

Liliam Katsue Harada Rocha

Estabilização estrutural e funcional de sericina em filme biopolissacarídico: bio-origami para a regeneração de pele

> Sorocaba/SP 2018

Liliam Katsue Harada Rocha

# Estabilização estrutural e funcional de sericina em filme biopolissacarídico: bio-origami para a regeneração de pele

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo BalcãoCoorientadora:Profª Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Sorocaba/SP 2018

## Ficha Catalográfica

R574e	Rocha, Liliam Katsue Harada Estabilização estrutural e funcional de sericina em filme biopolissacarídico : bio-origami para a regeneração de pele / Liliam Katsue Harada Rocha. – 2018. 220 f. : il.
	Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2018.
	1. Polímeros. 2. Polisssacarídeos. 3. Química farmacêutica. 4. Farmacologia. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, co-orient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Liliam Katsue Harada Rocha

# Estabilização estrutural e funcional de sericina em filme biopolissacarídico: bio-origami para a regeneração de pele

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_/\_\_\_

# BANCA EXAMINADORA:

Ass.

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão Universidade de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Fernando Sá Del Fiol Universidade de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Norberto Aranha Universidade de Sorocaba

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nanci Aparecida Rocha Harada e Antonino Harada

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade maravilhosa que colocou em meu caminho, à minha família, por todo o apoio, obrigada a todos pelo carinho e paciência! Em especial aos meus queridos irmãos, Telma e Antonino Jr. Aos meus irmãos de coração Aline e Gerson, e aos meus amados sobrinhos Thamires, Giovanna, Gustavo, Luiza, Julia e Mariana. E um obrigado mais que especial aos meus amados pais Nanci e Antonino Harada, e ao queridíssimo Bruno Tozi, pois muito disso só foi possível pelo seu apoio.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Manuel Balcão e coorientadora, Profa. Dra. Marta Maria Vila, por toda a paciência, atenção e suporte na realização deste trabalho, vocês são geniais!!!!!!!

À Thaisa B. Pickler (LAPETOX), Prof. Dra. Marli Gerenutti, Denicésar Baldo (LaBNUS), Prof. Dra. Bertha Castro, Mestre Valéria Orsi, Mestre Gustavo Alexandre dos Santos, Rosenéia (Lab. Química), e a todos os demais que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, mas que não foram nominalmente citados. Agradeço ainda ao Professor Dr. Norberto Aranha, por gentilmente ceder os casulos do bicho-da-seda para a realização deste trabalho, e ao Professor Dr. José Martins, pela realização das análises de fluorescência de raios-X e análises por tomografia de raios-X. Muito obrigada à Prof. Dra. Renata de Lima, à Tatiane Pasquoto e à Mariana Guilger, do LABITON (UNISO), pelo auxílio na realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Agradeço pela ajuda e amizade de meus queridos e amados presentes que o mestrado me deu: Laura Favaro, Erica Silva, Welida Campos, Fernando Batain, Ludmilla Jorge e Edson Yoshida. Obrigada pelas gargalhadas, lágrimas compartilhadas e incentivos.

À Universidade de Sorocaba, e a todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Por último, mas não menos importante, agradeço à FAPESP e à CAPES pela concessão de financiamento na forma de Bolsa de Estudo de Mestrado para a realização deste projeto de pesquisa, no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES para a concessão de bolsas em instituições públicas e privadas sem fins lucrativos de ensino superior do Estado de São Paulo (Bolsa de Mestrado, Ref. No. FAPESP 2016/16641-3). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas nesta dissertação de mestrado são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

"Even the smallest person can change the course of the future."

Dialogue between the elf queen (Galadriel) and Frodo, in "The Lord of the Rings" J.R.R. Tolkien (1892–1973)

### RESUMO

Hidrogéis são estruturas formadas por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, intumescendo em contato com água mas mantendo sua integridade estrutural. Os hidrogéis biopoliméricos são bastante interessantes para utilização em regeneração de pele e no tratamento de feridas cutâneas, como curativos, devido a muitos fatores, incluindo a sua baixa toxicidade. Na preparação de hidrogéis, utilizam-se polímeros tanto naturais como sintéticos, polimerizados por diferentes processos. Neste projeto de pesquisa, optouse pela utilização dos biopolissacarídeos goma xantana e carragenana, além da utilização da proteína sericina, que foi incorporada nos filmes como princípio ativo. A sericina é uma proteína globular bioativa, constituindo entre 25-30% (m/m) das proteínas da seda. Devido às suas propriedades bioquímicas e biofísicas exclusivas, a sericina tem sido estudada para várias potenciais aplicações. Este trabalho de pesquisa teve como objetivo desenvolver e avaliar um filme biopolimérico integrando sericina (bio-origami), com propriedades mecânicas adequadas, com potencial de regeneração cutânea. A sericina, extraída do casulo do bicho da seda (Bombyx mori) por dois processos distintos, foi comparada ao seu padrão e caracterizada por diferentes métodos, tanto do ponto de vista físicoquímico como biológico. Seguindo-se à caracterização da sericina, produziram-se os filmes biopoliméricos (bio-origamis) para estabilização estrutural e funcional de sericina, com recurso a um planejamento fatorial completo do tipo  $3^2$  (2 variáveis (% (m/m) de goma xantana e % (m/m) de carragenana) em 3 níveis ((-1), (0) e (+1)), com polimerização realizada por adição de álcool polivinílico (PVA) (98% hidrolizado) a 1,25% (m/v), e com adição de glicerol até 2,50% (m/v) em todas elas, para indução de efeito plastificante nas formulações, originando assim um total de 09 formulações. Para a matriz de filme biopolimérico otimizado estatisticamente, a incorporação de sericina foi avaliada na formulação ótima em termos de composição biopolissacarídica, nos níveis de 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>hidrogel</sub>. Os filmes bioorigami obtidos foram avaliados considerando a capacidade de liberação da entidade proteica bioativa (sericina), através de testes de permeação, assim como por testes de caracterização tanto físicoquímica como biológica. As duas técnicas de extração utilizadas para a produção dos extratos da proteína sericina apresentaram rendimentos relativamente semelhantes. No processo de caracterização biológica, os extratos de sericina apresentaram-se atóxicos e com atividade antimicrobiana positiva para cepas de Staphylococcus aureus. Na análise de atividade antioxidante, a sericina obtida pela técnica de extração por liofilização apresentou maior atividade antioxidante. A composição matricial do filme biopolimérico de escolha obtido pela otimização estatística foi aquela correspondendo ao nível (+1) (0), por resultar em um filme mais forte e elástico. Os resultados obtidos a partir da caracterização do filme bio-origami otimizado, integrando diferentes concentrações de sericina, evidenciam que a proteína sericina foi estabilizada tanto estruturalmente como funcionalmente, com o bio-origami dotado de efeitos de eliminação de radicais livres e capacidade de liberação prolongada da proteína bioativa, sugerindo assim uma potencial aplicação biofarmacêutica para a regeneração de pele.

**Palavras chave:** Filme biopolimérico. Bio-origami. Carragenana. Xantana. Sericina. Casulos de *Bombyx mori*. Extração. Citotoxicidade. Atividades antioxidante e antimicrobiana. Liberação controlada. Permeação transdérmica.

### ABSTRACT

Hydrogels are structures formed by three-dimensional networks of crosslinked hydrophilic polymers, swelling in contact with water but maintaining their structural integrity. Biopolymeric hydrogels are guite interesting for use in skin regeneration and treatment of cutaneous wounds, as dressings, due to many factors, including their low toxicity. In the preparation of hydrogels, both natural and synthetic polymers are used, polymerized by different processes. In this research project, one chose to use the biopolysaccharides xanthan and carrageenan gums, in addition to the use of the protein sericin, which was incorporated into the films as active principle. Sericin is a bioactive globular protein that constitutes 25-30% of the silk proteins. Due to its unique biochemical and biophysical properties, sericin has been studied aiming at several potential applications. This research work aimed at developing and evaluating a biopolymeric film integrating sericin (a bioorigami), with adequate mechanical properties, with potential for skin regeneration. Sericin, extracted from the cocoon of the silkworm (Bombyx mori) by two distinct extration procedures, was compared to its standard and characterized exhaustively by different methods, both physicochemically and biologically. Following sericin characterization, biopolymeric films (bio-origamis) were prepared aiming at the structural and functional stabilization of sericin, using a full experimental fatorial design of the type  $3^2$  (2 variables (%) (w/w) of xanthan and % (w/w) of carrageenan gums) at 3 levels ((-1), (0) and (+1))), with polymerization performed by addition of polyvinyl alcohol (PVA) (98% hydrolyzed) at 1.25% (w/v), and with addition of glycerol up to 2.50% (w/v) in all formulations, to induce plasticity, thus giving rise to a total of 09 formulations. For the matrix of biopolymeric film statistically optimized, incorporation of sericin was evaluated in the optimum formulation in terms of biopolysaccharide composition, at the levels of 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mgsericin/mLhydrogel. The bio-origami films produced were evaluated considering their ability to release the bioactive protein entity (sericin), via transdermal permeation tests, as well as by physicalchemical and biological characterization tests. The two extraction methodologies employed to produce the sericin extracts showed relatively similar yields. In the biological characterization process, both sericin extracts proved to be non-toxic and displayed positive antimicrobial activity for strains of Staphylococcus aureus. In the analysis of antioxidant activity, the sericin extract produced by the lyophilization technique displayed higher antioxidant activity. The matrix composition of the selected biopolymeric film, chosen from the statistical optimization was that corresponding to the level (+1) (0), since it resulted in a stronger and more elastic film. The results obtained from the characterization of the optimized bio-origami film, integrating different concentrations of sericin, suggest that sericin was structurally and functionally stabilized, with the bio-origami film exhibiting radical scavenging effects and ability to release the bioactive protein in a prolonged fashion, hence suggesting a potential biopharmaceutical application for skin regeneration.

**Keywords:** Biopolymeric film. Bio-origami. Carrageenan. Xanthan. Sericin. *Bombyx mori* cocoons. Extraction. Cytotoxicity. Antioxidant and antimicrobial activities. Controlled release. Transdermal permeation.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.	26
Figura 2.	Interações moleculares envolvidas na fomação de hidrogéis.	27
Figura 3.	Casulos do bicho da seda (Bombyx mori).	31
Figura 4.	Imagem de microscopia eletrônica de varredura, mostrando a interação sericina-fibroína (na imagem da direita, as cores foram modificadas digitalmente).	31
Figura 5.	Estrutura química dos aminoácidos e formação de uma ligação peptídica.	33
Figura 6.	Estrutura geral da pele humana.	35
Figura 7.	Esquema da cicatrização e reparação de uma lesão cutânea.	37
Figura 8.	Fluxograma da preparação e avaliação dos filmes biopolissacarídicos simples do tipo bio-origami de acordo com o planejamento fatorial experimental completo.	58
Figura 9.	Fluxograma da preparação e caracterização do filme bio-origami otimizado, integrando diferentes concentrações de sericina.	60
Figura 10.	Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.	66
Figura 11.	Aspecto dos extractos de sericina em bruto, obtidos a partir dos casulos do bicho-da-seda ( <i>Bombyx mori</i> ), pelos processos de precipitação por congelação/descongelação e liofilização.	67
Figura 12.	Espectros FTIR das amostras de sericina. Amostra A1 em pó (a), solução da amostra A1 (b), amostra A2 em pó (c), sobrenadante aquoso da amostra A2 em pó (d), pellet aquoso da amostra A2 em pó (e), amostra A3 em pó (f), sobrenadante aquoso da amostra A3 em pó (g) e pellet	69

Figura 13. Difratogramas de raios X (XRD) (a) e difratogramas com intensidade 71

aquoso da amostra A3 em pó (h).

normalizada **(b)** das amostras A1 (curvas a laranja), amostras A2 (curvas a púrpura) e amostras A3 (curvas a verde). Os difratogramas de raios-X foram coletados usando raios-X filtrados através de um alvo de Cu.

- Figura 14. Curvas termogravimétricas (a) e 1ª derivada das curvas de perda de peso 73
  (b) das amostras A1 (linhas a azul), amostras A2 (linhas a rosa) e amostras A3 (linhas a cinza).
- Figura 15. Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras A1, 74 A2 e A3.
- Figura 16. Curva de calibração para proteína produzida pelo método de Bradford 76 modificado. Os dados experimentais de Abs<sub>595nm</sub> representam a média de nove determinações para cada concentração de proteína, incluíndo cada um o respectivo desvio padrão.
- Figura 17. Eletroforetogramas de SDS-PAGE corados por Coomassie (imagem 78 superior) e por prata (imagem inferior), das amostras A1 (faixa 1), A2 (faixa 2), A3 (faixa 3) e marcadores de peso molecular de gama alargada (faixa M).
- Figura 18. Resultados obtidos pelos ensaios de atividade antimicrobiana realizados 80 à amostra de sericina padrão (A1) e amostras de extratos de sericina em bruto (A2 e A3). Octante 1: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de coquetel antibiótico (penicilina (10000 U.I./mL) / estreptomicina (10 mg/mL)); Octante 2: disco de papel de filtro estéril mergulhado em água ultrapura estéril; Octante 3: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A1 (10 mg/mL); Octante 4: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A1 (20 mg/mL); Octante 5: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A2 (10 mg/mL); Octante 6: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A2 (20 mg/mL); Octante 7: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (10 mg/mL); Octante 8: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (20 mg/mL). Os discos impregnados foram aplicados diretamente sobre a superfície do meio de cultura TSA inoculado por espalhamento de uma suspensão de Escherichia coli (a), Staphylococcus aureus (b) ou Pseudomonas aeruginosa (c).

- Figura 19. Resultados dos testes de viabilidade celular (via MTT) usando linhagem 82 celular HUVEC cultivada em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade das amostras de sericina A1, A2 e A3 após exposição das células a diferentes concentrações mássicas de sericina durante 24 h. Os valores são média de três determinações (n=3), com desvios padrão associados inferiores a 0,1 em todos os casos.
- Figura 20. Resultados do teste do Allium cepa. Efeito das diferentes amostras de sericina (A1, A2 e A3) no índice mitótico obtido a partir de análises citogenéticas usando células HUVEC expostas às soluções de amostra de sericina a uma concentração de 20 mg/mL e usando água ultrapura como negativo. O índice mitótico foi calculado como o número de células na mitose dividido pelo número total de células, enquanto que o índice de danos foi calculado como o número de danos dividido pelo número total de divisões celulares. \* indica danos relativos estatisticamente não-significativos e \*\* indica danos relativos estatisticamente significativos.
- Figura 21. Exemplos de fases mitóticas normais em células de *Allium cepa* (profase, 86 metafase, anafase, telofase) e tipos de anormalidades cromossômicas (prometafases, pontes, fragmentos) encontradas em células de *Allium cepa* expostas a amostras de sericina A1, A2 e A3.
- Figura 22. Índices relativos de dano ao DNA da linhagem celular HUVEC após 87 exposição das células a diferentes concentrações mássicas de sericina durante 24 h. Médias de três ensaios com σ associado: HUVEC (controle, 1,000±0,104; Padrão (amostra A1: 10 mg, 1,374±0,085; 15 mg, 1,298±0,242; 20 1,466±0,026); Extração mg. por congelação/descongelação (amostra A2: 10 mg, 1,289±0,228; 15 mg, 1,181±0,004; 20 mg, 1,150±0,142); extração por liofilização (amostra A3: 10 mg, 1,313±0,057; 15 mg, 1,584±0,165; 20 mg, 1,313±0,179)). As fotos inseridas representam as caudas de Cometa™ produzidas pelos diferentes tipos de células danificadas encontradas. \*, \* e \* indicam índices relativos de dano ao DNA estatisticamente não-significativo, e \*\* e \*\* indicam índices relativos de dano ao DNA estatisticamente significativos.
- Figura 23. Espectros de EDXRF de casulo de *Bombyx Mori* (a) e amostras de A1 91 (linhas pretas), A2 (linhas vermelhas) e A3 (linhas azuis) (b). O eixo YY

representa o número de contagens de raios-X característicos que atingiram o detector, enquanto o eixo XX representa a energia dos raios-X característicos.

- Figura 24. Imagens obtidas por análise tomográfica via transmissão de raios-X 93 (XRT) do casulo de *Bombyx mori*, sendo (a) uma imagem de perfil transversal da parede do casulo, e (b) uma imagem de perfil inclinado da superfície do casulo. As fatias de imagem tridimensionais foram coletadas usando uma tensão de operação ajustada para 29 kV e corrente elétrica com 415 μA.
- Figura 25. Fotomicrografias FESEM do casulo de Bombyx mori em várias 96 ampliações (a: x100; b: x2000; c: x600; d: x2000). As setas vermelhas inseridas apontam para a fibroína, enquanto as setas verdes inseridas apontam para a sericina (atuando como a cola que mantém as fibras de fibroína no lugar).
- Figura 26. Espectros FTIR de (a) extracto liofilizado de sericina, (b) filme bio-origami 99 simples, (c) filme bio-origami com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (d) filme bioorigami com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (e) filme bio-origami com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (f) filme bio-origami com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (g) filme bio-origami com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e (h) filme bio-origami com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>.
- Figura 27. Curvas termogravimétricas (a) e 1ª derivada das curvas de perda de 101 massa (b), do extrato liofilizado de sericina (curva púrpura), filme bioorigami simples (curva cinzento), filme bio-origami contendo 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva azul claro), filme bio-origami contendo 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> filme bio-origami 5 (curva laranja), contendo mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> marrom), filme bio-origami contendo 10 (curva mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva vermelha), filme bio-origami contendo 20 (curva verde), e filme mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> bio-origami contendo 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa claro).
- Figura 28. Termogramas de calorimetria diferencial exploratória do extrato liofilizado 104 de sericina e dos filmes bio-origami carregados com quantidades variáveis de sericina.
- Figura 29. Difractogramas de raios-X com intensidade normalizada (XRD) do extrato 106 liofilizado de sericina (curva púrpura), metilparabeno (curva amarela),

glicerol (curva rosa), PVA (curva vermelha), goma xantana (curva marrom escuro), goma carragenana (curva azul escuro), filme bio-origami simples (curva cinzenta), filme bio-origami contendo 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva azul claro), filme bio-origami contendo 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva laranja), filme bio-origami contendo 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva laranja), filme bio-origami contendo 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva marrom claro), filme bio-origami contendo 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa escuro), filme bio-origami contendo 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva verde), e filme bio-origami contendo 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa claro). Os difractogramas de raios-X foram obtidos usando raios-X filtrados por alvo de Cu.

- Figura 30. Resultados recolhidos a partir dos testes de resistência mecânica 110 realizados aos (a) filmes bio-origami simples (sem sericina) originados do planejamento fatorial experimental, e (b) filmes bio-origami produzidos com cargas variáveis de sericina tendo como base os níveis (+1) de goma carragenana e (0) de goma xantana.
- Figura 31. Resultados obtidos a partir dos ensaios de permeação transdérmica, 113 como (a) proteína média permeada por área de pele, e (b) percentagem de proteína liberada dos filmes bio-origami em relação à quantidade de sericina carregada nos filmes, durante um ensaio de 12 h. Os valores são a média de três ensaios (n=3), com desvios padrão associados inferiores a 0,01 em todos os casos. As linhas sólidas representam ajustes não lineares realizados aos dados experimentais, isto é, hiperbólico para aqueles filmes bio-origami carregados com quantidades de sericina entre 0 e 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e função de Gompertz para aqueles filmes bio-origami carregados com quantidades de sericina entre 20 e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>.
- Figura 32. Resultados obtidos a partir da modelação matemática dos resultados 118 experimentais obtidos nos ensaios de liberação de sericina a partir dos filmes bio-origami durante um período de 12 h. Os ajustes lineares realizados aos dados experimentais transformados, usando o modelo de Korsmeyer-Peppas linearizado encontram-se exibidos na figura (a), enquanto que na figura (b) o expoente de difusão ou liberação (n) no modelo de Korsmeyer-Peppas em função da carga de sericina no filme bio-origami permite observar a mudança no perfil de liberação de sericina.

- Figura 33. Imagens obtidas por análises tomográficas de transmissão de raios-X do 119 filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, sendo (a) imagem de perfil inclinado do filme bio-origami, (b) imagem perpendicular à superfície do filme bio-origami, e (c) vista inclinada da superfície do filme bio-origami. As fatias de imagem tri-dimensionais foram obtidas usando uma voltagem operacional de 29 kV e corrente elétrica com 415 μA.
- Figura 34. Espectros de EDXRF de filmes bio-origami selecionados, carregados com 122 quantidades variáveis de sericina. O eixo dos YY representa o número de contagens características de raios-X que chegaram ao detector, enquanto que o eixo dos XX representa a energia dos raios-X característicos.
- Figura 35. Fotomicrografias FESEM da superfície dos filmes bio-origami carregados 124 com quantidades variáveis de sericina, a várias magnificações (0 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a1: x500, a2: x5000, a3: x10000; 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, b1: x500, b2: x5000, b3: x10000; 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, c1: x500, c2: x5000, c3: x10000; 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, d1: x500, d2: x5000, d3: x10000; 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e1: x500, e2: x5000, e3: x10000; 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, f1: x500, f2: x5000, f3: x10000; 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, g1: x500, g2: x5000, g3: x10000).
- Figura 36. Fotomicrografias FESEM da seção transversal de fratura dos filmes bioorigami carregados com quantidades variáveis de sericina, a várias magnificações (0 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a4: x100, a5: x500, a6: x2500; 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, b4: x100, b5: x500, b6: x2500; 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, c4: x100, c5: x500, c6: x2500; 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, d4: x100, d5: x500, d6: x2500; 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e4: x100, e5: x500, e6: x2500; 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, f4: x100, f5: x500, f6: x2500; 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, g4: x100, g5: x500, g6: x2500).

# LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Planejamento fatorial experimental completo do tipo 3<sup>2</sup>, fornecendo os 57 valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.
- Quadro 2. Composição dos filmes do tipo bio-origami (vazios) para otimização das 58 propriedades mecânicas apropriadas.
- Quadro 3. Composição dos vários filmes bio-origami integrando quantidades 59 variáveis de sericina.
- Quadro 4. Resultados obtidos para a atividade antioxidante (%) das amostras de 89 sericina, expressa como capacidade de eliminação de radicais livres medida através da metodologia DPPH.
- Quadro 5.Resultados obtidos nas análises tomográficas via transmissão de raios-94X realizadas ao casulo de Bombyx mori.
- Quadro 6. Atividade antioxidante (%) dos vários filmes bio-origami integrando 108 quantidades variáveis de sericina, como capacidade de eliminação de radicais livres medida pelo método do DPPH.
- Quadro 7. Resultados obtidos para os ajustes não-lineares realizados à proteína 114 média permeada por área de pele ( ${{{\mu g_{proteina}} / mm_{pele}^2}}$ ) em função do tempo de permeação, para os vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina.
- Quadro 8. Resultados obtidos para os ajustes não-lineares realizados à 115 quantidade média de proteína liberada (%) dos filmes bio-origami em função do tempo de permeação, para os vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina.
- Quadro 9. Resultados obtidos a partir das análises tomográficas por transmissão 121 de raios-X realizadas aos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina de casulos de *Bombyx mori*.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHI	Brain Heart Infusion broth
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
XRD	Difração de raios-X
FTIR	Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier
HUVEC	Células Endoteliais da veia umbilical humana
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração máxima inibitória
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer system
PVA	Álcool polivinílico
RPM	Velocidade de agitação (rotações por minuto)
σ	Desvio padrão
т	Temperatura absoluta (K)
TGA	Análise termogravimétrica

TSA	Tryptic Soy agar
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

# SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	27
1.1 Introdução	27
1.2 Filmes polissacarídicos	28
1.3 Sericina	30
1.4 Estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas	32
1.5 Estrutura da pele e lesões associadas	34
1.6 Aplicações dérmicas	36
1.7 Regeneração de pele	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 JUSTIFICATIVA	40
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	41
4.1 Material	41
4.1.1 Reagentes e consumíveis	41
4.1.2 Material biológico	41
4.1.3 Equipamentos analíticos e outros	42
4.2 Procedimentos experimentais	44
4.2.1 Extração de Sericina	44
4.2.1.1 Extração por autoclavagem a alta-temperatura seguida de congelação-	44

descongelação

4.2.1.2 Extração por autoclavagem a alta-temperatura seguida de liofilização	44
4.2.2 Caracterização físicoquímica dos extratos de sericina	45
4.2.2.1 Determinação do teor de umidade por aquecimento com fonte de raios infravermelhos	45
4.2.2.2 Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	45
4.2.2.3 Análises por difração de raios-X (XRD)	46
4.2.2.4 Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)	46
4.2.2.5 Análises eletroforéticas por SDS-PAGE	47
4.2.2.6 Quantificação do teor de proteína pelo método de Bradford modificado	48
4.2.2.7 Determinação da composição elementar por análises de fluorescência de raios-X (XRF)	48
4.2.2.8 Análises tomográficas por transmissão de raios-X (XRT)	49
4.2.2.9 Análises por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM)	50
4.2.3 Caracterização biológica dos extratos de sericina	50
4.2.3.1 Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana dos extratos de sericina através do método de difusão em ágar	50
<ul> <li>4.2.3.2 Avaliação da atividade antioxidante por eliminação de radicais livres através do método DPPH</li> </ul>	51
4.2.3.3 Determinação do potencial de citotoxicidade da sericina, através do ensaio MTT	52
4.2.3.4 Avaliação do potencial de dano ao DNA pela sericina, através do teste Cometa™	53

- 4.2.3.5 Análise do potencial de indução de aberrações cromossômicas pela sericina, 55 através do ensaio *Allium cepa*
- 4.2.4 Planejamento fatorial experimental para otimização dos filmes bio-origami 57 vazios com apropriadas propriedades mecânicas
- 4.2.5 Produção dos filmes bio-origami com concentrações variáveis de sericina, 59 partindo da formulação matricial ótima resultante do planejamento fatorial experimental
- 4.2.6 Caracterização dos filmes bio-origami integrando concentrações variáveis de 60 sericina
- 4.2.6.1 Determinação do teor de umidade dos filmes bio-origami por aquecimento 60 com fonte de raios infravermelhos
- 4.2.6.2 Análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de 61 Fourier (FTIR)
- 4.2.6.3 Análises de difracção de raios-X (XRD) 61
- 4.2.6.4 Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial 61 exploratória (DSC)
- 4.2.6.5 Avaliação da atividade antioxidante dos filmes bio-origami por eliminação de 61 radicais livres através do método DPPH
- 4.2.6.6 Avaliação das propriedades de resistência mecânica dos filmes bio-origami 62
- 4.2.6.7 Determinação da composição elementar dos filmes bio-origami por análises 62 de fluorescência de raios-X (XRF)
- 4.2.6.8 Análises tomográficas dos filmes bio-origami integrando quantidades 63 variáveis de sericina, por transmissão de raios-X (XRT)
- 4.2.6.9 Análises morfológicas de superfície e de zona de fractura por microscopia
  63 eletrônica de varredura com energia dispersive (DESEM) dos filmes bioorigami integrando quantidades variáveis de sericina
- 4.2.7 Características de liberação controlada dos filmes bio-origami integrando 64 concentrações variáveis de sericina

4.2.7.1 Permeação transdérmica e cinética de liberação da proteína sericina pelos filmes bio-origami	64
4.2.7.2 Construção da curva de calibração para quantificação proteica das amostras recolhidas da câmara receptora da célula de difusão de Franz pelo método de Bradford modificado	65
4.2.7.3 Estudo da cinética de liberação de proteína (biodisponibilidade) pelos filmes bio-origami	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 Análises FTIR realizadas aos extratos de sericina	68
5.2 Análises XRD realizadas aos extratos de sericina	70
5.3 Análises termogravimétricas (TGA) e microcalorimétricas (DSC) realizadas aos extratos de sericina	72
5.4 Determinação do teor de proteína dos extratos de sericina	75
5.5 Análises electroforéticas (SDS-PAGE) realizadas aos extratos de sericina	77
5.6 Análises de atividade antimicrobiana realizadas aos extratos de sericina	79
5.7 Avaliação do potencial de citotoxicidade dos extratos de sericina, pelo método MTT	81
5.8 Avaliação do potencial de indução de aberrações cromossômicas dos extratos de sericina, pelo ensaio <i>Allium cepa</i>	83
5.9 Avaliação do potencial de indução de danos ao DNA dos extratos de sericina, pelo ensaio Cometa™	86
5.10 Avaliação da atividade de eliminação de radicais livres dos extratos de sericina, pelo ensaio DPPH	89
5.11 Análises EDXRF realizadas ao casulo de <i>Bombyx mori</i> e aos extratos de sericina	90
5.12 Análises XRT realizadas ao casulo de Bombyx mori	92

5.13 Análises FESEM realizadas ao casulo de Bombyx mori	95
5.14 Otimização estatística da matriz biopolissacarídica do filme bio-origami	97
5.15 Caracterização dos filmes bio-origami produzidos	97
5.15.1 Análises FTIR	97
5.15.2 Análises térmicas por TG e DSC	100
5.15.3 Análises de difração de raios-X (XRD)	106
5.15.4 Atividade de eliminação de radicais livres dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina	107
5.15.5 Resistência mecânica dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina	109
5.15.6 Estudos de permeação transdérmica de sericina a partir dos filmes bio- origami	112
5.15.7 Modelação matemática da liberação de sericina a partir dos filmes bio- origami	116
5.15.8 Análises XRT aos filmes bio-origami	119
5.15.9 Análises EDXRF aos filmes bio-origami	122
5.15.10 Análises microestruturais aos filmes bio-origami integrando sericina, por DESEM	123
6 CONCLUSÕES	126
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	128
REFERÊNCIAS	130
ANEXOS E APÊNDICES	141

## APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa aplicada realizado, intitulado "**Estabilização estrutural e funcional de sericina em filme biopolissacarídico: bio-origami para a regeneração de pele**", foi financiado pela Universidade de Sorocaba, com auxilio Bolsa de Mestrado concedido pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) à aluna Liliam Katsue Harada Rocha (FAPESP ref<sup>a</sup> 2016/16641-3), tendo sido orientado pelo Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, da Universidade de Sorocaba.

