

# AVALIAÇÃO DA DURABILIDADE AO ESCOAMENTO AQUOSO DE MEMBRANAS DE GELATINA ELETROFIADAS

E. NIEHUES<sup>1</sup>, M. J. DAS CHAGAS<sup>1</sup> e M. G. N. QUADRI<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: e\_niehues@hotmail.com; mara@enq.ufsc.br

**RESUMO** – A eletrofição é uma tecnologia em que forças elétricas são aplicadas em polímero fundido ou em solução para a fabricação de fibras ultrafinas com diâmetros na faixa de nanômetros a submicrômetros. As membranas formadas apresentam alta relação da superfície:volume e alta densidade de poros. Nanofibras de gelatina foram preparadas com sucesso por eletrofição usando como solvente ácido acético. Em seguida as membranas (4x4 cm<sup>2</sup>) foram reticuladas com solução aquosa de glutaraldeído (GTA) 2,5% nos tempos de 45, 60, 180 e 360 minutos. Estas foram avaliadas quanto ao grau de reticulação, determinado através de ensaios com ninidrina, além da solubilidade e durabilidade ao escoamento, ambos em meios aquosos a 25°C e quantificados por gravimetria. Para membranas reticuladas em 360 minutos obteve-se um grau de reticulação de 66,5±1,9 % resultando em 98,2±2,5 % de membrana insolúvel. Na avaliação da durabilidade das membranas em escoamento aquoso obteve-se 94,7±5,0% para membranas reticuladas por 180 minutos.

## 1. INTRODUÇÃO

A eletrofição é uma técnica em que um intenso campo elétrico é aplicado em um polímero líquido (em solução ou fundido) através de uma distância finita entre um capilar e um coletor aterrado. Como resultado, fibras ultrafinas com diâmetros entre nanômetros a sub-micrômetros são fabricadas (HUANG *et al.*, 2003; DOSHI *et al.*, 1995; FRENOT and CHRONAKIS, 2003). O sistema de eletrofição é composto por três componentes básicos: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar e um coletor aterrado. O capilar é ligado ao polo positivo da fonte de alta tensão e fica situado à frente do coletor, este conectado ao polo negativo.

A técnica da eletrofição tem sido reconhecida como um método eficiente para a fabricação de estruturas fibrosas em nanoescala (HUANG *et al.*, 2003). As fibras formadas apresentam características únicas e que as diferenciam das fibras regulares, como por exemplo, alta relação da superfície para volume e alta densidade de poros com tamanho pequeno. Com poros menores e superfícies maiores do que o usual, as nanofibras provenientes da eletrofição têm sido aplicadas com sucesso em diversas áreas como nanocatálise, engenharia de suporte de tecidos, proteção de roupas, filtração, além de serem úteis nas áreas biomédicas, farmacêuticas, de biotecnologia e de engenharia ambiental (LUU *et al.*, 2003; SUBBIAH *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2006; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; WELLE *et al.*, 2007; KHIL *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003).

