



INFLUÊNCIA DA RETICULAÇÃO EM BIOFILMES DE GELATINA E GALACTOMANANA

Nataly M. Siqueira^{1*}, Ítalo R. Barros¹, Ricardo V. B. Oliveira¹, Rosane M. D. Soares¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Instituto de Química, Campus do Vale, Porto Alegre-RS
Laboratório de Polímeros Avançados - LPA
nmsiqueira@gmail.com

Resumo: Neste trabalho foi avaliada a influência do agente de reticulação hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) sobre filmes de gelatina contendo galactomanana. Foram preparados filmes de gelatina tipo B (2 % m/m) contendo galactomanana nas concentrações de 0,1/0,3 e 0,5 % (m/m) através da técnica de evaporação do solvente (*casting*). Os mesmos foram modificados através de imersão das amostras em solução de EDC (10 mM). Os espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier mostraram a presença das bandas características de amostras com gelatina, e não apresentaram evidência de derivados a partir da reação com EDC. As micrografias obtidas das seções transversais dos filmes revelaram estruturas em lamelas organizadas, com eventual presença de poros. Os testes de intumescimento comprovaram a eficiência da modificação química, mostrando que os filmes modificados apresentaram as menores taxas de intumescimento sendo também mais resistentes à dissolução. Os resultados obtidos até agora e indicam que os filmes de gelatina contendo galactomanana modificados com EDC apresentam potencial para serem utilizados como biomaterial em etapas futuras.

Palavras-chave: *Filmes, casting, gelatina, galactomanana, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.*

Influence of 1-ethyl (3-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide in gelatin films containing galactomannan.

Abstract: The aim of this work was to evaluate the influence of the hydrochloride 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of gelatin/galactomannan films. The obtained gelatin films at 2 % (w/w) were prepared with galactomann concentrations ranging from 0.1 to 0.5 %. The casted films were modified by immersion in EDC solution (10 mM). The spectra of FTIR showed the presence of the main protein absorption bands and do not showed band related to urea derivatives, due to EDC/gelatin reaction. The SEM images revealed structures arranged in lamellae with some pores. The swelling tests showed the efficiency of chemical modification and indicated that modified films presented lower swelling properties compared to non-modified films. These results indicated that gelatin/galactomannan films modified with EDC have the potential as biomaterial and further investigation can be preformed.

Keywords: *Films, gelatin, galactomannan, 1-ethyl(3-3-dimethylaminopropil) carbodiimide.*

Introdução

O uso de substratos capazes de reproduzir as funções básicas da matriz extracelular permite a formação de estruturas organizadas e coordenadas que promovem simultaneamente locais adequados para ancoragem celular, estabilidade mecânica e orientação estrutural das células [1].



Recentemente, uma variedade de polímeros naturais, incluindo proteínas (gelatina, colágeno, fibra de seda) e polissacarídeos (celulose, -carragena, quitosana) tem sido empregados na produção de *scaffolds* para cultura de células [2]. Essas duas classes de biopolímeros apresentam interações inter- e intramoleculares únicas que chamam atenção para a produção de biomateriais biodegradáveis com propriedades diferenciadas. [3]. Além disso, é sabido através da literatura, que substratos a base de gelatina pura dissolvem e desaparecem rapidamente sob condições normais de cultura celular [4], o que envolve meios aquosos e uso de soluções tampão de pH neutro. Diante disso, uma diversidade de agentes reticulantes podem ser usados para formação de ligações cruzadas no material, tornando-o mais resistentes à dissolução.

Neste trabalho, foram avaliados filmes de gelatina contendo galactomanana modificados com 1-etil(3-3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Este agente de reticulação é um promotor de ligações cruzadas e não-tóxico quando comparado ao glutaraldeído, formaldeído e genipina, comumente usados para reticular biopolímeros. Os filmes modificados foram analisados através de testes de intumescimento em tampão fosfato-salino, morfologia através de microscopia eletrônica de varredura e foram acompanhadas as mudanças estruturais por infravermelho com transformada de Fourier.

