

ESTUDO DOS EFEITOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE MEMBRANAS DENSAS DE FIBROÍNA DE SEDA

Raquel F. Weska*, Mariana A. de Moraes, Marisa M. Beppu

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP –
raquelweska@terra.com.br

A fibroína de seda tem sido amplamente explorada para aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. A esterilização é uma etapa fundamental no processamento de biomateriais, e não deve alterar de forma negativa as propriedades funcionais dos dispositivos médicos. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência de diferentes métodos de esterilização nas características físicas e químicas de membranas densas de fibroína de seda. Membranas densas de fibroína foram esterilizadas por radiação ultravioleta, etanol 70%, autoclave, óxido de etileno e radiação gama, e foram analisadas por MEV, FTIR-ATR e DRX. Os resultados de esterilização mostraram que nenhum método ocasionou degradação das membranas, mas os métodos que utilizaram solvente orgânico, ou aumento de umidade e/ou temperatura (etanol 70%, autoclave e óxido de etileno) alteraram a conformação molecular da fibroína, sendo observado um aumento na proporção da estrutura folha- β , que indica o aumento da cristalinidade. Este efeito pode ser aproveitado quando se deseja que as membranas apresentem uma degradação *in vivo* mais lenta, dependendo da aplicação como biomaterial.

Palavras-chave: fibroína de seda, membrana, esterilização, biopolímero, biomaterial.

Study of the effects of different sterilization methods on the properties of dense and porous silk fibroin membranes

Silk fibroin has been widely explored for many biomedical applications, due to its biocompatibility and biodegradability. Sterilization is a fundamental step in biomaterials processing, and it must not alter in a negative way the functionality of medical devices. The aim of this study was to analyze the influence of different sterilization methods in the physical and chemical characteristics of dense silk fibroin membranes. Dense fibroin membranes were sterilized by ultraviolet radiation, 70% ethanol, autoclave, ethylene oxide and gamma radiation, and were analyzed by SEM, FTIR-ATR and XRD. The results for sterilization indicated that the methods didn't cause degradation of the membranes, but the methods that used organic solvent, or increase of humidity and/or temperature (70% ethanol, autoclave and ethylene oxide) altered the molecular conformation of fibroin, increasing the proportion of β -sheet structure, what indicates an increase of cristallinity. This effect may be positive when a slower degradation of the membranes is desired, depending on the application as a biomaterial.

Keywords: silk fibroin, membrane, sterilization, biopolymer, biomaterial.

Introdução

A fibroína de seda tem sido amplamente explorada para muitas aplicações biomédicas, incluindo matriz de suporte celular para a regeneração de ossos e ligamentos artificiais, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, reação inflamatória mínima e propriedades mecânicas adequadas^{1,2}.

Tanto para a fibroína, quanto para outros biomateriais, a esterilização 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 dos dispositivos médicos³.

Diversos artigos mencionam a esterilização de matrizes de fibroína por diferentes métodos, mas os efeitos destes nas propriedades físico-químicas e biológicas das matrizes ainda não foram reportados. Alguns estudos que mencionam a esterilização de matrizes de fibroína para aplicação como biomaterial utilizaram etanol a 70%⁴, radiação ultravioleta por 30 min⁵, autoclave², óxido de etileno⁶⁻⁸ e radiação gama⁹.

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência de cinco métodos de esterilização nas características físicas e químicas de membranas densas de fibroína de seda, visando a aplicação como biomaterial.

Experimental

Preparo das membranas de fibroína

A seda utilizada nos experimentos (lote BR 08 B – Tipo 1), proveniente do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), foi adquirida da indústria brasileira Bratac (São Paulo, SP). A sericina presente nos fios da seda foi removida de acordo com o método de Li *et al.*¹⁰, utilizando solução aquosa de Na₂CO₃ 0,5% durante 30 min, em banho termostaticado a 85 °C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, os fios foram lavados com água destilada em abundância. Os fios foram secos a temperatura ambiente por 48 h, e então diluídos na temperatura de 85 °C, durante 1 h e 30 min em solução ternária composta por CaCl₂-etanol-água (na proporção 1:2:8 molar), para a obtenção de uma solução de fibroína com concentração de 10%¹¹.

