquecido em rampa protocolar, e, em sequência a membrana é seca em cerca de 5 dias em estufa a 40 graus Celsius onde obteve-se a consistência da membrana padrão final a qual será usada como nosso padrão. Alguns parâmetros foram baseados no trabalho de Aciari (2013) e Ramirez (2016) [4], [5].

2.2- Estudos de Reologia da fase líquida da fibroína

A fibroína em fase líquida foi analisada em Reômetro onde foi checado em um primeiro momento o módulo de armazenamento G' e G'' e, em segundo momento, concentrou-se na análise da viscosidade da proteína em fase líquida. Alguns parâmetros foram baseados no trabalho de Ramirez (2016). O equipamento usado foi um Reômetro presente na Pós-Graduação em Engenharia (UFF-Volta Redonda)

2.3- Obtenção da membrana pelo método reverso por meio da liofilização

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de materiais em estado sólido [6] obtido a partir de líquido, devida a capacidade que o equipamento possui de passar do estado congelado diretamente para o sólido, de maneira que, a perda de líquidos não comprometa a espessura [7], [8], nem perda de propriedades de polímeros como o fenômeno de shrinkage. Dessa maneira, proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes. Sendo assim obtém-se o

extrato da fibroína obtida do casulo de seda, sendo que no nosso caso foi obtido comercialmente, congela-se em tubos Falcon a parte líquida por mais de 1 dia. Em seguida, tira-se imediatamente e leva-se ao liofilizador por 2 dias consecutivos obtendo assim a proteína seca na forma de cristais, de aspecto pré-pastosa.

2.4- Análise de DRX

A análise foi feita com objetivo de identificar algum grau de cristalinidade, uma vez que grande parte de materiais orgânicos são amorfos, entretanto na literatura mostra a organização da fibroína em glóbulos ou pseudo-cristais. A análise foi feita no equipamento Bruker D8 Advanced para análise de material policristalino operando em 40Kv, em lâmbida de 1,54060 e velocidade angular de 0,05/s e intervalo de varredura de 2 theta com variação de trabalho de 0 a 90 graus.

2.5- Análise de MEV

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada a fim de identificar rugosidade de superfície e estrutura topográfica e possíveis concavidades e glóbulos de superfície. As amostras de membrana de fibroína foram metalizadas em um metalizador marca Emitech, modelo K550X, sob corrente de 50 mA por 180s. O MEV apresenta detector de elétrons secundários (Jeol JSM 5800 LV UFF Volta Redonda). Os parâmetros de operação utilizados foram voltagem de 20kVa 21.24kV, WD de 12mm e distância de trabalho de 14-15mm

2.6- Análise de Raman

A análise Raman ainda estão sendo realizadas entretanto como a análise é de um material ainda não existente em bancos de dados, estes estão sendo construídos por meio de análises e construção de banco de dados no laboratório de superfície da COPPE/UFRJ. As análises preliminares ainda demonstram interferência. A espectroscopia Raman tem mostrado uma ótima ferramenta na Indústria farmacêutica pela facilidade, rapidez, monitoramento de incontáveis grupamentos químicos. É uma técnica altamente sensível, entretanto por enquanto ainda estamos estabelecendo os padrões da membrana fibroína nos nossos bancos de dados

2.7 Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise de Microscopia de Força Atômica foi realizado no laboratório da COPPE/UFRJ para análise da topografia da membrana de fibroína. O equipamento usado foi o Topometrix- Pronex-UFRJ com Witec focus de inovação-modelo alpha 300 por meio de protocolos desenvolvido no mesmo laboratório.

3- Resultados

3.1-Reologia da fase líquida da proteína fibroína

Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G''), obtidos por meio de ensaio reológico com placas paralelas foram realizados. A incorporação de microfibras de fibroína nos hidrogéis de colágeno aumentou os módulos G' (módulo elástico) e G'' (módulo viscoso). Percebe-se que o perfil da fase líquida assemelha-se ao perfil clássico obtido dos hidrogéis porém em maiores valores de G' e G'' . A viscosidade da fase líquida da fibroína foi obtida por meio do ensaio placa-placa conforme pode-se observar na figura 2 abaixo.