No contexto da biomedicina e das ciências farmacêuticas, a questão da estabilização de proteínas (terapêuticas) assume particular relevância. A estabilização de entidades proteicas traduz-se na preservação da sua estrutura e funcionalidade, e essa estabilização é principalmente atingida através do estabelecimento de um equilíbrio termodinâmico com o seu (micro)ambiente. Na sua essência, todas as formas de vida são poliméricas, uma vez que seus componentes mais importantes (proteínas, peptideos, carboidratos e ácidos nucleicos) são todos biopolímeros. E a natureza usa esses polímeros tanto como bioblocos de construção quanto como parte da altamente complexa maquinaria celular. Além dos polímeros (bio)naturais, os seres humanos possuem agora a tecnologia para produzir macromoléculas sintéticas através de processos de polimerização para formar materiais artificiais baseados em (bio)polímeros, geralmente com o objetivo de substituir os naturais. E é o fato de que esses biopolímeros são onipresentes na maquinaria metabólica de todos os seres vivos, o que os torna tão atraentes para aplicações biotecnológicas e industriais. De fato, a vida útil das proteínas dentro das células deve ser limitada uma vez que a proteólise constitutiva é a principal fonte de aminoácidos para a síntese proteica de novo. Mas estamos interessados em proteínas em condições não-nativas para aplicações biotecnológicas. A estabilização de proteínas tem uma tremenda importância devido ao crescente número de aplicações destas biomacromoléculas em quase todas as áreas, especialmente na biofarmacêutica e biomédica.

O trabalho de pesquisa aqui apresentado visou o estudo do potencial de estabilização estrutural e funcional de uma proteína globular bioativa extraída do casulo do bicho da seda *(Bombyx mori)*, visando a sua posterior utilização na formulação de um filme biopolissacarídico do tipo bio-origami com o objetivo de aplicação em regeneração de pele.

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa, foram parcialmente apresentados em formato de comunicação oral no I Simpósio de Pesquisa em

Ciências Farmacêuticas, realizado dentro da II Mostra de Atividades Acadêmicas (MAAC), pela Universidade de Sorocaba – Uniso (Sorocaba/SP, de 07 a 10 de Novembro de 2016) (**ANEXO A**), em formato de painel no 11<sup>th</sup> CIFARP – *International Congress of Pharmaceutical Sciences* (Ribeirão Preto/SP, de 15 a 18 de novembro de 2017) (**ANEXO B e APÊNDICE B**) e no MICROBIOTEC 17 – *Congress of Microbiology and biotechnology 2017* (Porto – Portugal, de 7 a 9 de Dezembro de 2017) (**ANEXO C e APÊNDICE C**).

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à publicação de um artigo científico na revista internacional *Process Biochemistry* (APÊNDICE D), e à preparação de um manuscrito científico que se encontra atualmente em processo de submissão para publicação em revista científica internacional indexada com arbitragem por pares com alto fator de impacto (Liliam K. Harada, Ludmilla R. Jorge, José M. Oliveira Jr., Matthieu Tubino, Marta M. D. C. Vila and Victor M. Balcão (2017) Structural and functional stabilization of sericin from *Bombyx mori* cocoons in a biopolysaccharide film: bio-origami for skin regeneration) (APÊNDICE E). Estes trabalhos comprovam a qualidade e importância dos resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito.

A Figura 1 apresenta um resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido, começando com a extração e caracterização de sericina a partir dos casulos do bicho da seda *(Bombyx mori)* e culminando na produção e caracterização de filmes bio-origami integrando essa mesma sericina, para aplicações em regeneração de pele.



Figura 1. Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.

Fonte: elaboração própria.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Introdução

Hidrogéis são estruturas formadas por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, intumescendo em contato com água, mas mantendo sua integridade estrutural. Os hidrogéis biopoliméricos são bastante interessantes para utilizações em regeneração de pele, como curativos, devido à sua muito baixa (ou total ausência de) toxicidade, ao potencial para liberação prolongada de entidades bioativas, às propriedades não abrasivas, à sua permeabilidade ao oxigênio e a vapores de água, às suas características de transparência que permitem visualizar o processo de cura, à sua impermeabilidade a células bacterianas, à capacidade de absorção do exsudado da ferida, à capacidade de manter a ferida hidratada, à sua elasticidade e à sua capacidade de adesão à pele sã sem no entanto aderir ao ferimento. Na preparação de hidrogéis utilizam-se polímeros oriundos de diversas fontes, tanto naturais como sintéticas, polimerizados por diferentes processos (ALMEIDA, 2010). Na Figura 2 podem observar-se os vários tipos de interações moleculares envolvidas na formação de hidrogéis (LI et al., 2017; DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016).



Figura 2. Interações moleculares envolvidas na fomação de hidrogéis.

Fonte: Adaptado de LI et al. (2017) e DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI (2016).

Segundo Ansel et al. (2000), vetores que aumentam a hidratação da pele favorecem a absorção percutânea. Curativos oclusivos agem como barreiras à umidade, impedindo a sua evaporação e gerando um aumento da hidratação cutânea.

Neste trabalho de pesquisa, os filmes biopoliméricos foram formados a partir da preparação de um hidrogel contendo os biopolissacarídeos goma xantana e carragenana, além de PVA (álcool polivinílico) e glicerol, como agentes polimerizante e doador de efeito plastificante, respetivamente. Após a preparação do hidrogel, procedeu-se à preparação do filme, que consiste no espalhamento da solução filmogênica e secagem à temperatura adequeda.

A goma xantana é um polissacarídeo obtido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Já a carragenana pertence à família de polissacarídeos lineares sulfatados, que são extraídos a partir de uma alga marinha vermelha. Ambos os biopolissacarídeos são utilizados separadamente como biomateriais em diversas áreas de aplicação, principalmente em medicamentos e alimentos. A goma xantana é muito utilizada por ser um agente espessante e estabilizante (GARCIA-OCHOA, et al., 2000). Em estudo utilizando diferentes combinações de gomas, misturas de carragenana e xantana mostraram resultados satisfatórios relacionados à firmeza (MARUYAMA, et al., 2006).

O álcool vinílico, também conhecido como álcool polivinílico (PVA), é amplamente utilizado para produzir hidrogéis visando o tratamento de úlceras tópicas, dado ser um polímero não tóxico e biocompatível que possui excelentes propriedades de formação de filme e facilidade de processamento, como resistências mecânicas, térmicas e químicas (LIU et al., 2009; HWANG et al., 2010; SONG et al., 2012; GUPTA et al., 2002).

A entidade proteica bioativa integrada aos biohidrogéis foi a proteína sericina.

### 1.2 Filmes polissacarídicos

As moléculas de (polis)sacarídeos são basicamente constituídas de carbono, oxigênio e hidrogênio. Neste grupo de compostos estão inclusos açúcares simples, denominados monossacarídeos, e seus polímeros, denominados polissacarídeos. Os monossacarídeos e os resíduos de polissacarídeos contêm muitos grupos hidroxilo, podendo ser portanto considerados como álcoois (MORAN *et al.*, 2013).

Grande parte das moléculas de origem biológica (como os polissacarídeos e as proteínas) apresentam estrutura macromolecular, podendo ser denominadas de (bio)polímeros naturais. Estes compostos apresentam características muito particulares, que permitem diferenciá-los dos polímeros sintéticos. Entre tais características pode ser observada a existência de cadeias de mesmo tamanho e a elevada especificidade e organização molecular (ORÉFICE et al., 2006). Polímeros naturais são metabolizados no sistema biológico por hidrólise ou degradação enzimática, e os produtos destas reações são unidades de aminoácidos ou sacarídeos, quando as macromoléculas de partida são, respectivamente, polissacarídeos ou polipeptídeos (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016).

Os filmes à base de polímeros naturais apresentam características interessantes para integrar formulações que atuam na regeneração de pele, como a permeabilidade ao oxigênio, aderência e atuação como barreira no local da lesão, além de serem biocompatíveis e atóxicos, e apresentarem ainda características positivas de elasticidade e resistência (SILVA, F., 2014; ALMEIDA, 2010).

Os filmes formados por biopolissacarídeos podem ser considerados sistemas de liberação controlada para fármacos de aplicação tópica, dependendo do tipo de formulação e aplicação em que são utilizados (ANDREWS et al., 2009), sendo redes tridimensionais de biopolímeros hidrofílicos que, em contato com uma superfície úmida, incham e podem liberar o princípio ativo por diferentes mecanismos (GANJI et al., 2010). Assim, os filmes de biopolissacarídeos são de particular interesse no tratamento da pele danificada, devido à sua baixa toxicidade, potencial para liberação prolongada de fármacos e capacidade humectante (YAN & POCHAN, 2010; MURPHY et al., 2012; SONG et al., 2012).

Dentre os materiais amplamente utilizados para a obtenção de filmes de biopolissacarídeos encontram-se as gomas de origem natural, tais como as gomas de carragenana, xantana, gelana, alfarroba, colágeno, entre outras, e as proteínas. Estes materiais podem ainda ser aplicados como coberturas (filmes) edíveis para frutas (ASSIS & DE BRITTO, 2014).

Origami é a arte tradicional da dobradura em papel, possibilitando formar com um material maleável (papel) estruturas mais ou menos complexas. O conceito desta arte despertou a atenção de cientistas, matemáticos e engenheiros, para a obtenção de produtos mais complexos, visando aplicação em diversas áreas, como por exemplo as áreas biomédica, automotiva, entre outras. Os filmes denominados bio-origamis, podem ser definidos como materiais dobráveis, podendo ser compostos por materiais biológicos, como por exemplo proteínas (JAMAL et al., 2007; BAERLECKEN et al., 2012).

### 1.3 Sericina

A sericina, ou cola da seda, é uma pequena proteína globular (glicoproteína) que constitui cerca de 25-30% das proteínas da seda. É composta por 18 aminoácidos, a maior parte dos quais têm cadeias laterais polares fortes, tais como grupos hidroxilo, carboxilo e amina. A sua elevada hidrofilicidade surge a partir do alto teor em serina e ácido aspártico, que representam cerca de 33,4% e 16,7% da sericina, respectivamente (PATEL & MODASIYA, 2011; ZHANG, 2002).

Devido às suas propriedades bioquímicas e biofísicas exclusivas, a sericina tem sido estudada para várias potenciais aplicações. Tais propriedades incluem, segundo vários autores, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, atividade anti-tirosinase, efeitos anticancerígenos, propriedades protetoras contra a radiação UV e capacidades hidratante e coagulante em preparações cosméticas. Por apresentar elevado teor em serina e glicina, a sericina também exibe propriedades hidratantes, impedindo a perda transepidérmica de água e restaurando fatores hidratantes naturais. Ela também promove um aumento da elasticidade da pele e tem efeitos anti-rugas e anti-envelhecimento através da sua atividade promotora de síntese de colágeno no tecido dérmico, pois exibe mais hidrofilicidade do que a fibroína (ROCHA et al., 2017; PATEL; MODASIYA, 2011).

Quanto ao seu peso molecular, pode apresentar variabilidade, pois exibe um grupo (família) de proteínas com pesos moleculares variando de 10 kDa a 310 kDa (TAO et al., 2005) ou de 20 kDa a 400 kDa (ROCHA et al., 2017; KUNZ et al., 2016; GIMENES et al., 2014). Esta proteína apresenta como características ser principalmente amorfa e solúvel em água, atuando como aglutinante, o que possibilita desempenhar seu papel na composição dos casulos, onde mantém a integridade estrutural dos mesmos (CHOPRA & GULRAJANI, 1994).

Como supracitado, a proteína sericina pode ser encontrada nos casulos do bicho da seda *(Bombyx mori)* (ver Figura 3), podendo ser extraída a partir dos casulos ou da água residual oriunda de processos de degomagem da indústria textil (WU et al., 2007; DIAS et al., 2015).



Figura 3. Casulos do bicho da seda (Bombyx mori).

Fonte: Elaboração própria.

No casulo, a principal função da proteína sericina é manter a coesão do mesmo, envolvendo a fibroína (KI et al., 2007), como é possível observar na Figura 4.

**Figura 4**. Imagem de microscopia eletrônica de varredura, mostrando a interação sericina-fibroína (na imagem da direita, as cores foram modificadas digitalmente).



Fonte(s): https://www.puresericin.com/en/pure-sericin/; http://morphomed.at/technology.

A sericina demonstra ser um bom biomaterial para a administração de fármacos por sua reatividade química e sua capacidade de resposta ao pH, o que facilita a fabricação de nanopartículas, micropartículas, hidrogéis e moléculas conjugadas (LAMBONI et al., 2015).

No estudo realizado por Sasaki, Yamada & Kato (2000 [A]), que investigava a relação do consumo da proteína sericina com a absorção intestinal de zinco, ferro, magnésio e cálcio, os resultados obtidos sugeriram que o consumo de sericina aumentava a biodisponibilidade daqueles elementos. Este aumento de absorção mostrou ser em torno de 41% para o zinco e ferro, 21% para o magnésio e 17% para o cálcio.

A sericina também exibe outros resultados positivos, quando avaliados o seu potencial na ingestão, como o alívio da constipação intestinal (SASAKI *et al.*, 2000 [C]), e uma possível ação como agente quimiopreventivo para a carcinogênese de cólon (SASAKI *et al.*, 2000 [B]). Os estudos supracitados sobre a ingestão de sericina foram realizados em ratos.

### 1.4 Estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas

As proteínas são compostas de aminoácidos, e cada aminoácido contém um grupo amina e um grupo carboxilo, além de uma cadeia lateral (grupo R) que é específica para cada aminoácido, conforme ilustrado na Figura 5. A ligação entre aminoácidos ocorre entre o grupamento amina de um, e o grupamento carboxilo de outro, que se condensam durante a síntese proteica, e esta junção forma uma ligação peptídica (grupo funcional amida). A ligação de vários peptídeos forma um polipeptídeo linear. Uma proteína funcional pode ser formada por um só polipeptídeo, ou por cadeias de polipeptídeos diferentes, que se ligam para formar uma estrutura mais complexa (MORAN et al., 2013).

As proteínas podem apresentar diversas formas, podendo ser solúveis em água, compactas e levemente esféricas. Apresentam cadeias de polipeptídeos bastante dobradas, podendo ser denominadas globulares. Estas proteínas possuem um interior hidrofóbico e superfície hidrofílica. As proteínas globulares possuem fendas ou cavidades, que permitem a ligação transiente a outros compostos (DAU, 2015).



Figura 5. Estrutura química dos aminoácidos e formação de uma ligação peptídica.

Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Peptidformationball.svg

Por serem componentes do metabolismo de todos os seres vivos, os biopolímeros são materiais interessantes para aplicações biotecnológicas e industriais. Neste sentido, a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas torna-se muito importante, devido ao aumento de aplicações destes biomateriais em diversas áreas, mas com utilização mais expressiva nas áreas farmacêutica e biomédica (BALCÃO & VILA, 2015; IYER, 2008; VILLEGAS et al., 1996).

O processo de estabilização de entidades proteicas visa a preservação estrutural e funcional destes biocompostos. Este processo é adotado também para a estabilização de outras moléculas de natureza proteica, como enzimas, proteínas recombinantes, bacteriófagos, anticorpos monoclonais e peptídeos (BALCÃO & VILA, 2015).

Nas aplicações biofarmacêuticas em que se deseja utilizar proteínas, são encontrados três principais desafios para a estabilização das mesmas, sendo eles (IYER & ANANTHANARAYAN, 2008; MOZHAEV & MARTINEK, 1990; BALCÃO & VILA, 2015):

Estabilidade operacional – capacidade da proteína para manter suas propriedades após os processos de produção;

- Estabilidade termodinâmica capacidade de manter a conformação de enovelamento, para evitar sua desnaturação quando em contato com diferentes meios;
- Estabilidade in vivo capacidade de se manter estável após penetrar na célula-alvo.

A estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas baseia-se na redução dos movimentos moleculares e, assim, na eliminação das transições conformacionais enquando a biomolécula ainda está em seu estado funcional (estado nativo). A estabilidade de proteínas multiméricas é dependente de sua concentração, pois por se tratar de uma estrutura (multimérica), resulta em baixa estabilidade térmica devido a um mecanismo de dissociação das suas subunidades (BALCÃO & VILA, 2015; MATEO et al., 2006; LOPEZ-GALLEG et al., 2007).

Os avanços relacionados com a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas, além de manterem estas estáveis e ativas, permitem também sua incorporação em produtos aplicados a diversas áreas, inclusivé produtos farmacêuticos, que necessitem garantir tais propriedades (BALCÃO & VILA, 2015).

### 1.5 Estrutura da pele e lesões associadas

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele, além de atuar como barreira física contra agentes infecciosos, exerce importantes funções como a regulação da temperatura corporal e das sensações (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016). É um sistema epitelial, porém, o que a difere dos demais sistemas epiteliais, é o fato da pele estar exposta a um ambiente externo muito agressivo, podendo ser considerada uma barreira mediadora entre o organismo e o ambiente. É uma membrana de dupla camada que envolve a superfície externa do corpo (HARRIS, 2009).

A pele é composta por basicamente três camadas (ver Figura 6): a epiderme, que é a camada epitelial mais externa, a derme, que é a camada intermediária, e a hipoderme, que é a camada mais profunda e que é constituída de lóbulos de lipócitos. Exibe ainda os denominados anexos cutâneos, sendo eles o folículo pilossebáceo, o folículo piloso, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (AZULAY et al., 2008).



Figura 6. Estrutura geral da pele humana.

Fonte: https://www.thinglink.com/scene/848934581921906689

Como função estética, é considerada a aparência, o toque, a maciez, os odores exalados e a coloração. A pele exibe ainda conotações de ordem social, racial e sexual, devido à sua função sensorial (HARRIS, 2009; AZULAY et al., 2008).

A perda de integridade da pele por diversas formas de injúrias, geralmente leva à formação de cicatrizes não fibróticas, acompanhada de perda substâncial de seus apêndices. Estes ferimentos na pele ocorrem ao violar a camada epidérmica, resultando na exposição da camada dérmica. Dependendo da profundidade da lesão, pode haver a exposição das camadas mais profundas, expondo fibroblastos, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, pele e osso (HENG, 2011; DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016).

As feridas crônicas que são agravadas por determinadas doenças, tais como isquêmia, *Diabetes mellitus* e estase venosa, são o maior desafio clínico devido aos tratamentos existentes que ainda são ineficientes (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016).
As queimaduras encontram-se entre as mais graves lesões sofridas pela pele, resultando ainda em graves sequelas, como limitações funcionais e desordens psicossociais (FERNANDES et al., 2012).

As queimaduras de primeiro grau, que atingem a epiderme, normalmente ocorrem pela exposição a raios solares e resultam em uma inflamação simples, que cicatriza rapidamente, sem grandes complicações sistêmicas. As queimaduras de segundo grau, passam através da epiderme e atingem a derme, levando à liberação de mediadores imunes e inflamatórios como a histamina, bradicinina e interleucinas, os quais resultam em um aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de líquidos e o acúmulo destes em uma epiderme intacta, formando flictemas ou bolhas. Estas lesões, de modo geral, não apresentam complicações. Já as lesões de terceiro grau comprometem todos os elementos da pele. Por causarem a destruição dessas estruturas, as feridas não se regeneram, necessitando muitas vezes de implantes cutâneos para o tratamento (MOSER et al., 2013).

### 1.6 Aplicações dérmicas

Geralmente, a administração cutânea é utilizada quando um efeito local é desejado, porém, quando há boa absorção pode alcançar-se um efeito sistêmico. Fármacos incorporados em adesivos para aplicações transdérmicas são cada vez mais utilizados. Estes adesivos promovem a liberação estável do fármaco, com o objetivo de evitar o metabolismo pré-sistêmico ou efeito de 1ª passagem, porém, é um método apropriado para fármacos lipossolúveis (RANG *et al.* 2007).

Quando existe a necessidade de atingir a derme, é necessária uma maior penetração do fármaco. Para que a permeação transdérmica de princípios ativos ocorra, é preciso levar em consideração dois pontos importantes: as substâncias que compõem o veículo que facilita a penetração do princípio ativo, e a natureza química do fármaco em questão (AZULAY et al., 2008).

O desafio da obtenção de formas farmacêuticas transdérmicas é exatamente o de favorecer a absorção de princípios ativos nas camadas da pele que atuam como barreiras para esta permeação. Por este motivo, estratégias têm sido utilizadas como, por exemplo, o uso de nanotecnologia no desenvolvimento e produção de fármacos, capazes de promoverem a liberação através da pele, e disto surgem formas farmacêuticas como

microemulsões, nanoemulsões e nanopartículas, com propriedades fisicoquímicas e farmacotécnicas apropriadas para o uso transdérmico (SILVA, J. et al., 2010).

A capacidade de interação com as entidades biológicas, torna os biopolímeros ótimas escolhas para aplicações biomédicas (ORÉFICE et al., 2006). Os materiais bioativos e biodegradáveis possuem ainda a vantagem de proporcionarem a recuperação de tecidos danificados, pois podem atuar no metabolismo intracelular e extracelular, os quais controlam a reprodução celular e a propagação dos tecidos em crescimento (PEREIRA et al., 1999).

## 1.7 Regeneração de pele

A reconstituição de uma pele perfeita é um grande desafio e objetivo de muitos trabalhos científicos (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016). A sequência da cicatrização e reparação de lesões cutâneas pode ser melhor visualizada na Figura 7.



Figura 7. Esquema da cicatrização e reparação de uma lesão cutânea.

Fonte: http://dicionariosaude.com/cicatrizacao/

A formação do coágulo para a manutenção da homeostase, possibilita a formação de uma matriz provisória para a migração das células. As plaquetas aderem ao tecido conjuntivo intersticial e agregam-se. Durante este processo, liberam mediadores e expressam fatores de coagulação. O coágulo formado localmente, de fibrina e trombina, age como um ninho para a adesão e agregação plaquetária. As plaquetas contribuem para a formação do tampão homeostático e na liberação de citocinas e fatores de crescimento. Além disso, a própria cascata de coagulação atrai os leucócitos para o local da lesão. A ativação endotelial por quimiostáticos, estimula a liberação de elastase e colagenase endotelial, que por sua vez acabam por facilitar a penetração celular através das membranas basais dos vasos sanguíneos. Os leucócitos agem na eliminação de bactérias invasoras e debris celulares (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016; AZULAY et al., 2008).

A fase inflamatória pode ser prolongada pela persistente presença de debris celulares e bactérias, dificultando assim a reparação normal. Os macrófagos desempenham um papel importante no processo de inflamação e reparação, pois secretam fatores de crescimento para fibroblastos, necessários para iniciar a formação tecidual nas feridas (DEMIRCI & KHADEMHOSSEINI, 2016).

Aproximadamente 4 dias após a agressão, o tecido de granulação inicia sua formação. A transição entre tecido de granulação rico em fibroblastos e uma matriz basicamente considerada acelular, ocorre após a apoptose dos fibroblastos em torno do 10º dia após início da reparação (AZULAY et al., 2008).

Os apêndices cutâneos, anteriormente citados, são conhecidos também como "ilhas de regeneração", pois possuem células epidérmicas que promovem a recuperação da pele quando ocorrem lesões mais profundas (PEREIMA et al., 2013).

Azulay et al. (2008) ainda apresenta alguns fatores que podem influenciar negativamente o processo de reparação cutânea, como por exemplo anoxia, pH anormal, necrose, infecção, hematomas e corpos estranhos.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar um bio-origami biopolimérico com potencial de regeneração cutânea.

## 2.2. Objetivos específicos

Especificamente, o trabalho de pesquisa almejou:

- Extrair sericina dos casulos do bicho da seda (Bombyx mori) usando diferentes técnicas de extração e caracterizar os extratos;
- Q Avaliar o potencial de atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, indução de aberrações cromossômicas e danos ao DNA, dos extratos de sericina;
- Q Desenvolver, através de um planejamento fatorial experimental completo, um filme biopolimérico para estabilização estrutural e funcional de sericina, contendo goma xantana, goma carragenana, PVA (98% hidrolizado) a 1,25% (m/v) como agente polimerizante e glicerol a 2,5% (m/v) para indução de efeito plastificante;
- Avaliar a integração de sericina no filme biopolissacarídico otimizado, utilizando diferentes concentrações proteicas;
- Avaliar as características de liberação e permeação transdérmica da proteína bioativa a partir dos filmes biopolissacarídicos, assim como proceder à sua caracterização fisicoquímica.

## **3. JUSTIFICATIVA**

Os hidrogéis biopoliméricos são bastante interessantes para utilização em regeneração de pele devido à sua muito baixa (ou quase nula) toxicidade, potencial para liberação prolongada de entidades bioativas, às propriedades não abrasivas, à sua permeabilidade ao oxigénio e ao vapor de água, às suas características de transparência que permitem visualizar o processo de cura, à sua impermeabilidade a células bacterianas, à capacidade de absorção do exsudado da ferida, à capacidade de manter a hidratação, à sua elasticidade e capacidade de adesão à pele sã sem no entanto aderir ao ferimento (ROSSI, et al., 2010).