Existe uma grande gama de polímeros usados na eletrofição capazes de formar nanofibras, entre eles estão os polímeros sintéticos e os naturais, são exemplos deste último as proteínas (OHGO *et al.*, 2003; WNEK *et al.*, 2003), os ácidos nucleicos (FANG and RENEKER, 1997) e os polissacarídeos (SON *et al.*, 2004a,b). Nos últimos anos, tem se obtido com grande sucesso eletrofição de proteínas principalmente provenientes de colágeno, gelatina, elastina e fibras de seda. (ZHANG *et al.*, 2005, 2006; ZHONG *et al.*, 2006). A partir do colágeno do tipo I, a proteína mais abundante no corpo humano, pode-se obter gelatina através de desnaturação térmica ou degradação física e química (HUANG *et al.*, 2004; KI *et al.*, 2005; CHOKTAWEEESAP *et al.*, 2007). Devido ao seu baixo custo e sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade em ambientes fisiológicos, a gelatina é comumente utilizada nas áreas alimentícia, fotográfica, cosmetológica, farmacêutica e aplicações médicas. No entanto, a estrutura de nanofibras eletrofiadas de gelatina é solúvel em água e mecanicamente fraca, o que limita suas aplicações. Para uma aplicação a longo prazo, uma membrana de nanofibras de gelatina eletrofiada deve ser reticulada, com a finalidade de melhorar tanto a durabilidade em água quanto o desempenho termomecânico (ZHANG *et al.*, 2006). A reticulação pode ser feita por aplicação de compostos químicos como o glutaraldeído (ZHA *et al.*, 2012), genipina (MADHAVAN *et al.*, 2010), entre outros. Glutaraldeído (GTA) é de longe o mais amplamente utilizado devido à sua elevada eficiência na estabilização de materiais de colágeno (KHOE, 1997). A reticulação de materiais colagenosos à base de GTA reduz significativamente a biodegradação, tornando estes materiais biocompatíveis e não trombogênicos, enquanto preserva a integridade biológica, força e flexibilidade. GTA é também facilmente disponível, de baixo custo e capaz de realizar a reticulação em um período de tempo relativamente curto. Embora outros agentes reticulantes tenham sido relatados na literatura com a finalidade de reduzir a citotoxicidade, estes não podem se igualar ao GTA na estabilização de colágeno (SUNG *et al.*, 1999). O risco de citotoxicidade pode ser minorado através da redução da concentração de solução de GTA (GOISSIS *et al.*, 1999) ou tratamento minucioso antes do uso. O objetivo deste trabalho foi fabricar fibras de gelatina eletrofiadas e avaliar o grau de reticulação em diferentes tempos além de verificar a solubilidade e a durabilidade ao escoamento das mesmas em água.

## 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1. Preparo da solução

A solução de gelatina suína tipo A (bloom 280), gentilmente cedida pela Gelnex, foi preparada na proporção de 18% (m/v) de gelatina em solução de 90% (v/v) de ácido acético. A solução permaneceu sob agitação suave durante 90 min.

### 2.2. Eletrofição

As membranas eletrofiadas foram coletadas em folha de alumínio (8x16 cm<sup>2</sup>) colocada a uma distância de 17 cm da agulha com voltagem de 17 kV e temperatura de 22±1°C. O volume da solução eletrofiada foi de 2 mL a uma velocidade 10 µl/min. As nanofibras eletrofiadas foram armazenadas em dessecador para testes posteriores.

### 2.3. Reticulação

A reticulação foi realizada em dessecador, colocando-se ao fundo uma placa de petri contendo 10 mL de solução aquosa de GTA 2,5% e acima da porcelana perfurada, as membranas fibrosas de gelatina (4x4 cm<sup>2</sup>) à temperatura ambiente. As membranas permaneceram no dessecador em diferentes tempos, 45, 60, 180 e 360 minutos; a seguir as amostras foram deixadas sob fluxo de ar em capela por duas horas, e submetidas a tratamento térmico a 100°C em estufa para remoção do GTA residual. Esta última etapa realça parcialmente a reticulação.

### 2.4. Grau de reticulação

O grau de reticulação foi determinado por ensaios com ninidrina (WU *et al.*, 2011). Em um tubo eppendorf, foram adicionados 5 mg de membranas de gelatina eletrofiadas e 1,00 ml de solução de ninidrina em etanol 1,5% (m/v), seguido de aquecimento da mistura por 25 min a 80 °C. Depois de resfriar até à temperatura ambiente, realizou-se diluição com água e a absorbância óptica (A) foi medida usando espectrômetro UV/VIS (PG Instruments, T90) em 570 nm contra uma solução em branco, sem membrana, que passou pelo mesmo procedimento das membranas reticuladas. O Grau de reticulação foi calculado pela Equação (1):

$$\text{Grau de reticulação}(\%) = \{1 - (A_{\text{membrana reticulada}} / A_{\text{membrana não reticulada}})\} \times 100 \quad (1)$$

### 2.5. Teste de solubilidade

As amostras reticuladas foram pesadas, submersas em água e mantidas em banho termostático com agitação suave por um período de 96h, na temperatura de 25°C. Em seguida as amostras foram secas em estufa a 100°C e pesadas novamente.

### 2.6. Durabilidade das membranas em escoamento aquoso

As membranas de gelatina reticuladas foram avaliadas quanto à durabilidade ao escoamento aquoso utilizando o aparato ilustrado na Figura 1.

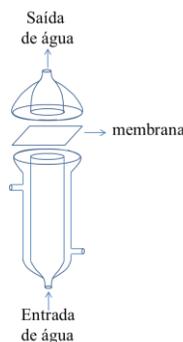


Figura 1: Esquema do aparato utilizado para determinação da durabilidade das membranas ao escoamento aquoso.