Para o preparo da membrana densa, a solução salina de fibroína foi dialisada por três dias, utilizando sacos de celulose, para reduzir a concentração de cálcio da solução, na temperatura de 8 °C. A diálise foi realizada em béqueres com água destilada, trocada a cada 24h, na proporção volumétrica de água para solução de fibroína de 1:15.

A solução dialisada foi espalhada em placas de Petri de poliestireno para a formação da membrana densa. A secagem das membranas ocorreu à temperatura ambiente num período entre 48 e 72 h. Depois de secas, as membranas foram imersas em etanol 70% durante 20 min, para torná-las hidrofóbicas, pelo aumento da proporção de estrutura folha-β da fibroína, com relação à estrutura hélice-α. Após o tratamento com etanol, as membranas foram lavadas abundantemente com água destilada e secas a 25 °C, sendo obtidas membranas com espessura final em torno de 100 μm.

Estudo do efeito da esterilização nas características das membranas de fibroína

Para avaliar o efeito da esterilização nas características das membranas densas de fibroína, as mesmas foram submetidas às diferentes técnicas de esterilização: etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama.

Para a esterilização com etanol, as membranas foram imersas em recipientes plásticos contendo álcool etílico 70%. Os recipientes foram mantidos fechados por 48 h, na temperatura de 8 °C¹². Em seguida, as membranas foram lavadas cinco vezes por imersão e agitação em recipiente contendo cerca de 100 mL de água destilada, trocada a cada lavagem.

A esterilização por radiação UV foi realizada em câmara de fluxo laminar com lâmpada de UV ($\lambda = 254$ nm). Cada face das membranas foi irradiada por 30 min e, posteriormente, as membranas foram embaladas em envelopes plásticos selados, e armazenadas na temperatura de 25 °C, até a realização dos ensaios de caracterização.

Para a esterilização em autoclave, as membranas densas de fibroína foram embaladas individualmente em envelopes compostos por papel grau cirúrgico em uma face, e filme plástico (polietileno e polipropileno) na outra. Os envelopes foram selados com uma seladora específica para este tipo de envelope. As membranas foram esterilizadas na temperatura de 121 °C, durante 30 min.

A esterilização com óxido de etileno foi realizada pela empresa Acecil – Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. (Campinas, SP). As membranas de fibroína foram embaladas com envelopes de papel grau-cirúrgico e filme plástico, e expostas ao óxido de etileno (Oxyfume 30, composto por 70% de CO₂ e 30% de C₂H₄O) sob as seguintes condições: vácuo de 400 a 450 mmHg, pressão de 0,5 a 0,6 kgf/cm², tempo de exposição de 4 h e temperatura de 50 a 55 °C. Após a esterilização, foram realizadas três aerações forçadas dentro da câmara com nitrogênio, e o processo foi finalizado com o armazenamento das membranas na temperatura de 25 °C por 72 h.

A esterilização por exposição à radiação gama foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/CNEN (São Paulo, SP). Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens de polietileno e seladas a quente. O equipamento apresentava as seguintes características: Fonte de ⁶⁰Co tipo Gammacell, modelo 220 (Atomic Energy of Canada Limited, Canadá); dimensões: diâmetro de 14 cm e altura de 20 cm. As amostras foram irradiadas numa taxa constante de 2,27 kGy/h, num tempo de irradiação de 11 h, totalizando uma dose de 25 kGy.

Para verificar a influência dos métodos de esterilização nas características das membranas densas e porosas de fibroína de seda, as mesmas foram caracterizadas antes e após a realização dos ensaios de esterilização.

A microestrutura da superfície e a área de seção transversal das membranas (fratura) foram analisadas por SEM, utilizando um microscópio Leica (LEO 440i, EUA), com uma corrente de 50 pA e tensão de 20 kV. No preparo das amostras, as membranas foram congeladas com nitrogênio líquido, fraturadas utilizando uma espátula metálica e liofilizadas por 24 h. Amostras da superfície e

da área de seção transversal de cada membrana foram fixadas em suportes de alumínio utilizando fita dupla-face de carbono, e foram recobertas com ouro.

A estrutura secundária das membranas densas de fibroína foi investigada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (MB 102, Bomem), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe. Os espectros foram obtidos na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , e 256 varreduras.