Na preparação de hidrogéis utilizam-se polímeros oriundos de diversas fontes, tanto naturais como sintéticas, polimerizados por diferentes processos. Adicionalmente, por se tratar de uma formulação a ser aplicada sobre a pele, normalmente sobre feridas abertas, têm-se envidado esforços para a utilização de biopolímeros naturais e biodegradáveis que não apresentem qualquer (cito)toxicidade.

Por todas as vantagens supracitadas, a utilização dos biopolímeros e da proteína sericina para o desenvolvimento de uma estrutura do tipo "bio-origami" para aplicações em regeneração de pele mostra-se uma alternativa segura, eficaz e muito promissora.

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Reagentes e consumíveis

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior, e foram usados sem qualquer purificação adicional. A água utilizada foi purificada num sistema Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) para uma resistividade final de cerca de 18,18 MΩ.cm e condutividade de 0,05 µS.cm<sup>-1</sup>. A sericina (ref. SIGMA S5201-1G, referida como amostra A1 a partir deste ponto), o Coomassie Brilliant Blue G250 (ref. SIGMA 27815-25G-F), o ácido *o*-fosfórico (85%, v/v; ref. SIGMA V000145-1L), o etanol UVASOL<sup>™</sup> para espectroscopia (99,8%, v/v; ref. SIGMA 32205-1L), o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (ref. SIGMA D9132-1G), o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e o metilparabeno (ref. SIGMA 47889) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). O alcool polivinílico (PVA) com um grau de hidrólise de 98% (PVA98) foi adquirido à Neon Comercial Ltda. (Suzano/SP, Brasil). O glicerol foi adquirido à Cinética (Jandira/SP, Brasil). As gomas carragenana (GENUVISCO® CG-131) e xantana (XANTURAL® 180) foram gentilmente doadas pela CPKelco (Limeira/SP, Brasil).

## 4.1.2. Material biológico

Os casulos de *Bombyx mori* foram adquiridos à Fiação de Seda BRATAC S.A. (Londrina/PR, Brasil). As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana foram *Staphylococcus aureus* CCCD-S007, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, e *Escherichia coli* CCCD-E003, e foram fornecidas pela CEFAR Diagnóstica (Jurubatuba/SP, Brasil). Os meios de crescimento microbiológico utilizados foram o BHI (Brain Heart Infusion) da HiMedia Laboratories (Mumbai, India), o Agar Bacteriológico da Prodimol Biotecnologia S.A. (São Paulo/SP, Brasil), e o TSA (Tryptic Soy Agar) da KASVI (Curitiba/PR, Brasil). As sementes de cebola comuns (cultivar Baia Periforme) utilizadas nos

ensaios de *Allium cepa* foram adquiridas à FELTRIN® (Farroupilha/RS, Brasil). A linhagem celular HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) utilizada nos ensaios de genotoxicidade (Cometa<sup>™</sup>) e citotoxicidade (MTT) foram adquiridas à Sigma-Aldrich (ref. SIGMA S200-05N) (St. Louis MO, EUA). As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>, em meio de crescimento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo D-glucose (4,5 g/L), L-glutamina (584,0 mg/L), piruvato de sódio (100 mg/mL), e bicarbonato de sódio (3,7 g/L) (Gibco Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), suplementado com 10% (m/m) de soro fetal bovino e 1% (m/m) de antibióticos (penicilina (100 Ul/mL) e sulfato de estreptomicina (100 μL/mL)).

#### 4.1.3. Equipamentos analíticos e outros

As determinações de atividade antimicrobiana foram realizados no PhageLab (UNISO) onde foram utilizados os equipamentos cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave (modelo AUTOCLAVE DIGITAL CS 50L, PRISMATEC, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, FANEM, São Paulo/SP, Brasil), geladeira da marca Electrolux (modelo DF80-553L, São Paulo/SP, Brasil). Na etapa de homogeneização para a análise da atividade antioxidante dos extratos de sericina, foi utilizado um vortex da marca FISATOM (modelo 774, São Paulo/SP, Brasil). As soluções aquosas contendo sericina foram liofilizadas em um liofilizador da marca ThermoFisher Scientific (modelo Multi-tasking cód. SNL216V-115, série R23T-659559-RT, Waltham MA, EUA). Para a preparação dos filmes biopoliméricos foram utilizados um agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil) e um banho de ultrasons (modelo USC-3380A, UNIQUE, Indaiatuba/SP, Brasil). A caracterização termogravimétrica dos extratos de sericina e dos filmes foi realizada por análise termogravimétrica (TG) num termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, EUA) enquanto as análises térmicas foram realizadas num calorímetro diferencial de varredura (DSC) também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, EUA), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP, Campinas/SP, Brasil). As análises de microestrutura dos casulos de Bombyx mori foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FESEM) da FEI (modelo QUANTA FEG 250, FEI Company, Hillsboro, EUA), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP, Campinas/SP, Brasil), enquanto as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes bio-origami integrando sericina foram realizadas num microscópio eletrônico de varredura com energia dispersiva (DESEM) da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo Leo 440i, Cambridge, Inglaterra), equipado com um detector EDS da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo 6070, Cambridge, Inglaterra), no LRAC-FEQ (UNICAMP, Campinas/SP, Brasil). Para o recobrimento metálico das amostras com ouro, utilizou-se um Sputter Coater POLARON (modelo SC7620, VG Microtech, Uckfield, Inglaterra). Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da AGILENT (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.) e os difratogramas de raios-X foram obtidos num difratômetro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão), equipamentos pertencentes ao IQ-UNICAMP (Campinas/SP, Brasil). As análises de resistência à tração, resiliência e resistência à perfuração, dos filmes bio-origami, foram realizadas em Texturômetro da Stabile Micro Systems (modelo TA-TX Plus, Godalming, Inglaterra), no LaBNUS-UNISO (localizado no Parque Tecnológico de Sorocaba, Sorocaba/SP, Brasil). Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis da Perkin Elmer (modelo Lambda 3s, Waltham MA, EUA), no LAPETOX-UNISO (Sorocaba/SP, Brasil) e no espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA) no PhageLab-UNISO (Sorocaba/SP, Brasil). As leituras de viabilidade celular nos ensaios de MTT foram realizadas num leitor de microplacas ELISA da Robonik India Private LTD. (modelo Readwell PLATE, Maharashtra, India). As análises de microscopia ótica para os ensaios Cometa™ foram realizadas num microscópio ótico da Zeiss (modelo Axiovert-60, Carl-Zeiss, Göschwitzer Str., Jena, Alemanha), no LABITON-UNISO (Sorocaba/SP, Brasil).

### 4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Extração de sericina

Aproximadamente 15 g de casulos de *Bombyx mori* foram pesados para um Erlenmeyer de 2000 mL, adicionados com 1000 mL de água ultrapura (solvente extrator) (casulos:água ultrapura, 1,5:100), e autoclavou-se a 120 °C durante 60 min.

# 4.2.1.1. Extração por autoclavagem a alta-temperatura seguida de congelaçãodescongelação

Após autoclavagem, a sericina foi extraída por precipitação de acordo com o procedimento descrito por Aguiar (2011), com ligeiras modificações. O excesso de massa de casulos foi depois removido, a solução resultante vertida para uma garrafa PET e congelada a -20 °C durante 24 h. Após o período de congelação, a solução foi descongelada à temperatura ambiente e filtrada a vácuo através de filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro usando um dispositivo de filtração Millipore, e o precipitado retido no filtro foi seco e triturado com gral e pistilo. O extrato resultante de sericina em pó é referido como amostra A2 a partir deste ponto.

4.2.1.2. Extração por autoclavagem a alta-temperatura seguida de liofilização

Após autoclavagem, a sericina foi extraída de acordo com os procedimentos descritos por Patel e Modasiya (2011) e Dias et al. (2015), com ligeiras modificações. O excesso de massa de casulos foi depois removido e a solução resultante foi filtrada a vácuo através de filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro usando um dispositivo de filtração Millipore. A solução filtrada foi depois distribuída por vários frascos de vidro e devidamente congelada a -86 °C antes da liofilização. Após liofilização, o extrato impuro foi devidamente triturado com gral e

pistilo. O extrato resultante de sericina em pó é referido como amostra A3 a partir deste ponto.

Após a obtenção dos extratos de sericina pelas duas metodologias de extração descritas, seguiu-se a sua caracterização, tanto do ponto de vista físicoquímico quanto biológico, comparando com o respectivo padrão de serina (sericina comercial, de uso laboratorial).

4.2.2. Caracterização físicoquímica dos extratos de sericina

4.2.2.1. Determinação do teor de umidade por aquecimento com fonte de raios infravermelhos

A determinação do teor de umidade dos extratos em bruto de sericina foi realizada num analisador de umidade por infravermelho da Shimadzu (modelo MOC63U, Kyoto, Japão), equipado com um temporizador, auto-calibração e ajuste de temperatura entre 50 °C e 200 °C, com parâmetros ajustados em temperatura de 60 °C e modo "slow".

4.2.2.2. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR de sericina pura (A1) e de amostras dos dois extratos de sericina (A2 e A3) foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier da Agilent (modelo Cary 630, Santa Clara CA, EUA), na gama de números de onda de 4000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, e utilizando apodização de Happ-Genzel.

Um espectro de infravermelho é a combinação das transformadas de Fourier para todos os números de onda considerados. Qualquer pico característico de uma dada amostra é representado pelo pico de maior intensidade, sendo a restante ondulação considerada ruído. Este ruído, para não ser identificado como pico, pode ser diminuído por vários processos. A apodização é um deles, e consiste em fazer decair suavemente a intensidade

do interferograma para zero nas extremidades do pico principal, por aplicação de uma função matemática ao interferograma, antes da Transformada de Fourier. A apodização de Happ-Genzel é considerada a melhor escolha para a maioria das aplicações, pois suprime melhor as "réplicas" laterais e com menor redução da resolução.

4.2.2.3. Análises por difração de raios-X (XRD)

Difratogramas de raios-X de amostras de sericina pura (A1) e de amostras dos dois extratos impuros de sericina (A2 e A3) foram obtidos num Difratômetro de raios-X (XRD) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão), usando radiação de raios-X produzida por uma lâmpada de cobre com radiação K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418$  Å) filtrada através de um alvo de Cu. A varredura de raios-X foi realizada à ângulos de difração de 2-Theta (de 5° a 90°, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2° min<sup>-1</sup>), com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA e potência de raios-X de 3 kW.

# 4.2.2.4. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A caracterização termogravimétrica dos extratos de sericina foi realizada foi realizada via análises termogravimétricas (TG) enquanto as análises térmicas foram realizadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC).

As análises de TG foram realizadas utilizando um termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, EUA), enquanto as análises térmicas de DSC foram realizadas utilizando um microcalorímetro diferencial exploratório também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, EUA). A caracterização térmica da sericina pura (A1) e de amostras dos extratos de sericina (A2 e A3) foi realizada tanto por TG como por DSC, seguindo o procedimento descrito por Glasser et al. (2016).

Tanto para as análises de TG como para as análises calorimétricas, as amostras (aproximadamente 7 mg A1, 7 mg A2 e 7 mg A3) foram pesadas diretamente no interior de

cadinhos de alumínio de alta pressão, e devidamente seladas por pressão. Um cadinho de alumínio de referência foi também preparado, por simples selagem de ar no seu interior.

As amostras foram então sujeitas a um aumento linear de temperatura, de cerca de 20 °C até 250 °C, a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C min<sup>-1</sup>, sob uma atmosfera inerte mantida com um fluxo constante de argônio de 50 mL min<sup>-1</sup>, durante o qual a quantidade de calor absorvido pelas amostras foi registrado a uma taxa de amostragem de 0,2 s por ponto de dados.

## 4.2.2.5. Análises eletroforéticas por SDS-PAGE

A distribuição de pesos moleculares da sericina foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando um sistema Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, EUA) acoplado a uma unidade de alimentação de energia PowerPac<sup>™</sup> HC (Bio-RAD, Califórnia CA, EUA) e a um banho digital seco também da Bio-RAD.

Para determinar tanto o perfil proteico da sericina pura (A1) como o das amostras de extratos de sericina (A2 e A3) e a sua distribuição de pesos moleculares, 500 µL de solução de extrato de sericina (contendo ou 50 mg<sub>extrato</sub> (para a coloração com Coomassie) ou 120 mg<sub>extrato</sub> (para a coloração com prata)) foram adicionados a um volume (500 µL) de tampão de disrupção (1,51% (m/v) Tris-Base, 0,5% (v/v) β-mercaptoetanol, 4% (m/v) dodecilsulfato de sódio, 10% (v/v) glicerol, e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) num tubo Eppendorf (com a tampa perfurada no centro por uma agulha) e fervido durante 10 min. Realizou-se então a análise de SDS-PAGE ao sobrenadante da amostra (10 µL) e aos marcadores de peso moleculares (10 µL de *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com padrões de proteína variando entre 10 kDa a 250 kDa), com os géis desenvolvidos a uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 45 min, após o que os géis (em duplicata) foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (permitindo assim a detecção de cerca de 70 µg de proteína) ou revelados com prata (permitindo assim a detecção de cerca de 7 µg of protein). Após revelação, os géis foram então fotografados para análise.

4.2.2.6. Quantificação do teor de proteína pelo método de Bradford modificado

Utilizou-se uma modificação do método de Bradford para quantificação proteica de acordo com o procedimento descrito por Robyt e White (1990) e Balcão et al. (1996). Tanto a sericina pura (amostra A1) como os extratos de sericina (amostras A2 e A3) foram dissolvidos em água ultrapura e diluídos quanto necessário.

Aliquotas de 500 µL das soluções de sericina foram adicionadas a 4,5 mL de solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (a solução de trabalho de Coomassie Brilliant Blue G-250 foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Robyt e White (1990) e Balcão et al. (1996)), incubadas à temperatura ambiente durante 5 min e a absorvância medida ao comprimento de onda de 595 nm utilizando cubetas de plástico descartáveis (Kartell, Noviglio MI, Itália) num espectrofotômetro UV-Vis da AGILENT (modelo Cary 60, Santa Clara CA, EUA).

Para construção da curva de calibração relacionando absorvância a 595 nm com concentração de proteína (mg/mL), preparou-se uma solução mãe de albumina sérica bovina (BSA) em água ultrapura, com a concentração de 1 mg/mL. A partir desta solução, prepararam-se diluições em água ultrapura com concentrações 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL. A 500 µL de cada uma destas soluções, adicionou-se sequencialmente 4,5 mL de solução de Coomassie Brilliant Blue G-250, incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min e a absorvância medida ao comprimento de onda de 595 nm utilizando cubetas de plástico descartáveis (Kartell, Noviglio MI, Itália) num espectrofotômetro UV-Vis da AGILENT (modelo Cary 60, Santa Clara CA, EUA).

# 4.2.2.7. Determinação da composição elementar por análises de fluorescência de raios-X (XRF)

A composição elementar das amostras A1, A2 e A3 e de casulos de *Bombyx mori* foi determinada usando um espectrômetro de fluorescênica de raios-X com dispersão de energia (EDXRF) da Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA), consistindo num ânodo de Ag e um detector de raios-X SDD de 25 mm<sup>2</sup> com uma resolução de 128 eV na linha Mn-Kα. A voltagem aplicada ao tubo de raios-X foi de 30 kV, 10 µA de corrente, com 10% de tempo de

atraso no detector. Todas as medidas foram realizadas usando ar atmosférico, e o tempo de medida foi de 300s (tempo real) para cada amostra. Na saída da fonte de raios-X utilizou-se um colimador com abertura de 1 mm. Os espectros foram recolhidos sequencialmente, com uma resolução de 0,02 keV, de 0 keV a 30 keV.

4.2.2.8. Análises tomográficas por transmissão de raios-X (XRT)

As imagens tomográficas da parede do casulo foram coletadas usando um tomógrafo computorizado de transmissão de raios-X de terceira geração (OLIVEIRA JÚNIOR e MARTINS, 2009) da Bruker microCT (modelo SkyScan 1174, Kontich, Bélgica).

As amostras de casulo foram colocadas dentro da câmara do tomógrafo e as fatias de imagem foram coletadas usando as seguintes configurações do sistema tomográfico: tensão de operação ajustada a 35 kV e corrente elétrica com 661 µA. A técnica utilizada para a obtenção das imagens tomográficas implicou a aquisição de um grande número de radiografias do objeto (fatias de imagem), obtidas medindo a intensidade de raios X transmitidos através da amostra de casulo, em diferentes posições angulares.

As amostras de casulos foram giradas 180°, com incrementos angulares de 0,8°, produzindo 225 radiografias (projeções) por imagem, cada contendo 1304×1304 (largura x altura) pixels com uma resolução espacial de 6,92  $\mu$ m. O tempo de exposição por projeção foi de 5000 ms. À saída da fonte de raios-X utilizou-se um filtro de Al com 0,25 mm de espessura.

Foram então usados algoritmos matemáticos apropriados para reconstruir as imagens tomográficas tridimensionais (3D) das amostras de casulo, através da composição apropriada de imagens bidimensionais (2D). As imagens 3D possuiram 652×652×652 pixels e a mesma resolução espacial das imagens 2D, e por isso o volume de dados gerados para cada amostra de casulo é isotrópico em relação à resolução espacial.

De posse de todas as projeções (radiografias recolhidas em cada posição angular), utilizou-se o software NRecon<sup>™</sup> da Bruker (versão 1.6.9.4, Kontich, Bélgica), que utiliza o algoritmo de FELDKAMP *et al.* (1984) no processo de reconstrução das imagens tomográficas, e o software CTVox<sup>™</sup> (versão 2.6.0 r908-64bit, da Bruker microCT), CTan<sup>™</sup> (versão 1.13.5.1-64bit, da Bruker microCT) e CTvol (versão 2.2.3.0-64bit, da Bruker microCT) para processar as imagens tomográficas. 4.2.2.9. Análises por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM)

A superfície e a morfologia do casulo de *Bombyx mori* foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FESEM) da FEI (modelo QUANTA FEG 250, FEI Company, Hillsboro, E.U.A.) equipado com uma fonte de emissão de campo.

As amostras da parede do casulo foram cortadas e revestidas com uma película de Au/Pd (80%/20%) por pulverização catódica sobre uma camada de carbono produzida por evaporação em um dispositivo de metalização da BAL-TEC (modelo BAL-TEC MED 020, BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein). As fotomicrografias foram coletadas usando feixes de elétrons com velocidades de aceleração de 10-20 keV por varredura aleatória.

4.2.3. Caracterização biológica dos extratos de sericina

4.2.3.1. Avaliação do potencial de atividade antimicrobiana dos extratos de sericina através do método de difusão em ágar

O potencial antimicrobiano tanto da sericina pura (A1) como dos extratos de sericina (A2 e A3) foi determinado através da técnica de difusão em ágar para susceptibilidade a antimicrobianos descrita por Bauer et al. (1966) e JORGENSEN e FERRARO (2009), e de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2011, 2003). Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando uma cepa de *Staphylococcus aureus* CCCD-S007, uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004 e uma cepa de *Escherichia coli* CCCD-E003 (mantidas a -80 °C em meio de cultura com 40 % (v/v) de glicerol).

Para o reavivamento das cepas bacterianas, cada uma foi individualmente suspendida em 50 mL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) e incubada em um agitador orbital a 100 rpm e (37±0,5) °C durante 24h, para permitir o crescimento da bactéria. Todas as culturas bacterianas foram padronizadas a 0,5 na escala de McFarland, contendo aproximadamente 1,5×10<sup>8</sup> UFC/mL. Foram realizadas diluições em caldo BHI estéril para se atingir uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala McFarland. Após este período de tempo, as culturas bacterianas foram inoculadas por espalhamento na superfície de duas placas de Petri contendo TSA solidificado (Tryptic Soy Agar) como meio de cultura.

Foram preparadas soluções aquosas de sericina (em água ultrapura estéril), tanto da sericina padrão, pura, (A1), como dos extratos em bruto (A2 e A3), com concentrações de 50 mg<sub>extrato</sub>/mL. Cada amostra, em pó, foi previamente exposta à luz ultravioleta durante 15 min, para eliminação de qualquer eventual carga microbiana. Após a diluição, todas as soluções de sericina foram microfiltradas através de filtros Chromafil™ (0,20 µm de tamanho de poro × 25 mm de diâmetro).

O teste de atividade antimicrobiana das soluções de sericina foi realizado em duplicata, adicionando (com o auxílio de pinça junto a bico de Bunsen) discos de papel de filtro estéreis (aproximadamente 7,0 mm de diâmetro) impregnados com 50 µL das soluções de sericina (preparadas como mencionado acima) sobre a superfície das placas inoculadas.

No quadrante superior esquerdo aplicou-se o disco impregnado com solução de A1, enquanto que no quadrante superior direito aplicou-se o disco impregnado com solução de A2. No quadrante inferior esquerdo foi aplicado um disco impregnado com a solução de A3, e no quadrante inferior direito foi aplicado o disco impregnado com a solução de coquetel antibiótico (penicilina (10000 U.I./mL) e estreptomicina (10mg/mL)). As placas de Petri foram então secas, foram invertidas e incubadas sob condições aeróbias a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, verificou-se (ou não) a formação de halos de inibição de crescimento microbiano.

# 4.2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante por eliminação de radicais livres através do método DPPH

O potencial para a atividade de eliminação de radicais livres das amostras de sericina A1, A2 e A3, utilizando o reagente DPPH, foi avaliado pelo método descrito por Wu et al. (2007) e Amarowicz et al. (2004), com pequenas modificações.

A 500  $\mu$ L de solução aquosa de extrato de sericina (preparada em água ultrapura, amostra A1: 5 mg/mL e 15 mg/mL, amostra A2: 15 mg/mL e 60 mg/mL, amostra A3: 25 mg/mL e 60 mg/mL) ou 500  $\mu$ L de solução aquosa de ácido ascórbico (dissolvido em água ultrapura, 0,5 mg/mL), adicionaram-se 3500  $\mu$ L de solução metanólica de radical DPPH

recém preparada (1,0x10<sup>-4</sup> mol/L) e vortexou-se. Após reação durante 25 minutos à temperatura ambiente (25 °C), no escuro, as misturas reacionais foram centrifugadas a 6400 rpm durante 5 min. A coloração resultante do sobrenadante foi então analisada por espectrofotometria ao comprimento de onda de 517 nm e comparada com um controle em branco que continha a solução de sericina (A1, A2 ou A3) e metanol puro em vez do radical DPPH. Além disso, um controle cego (negativo) contendo metanol e água ultrapura em vez de solução de sericina (500  $\mu$ L de água ultrapura adicionada a 3500  $\mu$ L de metanol) também foi analisado.

O cálculo da atividade de eliminação de radicais livres foi realizado utilizando a equação (1):

Atividade de eliminação (%) = 
$$\left(1 - \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{blind}}\right) \times 100$$
 (1)

onde a *atividade de eliminação* refere-se à percentagem de eliminação de radicais livres, *Abs<sub>amostra</sub>* refere-se à absorvância da amostra a 517 nm e *Abs<sub>blind</sub>* refere-se à absorbância do controle cego a 517 nm. O espectrofotômetro foi zerado com água ultrapura.

4.2.3.3. Determinação do potencial de citotoxicidade da sericina, através do ensaio MTT

O potencial de citotoxicidade da sericina foi avaliado em linhagem celular permanente HUVEC (células endoteliais retiradas da veia umbilical humana), tendo sido realizado o ensaio MTT para determinação da viabilidade celular. Para a proliferação celular, utilizaramse frascos específicos para cultura de células contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% (m/m) de soro fetal bovino e 1% (m/m) antibiótico de largo espectro de ação (100 UI<sub>penicilina</sub>/mL mais 100 µL sulfato de estreptomicina) a pH 7,4, tendo sido incubados a 37 °C sob uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência, as células foram desaderidas usando tripsina e utilizadas de acordo com a metodologia preconizada pelo teste. Nestes ensaios, o plaqueamento foi realizado inoculando aproximadamente  $0.5 \times 10^4$  células viáveis em cada poço de uma microplaca de 96 poços, utilizando um volume de suspensão celular de 100 µL, seguido de incubação durante 48 h até atingir semi-confluência. A análise da viabilidade celular usando a técnica MTT começou com o plaqueamento de uma suspensão celular contendo  $0.5 \times 10^5$  células/mL. Após 24 h (tempo necessário para aderência e estabilidade das células), as células foram colocadas em contato com amostras de A1, A2 e A3 (nas quantidades de 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 e 20.0 mg<sub>amostra</sub>/mL<sub>meio de cultura DMEM</sub>) por mais 24 h, seguido de centrifugação. Um controle negativo (meio DMEM puro) também foi preparado, sem adição de amostra de sericina.

As placas foram então mantidas durante 24 h em uma estufa de incubação ajustada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período de tempo, as amostras de sericina foram removidas por duas lavagens com tampão PBS e as células expostas ao MTT (0,5 mg/mL, 100 µL). A viabilidade celular foi determinada usando a redução do MTT.

Após 3 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, o número de células viáveis foi determinado medindo a quantidade de MTT convertido a formazan (um composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais. Para isso, a solução de MTT foi removida dos poços e foram adicionados 100  $\mu$ L de DMSO a cada poço e, após 5-10 min, realizaram-se leituras de absorbância a 540 nm usando um leitor de microplacas ELISA da Robonik India Private Ltd. (modelo Readwell PLATE, Maharashtra, Índia).

Todos os testes foram realizados em sextuplicatas para cada concentração de amostra testada. A análise dos resultados foi realizada assumindo como 100% de viabilidade celular a média dos valores de absorvância obtidos para o controle não tratado. Partindo desse pressuposto, os cálculos de viabilidade celular (%) em relação ao controle negativo foram realizados para cada concentração de amostra.

4.2.3.4. Avaliação do potencial de dano ao DNA pela sericina, através do teste Cometa™

As células HUVEC foram colocadas em contato com as amostras (A1, A2 e A3, em concentrações mássicas de 10 mg/mL, 15 mg/mL e 20 mg/mL para cada amostra, sendo o negativo meio DMEM simples em contato com as células HUVEC) durante um período de 1 h.

Para a preparação das lâminas, cada grupo de tratamento (amostra A1, amostra A2 e amostra A3) envolveu 15 µL de células (HUVEC, após contato com as amostras) em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%, m/v), com as misturas a serem colocadas sobre lâminas de microscópio que foram pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, m/v). Os testes foram realizados em duplicata para cada grupo. Colocaram-se lamínulas sobre as amostras nas lâminas do microscópio, e as lâminas foram colocadas sob condições de refrigeração durante 10 min para que a polimerização ocorresse. Após polimerização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas de modo a não danificar o gel e as lâminas foram tratadas em um recipiente com uma solução de lise arrefecida (4 °C) (NaCl 2,5 mol dm<sup>-3</sup>, EDTA 0,1 mol dm<sup>-3</sup>, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 10 mmol dm<sup>-3</sup> e 1% Triton X-100<sup>™</sup>, pH 10), completamente embrulhadas com folha de alumínio, durante 60 min.

Os grupos de tratamento foram então incubados em um tampão de eletroforese (NaOH 0,3 mol dm<sup>-3</sup> e EDTA 1 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 13) durante 20 minutos, seguido por análise eletroforética durante 20 min a 22 V, 300 mA e 10 W, a 1,3 V/cm. Após a eletroforese, as lâminas foram removidas do recipiente de eletroforese e inundadas com uma solução neutralizante (Tris 0,4 mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,5) durante 5 minutos, lavadas três vezes com água ultrapura e deixadas em repouso durante a noite à temperatura ambiente.