O diâmetro do orifício recoberto pela membrana é de 15mm. Uma cânula ligada ao orifício de entrada de água foi conectada a uma bomba peristáltica (Masterflex, 7518-00) com vazão de 15,8 mL/min. Após 3h de exposição ao fluxo de água à 25°C, as membranas foram secas em estufa à 100°C por 1 hora. A durabilidade das membranas foi determinada registrando-se as massas das mesmas antes e após submetidas ao escoamento aquoso. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Reticulação

Ao reticular as fibras de gelatina com glutaraldeído, uma retração da membrana com relação às dimensões iniciais foi observada (Figura 2). Isto pode ser justificado em função da reação do grupo funcional aldeído do glutaraldeído com as amins livres não protonadas da cadeia polimérica de proteína. Esta reação resulta na formação de novas ligações covalentes nas moléculas de gelatina, tanto intermolecular quanto intramolecular, com eliminação de moléculas de água (FARRIS *et al.*, 2010).

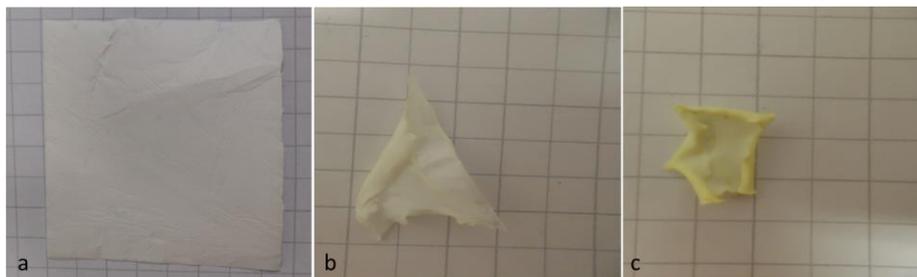


Figura 2: Imagens das membranas de gelatina eletrofiadas. (a) não reticulada; (b) e (c) reticuladas em 2,5% de GTA por 45 e 360 minutos respectivamente.

Com o objetivo de determinar a eficiência da reação entre glutaraldeído e gelatina nas condições estabelecidas, a quantidade de amins livres que não reagiram nas amostras reticuladas foi determinada por espectrofotometria através de ensaio com ninidrina. O grau de reticulação foi calculado pela comparação das amostras reticuladas com o padrão sem reticulação. Em 45 minutos,  $19,6 \pm 4,6$  % da membrana de gelatina reticulou, já em 60 minutos houve um aumento acentuado no grau de reticulação, passando para  $48,5 \pm 3,4$  % conforme pode ser observado na Figura 3. Aumentando o tempo de exposição das membranas ao glutaraldeído para 180 minutos obteve-se  $62,1 \pm 4,4$  % de reticulação e ao dobrar o tempo de reação com relação a este último, um aumento menos pronunciado foi observado, passando para  $66,5 \pm 1,9$ %. Já para 4320 minutos (72h) obteve-se grau de reticulação de  $94,0 \pm 0,3$ %.

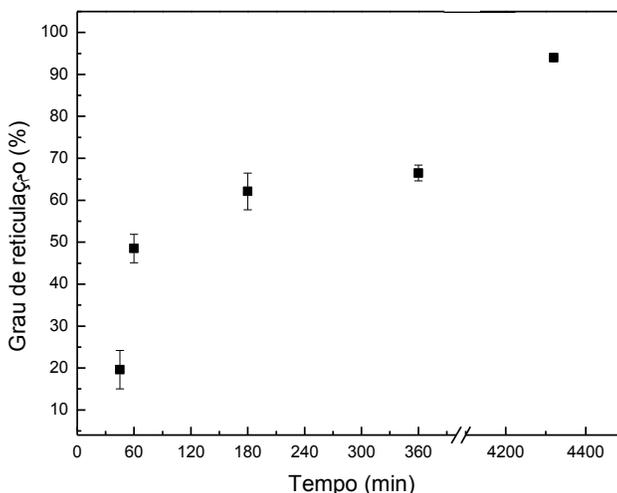


Figura 3: Variação do grau de reticulação em função do tempo de reação.