Experimental

Preparação dos filmes

Foram preparadas soluções aquosas de gelatina (tipo B) a 2% (m/m) com adição de galactomanana nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5% (m/m). Quantidades pré-determinadas de cada polímero foram solubilizadas em água a 45°C sob agitação por aproximadamente 60 min. Após este período, as soluções foram misturadas e permaneceram sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Os filmes foram preparados a partir das soluções, as quais foram vertidas em placas de polietileno (9 cm de diâmetro) e deixadas em repouso para completa evaporação do solvente. Os filmes obtidos foram imersos em solução de EDC 10 mM durante 2 horas. Após este período, os filmes foram lavados com EtOH, EtOH:H₂O e água deionizada, sucessivamente, para remoção de resíduos.



Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A composição dos filmes foi analisada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Foram realizados 64 scans, no intervalo de 4000-600 cm^{-1} , utilizando dispositivo de refletância total atenuada (ATR).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A seção transversal dos filmes foi avaliada a partir das amostras criofraturadas em nitrogênio líquido. As amostras foram então metalizadas com ouro e posteriormente analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL modelo JSM 6060, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Grau de Intumescimento (%)

Foram recortadas amostras individuais para cada filme com dimensões de 20 mm x 20 mm. As amostras foram previamente secas a 30 °C por 24 h. Para avaliação do grau de intumescimento, os filmes foram imersos em tampão salino-fosfato (pH 7.4). As amostras foram coletadas e o excesso de solvente foi cuidadosamente removido para a realização das pesagens. Para calcular o grau de dos filmes, foi utilizada a equação 1:

$$I(\%) = \frac{(F_s - F_i)}{F_s} \times 100 \quad (1)$$

onde F_s é a massa de filme seco e F_i , a massa de filme intumescido.

Resultados e Discussão

Os espectros obtidos para todas as amostras mostraram o posicionamento da banda de amida em 3400 cm^{-1} , associado ao estiramento de N-H. Também foram observadas bandas de amida I em 1650 cm^{-1} e amida II em 1560 cm^{-1} . Entre 1500 – 1200 cm^{-1} foram observadas vibrações da amida II. De acordo com Hashim e col. (2010), isto pode significar deformação de ligações N-H que são atribuídas às deformações de CH_2 . Nos espectros de gelatina tipo B é comum a ocorrência de quatro regiões características, como: amida A (3600-2300 cm^{-1}), amida I (1656-1644 cm^{-1}), amida II



(1560-1335) cm^{-1} e amida III (1240-670 cm^{-1}). Entretanto, é comum uma baixa intensidade na frequência de amida III, que está associada à perda do estado de tripla hélice durante a desnaturação do colágeno [6].

No espectro obtido do filmes de gelatina não-modificado observaram-se bandas entre 1000 – 1100 cm^{-1} , que podem estar relacionadas à presença de amida III. Entretanto, com a adição da galactomanana à mistura, a frequência destas bandas diminuem. O mesmo comportamento foi observado nos filmes modificados com EDC.

Um fato relevante se deve a ausência das bandas em 812 e 871 cm^{-1} , que indicam a presença de unidades -D-galactopiranosose e -D-manopiranosose, respectivamente, características da estrutura de galactomananas. Porém, o mais importante foi a ausência de banda referente à ligação C-N que está relacionada à presença de derivados de uréia que são gerados pela reação entre as amins primárias da gelatina e o EDC.

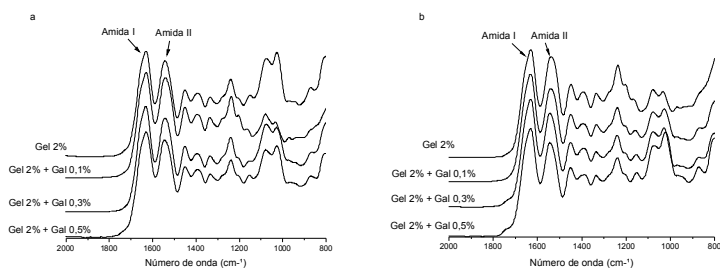


Figura 1– Espectros de FTIR-ATR obtidos dos filmes (a) não-modificados e (b) modificados com EDC.