Antes da coloração, as lâminas secas foram deixadas em uma solução de fixação (ácido tricloroacético 15% (m/v), sulfato de zinco 5% (m/v) e glicerol 5% (v/v)) durante 10 min, após o que foram lavadas três vezes com água ultrapura. Após estes procedimentos, as lâminas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente durante 1,5 h, sendo rehidratadas com água ultrapura e coradas durante aproximadamente 35 min com uma solução de coloração de prata consistindo na solução A (nitrato de amónio 0,2% (m/v), nitrato de prata 0,2% (m/v), ácido tungstosilícico 0,5% (m/v), formaldeído 0,15% (v/v) e carbonato de sódio 5% (m/v)) e solução B (carbonato de sódio 5 % (m/v)) (34:66, v/v). Posteriormente, as lâminas foram banhadas em uma solução de paragem (ácido acético, 1% (v/v)) e depois lavadas com água ultrapura. Finalmente, as lâminas foram novamente lavadas suavemente com água ultrapura e deixadas secar à temperatura ambiente. A coloração de prata é análoga à fluorescência, durante a qual a carga positiva dos cátions de prata permite a sua ligação ao DNA e a fragmentos de DNA, produzindo a coloração característica. Ao longo dos procedimentos envolvendo materiais celulares, tanto a luz natural como a luz de lâmpadas fluorescentes foram evitadas de modo a prevenir sua possível influência sobre os resultados.

As análises de microscopia óptica foram realizadas utilizando um microscópio óptico Zeiss Axiovert-60 da Carl-Zeiss (Göschwitzer Str., Jena, Alemanha). Pelo menos 50 células foram contadas em cada slide, com 2 lâminas para cada teste (aproximadamente 100 células). As análises foram realizadas em duplicata, totalizando 100 células para a análise de cada solução de amostra de sericina (A1, A2 e A3) testada.

As análises do ensaio Cometa foram realizadas atribuindo uma pontuação de 0 a 4, de acordo com a quantidade de DNA na cauda e o comprimento da cauda, da seguinte forma: pontuação 0, correspondente a células intactas (sem qualquer espalhamento, ou abaixo de 5 % de dano); pontuação 1, correspondendo a células com danos mínimos (dispersão de luz, com um cauda muito curta, 5-20% de dano); pontuação 2, correspondente às células com dano médio (dispersão suave e cauda larga, 20-40% de dano); pontuação 3, correspondente às células com dano severo (grande dispersão e cauda larga, 40-95% de dano); e pontuação 4, correspondendo às células com o máximo de dano (núcleo mínimo, grande dispersão e cauda larga, mais de 95% de dano) (SEABRA et al. 2014).

Para este método visual, o número de células encontradas para cada pontuação foi multiplicado pelo valor da pontuação. Todos os valores foram somados no final da análise de cada *slide*. Como a pontuação depende do número de células observadas, foi criado um índice de dano de cauda (ou dano de DNA) normalizando a pontuação atribuída à lâmina pelo número de células analisadas na lâmina. A análise estatística realizada aos dados coletados do teste Cometa<sup>™</sup> foi realizada usando o software GraphPad Prism v. 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, E.U.A.), aplicando o teste estatístico de Tukey com múltiplas comparações entre as amostras.

# 4.2.3.5. Análise do potencial de indução de aberrações cromossômicas pela sericina, através do ensaio *Allium cepa*

A avaliação do potencial de indução de aberrações cromossômicas de cada amostra, A1, A2 e A3, foi realizada utilizando sementes de cebola comum (cultivar *Baia Periforme* da FELTRIN® seeds, Farroupilha/RS, Brasil) através do ensaio de *Allium cepa*, que permite observar alterações cromossomais e nucleares nas células da ponta da raiz do *Allium Cepa*. *Allium cepa* é uma das plantas mais adequadas para a detecção do potencial genotóxico de compostos alvo. O teste permite a avaliação de diferentes pontos finais genéticos, possibilitando prever possíveis danos ao DNA humano. A cebola comum (*Allium cepa* L.) tem oito pares de cromossomas relativamente grandes (2n=16), que permitem uma fácil detecção de aberrações cromossômicas (NEFIC et al., 2013). O tamanho dos cromossomas torna as pontas do *Allium cepa* um material favorável para o estudo dos efeitos de compostos químicos sobre a frequência de aberrações cromossômicas, as quais são biomarcadores de danos ao material genético. Outras vantagens da utilização deste método encontram-se na baixa frequência de aberrações espontâneas das células da ponta da raiz da cebola comum, assim como no número estável de cromossomas. Para este teste, as sementes de *Allium cepa* foram germinadas em cima de papel de filtro úmido (estéril) em placas de Petri. Após germinação, as raízes foram coletadas no momento em que atingiram 20 mm de comprimento.

As raízes foram então colocadas em contato com as amostras de sericina a serem testadas (soluções de amostra A1, A2 e A3 a uma concentração de 20 mg/mL), utilizando um volume mínimo de amostra de modo a cobrir as raízes, por um período de 24 h. Água ultrapura foi usada como negativo. Após este período de tempo, as raízes de *Allium cepa* foram removidas da solução das amostras a serem testadas, lavadas com água ultrapura e colocadas em frascos com solução de fixação (etanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1). Os frascos foram então deixados à temperatura ambiente durante 6-8 h, e armazenados em condições de refrigeração.

Para a preparação das lâminas do microscópio, as raízes de *Allium cepa* foram removidas da solução de fixação, lavadas três vezes com água ultrapura e submetidas a hidrólise ácida (1 mol dm<sup>-3</sup> HCl a 60 °C durante 9 min). Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes com água ultrapura durante 5 min. O excesso de água foi então removido das raízes usando papel de filtro. As raízes foram mergulhadas no reagente de Schiff (no escuro) por um período de 2 h. Após este período, as raízes foram removidas do reagente de Schiff e lavadas com água ultrapura até remoção do excesso de corante. A região meristemática das raízes (ponta corada) foi cortada sobre uma lâmina de vidro, adicionada com uma gota de Carmim acético (2%, m/v) (corante citoplasmático) e coberta com uma lamínula. Bateu-se suavemente na lamínula com uma pinça, para esmagar as raízes e espalhar as células. As preparações foram então analisadas ao microscópio óptico.

# 4.2.4. Planejamento fatorial experimental para otimização dos filmes bio-origami vazios com apropriadas propriedades mecânicas

Um planejamento fatorial experimental completo do tipo 3<sup>2</sup> (duas variáveis, cada uma definida em três níveis), resultando assim num total de nove formulações, foi aplicado para maximizar a eficiência experimental com um mínimo de experimentos. As duas variáveis diferentes (concentrações mássicas de goma carragenana e goma xantana) em três níveis cada, baixa (-1), média/central (0) e alta (+1), e sua influência sobre as propriedades mecânicas dos filmes biopolissacarídicos produzidos (BPFi) foram devidamente estudadas. As variáveis independentes foram as concentrações de goma carragenana e goma xantana, enquanto que as variáveis dependentes estabelecidas sob escrutínio foram as propriedades mecânicas médias, isto é, a resistência à tração, a resistência à perfuração e a resiliência. Para cada variável independente, aos valores baixo, médio e alto dos níveis inferior, central e superior foi atribuído um sinal (-1), (0) e (+1), respectivamente (ver Quadro 1).

**Quadro 1.** Planejamento fatorial experimental completo do tipo 3<sup>2</sup>, fornecendo os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.

	Níveis			
Variáveis independentes	Baixo	Central	Alto	
	(-1)	(0)	(+1)	
Goma carragenana (%, m/m)	0,750	1,500	2,250	
Goma xantana (%, m/m)	0,250	0,500	0,750	

Fonte: elaboração própria.

Todas as formulações foram produzidas de acordo com o planejamento fatorial experimental exibido no Quadro 1, integrando quantidades constantes de PVA (1,25%, m/m; para induzir polimerização), glicerol (2,50%, m/m; para induzir plasticidade) e metilparabeno (0,1%, m/m; para inibir o crescimento fúngico), dando assim origem a nove formulações de filmes biopoliméricos simples (ver Quadro 2), como demonstrado na Figura 8.

Níveis / massa				DVA	Glicorol	Motilnarabono	Água
Goma carragenana		Goma xantana		F V A	(g)	(g)	ultrapura
(g)		(g)		(9)			(g)
(-1)	0,075	(-1)	0,025	0,125	0,250	0,010	9,515
(-1)	0,075	(0)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,490
(-1)	0,075	(+1)	0,075	0,125	0,250	0,010	9,465
(0)	0,150	(-1)	0,025	0,125	0,250	0,010	9,440
(0)	0,150	(0)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,415
(0)	0,150	(+1)	0,075	0,125	0,250	0,010	9,390
(+1)	0,225	(-1)	0,025	0,125	0,250	0,010	9,365
(+1)	0,225	(0)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,340
(+1)	0,225	(+1)	0,075	0,125	0,250	0,010	9,315

Quadro 2. Composição dos filmes do tipo bio-origami (vazios) para otimização das propriedades mecânicas apropriadas.

Fonte: elaboração própria.

**Figura 8.** Fluxograma da preparação e avaliação dos filmes biopolissacarídicos simples do tipo bioorigami de acordo com o planejamento fatorial experimental completo.



Fonte: elaboração própria.

# 4.2.5. Produção dos filmes bio-origami com concentrações variáveis de sericina, partindo da formulação matricial ótima resultante do planejamento fatorial experimental

Após a determinação dos níveis ótimos dos biopolissacarídeos, resultando em um filme adequado em termos de propriedades mecânicas (ou seja, adequada resistência à tração e à perfuração, e resiliência), mantendo um bom nível de maleabilidade, tais níveis foram utilizados para produzir diferentes filmes com quantidades variáveis de sericina. Assim, um total de sete filmes foram produzidos integrando sericina, de acordo com os dados incluídos no Quadro 3.

Bio- origami #	Goma carragenana (g)	Goma xantana (g)	PVA (g)	Glicerol (g)	Metilparabeno (g)	Sericina (g)	Água ultrapura (g)
Bioo1	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,000	9,340
Bioo2	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,010	9,330
Bioo3	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,020	9,320
Bioo4	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,050	9,290
Bioo5	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,100	9,240
Bioo6	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,200	9,140
Bioo7	0,225	0,050	0,125	0,250	0,010	0,500	8,840

Quadro 3. Composição dos vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina.

Fonte: elaboração própria.

Todos os filmes bio-origami produzidos partiram dos níveis ótimos das gomas carragenana e xantana (ver Quadro 2), com quantidades constantes adicionadas de PVA (1,25%, m/m; para induzir polimerização), glicerol (2,50%, m/m; para induzir plasticidade) e metilparabeno (0,1%, m/m; para inibir o crescimento fúngico), e integrando adicionalmente sericina a diferentes níveis.

Os filmes bio-origami foram depois caracterizados de acordo com o fluxograma exibido na Figura 9.





Fonte: elaboração própria.

- 4.2.6. Caracterização dos filmes bio-origami integrando concentrações variáveis de sericina
- 4.2.6.1. Determinação do teor de umidade dos filmes bio-origami por aquecimento com fonte de raios infravermelhos

A determinação do teor de umidade dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.2.1., utilizando amostras de 20 mg dos filmes bio-origami.

4.2.6.2. Análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina foram analisados por FTIR de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.2.2.

4.2.6.3. Análises de difracção de raios-X (XRD)

Os filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina foram analisados por XRD de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.2.3.

4.2.6.4. Análises térmicas por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Os filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina foram analisados por TG e DSC de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.2.4., utilizando para os ensaios calorimétricos de DSC aproximadamente 4,46 mg Bioo1, 5,60 mg Bioo2, 11,22 mg Bioo3, 5,52 mg Bioo4, 10,25 mg Bioo5, 5,01 mg Bioo6 ou 3,99 mg Bioo7, e utilizando para os ensaios de termogravimetria (TG) aproximadamente 9,10 mg Bioo1, 10,09 mg Bioo2, 5,61 mg Bioo3, 6,29 mg Bioo4, 13,61 mg Bioo5, 13,31 mg Bioo6 ou 4,89 mg Bioo7.

4.2.6.5. Avaliação da atividade antioxidante dos filmes bio-origami por eliminação de radicais livres através do método DPPH

O potencial dos filmes bio-origami, integrando quantidades variáveis de sericina, para atividade de eliminação de radicais livres, utilizando o reagente DPPH, foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Wu et al. (2007), Amarowicz et al. (2004) e Caetano et al. (2015) com ligeiras modificações. A amostras quadrangulares (10x10) mm dos filmes bio-origami,

adicionaram-se 3500  $\mu$ L de uma solução recém preparada do radical DPPH em metanol (1,0x10<sup>-4</sup> mol/L). Após reação durante 25 min à temperatura ambiente (25 °C), no escuro, as misturas reacionais foram centrifugadas a 6400 rpm durante 5 min. O resultado descolorante do sobrenadante foi então analisado espectrofotometricamente a 517 nm e comparado com um controle branco contendo o filme bio-origami e metanol puro em vez de DPPH. Adicionalmente, um controle cego contendo metanol e água ultrapura em vez do filme bio-origami (500  $\mu$ L de água ultrapura adicionada a 3500  $\mu$ L de metanol) foi também analisado. O cálculo da atividade de eliminação de radicais livres dos filmes bio-origami foi então realizado utilizando a equação (1).

4.2.6.6. Avaliação das propriedades de resistência mecânica dos filmes bio-origami

As propriedades mecânicas dos filmes bio-origami foram avaliadas utilizando um texturômetro da Stabile Micro Systems (modelo TA-TX Plus, Godalming, Inglaterra), analisando parâmetros tais como resistência à perforação, resistência à tração, e resiliência. Os parâmetros de determinação foram regulados para distância de 5 mm para os testes de resistência à perforação, distância de 2 mm para os testes de resiliência e resistência à tração, e uma força máxima de 5 kg para todos os testes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. As dimensões das amostras de filmes bio-origami foram 2 cm x 5 cm para a resistência à tração, e 2 cm x 2 cm para a resistência à perforação e resiliência.

4.2.6.7. Determinação da composição elementar dos filmes bio-origami por análises de fluorescência de raios-X (XRF)

A composição elementar de filmes bio-origami selecionados, carregados com quantidades variáveis de sericina, foi determinada seguindo a metodologia descrita na seção 4.2.2.7. 4.2.6.8. Análises tomográficas dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina, por transmissão de raios-X (XRT)

Amostras dos filmes bio-origami foram fixadas num suporte ôco (do tipo moldura quadrangular) e colocadas verticalmente na câmara do tomógrafo. Imagens tomográficas dos filmes bio-origami selecionados, carregados com quantidades variáveis de sericina, foram então obtidas seguindo a metodologia descrita na seção 4.2.2.8.

4.2.6.9. Análises morfológicas de superfície e de zona de fratura por microscopia eletrônica de varredura com energia dispersive (DESEM) dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina

A morfologia de superfície e a zona de fratura dos vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina foram observadas num microscópio eletrônico de varredura com energia dispersiva (DESEM) da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo Leo 440i, Cambridge, Inglaterra) equipado com um detector EDS (modelo 6070, Cambridge, Inglaterra). Amostras dos filmes bio-origami foram cortadas e revestidas com um filme de Au de 92 Å de espessura por pulverização catódica, numa camada de carbono produzida por evaporação num dispositivo metalizador (Sputter Coater POLARON) da VG Microtech (modelo SC7620, Uckfield, Inglaterra). Alternativamente, amostras dos filmes bio-origami foram mergulhadas em nitrogênio líquido e fraturadas antes do recobrimento a ouro. As fotomicrografias da superfície e da zona de fratura dos vários filmes bio-origami foram obtidas utilizando feixes de eletrons com velocidades de aceleração de 10-20 keV através de varredura aleatória.

- 4.2.7. Características de liberação controlada dos filmes bio-origami integrando concentrações variáveis de sericina
- 4.2.7.1. Permeação transdérmica e cinética de liberação da proteína sericina pelos filmes bio-origami

A capacidade de liberação de sericina dos vários filmes bio-origami foi avaliada através de estudos de permeação transdérmica num sistema DHC-6T Transdermal System da LOGAN INSTRUMENTS CORP. (Somerset NJ, EUA).

Para estes ensaios, discos de pele de orelha suína descongelada (previamente preparada de acordo com o procedimento descrito por Salerno et al. (2010) (0,5 mm de espessura x 30 mm  $\phi_{ext}$ ) foram cortados e grampeados entre as câmaras aceitadora e doadora no topo de um suporte de célula de difusão de Franz (possuindo um orifício central com 15 mm  $\phi_{ext}$ ). Sobre estes discos de pele de orelha suína, colocou-se cuidadosamente um disco de filme bio-origami com o mesmo diâmetro externo (30 mm  $\phi_{ext}$ ), eliminando quaisquer bolhas de ar, e adicionaram-se 3 gotas de tampão fosfato (pH 7,4) por forma a humedecer o filme bio-origami.

Para o receptáculo de vidro inferior da célula de difusão de Franz (possuindo uma pequena barra de agitação magnética cilíndrica revestida por teflon), injetaram-se cuidadosamente 8 mL de tampão fosfato (desgaseificado, pH 7,4) até que este tocasse a superfície inferior do disco de pele de orelha suína. Tomou-se cuidado para assegurar que não ficassem retidas bolhas de ar na câmara aceitadora, e a pele foi esticada para minimizar a presença de sulcos. A intervalos de tempo pré-determinados (isto é, 0, 0,25, 0,50, 1, 3, 6, 9, e 12 h), amostras de 2 mL foram coletadas do fluído receptor por baixo do disco de pele de orelha suína, e adicionou-se 2 mL de tampão fosfato fresco (pH 7,4) para repor o volume na câmara. Cada amostra foi de seguida analisada para determinação do teor de proteína através do método de Bradford modificado, como descrito anteriormente na seção 4.2.2.6.

4.2.7.2. Construção da curva de calibração para quantificação proteica das amostras recolhidas da câmara receptora da célula de difusão de Franz pelo método de Bradford modificado

Para determinar a concentração de proteína nas amostras recolhidas da câmara receptora da célula de difusão de Franz, utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.2.2.6. e respetiva curva de calibração.

4.2.7.3. Estudo da cinética de liberação de proteína (biodisponibilidade) pelos filmes bioorigami

Foram realizados ensaios para avaliar o perfil de liberação da proteína bioativa (sericina) integrada nos filmes bio-origami em concentrações variáveis, medindo a concentração de proteína numa solução de tampão fosfato (pH 7,4) em contacto com a superfície inferior dos filmes bio-origami.

Discos dos vários filmes bio-origami (0,5 mm de espessura x 30 mm  $\phi_{ext}$ ) foram recortados, contendo 0,0325 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,1108 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,2685 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,3940 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 1,6180 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), e 2,565 mg<sub>proteína</sub> (bio-origami com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), e as suas superfícies inferiores foram colocadas em contato com 8 mL de tampão fosfato (pH 7,4) à temperatura ambiente (25±0,1) °C. A intervalos de tempo pré-determinados, aliquotas do tampão fosfato (pH 7,4) em contacto com os filmes bio-origami foram recolhidas e analisadas quanto ao teor de proteína pelo método de Bradford modificado, como descrito em detalhe na seção 4.2.2.6. Os ensaios foram terminados quando a concentração de proteína atingiu um patamar, tendendo assintoticamente para um limite superior.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou a extração de sericina a partir de casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*) e sua estabilização estrutural e funcional em filmes do tipo bio-origami, com o objetivo final de aplicação em regeneração de pele. Neste sentido, o trabalho de pesquisa desenvolvido exigiu a realização de diversas etapas sequenciais tanto para a extração da sericina e sua caracterização físico-química e biológica, como para as etapas de otimização estatística da matriz biopolissacarídica resultando em um filme bio-origami com propriedades mecânicas adequadas para a integração de sericina e sua liberação de forma controlada. A Figura 10 apresenta resumidamente as etapas envolvidas neste trabalho de pesquisa.





Fonte: elaboração própria.

A extração de sericina realizada pelos dois métodos foi avaliada em termos de rendimento de produção de extrato. A extração utilizando o método de autoclavagem a alta temperatura seguido de precipitação por congelação/descongelação produziu um rendimento de 15% (m/m), enquanto que a extração utilizando o método de autoclavagem a alta temperatura seguido de liofilização produziu um rendimento de 18% (m/m). O teor médio de umidade de ambos os extratos de sericina (isto é, amostras A2 e A3) foi de 10,5% (m/m), um valor que é comparável ao mesmo parâmetro da amostra de sericina padrão (amostra A1), estando de acordo com resultados publicados na literatura (RANGI e JAJPURA, 2015).

Na Figura 11 pode observar-se o extrato em bruto obtido após o processo de liofilização e antes da trituração.

**Figura 11.** Aspecto dos extractos de sericina em bruto, obtidos a partir dos casulos do bicho-da-seda *(Bombyx mori)*, pelos processos de precipitação por congelação/descongelação e liofilização.



Fonte: elaboração própria.

### 5.1. Análises FTIR realizadas aos extratos de sericina

Os espectros de infravermelho da amostra A1 em pó (a), da solução aquosa da amostra A1 (b), da amostra A2 em pó (c), do sobrenadante da solução aquosa da amostra A2 (d), da solução aquosa do precipitado da amostra A2 (e), da amostra A3 em pó (f), do sobrenadante da solução aquosa da amostra A3 (g), e da solução aquosa do precipitado da amostra A3 (h) são apresentados na Figura 12.

Comparando o espectro da amostra A1 em pó (ver Figura 12a) com os espectros das amostras A2 e A3 em pó (ver Figura 12c e 12f) e os espectros de seus precipitados após centrifugação da solução aquosa de sericina (A2 e A3) (ver Figura 12e e 12h), observaramse os mesmos picos com pequenas variações em sua intensidade. Isto sugere que durante os processos de extração o aspecto químico da sericina foi preservado (SKOOG et al. 2007).

De acordo com Gupta *et al.* (2014), as moléculas de proteína podem apresentar uma absorção de energia característica entre os números de onda de 1650 cm<sup>-1</sup> a 1630 cm<sup>-1</sup> para amidas primárias, entre os números de onda de 1540 cm<sup>-1</sup> a 1520 cm<sup>-1</sup> para amidas secundárias e entre os números de onda de 1270 cm<sup>-1</sup> a 1230 cm<sup>-1</sup> para amidas terciárias.

A partir da inspeção dos espectros de transmissão exibidos na Figura 12, podem observar-se picos dentro da faixa de números de onda das amidas primárias em aproximadamente 1600 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento do grupo carbonilo (C=O), amidas secundárias em aproximadamente 1540 cm<sup>-1</sup> e amidas terciárias na região de 1230 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento da ligação C-N. Além disso, as posições desses picos confirmam a proteína, como 1650 cm<sup>-1</sup> (*random coil*) e 1630 cm<sup>-1</sup> (folha beta), para amida primária, 1540 cm<sup>-1</sup> (*random coil*) e 1520 cm<sup>-1</sup> (folha beta) para amida secundária, e 1270 cm<sup>-1</sup> (folha beta) e 1230 cm<sup>-1</sup> (random coil) para amida terciária (Gupta *et al.*, 2014). A amostra A1 (ver Figura 12a) e as amostras A2 e A3 em pó (ver Figura 12c e 12f) produziram espectros de infravermelho muito similares e encontram-se de acordo com o descrito por Gupta *et al.* (2014).

Figura 12. Espectros FTIR das amostras de sericina. Amostra A1 em pó (a), solução da amostra A1
(b), amostra A2 em pó (c), sobrenadante aquoso da amostra A2 em pó (d), pellet aquoso da amostra A2 em pó (e), amostra A3 em pó (f), sobrenadante aquoso da amostra A3 em pó (g) e pellet aquoso da amostra A3 em pó (h).



Fonte: elaboração própria.

Para verificar se os extratos de sericina (amostras A2 e A3) produziram soluções semelhantes à da sericina padrão (amostra de A1), produziram-se soluções aquosas que foram submetidas a centrifugação de modo a remover os sólidos em suspensão. Os resultados obtidos das análises de FTIR, realizadas com os sobrenadantes (ver Figura 12b, 12d e 12g) foram muito semelhantes uns aos outros, apresentando dois picos importantes, um entre 3284 cm<sup>-1</sup> e 3309 cm<sup>-1</sup>, correspondente a grupos OH da água, e outro a 1639 cm<sup>-1</sup>, correspondente a um estiramento do grupo C=O de amidas primárias, resultante do forte caráter hidrófilo das amidas primárias.

Em relação aos precipitados das soluções das amostras A2 e A3, após centrifugação (ver Figura 12e e 12h), os espectros FTIR revelaram picos exatamente iguais aos picos dos pós dos extratos de sericina. Os picos exibidos pelas amostras A2 e A3, ainda que com menor intensidade, foram exatamente iguais aos picos produzidos pela amostra A1, confirmando assim a identidade da sericina extraída por ambos os processos de extração testados. As vibrações de estiramento observadas na região do número de onda entre 3272 cm<sup>-1</sup> e 3309 cm<sup>-1</sup> (REIS et al. 2006), representando os grandes picos observados, são provavelmente originários dos grupos hidroxila das moléculas de água. Os picos característicos indicativos de proteína situam-se entre 1390 cm<sup>-1</sup> a 1250 cm<sup>-1</sup> para ligações C-N, entre 1640 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup> para agrupamentos N-H, e entre 3500 cm<sup>-1</sup> e 3300 cm<sup>-1</sup>

## 5.2. Análises XRD realizadas aos extratos de sericina

Os resultados obtidos a partir das análises de difração de raios X (XRD) realizados tanto à amostra A1 como às amostras A2 e A3, podem ser encontrados na Figura 13b sob a forma de difratogramas normalizados, permitindo observar um comportamento amorfo predominante sem picos de cristalinidade bem definidos.



Fonte: elaboração própria.

A normalização da intensidade em todos os difratogramas foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor de intensidade máxima em cada difratograma (ver Figura 13a), permitindo assim uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X das três amostras de sericina em pó.

Os difratogramas da amostra A1 e das amostras A2 e A3 exibiram uma ampla faixa ruidosa, com picos mais bem definidos na região de  $18,00^{\circ} \le 2\theta \le 26,00^{\circ}$ . Os padrões de difratograma de raios-X exibiram picos característicos de cristalidade a  $2\theta \cong 19^{\circ}$  (maior, superior),  $2\theta \cong 22^{\circ}$  (menos definidos e mais rasos) e uma ampla gama de sinais de baixa
intensidade, indicando a dominância de material amorfo nos pós de sericina (YOUNG, 2012). Quando comparamos os difratogramas das amostras A2 e A3, aquele correspondendo à amostra A2 (extração por congelação/descongelação) assemelha-se mais ao da sericina padrão (amostra A1, ver Figuras 13a e 13b, curvas púrpura e laranja).

O processo de liofilização envolve congelar a matriz de formulação líquida a uma temperatura à qual ocorre nucleação de gelo e a solução congela. Durante o processo de congelação, a proteína em solução é exposta ao estresse das mudanças de temperatura bem como a mudanças na concentração induzida por crioconcentração. Muito provavelmente, isto contribuiu para a semelhança nos padrões de difração de raios-X acima mencionada.

# 5.3. Análises termogravimétricas (TGA) e microcalorimétricas (DSC) realizadas aos extratos de sericina

As perdas de massa durante o aquecimento da amostra foram determinadas a partir de curvas termogravimétricas, enquanto que a temperatura da taxa máxima de alteração de massa ( $T_{max}$ ) foi determinada a partir do máximo da 1ª derivada das curvas de perda de peso (Dandurand et al., 2014).