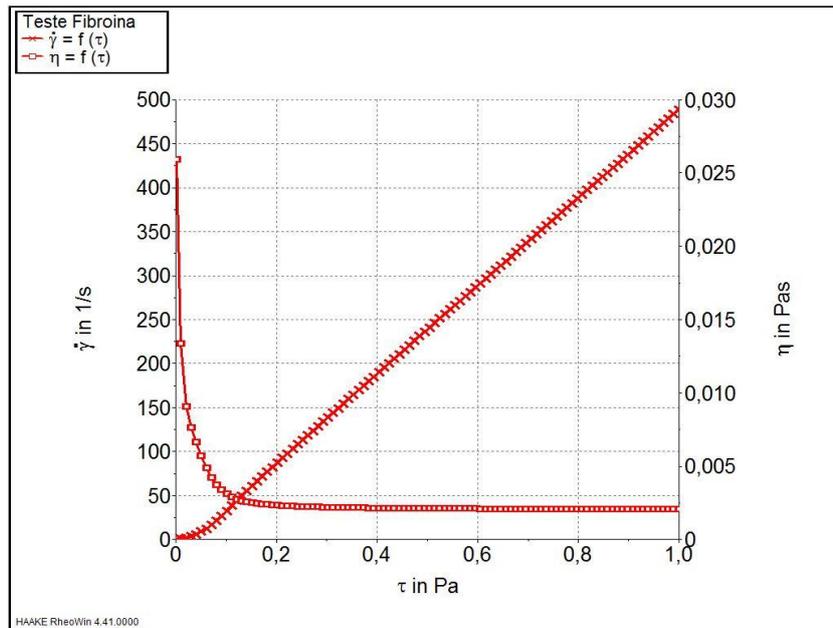


Figura 2: perfil de viscosidade padrão da fase líquida da fibroína

Poucos dados ainda existem na Literatura a respeito da reologia da fibroína, sobretudo na forma de membrana, entretanto, análises mais refinadas estão sendo desenvolvidas a fim de estabelecer bancos de dados no laboratório da Metalurgia da EEIMVR\Volta Redonda\UFF.

3.2-Obtenção da membrana de fibroína



Figura 2:Membrana de Fibroína obtida pelo método reverso pós-liofilização

3.3- Análise de DRX

A análise de DRX mostrou a existência de pico de cristalinidade na região mostrando que houve a presença de um pico cristalino na região a partir de 2º graus com picos presentes em de 33 e 34 graus. Estas análises corroboram os estudos de Pérez (2017) que identificou a presença de picos cristalinos na região a partir de 20 graus para a fibroína; além da análise de quitosana também

realizada por este autor. Pode-se identificar abaixo na Figura 3 o difratograma obtido de DRX na análise da membrana obtida [9].

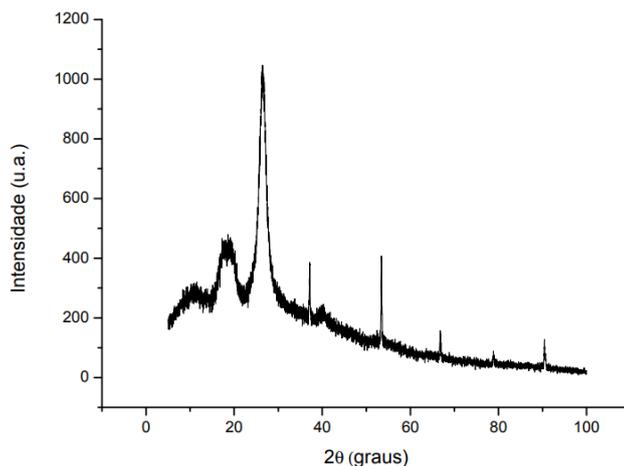


Figura 3: Difratograma de DRX da membrana de fibroína

3.4- Análise de MEV

Ao efetuar a análise no MEV viu-se uma membrana com conformação estável e morfologia na forma de glóbulos. Foi possível avaliar a superfície topográfica da membrana e identificar um revestimento relativamente homogêneo [10]. A fibroína como sendo proteína foi disposta de maneira pura se acomodando na forma de grânulos em especial denominados de glóbulos no caso da fibroína presentes em toda a extensão de área de superfície. Pode-se perceber na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) como identificada na Figura 4 abaixo.