### 3.2. Solubilidade

Levando em consideração que as membranas de gelatina são solúveis em água e que a reticulação tem por objetivo torná-las resistentes ao meio aquoso, foi realizado o teste de solubilidade para verificar a relação entre o grau de reticulação e a porcentagem em massa de membrana insolúvel em água por 96 h a 25°C. Os resultados (Tabela 1) mostram um aumento gradual da insolubilidade, sendo que a partir de 180 minutos não se observa variabilidade estatisticamente significativa no mesmo. Desta forma, considerando uma relação custo/ benefício adequada, 180 minutos é um tempo suficiente para obter um grau de reticulação que produza membranas suficientemente insolúveis para a aplicação desejada.

Tabela 1 - Variação da porcentagem de massa insolúvel da membrana de gelatina reticulada em função do tempo de reticulação

|                     | Tempo / min           |                       |                         |                           |                      |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|
|                     | 45                    | 60                    | 180                     | 360                       | 4320                 |
| Massa insolúvel / % | 82,2±0,5 <sup>a</sup> | 90,4±4,2 <sup>b</sup> | 93,2±4,5 <sup>b,c</sup> | 98,2±2,5 <sup>b,c,d</sup> | 100±0 <sup>c,d</sup> |

\*Letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Relacionando os resultados da Tabela 1 com o grau de reticulação apresentado na Figura 3, observa-se que 19,6 % de reticulação apresentam 82,2% de insolubilidade em água pelo período de 96 h a 25 °C, e que a membrana 62,1% reticulada torna-se praticamente insolúvel em água (93,2% em massa) nas mesmas condições de tempo e temperatura.

### 3.3. Durabilidade ao escoamento aquoso

Em consequência da retração da membrana, discutida no item 3.1, a amostra reticulada no tempo de 360 minutos apresentou dimensões inferiores ao orifício do instrumento utilizado no teste de durabilidade ao escoamento, não sendo possível realizar o ensaio nesta condição. A Tabela 2 mostra os resultados para as demais membranas, reticuladas nos tempos de 45, 60 e 180 minutos, submetidas ao escoamento aquoso com fluxo de 15,8 mL/min por 3h a 25°C. Embora o grau de reticulação aumente significativamente nesta faixa de tempo (Figura 2), a diferença na durabilidade ao escoamento não foi estatisticamente significativa.

Tabela 2- Variação da porcentagem de durabilidade ao escoamento da membrana de gelatina reticulada em função do tempo de reticulação

|                                | Tempo / min           |                       |                       |     |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----|
|                                | 45                    | 60                    | 180                   | 360 |
| Durabilidade ao escoamento (%) | 88,8±1,9 <sup>a</sup> | 94,7±5,0 <sup>a</sup> | 94,2±2,6 <sup>a</sup> | -   |

\*Letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Destes resultados pode-se concluir que a partir de aproximadamente 50% de reticulação, as membranas de gelatina apresentam alta durabilidade em sistemas aquosos nas condições investigadas. Admitindo que o processo de reticulação das membranas inicie na camada externa e avance para o interior das fibras, pode-se sugerir que a reticulação iniciada na superfície protege a membrana, garantindo durabilidade mesmo que esta não esteja 100% reticulada.

## 4. CONCLUSÕES

Este trabalho mostra a durabilidade a sistemas aquosos de membranas de gelatina eletrofiadas reticuladas com glutaraldeído. O aumento no tempo de exposição das membranas ao reticulante gera aumento no grau de reticulação, sendo possível observar que, mesmo não estando totalmente reticuladas, as membranas apresentaram alta durabilidade ao escoamento aquoso, atingindo valores acima de 90% de sua integridade. Ao que nos concerne, este é o primeiro trabalho em que membranas de gelatina eletrofiadas e reticuladas, são avaliadas quanto ao escoamento aquoso. Os resultados apresentados sugerem possíveis aplicações para estas membranas nas áreas de filtração e engenharia de tecidos.