De acordo com Dandurand et al. (2014), a tendência global das três curvas termogravimétricas corresponde ao comportamento térmico clássico de proteínas liofilizadas. O primeiro estágio, ocorrendo entre 25 °C e 200 °C (ver Figura 14a) está geralmente ligado à evaporação da água adsorvida nas moléculas de proteína e corresponde a aproximadamente 10% da massa total da amostra, o que significa que a congelação/descongelação e a liofilização são igualmente eficientes. O segundo estágio, ocorrendo entre 200 °C e 680 °C (ver Figura 14a), está associado à degradação das amostras de proteína, nomeadamente à desaminação progressiva, descarboxilação e despolimerização decorrentes da quebra de ligações (poli)peptídicas, com consequente carbonização da estrutura primária (entre cerca de 450 °C e 680 °C). A degradação da amostra A1 consiste em três etapas bem marcadas, como se pode ver pelos três máximos na curva da 1ª derivada da curva de perda de peso (ver Figura 14b), em  $T_{max1} \approx 250$  °C,  $T_{max2} \approx 320$  °C e  $T_{max3} \approx 550$  °C, em contraste com a degradação das amostras dos extratos de sericina A2 e A3 que ocorrem em uma faixa de temperatura nais estreita cor dois máximos na 1ª derivada da curva de perda de peso (ver Figura 14b) em  $T_{max1} \approx 270$  °C e

 $T_{max2} \approx 320$  °C (amostra A2) e em  $T_{max1} \approx 330$  °C e  $T_{max2} \approx 580$  °C (amostra A3). Os nossos resultados estão de acordo com resultados publicados por Dandurand et al. (2014) relativos à análise termogravimétrica de fragmentos peptídicos. A 1ª derivada da curva de perda de peso (isto é, a taxa de alteração de massa, ver Figura 14b) pode ser usada para indicar os pontos nos quais a perda de peso é mais aparente (pontos de inflexão), isto é, cerca de 250 °C, 320 °C e 550 °C para a amostra A1, cerca de 270 °C e 320 °C para a amostra A2, e cerca de 330 °C e 580 °C para a amostra A3.

Figura 14. Curvas termogravimétricas (a) e 1<sup>a</sup> derivada das curvas de perda de peso (b) das amostras A1 (linhas a azul), amostras A2 (linhas a rosa) e amostras A3 (linhas a cinza).



Fonte: elaboração própria.

Os resultados das análises de DSC realizadas às amostras A1, A2 e A3, registrados sob modo de aquecimento entre 25 °C e 250 °C podem ser encontrados na Figura 15. O pico endotérmico observado a 49,35 °C (amostra A1), 57,60 °C (Amostra A2) e 58,81 °C (amostra A3) pode ser considerado como a transição de primeira ordem geralmente observada numa vasta classe de biopolímeros hidratados. Por analogia com o trabalho de Dandurand *et al.* (2014), este evento endotérmico pode ser atribuído à evaporação de moléculas de água ligadas.





Fonte: elaboração própria.

Como já foi observado através das análises de TGA, a degradação dos resíduos proteicos começou acima dos 200 °C. No caso da amostra A1, a entalpia do evento endotérmico associado à evaporação de moléculas de água é cerca de 50 vezes mais fraca ( $\Delta$ H= 0,06967 J/g) do que o mesmo evento produzido para os extratos de sericina (ou seja,  $\Delta$ H = 3,133 J/g no caso da amostra A2 e  $\Delta$ H = 3,549 J/g no caso da amostra A3). No entanto, os rácios entre estas entalpias são da mesma ordem de grandeza.

O segundo maior evento endotérmico são os picos endotérmicos bem definidos a 134,61 °C (amostra A1, com entalpia de fusão de 1,932 J/g), 126,34 °C (amostra A2, com entalpia de fusão de 168,6 J/g) e 123,64 °C (amostra A3, com entalpia de fusão de 146,8 J/g), associados a transições ordem→desordem, que podem ser considerados como assinaturas térmicas de desnaturação proteica (irreversível).

O terceiro maior evento endotérmico são os picos endotérmicos mais rasos e menos definidos a 213,32 °C (amostra A1, com entalpia de fusão de 0,09251 J/g), 214,73 °C (amostra A2, com entalpia de fusão de 2,597 J/g) e 219,87 °C (amostra A3, com entalpia de fusão de 28,06 J/g), associados a fenômenos de degradação, que podem ser considerados como assinaturas térmicas de carbonização proteica.

Claramente, entre a transição ordem→desordem e os fenômenos de degradação, ao compararmos os extratos de sericina (amostras A2 e A3), aquele produzido por congelação/descongelação (amostra A2) exibe uma gama de perfil de fusão de  $\Delta$ T = 88,39 °C, um valor que é cerca de 1,10x inferior àquele produzido pelo extrato obtido por liofilização (amostra A3) (isto é,  $\Delta$ T = 96,23 °C). Estes resultados estão em claro acordo com os dados coletados pelas análises de XRD (ver Figura 13), permitindo concluir que a amostra A2 é, de fato, menos amorfa (ver Figura 13) do que a amostra A3, estando entre o amorfo e o cristalino.

### 5.4. Determinação do teor de proteína dos extratos de sericina

Preparou-se uma curva de calibração para proteína usando soluções de albumina sérica bovina (BSA) em água ultrapura em várias concentrações na gama de 0 a 1000 µg/mL (ver Figura 16).

A curva de calibração produzida por ajuste não linear aos dados de absorvância a 595 nm versus concentração de proteína ( $\mu$ g/mL), na gama de concentrações 0-1000  $\mu$ g/mL, encontra-se exibida como Figura 16, com o melhor ajuste não-linear sendo: Abs<sub>595nm</sub> = 1,6554 x C<sub>prot</sub> / (0,1922 + C<sub>prot</sub>) (r = 0,99529).

**Figura 16.** Curva de calibração para proteína produzida pelo método de Bradford modificado. Os dados experimentais de Abs<sub>595nm</sub> representam a média de nove determinações para cada concentração de proteína, incluíndo cada um o respectivo desvio padrão.



Fonte: elaboração própria.

Aplicando o método colorimétrico de Bradford modificado, amplamente utilizado para quantificação de proteína, a amostra A1 apresentou uma concentração mássica de proteína de 2,665% (m/m), enquanto a amostra A2 exibiu uma concentração mássica de proteína de 0,436% (m/m) e a amostra A3 exibiu uma concentração mássica de proteína de 1,255% (m/m).

Tomando em consideração que o segundo procedimento de extração utilizou autoclavagem dos casulos em suspensão aquosa antes da liofilização, era esperado um maior teor de proteína para este extrato (isto é, amostra A3), uma vez que provavelmente poderia conter alguma fibroína residual para além da sericina. O método de extração por congelação/descongelação promove a precipitação da fibroína (com maior peso molecular)

presente nos casulos e, portanto, uma menor quantidade de proteína no sobrenadante associada à sericina (com peso molecular mais baixo) também era esperada.

### 5.5. Análises electroforéticas (SDS-PAGE) realizadas aos extratos de sericina

A Figura 17 apresenta os resultados da análise eletroforética por SDS-PAGE aos sobrenadantes, obtidos após fervura de soluções das amostra A1, A2 e A3 em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e dodecilsulfato de sódio (faixa M, marcadores de peso molecular de gama alargada; faixa 1, amostra A1; faixa 2, amostra A2; faixa 3, amostra A3). Os extratos de sericina produzidos pelos diferentes métodos de extração (ver faixas 2 (A2) e 3 (A3) na Figura 17) não exibem gamas muito diferentes de pesos moleculares. O tratamento térmico das suspensões de casulo atacou as ligações peptídicas da estrutura primária da proteína, e portanto as amostras A2 e A3 apresentaram bandas mais amplas devido à mistura de peptídeos de diferentes pesos moleculares, uma observação que está de acordo com resultados publicados por Zhang et al. (2004) e Teramoto e Miyazawa (2005).

Como pode ser observado por inspeção do electroforetograma corado com Coomassie na Figura 17 (imagem superior), a sericina padrão (amostra A1 na faixa 1) exibiu uma ampla gama de pesos moleculares, desde cerca de 10 kDa até 100 kDa, sem qualquer banda isolada a sobressair, enquanto que os extratos de sericina em bruto (amostra A2 na faixa 2 e amostra A3 na faixa 3) exibiram faixas não tão amplas de pesos moleculares, na gama de 37 kDa - 200 kDa, também sem quaisquer bandas isoladas a sobressaírem, em estreita concordância com resultados publicados por Zhang *et al.* (2004).

Figura 17. Eletroforetogramas de SDS-PAGE corados por Coomassie (imagem superior) e por prata (imagem inferior), das amostras A1 (faixa 1), A2 (faixa 2), A3 (faixa 3) e marcadores de peso molecular de gama alargada (faixa M).



Fonte: elaboração própria.

Em relação ao electroforetograma corado com prata na Figura 17 (imagem inferior), uma curva de calibração realizada às proteínas na faixa de marcadores de peso molecular (faixa M) resultou na equação linear  $Log_{10}(MW,kDa) = -1,4817 \times Rf + 2,3727$  (r<sup>2</sup> = 0,93326). Uma inspeção atenta ao electroforetograma corado com prata permite a observação de duas bandas, uma aparecendo na faixa 2 (amostra A2) e uma aparecendo na faixa 3 (amostra A3). Após o cálculo da mobilidade relativa dessas duas bandas e aplicação da curva de calibração, foram obtidos os seguintes pesos moleculares: 22,15 kDa para a banda na faixa 2 e 21,17 kDa para a banda na faixa 3. Ainda que esses pesos moleculares sejam consistentes com resultados publicados por Takasu *et al.* (2002), é importante lembrar que a coloração com Coomassie permite a determinação/visualização de bandas proteicas com quantidades superiores a 70 µg de proteína, enquanto que a coloração com prata permite a determinação/visualização de bandas proteicas com quantidades de proteína tão pequenas quanto 7 µg. Assim, as duas bandas que aparecem nas faixas 2 e 3 no electroforetograma de SDS-PAGE corado com prata podem ser o resultado de duas pequenas proteínas em pequeníssimas quantidades nas amostras A2 e A3, respectivamente.

O aparecimento de um número muito elevado de bandas, ou esfregaço, numa faixa, pode ser devido ao desdobramento incompleto das proteínas durante o aquecimento com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol. Uma vez que analisamos extratos de proteínas isolados de casulos de seda, talvez tenha ocorrido alguma degradação que originou uma variedade de espécies proteicas.

De acordo com Takasu et al. (2002), a sericina extraída dos casulos de *Bombyx mori* consiste principalmente em três polipeptídeos com pesos moleculares de 400 kDa, 250 kDa e 150 kDa, conforme estimado na SDS-PAGE, correspondendo à sericina presente na parte do meio, parte anterior e parte posterior da glândula do bicho da seda. De acordo com outros pesquisadores (KUNZ et al., 2016; TAO et al., 2005; SILVA, F. 2014; CHIRILA et al. 2013; CHIRILA et al. 2016), o peso molecular da sericina varia entre 20 kDa a 400 kDa.

Em geral, os resultados obtidos nas análises por SDS-PAGE efetuadas às amostras A1 (sericina padrão), A2 e A3 (extratos em bruto), estão de acordo com o que foi descrito por vários outros pesquisadores, nomeadamente que a proteína sericina representa de fato uma família de proteínas com pesos moleculares que variam de valores bastante baixos a altos.

#### 5.6. Análises de atividade antimicrobiana realizadas aos extratos de sericina

As (potenciais) propriedades antimicrobianas da amostra A1 (octantes 3 e 4) são bastante diferentes dependendo das cepas bacterianas testadas, como aparente pelos diferentes diâmetros de halo de inibição de crescimento microbiano produzidos (ver Figura 18). A amostra A1 exibiu praticamente a mesma atividade antibacteriana contra *S. aureus*, independentemente da concentração mássica (ver Figura 18, octantes 3 e 4), mas não

exerceu nenhum efeito antibacteriano contra *P. aeruginosa* (ver Figura 18, octantes 3 e 4 ), exibindo apenas atividade antimicrobiana marginal contra *E. coli* (ver Figura 18, octantes 3 e 4).

Figura 18. Resultados obtidos pelos ensaios de atividade antimicrobiana realizados à amostra de sericina padrão (A1) e amostras de extratos de sericina em bruto (A2 e A3). Octante 1: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de coquetel antibiótico (penicilina (10000 U.I./mL) / estreptomicina (10 mg/mL)); Octante 2: disco de papel de filtro estéril mergulhado em água ultrapura estéril; Octante 3: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A1 (10 mg/mL); Octante 4: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A1 (20 mg/mL); Octante 5: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A2 (10 mg/mL); Octante 6: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A2 (20 mg/mL); Octante 7: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (10 mg/mL); Octante 8: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (20 mg/mL); Octante 8: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (20 mg/mL); Octante 8: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (20 mg/mL); Octante 8: disco de papel de filtro estéril mergulhado numa solução de amostra A3 (20 mg/mL). Os discos impregnados foram aplicados diretamente sobre a superfície do meio de cultura TSA inoculado por espalhamento de uma suspensão de *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus*

(b) ou Pseudomonas aeruginosa (c).



Fonte: elaboração própria.

Em relação aos extratos de sericina, a amostra A2 apresentou uma ligeira atividade antibacteriana contra *S. aureus* (ver Figura 18, octantes 5 e 6), mas não teve qualquer efeito contra *P. aeruginosa* (ver Figura 18, octantes 5 e 6) ou *E. coli* (ver Figura 18, octantes 5 e 6). A amostra A3 mostrou uma ligeira atividade antibacteriana positiva contra *S. aureus* (ver Figura 18, octantes 7 e 8), mas não teve qualquer efeito contra *P. aeruginosa* (ver Figura 18, octantes 7 e 8) ou *E. coli* (ver Figura 18, octantes 7 e 8). Em relação ao coquetel de antibióticos testado (octante 1), este foi mais eficaz na ordem *S. aureus > E. coli > P. aeruginosa*.

A atividade antibacteriana dos extratos de sericina poderá estar relacionada com o fato desta proteína revestir as fibras de fibroína dos casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*), conferindo integridade estrutural ao casulo ao mesmo tempo que protege a lagarta de invasões bacterianas. No entanto, a reduzida quantidade de extrato efetivamente impregnada nos discos esterilizados (2,5 mg de extrato, correspondendo a 66,6 µg de proteína (A1), 10,9 µg de proteína (A2) e 31,4 µg de proteína (A3)) poderá ter impedido a observação de uma atividade antibacteriana mais alargada.

Pode assim concluir-se que os extratos de sericina exibiram diferentes graus de atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, um agente infeccioso geralmente presente em feridas cutâneas derivadas ou não de queimaduras (CHILLER et al., 2001). Assim, os extratos de sericina exibem potencial para serem utilizados no tratamento de infecções de pele, de forma tópica, aumentando a sua concentração.

## 5.7. Avaliação do potencial de citotoxicidade dos extratos de sericina, pelo método MTT

Para os ensaios de viabilidade celular utilizando a linhagem celular (permanente) HUVEC (células endoteliais retiradas da veia umbilical humana), as amostras A1, A2 e A3 foram dispersas em meio de cultura DMEM. Como controle foi utilizado o meio DMEM simples.

Os ensaios MTT mostram viabilidade celular (média relativa de seis determinações e desvios padrão associados) encontrada após exposição a concentrações crescentes de sericina, independentemente do procedimento de extração utilizado, permitindo observar que a concentração inibitória máxima (IC50, uma medida da eficácia de uma substância na

inibição de uma função biológica ou bioquímica específica, que determina a concentração de produto necessária para matar 50% das células) não foi alcançada para todas as amostras de sericina testadas (ver linha vermelha na Figura 19). Assim, tal medida quantitativa indica o quanto de uma determinada substância é necessária para inibir um dado processo biológico pela metade.

Nas concentrações de amostra testadas nas células HUVEC, as amostras A1, A2 e A3 não apresentaram alta toxicidade, com estas células a apresentarem uma viabilidade superior a 60% para todas as concentrações de amostra testada. Embora tenha sido observada uma queda de cerca de 30% na viabilidade celular (ver Figura 19) para as concentrações menores das amostras A2 e A3, a viabilidade celular foi mantida alta para todas as amostras. As células HUVEC apresentaram maior resistência ao tratamento com a amostra A1. De fato, a amostra A1 foi aquela que matou células na menor extensão, como aparente por inspeção da Figura 19, mas também foi a que conferiu o maior nível de danos às mesmas células tanto nas análises por Cometa<sup>™</sup> como nas análises por *Allium cepa*, conforme será discutido em seguida.

**Figura 19.** Resultados dos testes de viabilidade celular (via MTT) usando linhagem celular HUVEC cultivada em meio DMEM para avaliar a citotoxicidade das amostras de sericina A1, A2 e A3 após exposição das células a diferentes concentrações mássicas de sericina durante 24 h. Os valores são média de três determinações (n=3), com desvios padrão associados inferiores a 0,1 em todos os casos.



Fonte: elaboração própria.

O tratamento com as amostras A2 e A3 não apresentou diferenças significativas em relação à manutenção da viabilidade celular, mas para a maior concentração de sericina (amostra A2) foi possível verificar uma toxicidade ligeiramente superior após tratamento das células HUVEC (ver Figura 19). Os resultados obtidos mostram claramente um ligeiro declínio da viabilidade celular para todas as concentrações de amostra, o que poderá indicar que a sericina em si não é tóxica para as células HUVEC. Para o contato da amostra A3 com as células, observou-se uma recuperação da atividade mitocondrial para a maior concentração testada, indicando uma possível recuperação celular. Apesar da concentração de micro- e macronutrientes presentes no meio DMEM, o meio DMEM por si só promoveu a manutenção da viabilidade celular (dados não mostrados), indicando assim que nenhum estresse foi induzido às células pelo meio de cultura.

# 5.8. Avaliação do potencial de indução de aberrações cromossômicas dos extratos de sericina, pelo ensaio *Allium cepa*

A análise das variações do índice mitótico (obtido como Índice mitótico = Número de células na mitose / Número total de células) e das aberrações cromossômicas (obtidas como Índice de danos = Número de danos / Número total de divisões celulares) foram realizadas para estabelecer os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos de sericina produzidos a partir de casulos de *Bombyx mori*.

Não foram observados efeitos mitodepressivos potencialmente induzidos pela sericina (ver Figura 20), independentemente do procedimento de extração e da concentração das soluções aquosas das amostras de sericina utilizadas para a imersão das raízes de *Allium cepa* formadas por germinação, com todas as amostras testadas a estimularem a divisão celular. Em comparação com a amostra negativa (água ultrapura), apenas a amostra A1 apresentou um índice de danos ligeiramente elevado, muito provavelmente devido a quaisquer conservantes adicionados para estabilizar o pó liofilizado comercial. Pelo contrário, as amostras A2 e A3 conferiram danos mínimos às células, bem abaixo daqueles produzidos pelo negativo (ver Figura 20).

**Figura 20.** Resultados do teste do *Allium cepa*. Efeito das diferentes amostras de sericina (A1, A2 e A3) no índice mitótico obtido a partir de análises citogenéticas usando células HUVEC expostas às soluções de amostra de sericina a uma concentração de 20 mg/mL e usando água ultrapura como negativo. O índice mitótico foi calculado como o número de células na mitose dividido pelo número total de células, enquanto que o índice de danos foi calculado como o número de danos dividido pelo número total de divisões celulares. \* indica danos relativos estatisticamente não-significativos e \*\* indica danos relativos estatisticamente significativos.



Fonte: elaboração própria.

A partir das análises estatísticas realizadas aos dados do índice mitótico, ao comparar as diferentes amostras de sericina (A1, A2 e A3) entre elas e mesmo quando comparadas com o negativo, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas no nível de significância de 5% (intervalo de confiança de 95%). Em relação ao índice relativo de danos, a amostra A1 apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com as demais amostras de sericina (A2 e A3) ou com o negativo, conforme identificado na Figura 20.

Além disso, a imersão de raízes de *Allium cepa* nas mesmas concentrações aquosas das amostras de sericina durante 24 h promoveu atividade mitótica para todas as amostras de sericina, com a grande maioria das células observadas nas lâminas preparadas a estarem na interfase (dados não mostrados: 87,5% das células em interfase para as células

tratadas com o negativo, 84,5% das células na interfase para as células tratadas com solução de amostra A1, 82,2% das células na interfase para as células tratadas com a solução da amostra A2, e 80,8% das células na interfase para as células tratadas com a solução da amostra A3). Assim, nenhum estresse intracelular (incluindo danos ao DNA) pode ser observado, o que de outra forma poderia ter impedido as células de entrarem na mitose (ver Figura 20).

A ação mitodepressiva pode ser consequência de uma interferência negativa das substâncias ativas em teste com proteínas específicas e enzimas que mediam a DNA polimerase (Hidalgo et al. 1989), com a síntese de DNA, com a formação de microtúbulos, com a síntese de nucleoproteínas prejudicada, e nível reduzido de ATP para fornecer energia para o alongamento do fuso, dinâmica dos microtúbulos e movimento cromossômico (MAJEWSKA et al. 2003).

Os baixos índices de dano produzidos pelas amostras de sericina A2 e A3 (ver Figura 20) estão diretamente relacionados com um baixo número de aberrações cromossômicas nos cromossomas das células da ponta radicular meristemática de *Allium cepa*, com uma baixa frequência de prometafases, pontes e fragmentos (ver Figura 21). Pelo contrário, a amostra A1 promoveu os mais elevados níveis de prometafases e fragmentos (ver Figura 21). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com resultados publicados na literatura (DRAGOEVA et al., 2012).

As células da ponta da raiz de *Allium cepa* tratadas com amostras de sericina A2 e A3 exibiram números médios mais elevados de profases, anafases e telofases, quando comparadas com as células tratadas com a amostra A1. Estas observações estão em clara concordância com o maior índice de danos promovido pela amostra A1.

O índice mitótico é um parâmetro confiável para identificar citotoxicidade e genotoxicidade, e por isso os níveis de citotoxicidade de um determinado composto podem ser determinados pelo aumento ou decréscimo do índice mitótico. Índices mitóticos inferiores aos do controle negativo podem indicar que o crescimento e desenvolvimento de células expostas foram afetados pelo composto testado.

**Figura 21.** Exemplos de fases mitóticas normais em células de *Allium cepa* (profase, metafase, anafase, telofase) e tipos de anormalidades cromossômicas (prometafases, pontes, fragmentos) encontradas em células de *Allium cepa* expostas a amostras de sericina A1, A2 e A3.



Fonte: elaboração própria.

Por outro lado, um aumento dos índices mitóticos é resultado da indução da divisão celular e pode ser caracterizado como um evento prejudicial às células, levando tanto à proliferação celular descontrolada quanto à formação de tumores (BOUMAZA et al., 2016). No entanto, os índices mitóticos observados no trabalho de pesquisa realizado e aqui descrito aumentaram no máximo 50% em relação aos do controle negativo, para as células tratadas com a amostra A2. Estes resultados indicam que ambos os extratos de sericina não possuem potencial para induzir aberrações cromossômicas significativas.

## 5.9. Avaliação do potencial de indução de danos ao DNA dos extratos de sericina, pelo ensaio Cometa<sup>™</sup>

O teste Cometa<sup>™</sup> é capaz de detectar quantitativamente o dano ao DNA (efeitos genotóxicos) causado por agentes alquilantes ou oxidantes e intercalantes. Os índices de dano ao DNA foram calculados de acordo com os tamanhos das caudas produzidas nas

células. As caudas foram pontuadas em cinco níveis (0, 1, 2, 3 e 4), onde zero e quatro representam os tamanhos mais baixos e mais altos da cauda do cometa, respectivamente, com o índice de danos ao DNA (ID) a ser calculado como

As lâminas foram analisadas usando uma revisão simples às cegas para minimizar a variabilidade. Para avaliar qualquer possível dano genético conferido às células pelas amostras A1, A2 e A3, o teste Cometa<sup>™</sup> foi realizado com a linhagem celular HUVEC, permitindo observar diferenças significativas entre o controle e a linhagem celular HUVEC que foi exposta às amostras de sericina A1 (20 mg/mL) e A3 (15 mg/mL) (ver Figura 22).

Figura 22. Índices relativos de dano ao DNA da linhagem celular HUVEC após exposição das células a diferentes concentrações mássicas de sericina durante 24 h. Médias de três ensaios com σ associado: HUVEC (controle, 1,000±0,104; Padrão (amostra A1: 10 mg, 1,374±0,085; 15 mg, 1,298±0,242; 20 mg, 1,466±0,026); Extração por congelação/descongelação (amostra A2: 10 mg, 1,289±0,228; 15 mg, 1,181±0,004; 20 mg, 1,150±0,142); extração por liofilização (amostra A3: 10 mg, 1,313±0,057; 15 mg, 1,584±0,165; 20 mg, 1,313±0,179)). As fotos inseridas representam as caudas de Cometa™ produzidas pelos diferentes tipos de células danificadas encontradas. \*, ◆ e ★ indicam índices relativos de dano ao DNA estatisticamente não-significativo, e \*\*\* e ★★ indicam índices relativos de dano ao DNA estatisticamente significativos.



Fonte: elaboração própria.

A análise estatística dos dados obtidos neste teste foi realizada utilizando o software GraphPad Prism v. 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, EUA), por aplicação do teste estatístico de Tukey com múltiplas comparações entre as amostras. Na análise estatística realizada para cada uma das amostras testadas, ao comparar cada uma das diferentes concentrações mássicas, não foram encontrados resultados estatisticamente diferentes.

Em relação à análise realizada para comparar as amostras (incluindo o controle), apenas a amostra A1 na sua concentração de 20 mg/mL e a amostra A3 na sua concentração de 15 mg/mL apresentaram diferenças estatisticamente relevantes, onde a amostra A1 na concentração mencionada exibiu um de *p*-valor ajustado de 0,0262 e a amostra A3 na concentração mencionada mostrou um *p*-valor ajustado de 0,0060, conforme identificado na Figura 22, quando essas amostras e as respectivas concentrações mássicas foram comparadas com o negativo. O resultado estranho obtido para a concentração mássica intermédia da amostra A3 pode ser atribuído a uma matriz mais solta neste extrato de sericina, liberando uma maior quantidade de proteína bioativa quando comparada com a concentração mássica mais elevada de extrato que poderia ter dificultado a liberação de sericina bioativa.

Os resultados obtidos para os índices de danos relativos (ver Figura 20) produzidos pelo teste *Allium cepa* realizado à amostra A1 (usando uma concentração de 20 mg/mL) estão em clara concordância com os resultados obtidos pelo teste Cometa<sup>™</sup> para a amostra A1 na mesma concentração, uma vez que no teste *Allium cepa* um índice relativo de danos mais elevado foi produzido quando comparado com o negativo e com as amostras A2 e A3. Foi obtida uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e a amostra A1 na concentração de 20 mg/mL, o que significa que um possível efeito genotóxico (ainda que não em grande extensão) pode ser atribuído à amostra A1. A amostra A3 a 15 mg/mL também apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle, conforme mencionado acima.

O elevado índice relativo de danos ao DNA promovido pela quantidade mássica intermediária (15 mg) da amostra A3 às células HUVEC (ver Figura 22) foi devido a uma alta contagem de células com dano do tipo 2. Não foram encontrados danos do tipo 4 para as células HUVEC tratadas com qualquer uma das amostras de sericina testadas, para todas as concentrações mássicas estudadas.

Todas as amostras (incluindo o controle) promoveram um mais elevado nível de danos do tipo 1 e do tipo 2 independentemente da concentração mássica testada. Baixos níveis de danos do tipo 3 foram produzidos pelas amostras de sericina para todas as concentrações testadas. Isto significa que as amostras de sericina testadas não possuem características que promovam grandes lesões no DNA, como aparente pelos muito baixos níveis de danos do tipo 3 encontrados. No entanto, a avaliação Cometa™ é realizada com uma exposição celular de 1h, porque é um procedimento de pré-teste sem a necessidade de quaisquer divisões celulares.