Análises de DRX das membranas foram realizadas utilizando um difratômetro de raios X (X'Pert PW 3050, Philips Analytical), com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \times 10^{-10}$ m). A fonte de raios X foi operada a 40 kV e 40 mA, e a intensidade de difração foi medida na modalidade *spinning*, com uma taxa de varredura de 0,6°/min, e 2 θ variando de 5 a 35°.

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as fotografias das amostras de membranas densas de fibroína, antes e após serem esterilizadas pelos diferentes métodos. Não foram observadas diferenças evidentes entre as membranas.

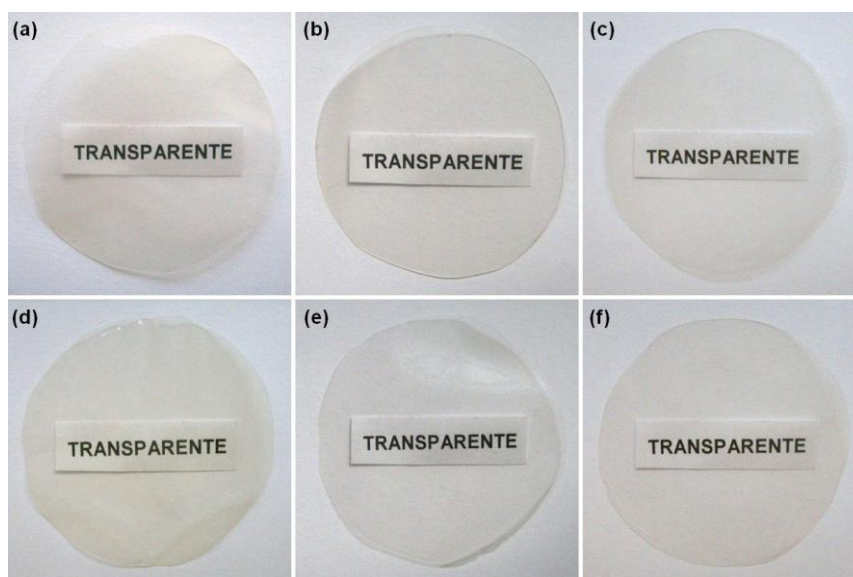


Figura 1 – Fotografias das membranas densas de fibroína não esterilizadas (a) e após esterilização com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

A Figura 2 apresenta as micrografias obtidas por SEM das membranas densas. Não foram observadas alterações evidentes nas membranas em função das esterilizações. É possível observar que as amostras de membrana densa possuem uma superfície regular, homogênea e lisa, e fratura característica de materiais densos poliméricos.