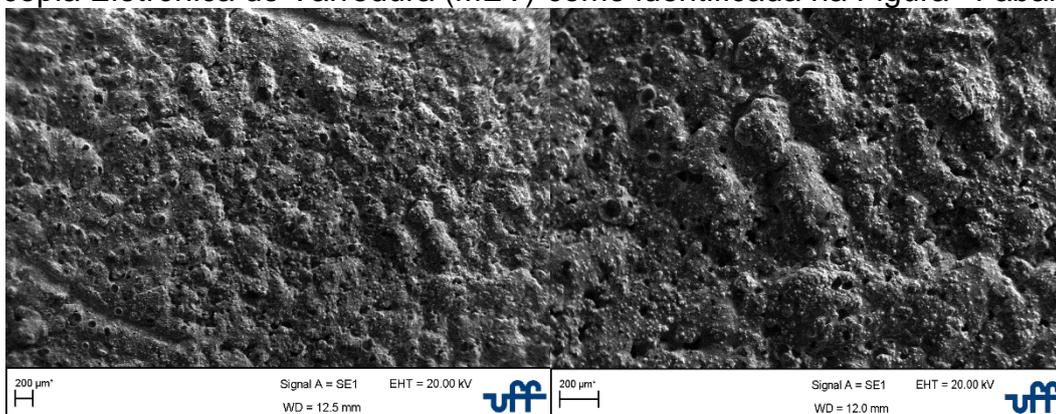


Figura 4: Aspectos de Morfologia de superfície obtida por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Estes aspectos topográficos propiciam a presença de microporosidades, além do próprio fato da fibroína ser uma proteína biológica constituindo assim a biomembrana propriamente dita, favorecendo assim a biocompatibilidade e a interação com o meio biológico.

3.4- Análise de Raman

A espectroscopia Raman tem mostrado uma ótima ferramenta na Indústria farmacêutica pela facilidade, rapidez, monitoramento de incontáveis grupamentos químicos. É uma técnica altamente sensível que necessita a identificação dos padrões da membrana fibroína nos nossos bancos de dados.

3.5- Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise de morfologia por meio de microscopia de Força Atômica (AFM) mostrou uma disposição homogênea da membrana de fibroína e também com a presença de relevos cuja literatura descreve como formação em glóbulos que são semi-cristais aos quais a fibroína se dispõe [11]. Podemos assim observar respectivamente na Figura 5 as análises obtidas por ajustes 5x5 na primeira imagem e 10x10 na segunda e 20x20 nas duas imagens inferiores.

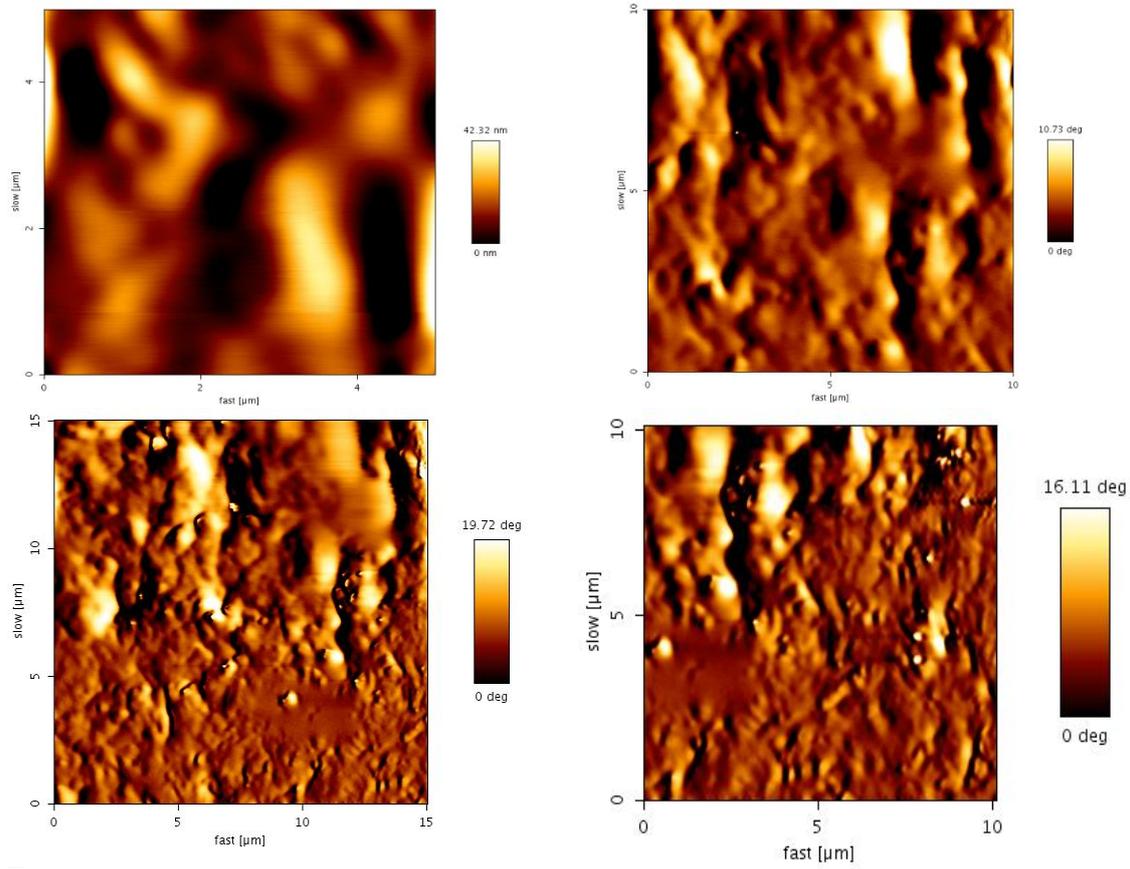


Figura 5: Análise por microscopia de Força Atômica (AFM) da membrana obtida de Fibroína

3.6- Modelagem da membrana fibroína

Ainda estão sendo realizadas. Uma espessura ideal da membrana para a aplicação da regeneração óssea guiada deveria ter a espessura de 1cm de espessura, e dimensões laterais de 1cm por 3 cm de dimensões laterais considerando as rugosidades do sistema, assim iremos simulamos as dimensões em Geogebra (free). As análises de tensão ainda estão gerenciados no programa ANSYS Software de elementos finitos Acadêmico.

