

**Programa de pós-Graduação em Processos
Tecnológicos e Ambientais
Universidade de Sorocaba - Uniso**

RELATÓRIO TÉCNICO 03/2021



PROTOCOLO: EXTRAÇÃO DE FIBROINA

Gustavo Alexandre
Angela Faustino Jozala
Norberto Aranha

Apresentação

Este relatório técnico apresenta o protocolo para a extração da fibroína a partir do casulo do bicho da seda *Bombyx Mori*. As etapas descritas permitem obter, ao final do processo, uma solução de fibroína que pode ser posteriormente transformada em gel, filmes, *scaffolds* e membranas.

Na literatura é possível encontrar variações do processo de extração, em relação a retirada da sericina (Etapa 1), que pode ser realizada utilizando apenas água à temperatura de 120 °C; ao tipo de solução utilizada para a dissolução dos fios de fibroína (Etapa 2); bem como ao tipo de membrana utilizada na diálise da solução de fibroína (Etapa 3) (ROCKWOOD et al, 2011).

O objetivo aqui é o de disponibilizar um protocolo onde são utilizados reagentes de baixo custo que também permite obter solução de fibroína compatível com as relatadas na literatura.



Conteúdo

Fibroína de seda.....	4
Protocolo.....	5
Etapa 1- Retirada da Sericina.....	5
Etapa 2- Solubilização da Fibroína.....	6
Etapa 3- Diálise.....	7
Etapa 4- Centrifugação.....	7
Etapa 5 - Esterilização.....	8
Referências.....	9

Fibroína de Seda

A seda é um material bastante utilizado em produtos farmacêuticos, biomédicos, cosméticos e nas indústrias têxteis (MIHAELA et al, 2013; PADAMWAR et al, 2004).

Constituída basicamente por dois componentes: a fibroína, uma proteína fibrosa e insolúvel em água, e a sericina, uma proteína globular que é solúvel em água. Ambas as proteínas possuem propriedades úteis que as tornam importantes polímeros naturais para uma variedade de aplicações, incluindo as relacionadas com biomateriais (CAPAR et al., 2008).

Pode-se processar a fibroína em diferentes formatos dependendo de sua aplicação. Além da forma de fio, a fibroína pode ser processada como filmes (HYEON et al, 2013; HAEYONG et AL, 2001), esponja (KARAGEORGIU et al, 2006), gel, membranas (BRIAN et al, 2009), tecidos porosos e em pó (CAO and WANG, 2009).

A fibroína de seda tem diversas aplicações na área biomédica, que pode ser atribuída à sua elevada resistência à tração, biodegradabilidade controlável, propriedades hemostáticas, não citotóxica, baixa antigenicidade e características não inflamatórias (MORI e TSUKADA, 2000). Resultados de estudos recentes indicam que a fibroína de seda pode formar uma boa base para o desenvolvimento de novos materiais biomédicos, especialmente no campo da engenharia de tecidos (ALTMAN et al, 2003).

Membranas de fibroína de seda regeneradas demonstraram ter boas características físico-químicas, especialmente biocompatibilidade. Portanto, esse polímero natural tem sido visto como uma matriz biológica com potencial para tratamento de feridas (LIU ET AL, 2010).

Estudos avaliaram a biocompatibilidade de membrana de fibroína regenerada com fibroblastos e células endoteliais, que formam o tecido de reparação mais importante na reconstituição de células danificadas. Verificou-se que a membrana de fibroína de seda não apresentou toxicidade ou genotoxicidade (NGUYEN et al, 2019), por isso pode ser utilizada como material de reparo do tecido e pele artificial.

A fibroína de seda tem, portanto, demonstrado ser um polímero de grande espectro de aplicações tecnológicas, particularmente na área médica.

Protocolo de Extração

Etapa 1 - RETIRADA DA SERICINA

A sericina é a proteína que funciona como cola e envolve os fios de fibroína presente nos casulos do bicho da seda *Bombyx Mori*. Esta primeira etapa é necessária para que a sericina seja totalmente removida, resultando ao final apenas os fios de fibroína.



Em uma cuba de aquecimento (ou um banho Maria) coloca-se um béquer contendo uma solução de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) na proporção: 2L de água MiliQ (água deionizada) para 4,24 g de Na_2CO_3 .

Em seguida, adiciona-se à solução 5,00 g de casulos do bicho-da-seda previamente cortados em pequenos pedaços. Aqueça a solução até atingir 80 °C, monitorando sempre com um termômetro, e transfira os casulos deixando-os por 35 minutos, a esta temperatura, para a remoção da sericina. Recomenda-se tampar o béquer para

minimizar a perda de água por evaporação. Ao final obtém-se as fibras de fibroína que são, em seguida, lavadas em água corrente por aproximadamente 10 minutos.