Estes resultados estão em clara concordância com a total ausência de efeitos citotóxicos observados para esta linhagem celular (ver Figura 19). Assim, a ausência de efeitos citotóxicos está de acordo com a ausência de danos extensos ao DNA, o que por sua vez está em concordância com resultados publicados por SEABRA *et al.* (2014). Estes resultados estão intimamente relacionados com a ausência de aberrações cromossômicas significativas produzidas pelas amostras de sericina A1, A2 e A3 (ver índices mitóticos na Figura 20), demonstrando uma estreita faixa de distorções cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular da linhagem HUVEC (ver Figura 21).

# 5.10. Avaliação da atividade de eliminação de radicais livres dos extratos de sericina, pelo ensaio DPPH

Os resultados obtidos para a atividade de eliminação de radicais DPPH pelo ácido ascórbico e pelas amostras de sericina A1, A2 e A3 estão apresentados Quadro 4.

**Quadro 4.** Resultados obtidos para a atividade antioxidante (%) das amostras de sericina, expressa como capacidade de eliminação de radicais livres medida através da metodologia DPPH.

Concentração (mg/mL)	Atividade (relativa) de eliminação de radicais livres [média (n=3) ± s]					
	Ácido ascórbico	Amostra A1	Amostra A2	Amostra A3		
0,5	0,9650±0,0023					
5		0,0051±0,0023				
15		0,0801±0,0020	0,0340±0,0185			
25				0,4568±0,0826		
60			0,0081±0,0196	0,4418±0,1685		

Fonte: elaboração própria.

Os extratos de sericina mostraram diferentes níveis de atividade de eliminação de radicais DPPH na faixa de concentrações 5-60 mg/mL (ver Quadro 4). A sericina extraída através da metodologia de liofilização (amostra A3) apresentou a maior atividade de eliminação de radicais DPPH em comparação com a amostra A2 e a amostra A1. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão antioxidante a uma concentração de 0,5 mg/mL, e sua atividade de eliminação de radicais livres foi de 96,5%. Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa sugerem que as amostras A2 e A3 são capazes de eliminar os radicais livres (embora em diferentes extensões) e impedir a iniciação de radicais livres estabilizando-os para impedir a sua participação em quaisquer reações deletérias. Estes resultados estão de acordo com resultados publicados por Rangi e Jajpura (2015) e Dehpour et al. (2009).

Diferentes concentrações de sericina possuíram diferentes capacidades para eliminar os radicais DPPH. Observou-se que nas concentrações 15, 25 e 60 mg/mL de extrato de sericina foram eliminados (3,40±1,85)%, (45,7±8,26)% e (44,2±16,9)% de radicais DPPH, respectivamente (ver Quadro 4). FAN et al. (2009) referem no seu trabalho que os grupos funcionais presentes nos resíduos de aminoácidos Cys, Tyr e His, que compõem a estrutura primária da sericina, reduzem e descoloram o DPPH pela sua capacidade de doação de hidrogênios. Assim, não é surpreendente concluir que a sericina do casulo do bicho da seda contém doadores de elétrons que reagem com os radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis e terminar a reação em cadeia dos radicais.

## 5.11. Análises EDXRF realizadas ao casulo de *Bombyx mori* e aos extratos de sericina

O casulo do bicho da seda (*Bombyx mori*) é uma estrutura de biomaterial projetada por insetos. Várias espécies selvagens produtoras de casulos de seda, bem como seda de aranha, possuem maior conteúdo elementar (Na, K, Cl, Mg, S, Cu, Ca, P, Zn) (TULACHAN et al., 2014). O cobre também demonstrou estar envolvido no processo de formação de seda por *Bombyx mori* (TULACHAN et al., 2014). Foi sugerido que os íons de Na, Cl e K desempenham um papel na formação da seda de aranha (Vollrath e Cavaleiro, 2001; Knight e Vollrath, 2001). Algumas das espécies selvagens produtoras de casulos de seda possuem cristais de oxalato de cálcio em suas superfícies externas (AKAI, 2001; TULACHAN et al.

2014). Os cristais de oxalato de cálcio não estão, no entanto, presentes em grande extensão na superfície do casulo de *Bombyx mori* (TULACHAN et al. 2014).

A Figura 23 mostra o espectro típico de fluorescência de raios-X de um casulo de *Bombyx mori* (a) e os espectros de fluorescência de raios-X das amostras A1, A2 e A3 (b). Os principais elementos químicos encontrados estão identificados na Figura 23.

Figura 23. Espectros de EDXRF de casulo de Bombyx Mori (a) e amostras de A1 (linhas pretas), A2 (linhas vermelhas) e A3 (linhas azuis) (b). O eixo YY representa o número de contagens de raios-X característicos que atingiram o detector, enquanto o eixo XX representa a energia dos raios-X característicos.



Fonte: elaboração própria.

Os espectros medidos foram analisados com o pacote de software XRS-FP<sup>™</sup> fornecido pela Amptek Inc., tendo em conta os picos de escape e os picos de soma, e representando o *background* com uma função polinomial. No casulo simples (ver Figura 23a), encontrou-se uma grande quantidade de Ca e K e quantidades vestigiais de S, CI, Cr, Fe, Ni e Cu. No espectro de fluorescência da amostra A1, os principais elementos químicos encontrados foram o S e o CI, e uma quantidade mínima de Ca (ver Figura 23b). Quanto aos extratos de sericina (amostras A2 e A3), pequenas quantidades de S e Fe foram encontradas nas mesmas proporções.

O extrato de sericina produzido por liofilização (amostra A3) mostrou, no entanto, maiores quantidades de Ca e K. Ca foi encontrado nos casulos de *Bombyx mori* em quantidades relativamente elevadas e também em quantidades maiores nas amostras A2 e A3, muito provavelmente devido à concentração durante o procedimento de extração. Uma vez que os cristais de oxalato de cálcio geralmente não estão presentes na superfície do casulo de *Bombyx mori* (TULACHAN et al,. 2014), eles não foram observados nas análises de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM). A presença de Cu nos casulos de *Bombyx mori* está em concordância com os resultados publicados por Tulachan et al. (2014), Wilaiwan et al. (2010), Zong et al. (2004) e Zhou et al. (2003).

### 5.12. Análises XRT realizadas ao casulo de Bombyx mori

Um casulo é um compósito de polímero (proteína) natural, que exibe uma microestrutura porosa hierárquica muito especial que permite que o casulo possua excelentes propriedades mecânicas (FEI et al., 2013). O casulo do bicho da seda (*Bombyx mori*) "respira" naturalmente, devido às suas capacidades superiores de transferência de calor e umidade, bem como de transporte de oxigênio (FEI et al., 2013). A partir das análises tomográficas via transmissão de raios-X realizadas a uma seção da parede do casulo de *Bombyx mori* (ver Figura 24), pode observar-se uma superfície homogênea.

**Figura 24.** Imagens obtidas por análise tomográfica via transmissão de raios-X (XRT) do casulo de *Bombyx mori*, sendo **(a)** uma imagem de perfil transversal da parede do casulo, e **(b)** uma imagem de perfil inclinado da superfície do casulo. As fatias de imagem tridimensionais foram coletadas usando uma tensão de operação ajustada para 29 kV e corrente elétrica com 415 μA.



Fonte: elaboração própria.

Devido a absorver mais radiação, decorrente da sua maior densidade atômica, as fibras (em verde, na Figura 24) estão em maior evidência, enquanto que os espaços vazios aparecem em preto. Uma análise de porosidade comparativa da parede do casulo de *Bombyx mori* pode ser encontrada no Quadro 5.

Quadro 5	Resultados	obtidos nas	análises	tomográficas	via tra	ansmissão	de raios-X	realizadas	ao
			casulo	de Bombyx n	nori.				

Parâmetro	Casulo de Bombyx mori			
Número de camadas	201			
Tamanho de pixel (µm)	6,918			
Volume de interesse total (VOI, volume of interest), TV (mm <sup>3</sup> )	2,627			
Volume de objeto, Obj.V (mm <sup>3</sup> )	1,264			
Percentagem de volume de objeto, Obj.V/TV (%)	48,112			
Superfície VOI total, TS (mm <sup>2</sup> )	25,370			
Superfície do objeto, Obj.S (mm <sup>2</sup> )	138,688			
Superfície de intersecção, i.S (mm <sup>2</sup> )	8,840			
Superfície do objeto / rácio de volume, Obj.S/Obj.V (mm <sup>-1</sup> )	109,715			
Densidade superficial do objeto, Obj.S/TV (mm <sup>-1</sup> )	52,787			
Grau de anisotropia, DA	4,768 (0,790)			
Eigenvalue 1	-0,187			
Eigenvalue 2	0,276			
Eigenvalue 3	0,892			
Número de poros fechados, Po.N(cl)	1993			
Volume de poros fechados, Po.V(cl) (mm <sup>3</sup> )	0,00155			
Superfície de poros fechados, Po.S(cl) (mm <sup>2</sup> )	0,824			
Porosidade fechada (%), Po(cl) (%)	0,123			
Volume de espaço de poros abertos, Po.V(op) (mm <sup>3</sup> )	1,362			
Porosidade aberta (%), Po(op) (%)	51,829			
Volume total de espaço de poros, Po.V(tot) (mm <sup>3</sup> )	1,363			
Porosidade total (%), Po(tot) (%)	51,888			
Número de Euler, Eu.N	-22606			
Conectividade, Conn	28196			
Densidade de conectividade, Conn.Dn (mm <sup>-3</sup> )	10731,817			

Fonte: elaboração própria.

A anisotropia pode ser definida como uma diferença, quando medida ao longo de diferentes eixos, nas propriedades físicas ou mecânicas de um material (por exemplo, absorvância). O grau de anisotropia, calculado como Grau de anisotropia = (1 - [Eigenvalue<sub>min</sub> / Eigenvalue<sub>max</sub>]), é 0 para isotropia total e 1 para anisotropia total. Assim, como pode ser observado por inspecção dos dados no Quadro 5, o grau de anisotropia para

a parede do casulo é de 0,790, um valor mais próximo da anisotropia do que da isotropia na escala acima mencionada.

Sendo o casulo do bicho da seda um biomaterial projetado por inseto com uma estrutura tecida, este resultado é facilmente compreendido à luz das imagens FESEM exibidas na Figura 25a. Ao analisar a estrutura da parede do casulo, verifica-se que o mesmo possui um baixo volume de poros fechados (1,55×10<sup>-3</sup> mm<sup>3</sup>) correspondendo a uma porosidade aberta de 51,83% e uma porosidade total de 51,89% (ver Quadro 5). Estes resultados estão em clara concordância com a elevada porosidade observada em casulos de seda de *Bombyx mori* (TULACHAN et al., 2014; FEI et al., 2013; CHEN et al., 2013).

### 5.13. Análises FESEM realizadas ao casulo de Bombyx mori

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície externa (lisa) da parede do casulo do bicho da seda *(Bombyx mori)* permitem observar uma matriz fibrosa tecida (ver Figura 25).

Não foram encontrados cristais de oxalato de cálcio na superfície do casulo de *Bombyx mori*. Estes resultados estão de acordo com os resultados publicados por Tulachan et al. (2014). Verificou-se que os fios de fibras de seda do casulo de *Bombyx mori* foram um pouco mais espessos (≈ 30 microns, ver Fig. 25b) do que aqueles analisados por Tulachan et al. (2014) para o mesmo tipo de origem do casulo do bicho da seda, como pode ser observado por inspeção das fotomicrografias FESEM exibidas na Figura 25, com poros bastante visíveis na bio-estrutura do casulo de *Bombyx mori*, um resultado que também está de acordo com aqueles publicados por Tulachan et al. (2014). **Figura 25.** Fotomicrografias FESEM do casulo de *Bombyx mori* em várias ampliações (a: x100; b: x2000; c: x600; d: x2000). As setas vermelhas inseridas apontam para a fibroína, enquanto as setas verdes inseridas apontam para a sericina (atuando como a cola que mantém as fibras de fibroína no lugar).



Fonte: elaboração própria.

Adicionalmente, uma inspeção detalhada das fotomicrografias na Figura 25 permite observar claramente as fibras de fibroína (ver setas vermelhas inseridas na Figura 25b-d) rodeadas pela cola que as mantém no lugar, isto é, a proteína sericina (ver setas verdes inseridas nas fotomicrografias da Figura 25b-d).

#### 5.14. Otimização estatística da matriz biopolissacarídica do filme bio-origami

O planejamento fatorial experimental seguido para definir a melhor composição biopolissacarídica e propriedades mecânicas associadas para os filmes bio-origami (ver Quadro 1) originou como melhor composição para os filmes bio-origami aquela do nível (+1)(0) [(goma carragenana)(goma xantana)] (ver Quadro 2). Partindo desta composição (ótima), conduzindo a filmes bio-origami com os maiores valores de resiliência, resistência à perfuração e resistência à tração, sete filmes bio-origami foram produzidos (ver Quadro 3) integrando o mesmo nível fatorial de (goma carragenana)(goma xantana) (isto é, (+1)(0)) e quantidades variáveis de sericina (isto é, 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>).

Num artigo de revisão da autoria de Baker et al. (2012), aqueles pesquisadores afirmam que é possível produzir hidrogéis macios com cerca de 10% (m/m) PVA e hidrogéis rígidos com cerca de 50% a 60% (m/m) PVA. O principal objetivo do trabalho de pesquisa realizado e aqui descrito consistiu em produzir um filme bio-origami biopolissacarídico dotado de maleabilidade, ainda que com uma certa resistência por forma a poder ser utilizado em aplicações tópicas. O teor de umidade médio dos vários filmes bio-origami produzidos variou entre (56,81±0,44)% (m/m) e (32,28±1,47)% (m/m) para os filmes bio-origami integrando 0 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, respetivamente.

### 5.15. Caracterização dos filmes bio-origami produzidos

#### 5.15.1. Análises FTIR

Um gráfico de intensidade versus frequência de radiação, conhecido como espectro de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais num determinado material, fazendo da espectrofotometria FTIR uma técnica vastamente utilizada na análise da estrutura de sistemas (bio)poliméricos. A espectrofotometria FTIR pode permitir clarificar possíveis interações entre a proteína incorporada e a matriz biopolimérica do filme bio-origami, através da análise dos grupos funcionais presentes nos diferentes componentes envolvidos no processo.

Os espectros FTIR de (a) extrato de sericina em bruto liofilizado, (b) filme bio-origami simples, (c) filme bio-origami carregado com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (d) filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (e) filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (f) filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (g) filme bio-origami carregado com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e (h) filme bio-origami carregado com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, podem ser encontrados na Figura 26.

Comparando o espectro do extrato liofilizado de sericina (ver Figura 26a) com o espectro do filme bio-origami simples (ver Figura 26b) e os espectros dos filmes bio-origami carregados com sericina (ver Figuras 26c-h), os mesmos picos característicos podem ser observados com apenas pequenas variações na intensidade dos picos, como por exemplo nos números de onda 1398 cm<sup>-1</sup>, 1423 cm<sup>-1</sup>, e 1409 cm<sup>-1</sup>. Isto sugere claramente que o aspecto químico da sericina foi preservado durante a sua integração nos filmes bio-origami. De acordo com Gupta et al. (2014), as moléculas proteicas podem apresentar absorção característica de energia entre os números de onda 1540 cm<sup>-1</sup> a 1520 cm<sup>-1</sup> para amidas secundárias e entre os números de onda 1270 cm<sup>-1</sup> a 1230 cm<sup>-1</sup> para amidas terciárias.

Da análise do espectro de transmitância incluído na Figura 26a, podemos observar picos dentro da gama de números de onda representando provavelmente amidas primárias em aproximadamente 1620 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento do grupo carbonilo (C=O), amidas secundárias em aproximadamente 1519 cm<sup>-1</sup> e amidas terciárias na região de 1238 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento da ligação C-N. Adicionalmente, as posições destes picos confirmam a proteína, tais como 1650 cm<sup>-1</sup> (*random coil*) e 1613 cm<sup>-1</sup> (folha beta-pregueada), para amida primária, 1540 cm<sup>-1</sup> (*random coil*) e 1520 cm<sup>-1</sup> (folha beta-pregueada) para amida secundária, e 1270 cm<sup>-1</sup> (folha beta-pregueada) e 1230 cm<sup>-1</sup> (*random coil*) para a amida terciária (GUPTA et al., 2014).

Os filmes bio-origami (ver Figuras 26b-h) produziram espectros de infravermelho muito similares, independentemente da presença de proteína no filme, com um pico grande produzido entre 3274 cm<sup>-1</sup> e 3308 cm<sup>-1</sup>, correspondendo a grupos OH nas moléculas de água, e outro pico grande em 1648 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26b), 1650 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26c), 1650 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26d), 1650 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26e), 1655 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26f), 1655 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26g), e 1639 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 26h) correspondendo a um estiramento do grupo C=O de amidas primárias, devido muito provavelmente ao forte carácter hidrofílico das amidas primárias.

Figura 26. Espectros FTIR de (a) extracto liofilizado de sericina, (b) filme bio-origami simples, (c) filme bio-origami com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (d) filme bioorigami com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (e) filme bio-origami com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (f) filme bio-origami com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, (g) filme bio-origami com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e (h) filme bio-origami com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>.



Fonte: elaboração própria.

As vibrações de estiramento observadas na região de números de onda entre 3274 cm<sup>-1</sup> - 3308 cm<sup>-1</sup> (Reis et al., 2006), responsáveis pelos grandes picos observados são muito provavelmente derivadas de grupos hidroxilo de moléculas de água. Picos característicos indicativos de proteína situam-se entre 1390 cm<sup>-1</sup> a 1250 cm<sup>-1</sup> para ligações C-N, entre 1640 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup> para agrupamentos N-H, e entre 3500 cm<sup>-1</sup> e 3300 cm<sup>-1</sup> correspondendo a grupos OH de moléculas de água (MEHTA et al., 2013). Os espectros de infravermelho exibidos na Figura 26 sugerem claramente que o aspecto químico da proteína foi preservado durante a produção dos filmes bio-origami, permitindo concluir que a proteína sericina não se envolveu em quaisquer interações químicas com os componentes do filme bio-origami, sendo apenas carreada pelo filme, o que de contrário poderia ter reduzido a sua atividade antioxidante.

#### 5.15.2. Análises térmicas por TG e DSC

Os decrementos de massa durante o aquecimento dos filmes bio-origami foram avaliados a partir de curvas termogravimétricas, enquanto a temperatura da taxa máxima de variação de massa (T<sub>max</sub>) foi determinada a partir do máximo da 1ª derivada das curvas de perda de massa. De acordo com Dandurand et al. (2014), a tendência global da curva termogravimétrica representada em púrpura na Figura 27a (isto é, sericina liofilizada) corresponde ao comportamento térmico clássico de uma proteína liofilizada. O primeiro estágio, ocorrendo entre 25 °C e 100 °C (ver Figura 27a), está geralmente ligado à evaporação de água adsorvida às moléculas de proteína, e corresponde a cerca de 10% da massa total de amostra de sericina. O segundo estágio, ocorrendo entre 200 °C e 400 °C (ver Figura 27a) está associado à degradação das moléculas de proteína na amostra de extrato de sericina, nomeadamente na desaminação progressiva, descarboxilação e despolimerização resultantes da quebra de ligações (poli)peptídicas, e consequente carbonização da estrutura primária (entre cerca de 500 °C a 600 °C).

Figura 27. Curvas termogravimétricas (a) e 1ª derivada das curvas de perda de massa (b), do extrato liofilizado de sericina (curva púrpura), filme bio-origami simples (curva cinzento), filme bio-origami contendo 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva azul claro), filme bio-origami contendo 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva laranja), filme bio-origami contendo 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva marrom), filme bio-origami contendo 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva vermelha), filme bio-origami contendo 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva verde), e filme bio-origami contendo 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa claro).



Fonte: elaboração própria.

A degradação da sericina consiste em três etapas bem marcadas como mostrado pelos três máximos na curva da 1a derivada da curva de perda de massa (ver Figura 27b) em  $T_{max1} \approx 260$  °C,  $T_{max2} \approx 320$  °C e  $T_{max3} \approx 570$  °C. Estes resultados estão de acordo com resultados publicados por Rocha et al. (2017), relativamente à análise termogravimétrica de

extratos impuros de sericina obtidos a partir de casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*), e por Dandurand et al. (2014), relativamente à análise termogravimétrica de fragmentos peptídicos.

A 1ª derivada da curva de perda de massa (isto é, a taxa de variação de massa, ver Figura 27b) pode ser utilizada para predizer os pontos nos quais a perda de massa é mais aparente (pontos de inflexão), isto é, aproximadamente 60 °C, 260 °C, 320 °C e 570 °C para o extrato liofilizado de sericina, aproximadamente 60 °C, 180 °C, 270 °C e 430 °C para o filme bio-origami simples, aproximadamente 60 °C, 170 °C, 270 °C e 430 °C para o filme bio-origami carregado com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, aproximadamente 60 °C, 175 °C, 265 °C e 430 °C para o filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, aproximadamente 50 °C, 175 °C, 280 °C e 430 °C para o filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, aproximadamente 70 °C, 190 °C, 290 °C e 430 °C para o filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, aproximadamente 70 °C, 180 °C, 290 °C e 430 °C para o filme bioorigami carregado com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e aproximadamente 60 °C, 170 °C, 290 °C e 430 °C para o filme bio-origami carregado com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>.

Em geral, as análises térmicas são ferramentas úteis no desenvolvimento de formulações uma vez que permitem avaliar a compatibilidade entre os componentes da formulação e a estabilidade e decomposição térmica de moléculas bioativas. Os resultados obtidos a partir da análise térmica estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto (bio)farmacêutico, permitindo inferir sobre aspectos da eficácia terapêutica do produto ou sobre a estabilidade do produto ao longo do período de vida de prateleira (ou validade). A análise termogravimétrica (TGA) acompanha a variação na massa da amostra em função de um aumento linear de temperatura durante um intervalo de tempo prédeterminado, permitindo determinar o perfil térmico dos filmes bio-origami preparados.

Como pode ser observado por inspeção das curvas na Figura 27b, o comportamento térmico é bastante similar para todos os filmes bio-origami, com uma pequena perda de massa em torno de 60 °C a indicar a perda de água. Entre 160 °C e 190 °C podemos verificar uma maior perda de massa, indicando uma perda maciça de água. Entre 260 °C e 300 °C, uma perda significativa de massa indica a degradação dos componentes biopolissacarídicos nos filmes bio-origami.

Os resultados das análises térmicas por DSC realizadas a amostras do extrato liofilizado de sericina e dos filmes bio-origami sem e com sericina, registados sob modo de aquecimento entre 25 °C e 250 °C, encontram-se exibidos na Figura 28. O pico endotérmico observado a 58,81 °C (amostra de extrato liofilizado de sericina, com entalpia de fusão

associada de 3,549 J/g) pode ser considerado como a transição de primeira ordem normalmente associada a uma vasta classe de biopolímeros hidratados tais como as proteínas.

Por analogia com o trabalho de Dandurand et al. (2014), este evento endotérmico é atribuível à evaporação de moléculas de água ligadas. Como já observado anteriormente por TGA, a degradação das moléculas de proteína começou acima de 200 °C. No caso da amostra de extrato liofilizado de sericina, o segundo maior evento endotérmico é o pico endotérmico bem definido a 123,64 °C (com entalpia de fusão associada de 146,8 J/g), associado a transições ordem→desordem, as quais podem ser consideradas como assinaturas térmicas de desnaturação proteica (irreversível) (Rocha et al., 2017). O terceiro principal evento endotérmico é o pico endotérmico raso a 219,87 °C (com entalpia de fusão associada de 28,06 J/g), associado a fenômenos de degradação, o qual pode ser considerado como assinatura térmica da carbonização proteica.

A técnica de análise de DSC mede a entalpia das amostras, e pode indicar a temperatura de transição vítrea e eventos endotérmicos e/ou exotérmicos nas amostras sob escrutínio. O filme bio-origami simples (sem sericina incorporada) produzido de acordo com o planejamento fatorial experimental, bem como os filmes bio-origami carregados com quantidades variáveis de sericina, possuíam na sua composição 1,25% (m/m) PVA com um grau de hidrólise de 98%, 2,50% (m/m) glicerol, e 0,1% (m/m) metilparabeno.

Os termogramas obtidos (ver Figura 28) apresentaram um evento endotérmico, a 122,76 °C (filme bio-origami sem sericina), a 114,13 °C (filme bio-origami carregado com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), a 132,72 °C (filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), a 131,83 °C (filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), a 132,04 °C (filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), a 127,46 °C (filme bio-origami carregado com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), e a 103,81 °C (filme bio-origami carregado com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>).

Uma vez que os vários filmes bio-origami apenas diferiram na quantidade integrada de extrato de sericina e água adicionada, os resultados obtidos pelas análises de DSC indicaram que as diferenças no comportamento térmico dos vários filmes bio-origami surgiram principalmente da proteína adicionada, e também que a incorporação de sericina em níveis muito elevados compromete a estabilidade do filme bio-origami para o uso intencionado.





Fonte: elaboração própria.

A presença de proteína nos filmes bio-origami promoveu uma deslocação suave do evento endotérmico próximo a 122,76 °C no filme bio-origami simples, de -8,63 °C no filme bio-origami carregado com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de +9,96 °C no filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de +9,07 °C no filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de +9,28 °C no filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de +4,70 °C no filme bio-origami carregado com 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>. Quantidades crescentes de sericina nos filmes bio-origami conduziram também a decréscimos nas variações de entalpias de fusão (isto é,  $\Delta\Delta$ H), de -51,8 J/g no filme bio-origami carregado com 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -32,1 J/g no filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -96,5 J/g no filme bio-origami carregado com 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,5 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, de -41,9 J/g no filme bio-origami carregado com 3 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, o que está em clara concordância com as quantidades crescentes de sericina integrada e consequente decréscimo das quantidades de água nos filmes bio-origami.

Infelizmente, para quantidades muito elevadas de sericina no filme bioorigami, a estabilidade térmica do filme diminui (o que pode ser concluído pela elevada diminuição no pico de temperatura, associada à elevada diminuição no valor da entalpia de fusão). A adição (impregnação) de extrato impuro de sericina promoveu um ligeiro aumento no pico de temperatura de fusão a baixos níveis de adição (ver Figura 28), e um elevado decréscimo no pico de temperatura de fusão a elevados níveis de adição (ver Figura 28), implicando uma diminuída estabilidade do filme bio-origami para cargas elevadas de sericina.

O decréscimo na temperatura de fusão verificado a elevadas cargas dos filmes bioorigami com extrato liofilizado de sericina poderá ser devido à amorfização do sistema. Os resultados obtidos a partir das análises térmicas de DSC realizadas tanto ao filme bioorigami sem sericina como aos filmes bio-origami com sericina (ver Figura 28) estão em íntima concordância com aqueles resultados obtidos a partir de estudos de difração de raios-X (ver Figura 29) uma vez que, como pode ser observado por inspecção dos termogramas de DSC, a impregnação dos filmes bio-origami com extrato liofilizado de sericina conduziu a uma diminuída cristalinidade. Notavelmente, os eventos térmicos apresentados na Figura 28 e os difratogramas de raios-X apresentados na Figura 29 denotam uma clara transição de um estado menos amorfo do filme bio-origami simples (ver Figura 29, curva cinzenta) para um estado mais amorfo (ver Figura 29, filme bio-origami carregado com a mais elevada quantidade de extrato liofilizado de sericina, curva rosa claro). Os resultados obtidos a partir das análises de difração de raios-X (XRD) realizadas tanto aos filmes bio-origami sem e com sericina como aos seus constituintes isolados, encontram-se exibidos na Figura 29 na forma de difractogramas normalizados, e permitem observar um comportamento amorfo generalizado com dois pequenos picos de cristalinidade para os filmes bio-origami.