3 CONCLUSÃO

4- Conclusões

Nossos resultados iniciais demonstram ser possível obter a membrana de fibroína que será usada como nosso padrão em nosso laboratório. Assim, as análises iniciais

mostram que foi possível obter a membrana de fibroína a partir do extrato puro com dados reológicos condizentes à Literatura. Na análise do MEV, a disposição de glóbulos demonstrou a disposição em semi-cristais identificada no espectro de DRX, as análises de Raman ainda caminham para a construção do banco de dados uma vez que este dado ainda não existe, a Microscopia de Força Atômica mostrou uma topografia de membrana viável, entretanto ensaios de otimização ainda devem ser dados continuidade. Foi possível obter a membrana convertendo o estado líquido para sólido na matéria, perfazendo o revestimento das membranas de fibroína pelo processo inovador da Liofilização. As técnicas de caracterização físico-química demonstraram ser possível caracterizar as amostras no seu ponto chave sendo que o MEV demonstrou a obtenção de uma topografia favorável. Os parâmetros de modelagem ainda estão sendo estudados a fim de concluir o perfil de modelagem da membrana de fibroína obtida.

Agradecimentos

Agradecemos à PNPD\CAPES pelo suporte financeiro. Aos programas de Engenharia Metalúrgica e de Materiais UFF de Volta redonda e COPPE\UFRJ, ao laboratório de superfícies da COPPE\UFRJ e laboratório de DRX do Instituto de Física da UFF

REFERÊNCIAS

- 1-Terry, AE. et al. pH induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of Bombyx mori silkworm. *Biomacromolecules*, 2004.;5, (3):768-772
- 2-Moraes, MA, Obtenção e caracterização de materiais micro e nanoestruturados contendo fibroína de seda combinada a outros polímeros biocompatíveis para contato com as células, Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade de Campinas\UNICAMP, 2014
- 3-Curso on line de criação do bicho da seda da Universidade federal de Viçosa, <https://www.uov.com.br/cursos-online-pequenas-criacoes/criacao-do-bicho-da-seda>, acesso em 20-02-2019
- 4-Aciari, JRF, Preparação de micropartículas de fibroína da seda calcificadas. Dissertação de mestrado do programa Interunidades Bioengenharia da escola de Engenharia de São Carlos da Faculdade de Medicina de ribeirão preto. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo\USP, 2013
- 5-Ramirez, S. M. V., Avaliação dos efeitos da idade da fibroína de seda nas suas propriedades durante o processamento, Dissertação de mestrado da Universidade Estadual de Campinas\UNICAMP, 2016
- 6- Polak, R., Preparação, avaliação físico-química e biológica *in vitro*, de pericárdio bovino conjugado fibroína de seda\quitosana via liofilização e irradiação, Universidade de São Paulo-USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Dissertação de mestrado, 2010.
- 7-Grínia, MN, Beppu, MM., Preparação e caracterização mecânica de membranas porosas e densas de fibroína de seda, UNICAMP, departamento de Termofluidodinâmica, 8º Congresso brasileiro de polímeros, 2006
- 8-Araújo, LCP., Júnior, JMO., Aranha, N., Synthesis and characterization of fibroin scaffolds, *Matéria*, 2018: 23, (4).
- 9-Freire, RA., Assunção de Jesus, MA., Rocha, IA., Andrade, GS., Lima, PA, Preparação e caracterização de diferentes composições de enxertos 3D à base de

Quitosana e fibroína para regeneração óssea guiada, os desafios contemporâneos para a sustentabilidade e equidade em saúde, CIE. De Enfermagem.2017:1, (1).

10-Bexiga, N.M., Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de seda com conteúdo variado de serina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes, Universidade de São paulo\USP, faculdades de Ciências farmacêuticas, 2014

11-Pérez-Cárdena, Y. C., Graziano-Vera, R., Munõz-Preto, E., Gómez-Pachón, E., Preparation and characterization of scaffold nanofibers by electrospinning, based on chitosan and fibroin from silkworm (*Bombyx mori*), Ingeniería y competitividad,2017:19, (1)