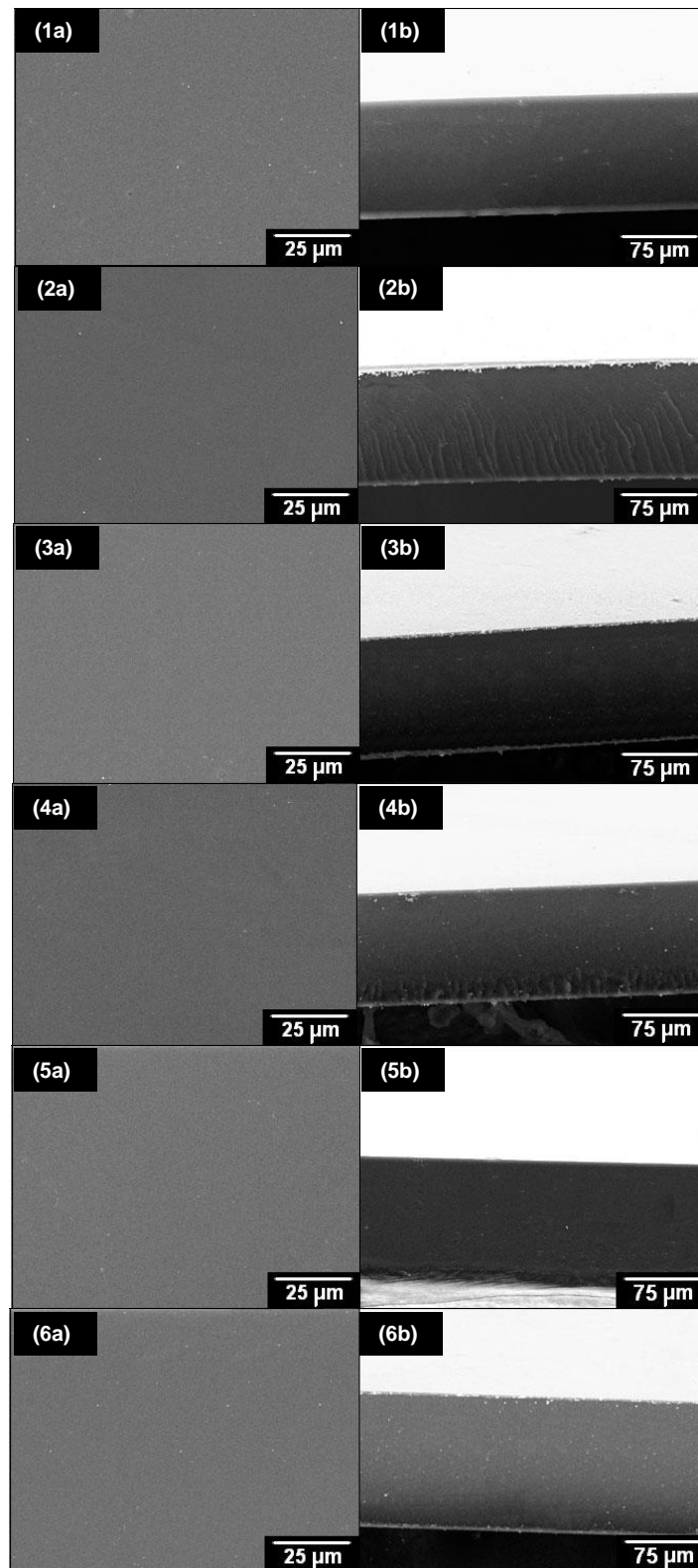


Figura 2 – Micrografias, obtidas por SEM, da superfície (a) e fratura (b) das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (1), e esterilizadas por etanol 70% (2), radiação UV (3), autoclave (4), óxido de etileno (5) e radiação gama (6).

A espectroscopia de FTIR é sensível às diferentes conformações moleculares da fibroína¹³. Cada conformação da fibroína possui bandas de absorção específicas em regiões de vibração distintas associadas aos grupos amida das proteínas. As bandas de amida I, II e III são atribuídas ao

estiramento C=O, deformação N-H, e dobramento O-C-N. Duas bandas distintas têm sido associadas com as vibrações da amida I, aparecendo em 1660 e 1630 cm^{-1} como contribuições das conformações seda I (enovelamento aleatório estrutura hélice- α) e seda II (estrutura folha- β), respectivamente. Na região da amida II, o pico em 1543 cm^{-1} , devido à conformação seda I, é desviado para 1515 cm^{-1} quando ocorre transição para a conformação seda II. Já banda de amida III ocorre na faixa de 1230 a 1260 cm^{-1} . A banda em 1230 cm^{-1} se deve à conformação seda I, enquanto que a banda em 1260 cm^{-1} é atribuída à fase cristalina (seda II)¹⁴.

A Figura 3 apresenta os espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana densa, antes e após os ensaios de esterilização. Nas regiões referentes às amidas II e III dos espectros de todas as amostras, foram observados picos em aproximadamente 1514 cm^{-1} e 1235 cm^{-1} , indicando que a conformação molecular predominante é seda II e seda I, respectivamente¹³⁻¹⁶. Estes resultados provavelmente foram obtidos, inclusive para a membrana não esterilizada, devido à forma como as membranas densas foram preparadas. Membranas de fibroína produzidas a partir de solução dialisada, e secas na temperatura de 25 °C apresentam predominância de estrutura seda I. O tratamento com etanol 70% por 20 min, realizado para tornar as membranas hidrofóbicas, induziu o aumento da proporção da conformação seda II¹⁶⁻¹⁸.