Já na temperatura ambiente, as fibras de fibroína são transferidas para um béquer contendo 2L de água MiliQ, permanecendo por 30 minutos sob agitação e sem aquecimento.

Repete-se o processo por duas vezes, substituindo a água MiliQ em cada vez, para a retirada total de resíduos presentes nos fios de fibroína.



Ao final do processo, as fibras são secas em estufa à 50°C por 24 horas.

Etapa 2 - SOLUBILIZAÇÃO DA FIBROINA

Após a retirada da sericina, as fibras de fibroína são dissolvidas em uma 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); contendo 60,00 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de Cálcio hidratado), 44,17 mL de etanol e 30,77 mL de água MiliQ.

Em um béquer de 2L, transfere-se esta solução ternária juntamente com as fibras secas de fibroína. Deixa-se em aquecimento sobre uma placa aquecedora (ou banho termostatizado) até a temperatura de 80°C, para que as fibras sejam solubilizadas por completo.



Ao final da dissolução dos fios de fibroína, obtém-se uma solução viscosa de cor amarelada.



Etapa 3 - DIÁLISE

A diálise tem por finalidade remover restos de sal e impurezas presentes na solução de Fibroína obtida ao final da Etapa 2.



Geralmente é reportado na literatura o uso de membranas de 3.500 Da; neste caso utilizou-se membrana de celulose MWCO 12.000 Da.

Em torno de 12 mL da solução de fibroína amarelada e viscosa é transferida para a membrana de diálise de aproximadamente 15 cm de comprimento. Esta membrana é então transferida para um béquer contendo 1L de água MiliQ, onde permanece sob agitação constante à temperatura ambiente. A água foi trocada após 24, 48 horas após o início, completando uma amostra de 48 horas de diálise

Etapa 4 - CENTRIFUGAÇÃO

A solução obtida após a diálise (Etapa 3) deve ser centrifugada pelo menos duas vezes a 5.500 rpm, a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 30 min. Esta etapa é importante para remover quaisquer resíduos sólidos (impurezas) que tenham permanecido na solução de fibroína.

Etapa 5 – ESTERILIZAÇÃO

Para garantir a integridade da solução de fibroina durante sua estocagem, esta é submetida ao aquecimento, em autoclave, a 127 °C por 20 minutos. Após seu resfriamento a solução é armazenada em geladeira para posterior utilização.

Referências

ALTEMAN, A. L. et al. Selective nonoperative management of blunt grade 5 renal. **J Urol**, v. 164, n. 1, p. 27-30, 2003.

Brian D. L., Jeffrey K. M., Mariya A. P., Fiorenzo G. O., David L. K. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering; **Biomaterials** 30, 1299–1308, 2009.

Cao, Y., Wang, B. Biodegradation of silk biomaterials. **International Journal of Molecular Sciences**. 10 (4), 1514-1524, 2009.

CAPAR, Nejat; KOTABE, Masaaki. The relationship between international diversification and performance in service firms. **Journal of international business studies**, v. 34, n. 4, p. 345-355, 2008.

Haeyong K., Hyun C. H., IN Chul U., Young H. P., Physical Properties of Silk Fibroin/Chitosan Blend Films; **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 80, 928–934, 2001.

Hyeon Y., Eun Y. K., Hyeongseok K., Chan H. P., Choun-KI J., Gillson K. Fabrication of Transparent Silk Fibroin Film for the Regeneration of Corneal Endothelial Cells; Preliminary Study, **Macromolecular Research**, 2013.

Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, et al. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. **J Biomed Mater Res A**, 78A, 324–34, 2006.

Liu T.L., Miao J.C., Sheng W.H., Xie Y.F., Huang Q., Shan Y.B., Yang J.C., Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing; *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 11(1):10-16, 2010.

Mihaela R. T., Cătălin Z., Izabela C. S., Eugeniu V., Roxana T., Corneliu C. Natural silk fibroin micro and nanoparticles with potential uses in drug delivery systems, **U.P.B. Sci. Bull., Series B**, Vol. 75, Iss. 1, 43-52, 2013.

MORI, Hajime; TSUKADA, Masuhiro. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 95-103, 2000.

Padamwar M. N., Pawar A. P. Silk sericin and its applications: A review, **Journal of Scientific & Industrial Research**, Vol. 63, 323-329, 2004.

Rockwood D.N., Preda R.C., Yücel T., Wang X., Lovett M.L. and Kaplan D.L., Materials Fabrication from Bombyx mori Silk Fibroin, **Nat Protoc.**; 6(10):. doi:10.1038/nprot.2011.379.

Nguyen T.P., Nguyen Q.V., Nguyen V.H, Le T.H., Huynh V.Q.N, Vo D.V.N., Trinh Q.T., Kim S.Y. and Le Q.V., Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review, **Polymers** 2019, 11, 1933; doi:10.3390/polym11121933