## 5. REFERÊNCIAS

- CHOKTAWEEESAP, N.; ARAYANARAKUL, K.; AHT-ONG, D.; MEECHASUE, C.; SUPAPHOL, P. Electrospun gelatin fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameters. *Polym. J.*, v. 39, p. 622-631, 2007.
- CUI, W. G.; ZHOU, S. B.; LI, X. H.; WENG, J. Drug-loaded biodegradable polymeric nanofibers prepared by electrospinning. *Tissue Eng.*, v. 12, p. 1070-1070, 2006.
- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. of Electrostat.*, v. 35, p. 151-160, 1995.
- FANG, X.; RENEKER, D. H. DNA fibers by electrospinning. *J. Macromol. Sci. Phys. B*, v. 36, p. 169-73, 1997.
- FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *J. Agr. Food Chem.*, v. 58, p. 998-1003, 2010.
- FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid in.*, v. 8, p. 64-75, 2003.
- GOISSIS, G.; JUNIOR, E. M.; MARCANTONIO, J. A. C.; LIA, R. C. C.; CANCIAN, D. C. J.; DE CARVALHO, M. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomater.*, v. 20, p. 27-34, 1999.
- HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. and Technol.*, v. 63, p. 2223-2253, 2003.
- HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*, v. 45, p. 5361-5368, 2004.
- KHIL, M. S.; CHA, D. I.; KIM, H. Y.; KIM, I. S.; BHATTARAI, N. Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *J. Biomed Mater. Res*, v. 67, p. 675-679, 2003.
- KI, C. S.; BAEK, D. H.; GANG, K. D.; LEE, K. H.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*, v. 46, p. 5094-5102, 2005.
- KIM, S. H.; NAM, Y. S.; LEE, T. S.; PARK, W. H. Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure. *Polymer J.*, v. 35, p. 185-190, 2003.
- LUU, Y. K.; KIM, K.; HSIAO, B. S.; CHU, B.; HADJIARGYROU, M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Control. Release*, v. 89, p. 341-353, 2003.
- MADHAVAN, K.; BELCHENKO, D.; MOTTA, A.; TAN, W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 1413-1422, 2010.

- OHGO, K.; ZHAO, C.; KOBAYASHI, M.; ASAKURA, T. Preparation of non-woven nanofibers for Bombyx mori silk, Samia cythia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polym.*, v. 44, p. 841–846, 2003.
- RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; YONG, T.; MA, Z.; RAMASESHAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Mater. Today*, v. 9, p. 40-50, 2006.
- SON, W. K.; YOUK, J. H.; PARK, W. H. Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning. *Biomacromol.*, v. 5, p. 197–201, 2004a.
- SON, W. K.; YOUK, J. H.; LEE, T. S.; PARK, W. H. Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. *J. Polym. Sci., B Polym. Phys.*, v. 42, p. 5-11, 2004b.
- SUBBIAH, T.; BHAT, G. S.; TOCK, R. W.; PARARNESWARAN, S.; RAMKUMAR, S. S. Electrospinning of nanofibers. *J. of Applied Polym. Sci.*, v. 96, p. 557-569, 2005.
- SUNG, H. W.; HUANG, D. M.; CHANG, W. H.; HUANG, R. N.; HSU, J. C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J. of Biomedical Mater. Res.*, v. 46, p. 520-530, 1999.
- WELLE, A.; KROEGER, M.; DOERING, M.; NIEDERER, K.; PINDEL, E.; CHRONAKIS, I. S. Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials. *Biomater.*, v. 28, p. 2211-2219, 2007.
- WNEK, G. E.; CARR, M. E.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Electrospinning of nanofibers fibrinogen structures. *Nano Lett.*, v. 3, p. 213–6, 2003.
- WU, S. C.; CHANG, W. H.; DONG, G. C.; CHEN, K. Y.; CHEN, Y. S.; YAO, C. H. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. *J. of Bioactive and Compatible Polym.*, v. 26, p. 565–577, 2011.
- ZHANG, Y.; OUYANG, H.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S.; HUANG, Z. M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, v. 72, p 156–165, 2005.
- ZHANG, Y. Z.; VENUGOPAL, J.; HUANG, Z. M.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polym.*, v. 47, p. 2911–2917, 2006.
- ZHA, Z. B.; TENG, W. B.; MARKLE, V.; DAI, Z. F.; WU, X. Y. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate buffer saline as a benign solvent. *Biopolym.*, v. 97, p. 1026-1036, 2012.
- ZHONG, S.; TEO, W. E.; ZHU, X.; BEUERMAN, R.; W.; RAMAKRISHNA, S.; YUNG, L. Y. L. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 79A, p. 456–63, 2006.