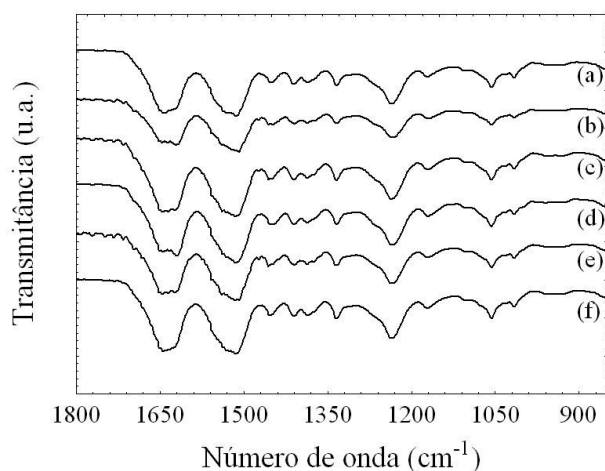


Figura 3 – Espectros de FTIR-ATR das amostras de membrana densa de fibroína não esterilizada (a), e esterilizadas com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

Na região do espectro referente à amida I, para todas as amostras foi observado que a banda de absorção cobre o intervalo entre 1645 cm^{-1} e 1622 cm^{-1} , mas para as amostras de membrana densa não esterilizadas, e esterilizadas por radiações UV e gama, o pico de absorção é maior em aproximadamente 1645 cm^{-1} (seda I), enquanto que nos espectros das amostras esterilizadas por etanol 70% e autoclave, o pico de absorção é maior em 1622 cm^{-1} (seda II). Estes resultados indicam que as amostras esterilizadas por etanol 70% e autoclave apresentam uma proporção maior

de estrutura folha- β , e menor de enovelamentos aleatórios e hélice- α , quando comparadas com a membrana não esterilizada¹³⁻¹⁵.

A posição da banda referente à amida I das amostras de membranas densas esterilizadas com etanol 70% e autoclave indica que os grupos C=O nas estruturas folha- β estão envolvidos em mais ligações de hidrogênio, quando comparadas com as estruturas folha- β das demais amostras, o que desvia o pico de FTIR correspondente para uma frequência menor¹⁴.

Lawrence *et al.*¹⁸ observaram que a esterilização por autoclave de membranas densas de fibroína mesmo não tratadas previamente com metanol ou etanol ocasionou um aumento da conformação seda II, o que indica que a esterilização por autoclave, devido à exposição das membranas de fibroína a condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, induz o aumento no conteúdo total da estrutura folha- β , e conseqüente diminuição da proporção da conformação seda I, similar ao efeito do tratamento das membranas densas de fibroína com metanol ou etanol¹⁶⁻¹⁷.

O espectro da membrana esterilizada por óxido de etileno apresentou picos de intensidade semelhante em 1622 e 1645 cm^{-1} , indicando que esta amostra apresenta uma proporção de conformação seda II maior do que a membrana não esterilizada, mas menor do que as membranas esterilizadas por etanol 70% e autoclave. O efeito do tratamento prévio da membrana com etanol 70%, associado à temperatura de 55 °C utilizada na esterilização com óxido de etileno provavelmente foram os fatores que resultaram no aumento da estrutura folha- β . Convém ressaltar que no espectro da membrana esterilizada por óxido de etileno, a ausência de picos em posições não relacionadas à fibroína indica que não houve interações químicas, e também que o processo de aeração que foi realizado após a esterilização provavelmente foi suficiente para a remoção efetiva do óxido de etileno¹⁹.

A Figura 4 apresenta os difratogramas de raios X das amostras de membranas densas antes da esterilização, e após os diferentes ensaios de esterilização. Todas as amostras apresentaram picos semelhantes, e o maior pico observado em todas as amostras, em 20°, é referente ao espaçamento cristalino de 4,55 Å (muito forte) de cristais folha- β . Outros picos menores que indicam a presença de cristais folha- β foram observados em 24,5° (3,8 Å), 16,5° (5,37 Å) e 8,7° (10,1 Å). Também foram observados dois picos referentes à conformação seda I: o segundo maior pico dos difratogramas em 12°, e um pico pequeno em 28,5° (3,2 Å), que indicam a presença de estruturas hélice- α . Pelos resultados observados, pode-se inferir que a estrutura cristalina das membranas densas é formada por uma coexistência das conformações seda I e seda II^{10,13,20,21}.