**Figura 29.** Difractogramas de raios-X com intensidade normalizada (XRD) do extrato liofilizado de sericina (curva púrpura), metilparabeno (curva amarela), glicerol (curva rosa), PVA (curva vermelha), goma xantana (curva marrom escuro), goma carragenana (curva azul escuro), filme bio-origami simples (curva cinzenta), filme bio-origami contendo 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva azul claro), filme bio-origami contendo 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva laranja), filme bio-origami contendo 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva marrom claro), filme bio-origami contendo 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa escuro), filme bio-origami contendo 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva verde), e filme bio-origami contendo 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (curva rosa claro). Os difractogramas de raios-X foram obtidos usando raios-X filtrados por alvo de Cu.



Fonte: elaboração própria.

A normalização da intensidade em todos os difratogramas foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor de intensidade máxima em cada difratograma (ver Figura 29), permitindo assim uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X de todas as amostras analisadas. Os difratogramas dos filmes bio-origami sem e com sericina integrada partilham uma característica comum, exibindo uma banda larga e com ruído (menos definida e rasa) entre  $16,00 \le 2\theta \le 29,00$  com picos (de cristalinidade) mais bem definidos nas regiões de  $6,00 \le 2\theta \le 7,00$  e  $12,00 \le 2\theta \le 14,00$ , indicando a dominância de material amorfo nos filmes bio-origami (Young, 2012), claramente contribuída pela sericina, goma xantana e goma carragenana. Adicionalmente, é possível observar um ponto de inflexão no difratograma do bio-origami simples (ver curva cinza na Figura 29), em torno de  $2\theta = 28^{\circ}$ , que desaparece nos outros filmes bio-origami em virtude da integração dos extratos de sericina nos mesmos.

Os dois pequenos picos de cristalinidade nos filmes bio-origami são muito provavelmente originários do metilparabeno e do PVA utilizados na formulação. Quando comparamos os difractogramas do filme bio-origami sem sericina (ver a curva cinzenta na Figura 29) e do filme bio-origami carregado com a mais elevada quantidade de sericina (ver a curva rosa claro na Figura 29), podemos notar um alargamento e achatamento da banda larga ruidosa entre 16,00  $\leq 2\theta \leq 29,00$ , devido a uma amorfização em maior extensão do sistema causada pela maior carga de sericina. Estes resultados corroboram os resultados obtidos via FESEM, que indicam a formação de um filme essencialmente amorfo.

A vantagem decisiva dos métodos de análise por difração de raios-X em relação a outras técnicas analíticas baseia-se na singularidade dos padrões de difração de substâncias cristalinas, na capacidade de distinguir entre elementos e seus óxidos e na possibilidade de identificar compostos químicos, formas polimórficas e cristais mistos. Os picos com alta intensidade e largura de base estreita estão relacionados a materiais cristalinos, enquanto os picos de base ampla estão relacionados a materiais amorfos.

5.15.4. Atividade de eliminação de radicais livres dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina

Os resultados obtidos para a atividade de eliminação do radical DPPH pelo ácido ascórbico e por todos os filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina, estão apresentados no Quadro 6.
	Atividade (relativa) de eliminação de radicais			
Carga de sericina no filme bio-origami	livr	livres (%)		
(mg <sub>sericina</sub> /mL <sub>filme</sub> )	[média (n=3) ± σ]			
	Ácido ascórbico	Filme bio-origami		
0	96,50±0,23	0,00±0,00		
1		0,00±0,00		
2		0,00±0,00		
5		0,00±0,00		
10		0,00±0,00		
20		19,50±0,00		
50		24,19±4,50		

**Quadro 6.** Atividade antioxidante (%) dos vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina, como capacidade de eliminação de radicais livres medida pelo método do DPPH.

Fonte: elaboração própria.

Para níveis muito baixos de sericina nos filmes bio-origami nenhuma atividade antioxidante pode ser detectada e, para aqueles com os níveis mais elevados de sericina, diferentes níveis de eliminação do radical DPPH puderam ser observados (ver Quadro 6). O filme bioorigami que integra a maior carga de sericina exibiu a mais intensa atividade de eliminação de radicais DPPH.

O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante em uma concentração de 0,5 mg/mL e o seu poder de eliminação de radicais livres foi de 96,5%. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que ambos os filmes bio-origami que integram 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> são capazes de eliminar os radicais livres (ainda que em diferentes extensões) e impedir a sua iniciação, estabilizando-os e impedindo-os de participarem em quaisquer reações deletérias. Estes resultados estão em clara concordância com resultados previamente publicados por Rocha et al. (2017) e Rangi e Jajpura (2015).

Diferentes concentrações de sericina nos filmes bio-origami permitiram diferentes capacidades para extinguir os radicais DPPH. Observou-se que os filmes bio-origami com 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> eliminaram (19,50±0,00)% e (24,19±4,50)% dos radicais DPPH, respetivamente (ver Quadro 6). Fan et al. (2009) referem no seu trabalho que os grupos funcionais presentes nos resíduos dos aminoácidos Cys, Tyr e His que compõem a estrutura primária da sericina reduzem e descoloram o DPPH através da sua capacidade de doação de hidrogênio. Assim, não é surpreendente concluir que a sericina

que foi liberada dos filmes bio-origami contém doadores de elétrons que reagem com os radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis e menos reativos.

# 5.15.5. Resistência mecânica dos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina

A avaliação das propriedades mecânicas dos filmes bio-origami produzidos sem sericina, seguindo o planejamento fatorial experimental detalhado no Quadro 1 e a composição detalhada no Quadro 2, abrangeu resistência à perfuração, resistência à tração e resiliência (ver Figura 30).

De acordo com os gráficos exibidos na Figura 30a, os melhores resultados produzidos em termos de resistência à perfuração, resistência à tração e resiliência foram obtidos para os níveis (+1) de goma carragenana e (0) de goma xantana.

A capacidade do filme bio-origami de voltar a adquirir a sua forma após a deformação causada por esforço foi um atributo especialmente importante, uma vez que a sua elasticidade (isto é, a sua resiliência) é uma característica importante para aplicações dérmicas.

Figura 30. Resultados recolhidos a partir dos testes de resistência mecânica realizados aos (a) filmes bio-origami simples (sem sericina) originados do planejamento fatorial experimental, e (b) filmes bio-origami produzidos com cargas variáveis de sericina tendo como base os níveis (+1) de goma carragenana e (0) de goma xantana.



Fonte: elaboração própria.

Assim, este conjunto de níveis biopolissacarídicos foi seguido para a produção de filmes bio-origami carregados com sericina (ver Figura 30b).

As propriedades mecânicas dos filmes bio-origami estão relacionadas principalmente com a capacidade do biopolímero formar ligações em cadeias poliméricas, dificultando a sua separação quando sujeitas a forças mecânicas (YANG, 2012). O plastificante utilizado (glicerol, neste caso) também tem influência nestas propriedades (BOURTOOM, 2008). Os resultados produzidos durante a avaliação da resistência mecânica dos filmes bio-origami com diferentes cargas de sericina, em relação à perfuração, tração e resiliência, estão exibidos na Figura 30b.

A partir da inspeção dos resultados exibidos na Figura 30b, cargas crescentes de sericina integradas no filme bio-origami produziram resistências aumentadas à perfuração e resiliência e resistências diminuídas à tração para cargas de sericina até 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>. Para cargas de sericina mais elevadas nos filmes bio-origami, esta tendência foi de alguma forma invertida, e o filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> produziu os melhores resultados em termos de resiliência, resistência à perfuração e resistência à tração, quando comparado com todos os outros filmes bio-origami e também com o filme bio-origami simples (sem sericina).

Assim, podemos concluir que a presença de sericina em maiores concentrações melhorou as características viscoelásticas de deformação e relaxação molecular (isto é, regresso do filme bio-origami de condições tensas de volta ao equilíbrio). O filme bio-origami produzido com a maior carga de sericina (ver Figura 30b) apresentou um decréscimo na resiliência e um decréscimo marcado na resistência à tração.

O filme bio-origami aplicado diretamente em pele danificada não deveria aderir fortemente, permitindo a regeneração e a re-epitelização da pele danificada. Assim, resistência à perfuração, resistência à tração e resiliência foram os parâmetros de resistência mecânica avaliados, enquanto que a adesividade ou bioadesividade não foram de todo consideradas importantes no trabalho de pesquisa desenvolvido. O filme bio-origami otimizado é intencionado para ser aplicado em pele danificada e mantido no lugar por uma ligadura, sem colar ou aderir à pele ferida. Esta perspectiva é suportada por referências encontradas na literatura (RIPPON et al., 2007; PAL et al., 2009).

O filme bioorigami também se destina a ajudar a manter um microclima adequado na superfície da pele danificada, de extrema importância para as reações biossintéticas necessárias para atividades celulares. Os curativos para a pele permitem a criação de um ambiente húmido e quente sob o filme bio-origami, trazendo assim benefícios para o

processo de regeneração (BOATENG et al., 2008). Os filmes bio-origami desenvolvidos possuem PVA na sua composição, que é um polímero hidrofóbico com baixa energia livre de superfície (ASADINEZHAD et al., 2012) que não favorece a atração de moléculas de água presentes na dispersão contendo os biopolímeros. Em consequência, isto promove a não-aderência do filme bio-origami à pele danificada.

5.15.6. Estudos de permeação transdérmica de sericina a partir dos filmes bio-origami

Os resultados obtidos nos estudos de permeação transdérmica de sericina realizados com os diferentes filmes bio-origami encontram-se exibidos na Figura 31. Como pode ser observado por inspeção da Figura 31a, cargas crescentes de sericina nos filmes bio-origami conduziram a uma quantidade aumentada de proteína permeada por área de pele.

Realizando ajustes não lineares (hiperbólicos,  $y = \frac{(m_1 \cdot x)}{(m_2 + x)}$ ) aos resultados obtidos nos ensaios de permeação transdérmica com os filmes bio-origami carregados com 1, 2, 5 e 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, obteve-se a quantidade máxima de proteína permeada por área de pele (parâmetro m<sub>1</sub>, ver Quadro 7) e o tempo requerido para atingir metade da quantidade máxima de proteína permeada por área de pele (parâmetro m<sub>2</sub>, ver Quadro 8), com excelentes coeficientes de correlação.

Em relação às cargas de sericina mais elevadas, a 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a tendência sigmoidal dos dados de permeação de proteína foi melhor descrita pelo ajuste não-linear da função de Gompertz ( $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$ , ver Figura 31a e Quadro 7), permitindo obter o valor da assímptota (m<sub>1</sub>, isto é, a quantidade máxima atingível de proteína permeada por área de pele, ver Quadro 7), o deslocamento da tendência de dados ao longo do período de tempo estudado (isto é, m<sub>2</sub>, ver Quadro 7) e a taxa de crescimento de dados (isto é, m<sub>3</sub>, ver Quadro 7), com excelentes coeficientes de correlação.

**Figura 31.** Resultados obtidos a partir dos ensaios de permeação transdérmica, como **(a)** proteína média permeada por área de pele, e **(b)** percentagem de proteína liberada dos filmes bio-origami em relação à quantidade de sericina carregada nos filmes, durante um ensaio de 12 h. Os valores são a média de três ensaios (n=3), com desvios padrão associados inferiores a 0,01 em todos os casos. As

linhas sólidas representam ajustes não lineares realizados aos dados experimentais, isto é, hiperbólico para aqueles filmes bio-origami carregados com quantidades de sericina entre 0 e 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e função de Gompertz para aqueles filmes bio-origami carregados com quantidades de sericina entre 20 e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>.



Fonte: elaboração própria.

A função de Gompertz é uma função sigmoidal, onde o crescimento é mais lento no início (onde a concentração de proteína era inicialmente elevada no filme, pelo que a tomada de proteína pela pele foi lenta) e no fim (devido ao abrandamento da permeação de proteína uma vez que se atingiu saturação na pele) de um dado período de tempo.

**Quadro 7.** Resultados obtidos para os ajustes não-lineares realizados à proteína média permeada por área de pele ( $\mu g_{proteina} / mm_{pele}^2$ ) em função do tempo de permeação, para os vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina.

Carga de sericina no filme bio- origami	Função hiperbólica: $y = \frac{m_1 \cdot x}{m_2 + x}$		Função de Gompertz: $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$		r	
(IIIgsericina/IIILfilme)	m₁	<b>m</b> <sub>2</sub>	m₁	m <sub>2</sub>	m <sub>3</sub>	]
1	0,03400	0,35955				0,52251
2	0,80669	4,83650				0,99616
5	0,55243	0,20255				0,82172
10	1,53480	1,92380				0,99699
20			0,62395	12,748	1,86340	0,93200
50			1,70220	16,362	0,78679	0,99892

Fonte: elaboração própria.

Como pode ser observado por inspeção da Figura 31a e dos dados no Quadro 7, o filme bio-origami com a mais elevada carga de sericina permitiu a mais elevada quantidade média de proteína permeada por área de pele, isto é, 1,7022 µg<sub>proteína</sub>/mm<sup>2</sup><sub>pele</sub>. No entanto, esta maior quantidade de proteína permeada do filme bio-origami com a mais elevada carga de sericina traduziu-se em apenas cerca de 11,73% do conteúdo total de proteína neste filme bio-origami após 12 h (ver Figura 31b e Quadro 8).

Quadro 8. Resultados obtidos para os ajustes não-lineares realizados à quantidade média de proteína liberada (%) dos filmes bio-origami em função do tempo de permeação, para os vários filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina.

Carga de sericina no filme bio- origami	Função hiperbólica: $y = \frac{m_1 \cdot x}{m_2 + x}$		Função de Gompertz: $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$			r
(IIIgsericina/IIILfilme)	m₁	m <sub>2</sub>	m <sub>1</sub>	m <sub>2</sub>	m <sub>3</sub>	]
1	26,589	0,35864				0,90344
2	128,68	4,83850				0,99616
5	47,225	0,34991				0,98566
10	68,840	1,92380				0,99699
20			6,81460	12,7470	1,86330	0,93200
50			11,7270	16,3630	0,78680	0,99892

Fonte: elaboração própria.

Claramente, esta não é de todo uma situação ideal numa aplicação real em pele, uma vez que colocar este bio-origami na pele levaria a um desperdício de proteína bioativa atingindo elevadíssimos 88,27% da carga de proteína no filme bio-origami, devido a condições de saturação na pele. Por outro lado, o filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>proteína</sub>/mL<sub>filme</sub> permitiu a liberação de virtualmente toda a sua carga proteica para a pele durante um período de 12 h, o que se traduziu em 0,807 µg<sub>proteína</sub>/mm<sup>2</sup><sub>pele</sub> (ver Quadro 7). Numa aplicação real sobre a pele, o filme bio-origami carregado com 2 mg<sub>proteína</sub>/mL<sub>filme</sub> advogaria uma situação ideal, mas a baixa carga de sericina torná-lo-ia impraticável.

Por outro lado, e considerando também as suas propriedades mecânicas como discutido anteriormente, o filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>proteína</sub>/mL<sub>filme</sub> seria ideal uma vez que num período de 12 h (considerado adequado) cerca de 50% de toda a proteína bioativa no filme bio-origami seria liberada para a pele. Pelo contrário, os filmes bio-origami carregados com 20 mg<sub>proteína</sub>/mL<sub>filme</sub> ou 50 mg<sub>proteína</sub>/mL<sub>filme</sub> não permitiriam liberação de mais proteína para a pele, mesmo durante períodos mais longos (ver Quadros 7 e 8).

5.15.7. Modelação matemática da liberação de sericina a partir dos filmes bio-origami

Para lançar luz sobre o perfil de liberação de proteína (sericina) dos filmes bio-origami, e porque após o período de 12 h dos ensaios, a quantidade de proteína liberada (que efetivamente permeou através da membrana de pele para o tampão fosfato receptor) atingiu um patamar, decidiu-se aplicar os modelos matemáticos de primeira ordem (  $Ln Q_t = Ln Q_0 + k_1 \times t$ , onde  $Q_t$  é a quantidade de proteína liberada no instante de tempo t,  $Q_0$  é a quantidade inicial de proteína na forma de dosagem,  $k_t$  é uma constante cinética de liberação, e t é o tempo), Higuchi ( $Q_t = k_H \cdot \sqrt{t}$ , onde  $Q_t$  é a quantidade de proteína liberada no instante de tempo t,  $k_H$  é a constante de Higuchi e t é o tempo) e Korsmeyer-Peppas (  $Q_t / Q_{\infty} = k_{KP} \cdot t^n$ , onde  $Q_t$  é a quantidade de proteína liberada no instante de tempo t,  $Q_{\infty}$  é a quantidade total de proteína permeada quando a forma de dosagem (filme bio-origami) estiver exaurida,  $k_{KP}$  é a constante cinética de Korsmeyer-Peppas, n é o expoente de difusão ou liberação, e t é o tempo) aos dados de liberação (permeação) de proteína.

As determinações de proteína realizadas mostraram claramente (ver Figuras 31a e 31b) que o perfil de liberação de proteína (permeação) atingiu patamares crescentes com cargas crescentes de sericina nos filmes bio-origami. De fato, para cargas de sericina de 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a liberação de proteína dos filmes bio-origami não ocorreu por difusão mas sim por erosão da matriz biopolimérica (ver Figura 32b), enquanto que para cargas de sericina de 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> a liberação de proteína dos filmes bio-origami ocorreu por difusão (ver Figura 32b). De fato, estas conclusões são suportadas pelos ajustes dos modelos aos dados experimentais de liberação de proteína dos filmes bio-origami, os quais produziram um coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) de 0,23904 (1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,66186 (2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,32995 (5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,57894 (10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,43007 (20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) e 0,68887 (50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) para o modelo de primeira ordem, um coeficiente de correlação de 0,08711 (1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,16249 (2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,16684 (5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,94777 (10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,74003 (20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) e 0,83605 (50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) para o modelo de Higuchi, e um coeficiente de correlação de 0,70704 (1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,89503 (2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,84241 (5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,93728 (10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), 0,83899 (20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) e 0,92070 (50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) para o modelo de Korsmeyer-Peppas (ver Figura 32a).

Os ajustes realizados mostram claramente um r<sup>2</sup> mais fraco tanto para o modelo de primeira ordem como para o modelo de Higuchi e um r<sup>2</sup> muito melhor para o modelo de Korsmeyer-Peppas. Adicionalmente, o expoente de difusão ou liberação (n) no modelo de Korsmeyer-Peppas produzido por ajuste do modelo aos dados experimentais de liberação de proteína (ver Figuras 32a e 32b) foi n=0,55673 (1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), n=1,19010 (2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), n=0,20758 (5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), n=0,58699 (10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>), n=0,75754 (20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) e n=1,15200 (50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>) (no modelo de Korsmeyer-Peppas, n=0,45 sugere difusão Fickiana, 0,45<n<0,89 sugere difusão anômala ou difusão não-Fickiana, e n≥0,89 sugere erosão da cadeia polimérica), o que sugere claramente que a liberação de proteína dos filmes bio-origami carregados com 2 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> não ocorreu por difusão mas sim por erosão da matriz biopolimérica (ver Figura 32b), enquanto que para cargas de sericina de 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> e 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> a liberação de proteína dos filmes bio-origami ocorreu por difusão anômala ou difusão não-Fickiana ou difusão não-Fickiana (ver Figura 32b).

Os ajustes lineares realizados aos dados transformados de permeação (liberação) de proteína usando o modelo de Korsmeyer-Peppas (ver Figura 32a) permitem observar que se produziram ajustes quase perfeitos, suportando ainda mais a conclusão de que a liberação de proteína dos filmes bio-origami ocorreu por difusão anômala ou difusão não-Fickiana para cargas muito baixas e intermédias de sericina, e por erosão da matriz biopolimérica para cargas de sericina baixas e muito elevadas (ver Figura 32b).

Ainda que se pretenda uma liberação mais lenta de proteína bioativa para aplicações reais na pele, onde o filme bio-origami é intencionado para aplicação numa pele onde a exsudação normal produzida não é tão abundante como nas condições implementadas no laboratório, a erosão do filme bio-origami com liberação concomitante de proteína bioativa deverá acontecer a uma extensão muito mais baixa.

Figura 32. Resultados obtidos a partir da modelação matemática dos resultados experimentais obtidos nos ensaios de liberação de sericina a partir dos filmes bio-origami durante um período de 12 h. Os ajustes lineares realizados aos dados experimentais transformados, usando o modelo de Korsmeyer-Peppas linearizado encontram-se exibidos na figura (a), enquanto que na figura (b) o expoente de difusão ou liberação (n) no modelo de Korsmeyer-Peppas em função da carga de sericina no filme bio-origami permite observar a mudança no perfil de liberação de sericina.



Fonte: elaboração própria.

O filme bio-origami otimizado desenvolvido pode ser considerado um compósito polimérico natural exibindo uma microestrutura porosa muito especial que permite que o filme possua excelentes propriedades mecânicas. A partir das análises tomográficas por transmissão de raios-X realizadas a uma seção quadrangular do filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> (ver Figura 33), podemos observar uma superfície homogênea.

Figura 33. Imagens obtidas por análises tomográficas de transmissão de raios-X do filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, sendo (a) imagem de perfil inclinado do filme bio-origami, (b) imagem perpendicular à superfície do filme bio-origami, e (c) vista inclinada da superfície do filme bio-origami. As fatias de imagem tri-dimensionais foram obtidas usando uma voltagem operacional de 29 kV e corrente elétrica com 415 μA.



Fonte: elaboração própria.

Devido a absorver mais radiação, por causa da sua maior densidade atômica, a matriz biopolissacarídica em rede (em verde na Figura 33) está em maior evidência, enquanto que os espaços vazios aparecem em preto. Estes resultados estão em clara concordância com aqueles obtidos por espectrofotometria de infravermelho FTIR (ver Figura 26) os quais indicaram que a sericina muito provavelmente não se envolveu em qualquer ligação química com a matriz biopolimérica.

Este é claramente um dado importante e positivo, uma vez que ao não se envolver em nenhuma ligação química com a matriz biopolimérica, a sericina torna-se prontamente disponível e mantém a sua atividade antioxidante. Uma análise comparativa da porosidade do filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub> pode ser encontrada no Quadro 9, resultando de análises morfológicas 2D e 3D.

A anisotropia é a propriedade de ser dependente direcionalmente, em oposição à isotropia, que implica propriedades idênticas em todas as direções. A anisotropia pode ser definida como uma diferença, quando medida ao longo de diferentes eixos, nas propriedades mecânicas ou físicas de um material.

O grau de anisotropia, calculado como Grau de anisotropia = 1-
$$\begin{pmatrix} Eigenvalue_{min} / Eigenvalue_{max} \end{pmatrix}$$
, é

0 para isotropia total e 1 para anisotropia total. Assim, como pode ser observado por inspeção dos dados no Quadro 9, o grau de anisotropia é 0,75480 para o filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, um valor que está mais próximo da anisotropia do que da isotropia na escala mencionada acima.

Sendo o filme bio-origami carregado com sericina de *Bombyx mori* um material projetado com uma estrutura tecida, este resultado é facilmente compreensível à luz das imagens DESEM exibidas nas Figuras 35 e 36. Ao analisar a estrutura do filme bio-origami carregado com 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, encontramos uma porosidade aberta de 50,61% e um valor igual para a porosidade total (ver Quadro 9). Adicionalmente, o índice de fragmentação médio (ver Quadro 9) dá um índice de conectividade e calcula um índice relativo de convexidade ou concavidade da superfície total do objeto, baseado no princípio de que a concavidade indica conectividade (e a presença de "nodos"), e a convexidade indica estruturas disconectadas isoladas (struts). Baixos índices de fragmentação significam melhores redes interligadas enquanto elevados índices de fragmentação significam uma estrutura mais desconectada.

Escassas cavidades fechadas e superfícies côncavas podem deslocar o índice de fragmentação para (maiores) valores positivos, o que foi de fato determinado nas análises

realizadas (ver Quadro 9). Estes resultados são muito importantes, uma vez que devido ao fato da sericina ter sido dispersa homogeneamente ao longo da estrutura biopolimérica do filme bio-origami durante o processo de polimerização, o bio-origami pode ser aplicado com qualquer uma das suas superfícies voltadas para a pele.

Quadro 9. Resultados obtidos a partir das análises tomográficas por transmissão de raios-X realizadas aos filmes bio-origami integrando quantidades variáveis de sericina de casulos de *Bombyx mori.* 

	Filme bio-origami carregado com 10 mg <sub>sericina</sub> /mL <sub>filme</sub>			
Parâmetro	Análise morfológica bi-dimensional (2D)	Análise morfológica tri- dimensional (3D)		
Número de camadas		101,000		
Tamanho de pixel (µm)		20,7991		
VOI total (volume de interesse), TV (mm <sup>3</sup> )	0,07810	0,07076		
Volume de objeto, Obj.V (mm <sup>3</sup> )	0,04102	0,03495		
Volume percentual de objeto, Obj.V/TV (%)	52,5216	49,3932		
Superfície VOI total, TS (mm <sup>2</sup> )	5,54313	5,08429		
Superfície de objeto, Obj.S (mm <sup>2</sup> )	4,02444	3,68457		
Superfície de interseção, i.S (mm <sup>2</sup> )		1,42233		
Superfície de objeto / rácio de volume, Obj.S/Obj.V (mm <sup>-1</sup> )	98,1101	105,426		
Espessura transversal seccional, Cs.Th (mm)	0,02584			
Densidade de superfície do objeto, Obj.S/TV (mm <sup>-1</sup> )		52,0735		
Grau de anisotropia, DA		4,07826 (0,75480)		
Eigenvalue 1		0,02233		
Eigenvalue 2		0,06913		
Eigenvalue 3		0,09109		
Número de poros fechados, Po.N(cl)		0,00000		
Volume de poros fechados, Po.V(cl) (mm <sup>3</sup> )		0,00000		
Superfície de poros fechados, Po.S(cl) (mm <sup>2</sup> )		0,00000		
Porosidade fechada (%), Po(cl) (%)	0,00000	0,00000		
Índice de fragmentação médio, Fr.I (mm <sup>-1</sup> )	11,9519	15,3358		
Dimensão fractal média, FD	0,78338	1,71086		
Volume de espaços de poros abertos, Po.V(op) (mm <sup>3</sup> )		0,03581		
Porosidade aberta (%), Po(op) (%)		50,6068		
Volume total de espaço de poros, Po.V(tot) (mm <sup>3</sup> )		0,035810		
Porosidade total (%), Po(tot) (%)		50,6068		
Número de Euler, Eu.N		-54,0000		
Conectividadde, Conn		151,000		
Densidade de conectividade, Conn.Dn (mm <sup>-3</sup> )		2134,06		

Fonte: elaboração própria.

A Figura 34 mostra os espectros típicos de fluorescência de raios-X de vários dos filmes bio-origami produzidos com quantidades variáveis de sericina de *Bombyx mori*. Os principais elementos químicos encontrados encontram-se indicados na Figura 34.

Figura 34. Espectros de EDXRF de filmes bio-origami selecionados, carregados com quantidades variáveis de sericina. O eixo dos YY representa o número de contagens características de raios-X que chegaram ao detector, enquanto que o eixo dos XX representa a energia dos raios-X característicos.