Para os filmes modificados com EDC, observou-se a diminuição do grau de intumescimento. Isto aconteceu provavelmente devido à ocorrência de ligações cruzadas entre as cadeias da gelatina, em presença do EDC, o que leva a uma limitação na mobilidade das cadeias e menor espaço entre elas para absorção de líquido pelos filmes. Isto vai de encontro ao resultado observado por alguns autores, onde tanto a solubilidade como o grau de intumescimento foram reduzidos devido à reticulação da gelatina [7,8]. O uso de agentes de reticulação em matrizes de gelatina tem sido proposto por alguns autores como uma estratégia para minimizar o intumescimento e conseqüente dissolução da gelatina em meios aquosos [4]. Um fato relevante se



deve ao aumento da concentração de galactomanana nos filmes, o que proporcionou integridade e mais resistência quando foram imersos no tampão fosfato-salino. Estes resultados são interessantes uma vez que, com estas composições, podem ser obtidos filmes mais resistentes que possibilitarão uma interação reforçada entre célula e scaffold [1].

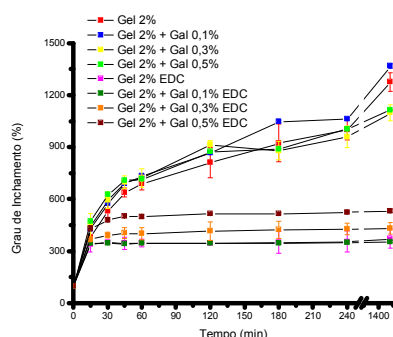


Figura 2– Gráfico do grau de inchamento em tampão fosfato-salino pH 7.4 para os filmes modificados e não-modificados.

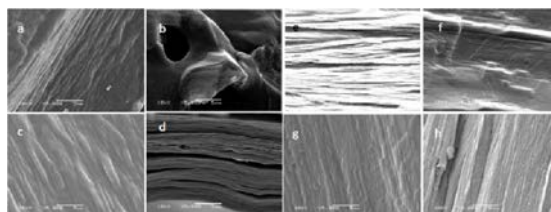


Figura 3– Secção transversal dos filmes de gelatina/galactomanana nas seguintes composições: (a) gelatina, (b) gel:gal 0,1 %, (c) gel:Gal 0,3% e (d) gel:Gal 0,5%, e filmes modificados de (e) gelatina, (f) gel:gal 0,1 %, (g) gel:Gal 0,3% e (h) gel:Gal 0,5%.

As fotomicrografias das seções transversais dos filmes (Fig. 3) mostram a formação de lamelas organizadas, eventualmente com presença de poros, no caso dos filmes não-modificados. Isto, provavelmente, permitiu a absorção de maior quantidade de tampão fosfato-salino pelas estruturas, o que pode ser explicado por uma de suas principais funções biológicas, a retenção de água [5]. Deve-se levar em consideração que a formação de poros pode estar associada à propriedade de retenção de água aliada à técnica de formação de filmes por *casting*. Ou seja, as



galactomananas retém o líquido quando estão em solução, e após a evaporação do solvente, espaços vazios podem ser gerados devido a perda do líquido que ocupava aquele local.

Conclusões

Os resultados apontam que a modificação química dos filmes de gelatina contendo galactomanana foi promissora. Isto foi baseado nos resultados de intumescimento, que mostraram a diminuição no grau de inchamento para os filmes modificados, bem como maior resistência e integridade dos mesmos após imersão em tampão fosfato-salino. Também foi possível observar, através dos espectros de infravermelho, que ambos os tipos de filmes (modificados ou não) mantiveram sua composição. Além disso, não foi detectada presença de derivados de uréia gerados pela reação com EDC.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

1. V. Guarino; M. Alvarez-Perez; V. Cirillo; L. Ambrosio. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2011, 26, 144.
2. N. Tirelli. *Macromol. Biosci.* 2006, 6, 575–578.
3. H. Chambi; C. Grosso. *Eur. Food Res. Technol.* 2011, 232, 63.
4. Y.Z. Zhang; H.W. Ouyang; C.T. Lim; S. Ramakrishna; Z.M. Huang. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2005; 72: 145-165.
5. V. D. Scherbukhin; O. V. Anulov. *App. Biochem. Microbiol.* 1999; 35: 229-244.
6. D. M. Hashim et al. *Food Chemistry* 2010; 118: 856-860.
7. A. J. Kuijpers et al. *Biomaterials* 2000; 21: 1763-1772.
8. B. Piotrowska et al. *Food Hydrocol.* 2008; 22: 1362-1371.