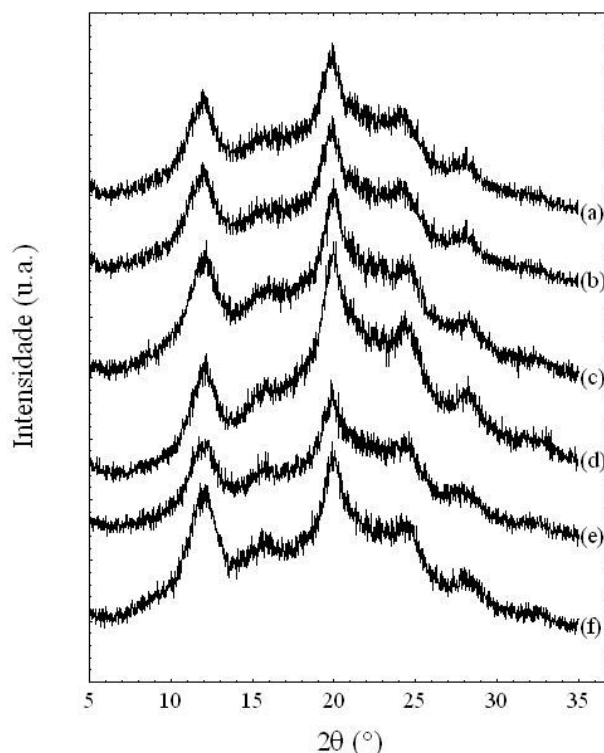


Figura 4 – Difratogramas de raios X das amostras de membrana densa de fibroína *in natura* (a), e tratadas com etanol 70% (b), radiação UV (c), autoclave (d), óxido de etileno (e) e radiação gama (f).

Conclusões

Os resultados das esterilizações de membranas densas de fibroína de seda pelos métodos de etanol 70%, radiação UV, autoclave, óxido de etileno e radiação gama mostraram que nenhum método ocasionou degradação das membranas e os métodos que utilizam solvente orgânico, e aumento de umidade e/ou temperatura (etanol 70%, autoclave e óxido de etileno) tornaram as membranas densas mais cristalinas, o que pode ser aproveitado quando se deseja que as membranas apresentem uma degradação *in vivo* mais lenta, dependendo da aplicação como biomaterial.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Acecil (Campinas, SP) e ao Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/CNEN (São Paulo, SP), pela esterilização das membranas de fibroína com óxido de etileno e radiação gama, respectivamente, e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Q. Lu, et al. *Biomaterials* 2007, 28, 2306.
2. Y. Yang, et al. *Biomaterials* 2007, 28, 1643.
3. C. T. Vangness *Arthroscopy* 2006, 22, 1351.

4. S. Fuchs, *et al. Biomaterials* 2006, 27, 5399.
5. Y. Gotoh, *et al. Biomaterials*, 1997, 18, 267.
6. B. Panilaitis, *et al. Biomaterials*, 2003, 24, 3079.
7. H. J. Jin, *et al. Biomaterials*, 2004, 25, 1039.
8. L. Uebersax, *et al. Biomaterials*, 2006, 27, 4599.
9. M. Fini, *et al. Biomaterials*, 2005, 26, 3527.
10. M. Li, *et al. Int. J. Biol. Macromol.*, 2002, 30, 89.
11. I. C. Um, *et al. Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, 29, 91.
12. P. R. Marreco, *et al. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 2004, 71, 268.
13. Q. Lv, *et al. J. Appl. Pol. Sci.*, 2005, 96, 2168.
14. C. C. Rusa, *et al. Macromolecules*, 2005, 38, 5640.
15. Y. Miyaguchi, J. Hu *Food Sci. Technol. Res.*, 2005, 11, 37.
16. I. C. Um, *et al. Int. J. Biol. Macromol.*, 2004, 34, 107.
17. B. Zuo; L. Liu; Z. Wu *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, 106, 53.
18. B. D, Lawrence, *et al. J. Mat. Sci.*, 2008, 43, 6967.
19. M. H. Lee, *et al. Surf. Coat. Technol.*, 2008, 202, 5762.
20. S. H. Kim, *et al. Polym. J.*, 2002, 35, 185.
21. Q. Lv, *et al. J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2004, 15, 1193.