Fonte: elaboração própria.

Os espectros medidos foram analisados com o software XRS-FP™, fornecido pela Amptek Inc., tomando em consideração tanto picos de escape como picos soma, e representando o fundo com uma função polinomial. Os mesmos elementos foram encontrados em todos os filmes bio-origami, mas nos filmes carregados com maiores quantidades de sericina (ver Figura 34), encontraram-se maiores quantidades de Ca, S e K e quantidades vestigiais de P, Cr, Nd, Mn e Ni, resultados que são consistentes e em clara concordância com resultados publicados para extratos impuros de sericina obtidos a partir de casulos de *Bombyx mori* (ROCHA et al., 2017). 5.15.10. Análises microestruturais aos filmes bio-origami integrando sericina, por DESEM

As imagens de microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva (DESEM) da superfície e da seção transversal de fratura dos filmes bio-origami carregados com quantidades variáveis de sericina encontram-se representadas nas Figuras 35 e 36, respetivamente, e permitem observar uma superfície rugosa com ausência generalizada de rachaduras/fendas (ver Figuras 35 e 36).

Provavelmente devido ao processo envolvido na preparação das amostras antes do revestimento com Au colidal, a fixação dos filmes nos suportes de carbono, esticando-os, poderá ter produzido as fissuras microscópicas observáveis em algumas das fotomicrografias na Figura 35, especialmente para magnificações mais elevadas.

Não obstante, a partir dos resultados obtidos nas análises de microscopia eletrônica de varredura com dispersão de energia realizadas aos filmes bio-origami, pode observar-se uma morfologia de superfície bastante uniforme (ver Figura 35), às três magnificações estudadas (x500, x5000, e x10000). Na figura 35 é ainda possível observar, em algumas fotomicrografias, pontos brancos originados muito provavelmente da aglomeração de extrato de sericina aquando do processo de polimerização dos filmes.

Na Figura 36 podemos observar a seção transversal de fratura dos filmes bio-origami após congelação com nitrogénio líquido, fratura e revestimento com ouro coloidal. Por inspeção das fotomicrografias na Figura 36 pode observar-se para todos os filmes bioorigami uma espessura constante e homogénea da matriz biopolissacarífica, o que facilita a liberação de sericina por contacto do filme com a pele danificada. Pode ainda observar-se que a topografia da bioestrutura dos filmes exibida nas fotomicrografias da Figura 36 é altamente uniforme. Figura 35. Fotomicrografias FESEM da superfície dos filmes bio-origami carregados com quantidades variáveis de sericina, a várias magnificações (0 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a1: x500, a2: x5000, a3: x10000; 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, b1: x500, b2: x5000, b3: x10000; 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, c1: x500, c2: x5000, c3: x10000; 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, d1: x500, d2: x5000, d3: x10000; 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e1: x500, e2: x5000, e3: x10000; 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, f1: x500, f2: x5000, f3: x10000; 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, g1: x500, g2: x5000, g3: x10000).



Fonte: elaboração própria.

Figura 36. Fotomicrografias FESEM da seção transversal de fratura dos filmes bio-origami carregados com quantidades variáveis de sericina, a várias magnificações (0 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, a4: x100, a5: x500, a6: x2500; 1 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, b4: x100, b5: x500, b6: x2500; 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, c4: x100, c5: x500, c6: x2500; 5 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, d4: x100, d5: x500, d6: x2500; 10 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, e4: x100, e5: x500, e6: x2500; 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, f4: x100, f5: x500, f6: x2500; 50 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, g4: x100, g5: x500, g6: x2500).



Fonte: elaboração própria.

#### 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho de pesquisa, a extração de sericina a partir de casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*) e sua utilização no desenvolvimento de um filme biopolissacarídico do tipo bio-origami foi proposta visando aplicações tópicas para a regeneração de pele. Não foi observada citotoxicidade nem genotoxicidade associada aos extratos de sericina produzidos pelos dois métodos de extração seguidos, o que confere (bio)segurança em sua utilização.

Os dois métodos de extração testados permitiram a produção de extratos de sericina em bruto com o aspecto químico da sericina preservada, com comportamento amorfo sem picos de cristalinidade. Ambos os extratos exibiram as assinaturas térmicas de desnaturação e carbonização proteica. No entanto, o extrato A2 mostrou ser menos amorfo que o extrato A3, implicando assim uma aumentada cristalinidade do extrato A2 quando comparado com o padrão de sericina comercial. Os extratos de sericina exibiram uma gama alargada de pesos moleculares (37 kDa - 200 kDa), como mostrado nos esfregaços produzidos no gel SDS-PAGE, sem quaisquer bandas isoladas a sobressaírem. Tal como a amostra A1, os extratos A2 e A3 exibiram leve atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, exibindo assim potencial para utilização tópica no tratamento de infecções de pele por este agente infeccioso.

O valor de IC<sub>50</sub> não foi atingido para nenhum dos extratos de sericina, com os extratos a não exibirem alta toxicidade para células HUVEC e mantendo uma viabilidade superior a 60% em todas as concentrações de amostra testadas. Não foram encontrados efeitos mitodepressivos dos extratos de sericina, independentemente do procedimento de extração seguido e da concentração testada. Os extratos A2 e A3 foram capazes de eliminar radicais livres (ainda que em diferentes extensões). Assim, os extratos de sericina produzidos podem ser considerados adequados para aplicações biofarmacêuticas, uma conclusão totalmente suportada pelos resultados da extensa caracterização físicoquímica e biológica realizada.

Os filmes bio-origami desenvolvidos integrando sericina exibiram boas características em relação à liberação da proteína bioativa com atividade antioxidante, o que foi verificado através de estudos de permeação transdérmica e cinética associada ao processo de liberação de sericina e, uma vez que a liberação de sericina a partir da matriz biopolissacarídica do filme bio-origami ocorreu por difusão não-Fickiana para cargas de sericina até 20 mg<sub>sericina</sub>/mL<sub>filme</sub>, os filmes podem ser utilizados na regeneração oclusiva de feridas por longos períodos de tempo.

Assim, os filmes bio-origami produzidos integrando cargas variáveis de sericina proveniente dos casulos do bicho da seda *(Bombyx mori)* podem ser considerados adequados para aplicações biofarmacêuticas e de regeneração de pele, uma conclusão totalmente suportada pela caracterização que foi realizada aos filmes bio-origami.

#### 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Ainda que o trabalho de pesquisa desenvolvido tenha seguido uma evolução natural (e sequencial), permitindo retirar algumas principais (e complementares) conclusões, uma visão mais profunda deve ser adquirida em relação à caracterização e seleção do produto final desenvolvido, isto é, o filme bio-origami. Este capítulo apresenta, sucintamente, uma série de áreas potencialmente frutíferas para pesquisa num futuro próximo, abrangendo estudos que vão um pouco mais além e que partem daqueles apresentados até agora nesta dissertação.

Não obstante o fato de que esta dissertação tenha tentado consistentemente e compreensivamente desenvolver e caracterizar um novo produto (filme bio-origami para regeneração de pele), existe um número de áreas que fazem interface, mais ou menos diretamente, com aquelas e que se espera conduzam a uma melhor compreensão e a um *design* mais racional.

A purificação da sericina nos extratos impuros previamente à sua incorporação nos filmes biopolissacarídicos poderia ser realizada, aumentando desse modo a quantidade de proteína bioativa pura nos bio-origamis.

Avaliação das características de estrutura e composição dos filmes bio-origami por ressonância magnética nuclear, tanto de filmes sem a proteína bioativa pura como de filmes incorporando a proteína pura, seguido de tentativas para correlacioná-las uma com a outra.

Em adição aos testes de atividade antibacteriana e antioxidante *in vitro*, a avaliação destas bioatividades *in vivo* usando modelos animais seria crucial para aferir a eficácia do produto desenvolvido.

Adicionalmente, e porque o sistema bio-origami desenvolvido integra sericina bioativa, outras entidades proteicas hidrofílicas tais como partículas bacteriofágicas poderiam igualmente ser integradas na matriz biopolissacarídica, avaliando-se assim o potencial de aprisionamento simultâneo de entidades proteicas distintas (partículas bacteriofágicas) que apresentassem atividade sinérgica (antibacteriana pronunciada) com a sericina (antioxidante e promotora de síntese de colágeno), para a regeneração de pele.

Finalmente, a avaliação da estabilidade e estabilização dos filmes bio-origami para armazenamento à temperatura ambiente e a avaliação econômica do processo agregaria valor ao trabalho desenvolvido até ao momento.

### REFERÊNCIAS

AGUIAR, I. C. S. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes de sericina reticulados com dimetilolureia. 2011. Monografia (Tecnologia em Processos Químicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2011.

AKAI, Hiromu. Calcium crystals deposited in cocoons of wild silkmoths. **International Journal of Wild Silkmoth and Silk**, Japão, 6, 33-44, 2001.

ALMEIDA, José Filipe da Silva Lapas. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. 2010. Tese de Doutorado. (Doutorado em Engenharia Química, especialidade Processos Químicos) Universidade de Coimbra da Faculdade de Ciências e Tecnologia. Coimbra, 2010.

AMAROWICZ, R. et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 551-562, 2004.

ANDREWS, Gavin P.; LAVERTY, Thomas P.; JONES, David S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ANSEL, Howard C.; POPOVICH, Nicholas G.; ALLEN JÚNIOR, Loyd V. **Farmacotécnica:** formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.

ASADINEZHAD, Ahmad et al. Recent progress in surface modification of polyvinyl chloride. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2937-2959, 2012.

ASSIS, Odilio Benedito Garrido; DE BRITTO, Douglas. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações/Review: edible protective coatings for fruits: fundamentals and applications. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87, 2014.

AZULAY, Rubem David; AZULAY, David Rubem; AZULAY-ABULAFIA, Luna. **Dermatologia.** 5. ed., rev. atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1014 p.

BAERLECKEN, D. et al. Bio-Origami: Form Finding and Evaluation of Origami Structures. **Digital Physicality: Proceedings of the 30th eCAADe Conference**, Prague, v. 1, Set. 2012. Disponível em: <a href="http://www.ecaade.org/downloads/ecaade2012-vol-1-lowres.pdf">http://www.ecaade.org/downloads/ecaade2012-vol-1-lowres.pdf</a>. Acesso em: 11 out. 2012.

BAKER, Maribel I. et al. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 5, p. 1451-1457, 2012.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 25-41, 2015.

BALCÃO, V. M.; VIEIRA, M. C.; MALCATA, F. X. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. **Biotechnology Progress,** v. 12, n. 2, p. 164-172, 1996.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BOATENG, Joshua S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BOURTOOM, Thawien. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 30, 2008.

BOUMAZA, A. et al. Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Clodinafop-propargyl Commercial Formulation on Allium cepa L. Journal of Materials and Environmental Science, v. 7, n.4, p.1245-1251, 2016.

CAETANO, K. S. et al. Atividade antioxidante de filmes biodegradáveis de amido de mandioca com adição de extrato de casca de abóbora e óleo de orégano, In: **Anais do 5° Simpósio de Segurança Alimentar** - Alimentação e Saúde, 26-29 May 2015, Bento Gonçalves/ RS. 2015.

CARDOSO, M. P. A constituição da pele. Disponível em: <a href="http://www.trabalhosescolares.net/a-constituicao-da-pele/">http://www.trabalhosescolares.net/a-constituicao-da-pele/</a>. Acesso em: 20 nov. 2017.

CHEN, Y. et al. Rheological characterisation of κ-carrageenan/locust bean gum mixtures. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 2, p. 117-124, 2001.

CHILLER, Katarina; SELKIN, Bryan A.; MURAKAWA, George J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. In: Journal of Investigative Dermatology Symposium **Proceedings**. Elsevier, 2001. p. 170-174.

CHIRILA, Traian V. et al. Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on Bombyx mori sericin membranes. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 14, 2013.

CHIRILA, Traian V.; SUZUKI, Shuko; MCKIRDY, Natalie C. Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from Bombyx mori silk cocoons. **Progress in Biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 135-145, 2016.

CHOPRA, Sheetal; GULRAJANI, M. L. Comparative evaluation of the various methods of degumming silk. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 19, p.76-83, Jun. 1994.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard - 8th Edition 2003. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement 2011. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

DANDURAND, Jany et al. Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature of the amyloid fibers. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 100-107, 2014.

DAU, Ana Paula de Mattos Arêas. **Bioquímica Humana.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2015. 303 p.

DIAS, D. B. et al. CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE SERICINA MODIFICADOS COM POLIETILENOGLICOL. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 8932-8939, 2015.

DE OLIVEIRA JR, José Martins; MARTINS, Antonio César Germano. Construction and Test of Low Cost X-Ray Tomography Scanner for Physical-Chemical Analysis and Nondestructive Inspections. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP, p. 102-105, 2009.

DEHPOUR, Abbas Ali et al. Antioxidant activity of the methanol extract of Ferula assafoetida and its essential oil composition. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 4, p. 405-412, 2009.

DERMIRCI, U.; KHADEMHOSSEINI, A. **Gels Handbook**: fundamentals, properties and application. New Jersey: World Scientific, 2016. 3v.

DRAGOEVA, Asya et al. Citotoxic and genotoxic effects of diphenyl-ether herbicide GOAL (oxyfluorfen) using the *Allium cepa* test. **Research Journal of Mutagenesis**, v. 2, p. 1-9, 2012.

FAN, J. B. et al. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm Bombyx mori. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p. 74-88, 2009

FEI, Dong-Dong et al. Fractal approach to heat transfer in silkworm cocoon hierarchy. **Thermal Science**, v. 17, n. 5, p. 1546-1548, 2013.

FELDKAMP, L. A.; DAVIS, L. C.; KRESS, J. W. Practical cone-beam algorithm. **JOSA A**, v. 1, n. 6, p. 612-619, 1984.

FERNANDES, F. M. F. A. et al. Queimaduras em crianças e adolescents: caracterização clínica e epidemiológica. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 4, Porto Alegre, 2012.

FIBROINA di seta. Cos' é la fibroina di seta. Disponível em <a href="http://www.fibroinadiseta.it/cose-fibroina-seta/">http://www.fibroinadiseta.it/cose-fibroina-seta/</a>. Acesso em 23 nov. 2017.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375-398, 2010.

GARCÍA-GARCÍA, Elizabeth; TOTOSAUS, Alfonso. Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and  $\kappa$ -carrageenan by a mixture design approach. **Meat Science**, v. 78, n. 4, p. 406-413, 2008. GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GIMENES, M. L.; SILVA, V.R.; VIEIRA, M.G.A.; SILVA, M.G.C.; SCHEER, A. P. High molecular sericin from Bombyx mori cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 3, p. 266, 2014.

GLASSER, Cássia A. et al. Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part II: process and product characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 12, p. 1990-2000, 2016.

GUPTA, D.; AGRAWAL, A.; RANGI, A. L. Extraction and characterization of silk sericin. **Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)**, v. 39, n. 4, p. 364-372, 2014.

GUPTA, Piyush; VERMANI, Kavita; GARG, Sanjay. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.

HARRIS, Maria Inês Nogueira de Camargo. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento.3. ed. rev. e ampl. São Paulo: SENAC, 2009.

HENG, Madalene C.Y. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 9, p. 1058-1066, 2011.

HIDALGO, A. et al. Abnormal mitosis and growth inhibition in Allium cepa roots induced by propham and chlorpropham. **Cytobios**, v. 57, n. 228, p. 7-14, 1989.

HWANG, Ma-Ro et al. Gentamicin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol/dextran hydrogel: gel characterization and in vivo healing evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1092-1103, 2010.

IYER, Padma V.; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

JAMAL, Mustapha *et al.* Bio-Origami Hydrogel Scaffolds Composed of Photocrosslinked PEG Bilayers. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 8, p. 1142-1150, 2013.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p.1749-1755, 2009.

KI, C. S.; KIM, J. W.; OH, H. J.; LEE, K. H.; PARK, Y. H. The effect of residual silk sericin on the structure and mechanical property of regenerated silk filament. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 346-353, 2007.

KUNZ, R. I.; BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C.; NATALI, M.R.M. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

LAMBONI, Lallepak et al. Silk sericin: a versatile material for tissue engineering and drug delivery. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1855-1867, 2015.

LI, Q. et al. The design, mechanism and biomedical application of self-healing hydrogels. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 9, p. 1857-1874, 2017.

LIMA, A. D. L. Cicatrização e reparo. Disponível em: <a href="https://pt.slideshare.net/Enfanhangue/cicatrizao-e-reparo-2">https://pt.slideshare.net/Enfanhangue/cicatrizao-e-reparo-2</a>>. Acesso em: 24 Nov. 2017.

LIU, Y. et al. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90, n. 2, p. 492-502, 2009.

LOPEZ-GALLEGO, Fernando et al. Stabilization of different alcohol oxidases via immobilization and post immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 278-284, 2007.

MAJEWSKA, Agnieszka et al. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of Allium cepa L. root tips treated with the extract from Rhodiola rosea roots. **Caryologia**, v. 56, n. 3, p. 337-351, 2003.

MARTINS, Joana T. et al. Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 280-289, 2012.

MARUYAMA, Larissa Yukie et al. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 386-393, 2006.

MATEO, Cesar et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 129-141, 2006.

MEHTA, P. et al. Design, development and evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and wounds. **Innovare Journal of Life Science**, v. 1, p. 38-44, 2013.

MORAN, Laurence A. et al. Bioquímica. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013.

MOSER, H. H.; PEREIMA, R. R.; PEREIMA, M. J. L. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 2, p. 60-7, 2013.

MOZHAEV, Vadim V.; MARTINEK, Karel. Structure-stability relationships in proteins: a guide to approaches to stabilizing enzymes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 4, n. 3, p. 387-419, 1990.

MURPHY, D. J.; SANKALIA, M. G.; LOUGHLIN, R. G.; DONNELLY, R. F.; JENKINS, M. G.; MCCARRON, P. A. Physical characterisation and component release of poly (vinyl alcohol)– tetrahydroxyborate hydrogels and their applicability as potential topical drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 326-334, 2012.

NEFIC, Hilada et al. Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of Allium cepa L. induced by alprazolam. **Medical Archives**, v. 67, n. 6, p. 388, 2013.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. **Biomateriais:** fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197-220, 2009.

PATEL, R. J.; MODASIYA, M. K. Sericin-pharmaceutical applications. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, v. 2, n. 3, p. 913-917, 2011.

PEREIMA, Maurício José Lopes et al. Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 145-52, 2013.

PEREIRA, Ana Paula V.; VASCONCELOS, Wander L.; ORÉFICE, Rodrigo L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-Inorgânicos bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 4, p. 104-109, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guabanara, Koogan AS, 2007.

RANGI, Abhilasha; JAJPURA, Lalit. The biopolymer sericin: extraction and applications. **Journal of Textile Science and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2015.

REIS, Elizabeth Fonseca dos et al. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. **Materials Research**, v. 9, n. 2, p. 185-191, 2006.

RIPPON, Mark; WHITE, Richard; DAVIES, Phil. Skin adhesives and their role in wound dressings. **WOUNDS UK**, v. 3, n. 4, p. 76, 2007.

ROBYT, J.F.; WHITE, B.J. **Biochemical Techniques** - Theory and Practice. Chicago IL: Waveland, 1990.

ROCHA, L. K. H. et al. Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 163-177, 2017.

ROSSI, Lídia A. et al. Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 2010.

SALERNO, Claudia; CARLUCCI, Adriana M.; BREGNI, Carlos. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 986-993, 2010. SASAKI, Masahiro; YAMADA, Hideyuki; KATO, Norihisa. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1505-1511, 2000 [A].

SASAKI, Masahiro; YAMADA, Hideyuki & KATO, Norihisa. Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine in mice. **Oncology Reports**, v. 7, n. 5, p. 1049-1052, 2000 [B].

SASAKI, Masahiro; YAMADA, Hideyuki; KATO, Norihisa. A resistant protein, sericin improves atropine-induced constipation in rats. **Food Science and Technology Research**, v. 6, n. 4, p. 280-283, 2000 [C].

SEABRA, A. B.; PASQUÔTO, T.; FERRARINI, A. C.; SANTOS, M. C.; HADDAD, P. S.; LIMA, R. Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolatedand s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1207-1218, 2014.

SILVA, F. E. F. **Produção de filmes poliméricos a base de polissacarídeos de** *Anacardium occidentale* L., 2014. 68f. (Dissertação de Mestrado) – Mestrado em biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Instrumental Analysis**. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2007.

SONG, Airong; RANE, Aboli A.; CHRISTMAN, Karen L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly (ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 41-50, 2012.

TAKASU, Yoko; YAMADA, Hiromi; TSUBOUCHI, Kozo. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 12, p. 2715-2718, 2002.

TAO, Wei; LI, Mingzhong; XIE, Ruijuan. Preparation and structure of porous silk sericin materials. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 290, n. 3, p. 188-194, 2005.

TERAMOTO, Hidetoshi; MIYAZAWA, Mitsuhiro. Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 2049-2057, 2005.

TULACHAN B. et al. Electricity from the Silk Cocoon Membrane. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-15, 2014.

VILLEGAS, V.; VIGUERA, A. R.; AVILÉS, L.; SERRANO, L. Stabilization of proteins by rational design of α-helix stability using helix/coil transition theory. **Folding and Design**, v. 1, n. 1, p. 29-34, 1996.

WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. Disponível em: <a href="https://pt.wikipedia.org/wiki/Aminoácido#/media/File:AminoAcidball.svg">https://pt.wikipedia.org/wiki/Aminoácido#/media/File:AminoAcidball.svg</a>. Acesso em: 23 nov. 2017.

WILAIWAN, S. et al. Screening of some elements in different silk cocoon varieties. **Journal** of Applied Sciences, v. 10, p. 575-579, 2010.

WU, J-H; WANG, Z.; XU, S-Y. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1255-1262, 2007.

YAN, Congqi; POCHAN, Darrin J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3528-3540, 2010.

YOUNG, A. L. Powder X-ray Diffraction and its Application to Biotherapeutic Formulation Development. **American Pharmaceutical Review**, v. 15, n. 1, p. 74, 2012.

ZHANG, Yu-Qing. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 91-100, 2002.

ZHANG, Yu-Qing et al. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3751-3759, 2004.

ZHOU, Li et al. Copper in the silk formation process of Bombyx mori silkworm. **FEBS** Letters, v. 554, n. 3, p. 337-341, 2003.

ZONG, Xiao-Hong et al. Effect of pH and copper (II) on the conformation transitions of silk fibroin based on EPR, NMR, and Raman spectroscopy. **Biochemistry**, v. 43, n. 38, p. 11932-11941, 2004.

**ANEXOS E APÊNDICES** 

**ANEXO A** - Trabalho científico apresentado sob a forma de comunicação oral no I Simpósio de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, realizado dentro da II Mostra de Atividades Acadêmicas (MAAC), Universidade de Sorocaba – Uniso (Sorocaba/SP, de 07 a 10 de Novembro de 2016).



## Certificado

Certificamos que o trabalho "Extração de sericina a partir de casulos do bicho-da-seda.", de autoria de Liliam Katsue Harada, Laura Isabella Lopes Favaro, Valeria de Campos Orsi, Marta Maria Duarte Carvalho Vila e Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, foi apresentado em formato oral no I Simpósio de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, realizado dentro da II Mostra de Atividades Acadêmicas - MAAC, na Universidade de Sorocaba - Uniso, em Sorocaba -SP, Brasil, de 07 a 10 de Novembro de 2016.

Sorocaba, 28 de Novembro de 2016

min Coto de Oliveira Junior Profa. Drar Maril C enadora do I Simpa Dra, Denise Groto a do I Simpósio de Pe UNISO
**ANEXO B** - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico **11th CIFARP** - **International Congress of Pharmaceutical Sciences** (Ribeirão Preto, Brasil, 15 a 18 de novembro de 2017).



We certify that the Abstract entitled

"EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SERICIN FROM BOMBYX MORI COCOONS.",

authored by "HARADA, L. K. FAVARO, L. I. L. RIOS, A. C. SILVA, E. C. SILVA, W. F. OLIVEIRA JR, J. M. VILA, M. M. D. C. BALCAO, V. M. ", was presented in the Poster Presentation at the 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences, held on November 15-18, 2017.

Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, November 18th, 2017.



ANEXO C - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico
 MICROBIOTEC 17 - CONGRESS OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
 (Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto,
 Portugal, 07 a 09 de Dezembro de 2017).



EviKey versão 3.0.0.0 | Licenciado a UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO | Desenhado e Desenvolvido por EventKey | Copyright 2016 Universidade Católica Portuguesa - Porto





This is to certificate that

Liliam Harada

University of Sorocaba - PhageLab, Sorocaba/SP, Brazil

has Presented the Poster, Structural and functional stabilization of silk sericin: bio-origami for skin regeneration. by Liliam Harada; Ludmilla Silva; José Martins Oliveira Jr.; Matthieu Tubino; Marta Vila; Victor Balcão in Microbiotec'17, which took place at Universidade Católica Portuguesa - Porto, from 7<sup>th</sup> - 9<sup>th</sup> December 2017.

The conference Co-Chairs

Colorface Hona Manuala Pintado

Célia Manaia

Manuela Pintado

**APÊNDICE B** - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico **11th CIFARP - International Congress of Pharmaceutical Sciences** (Ribeirão Preto, Brasil, 15 a 18 de novembro de 2017). Liliam K. H. Rocha<sup>1</sup>, Laura I. L. Favaro<sup>1</sup>, Alessandra C. Rios<sup>1</sup>, Erica C. Silva<sup>1</sup>, Welida F. Silva<sup>1</sup>, José<sup>1</sup>, M. Oliveira Jr.<sup>1</sup>, Marta M. D. C. Vila<sup>1</sup> and Victor M. Balcão<sup>1</sup>

PhageLab – Laboratory of Biofilms and Bacteriophages of UNISO, i(bs)<sup>2</sup> – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil
 [victor.balcao@prof.uniso.br]. <sup>2</sup>CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

### EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SERICIN FROM BOMBYX MORI COCOONS.

Introduction: Sericin is a globular protein that makes up about 25-30% of the silk proteins. Sericin is composed of 18 amino acids, most of which have strong polar side chains, such as hydroxyl, carboxyl and amine groups. Due to its biochemical and biophysical properties, sericin has been studied for several potential applications. Such properties include biocompatibility, biodegradability, antibiotic-antibacterial activity, anti-oxidant activity, anti-tyrosinase activity, anticancer effects and UV protective properties. Objective: To produce and characterize a crude sericin extract from Bombix mori cocoons. Material and Methods: In the present research effort, production of crude sericin extracts from *Bombyx mori* silk cocoons was attempted using two different approaches. Sericin was extracted from cocoons by hightemperature autoclaving followed either by lyophilization or freezing-thawing precipitation, to obtain a crude sericin powder. The physico-chemical and biological characteristics of the crude sericin extracts were evaluated in detail via FTIR, XRD, XRF, XRT, UV-Vis scanning, TGA and DSC, protein quantification, antimicrobial activity, free radical scavenging activity, cytotoxic activity, potential for inducing chromossomal aberrations, genotoxicity via Allium cepa assays and Comet<sup>TM</sup> analyses. The molecular weight was also investigated, via sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the results duly compared to standard sericin. Results and Discussion: The two extraction methods assayed allowed to produce crude sericin extracts with the chemical aspect of sericin preserved, with an amorphous behavior without peaks of crystallinity. Both crude extracts displayed the thermal signatures of protein denaturation and carbonization. These same samples exhibited a wide range of molecular weights (37 kDa - 200 kDa) without any isolated bands standing out. The crude sericin extracts did not exhibit a high toxicity and presented a cell viability higher than 60% at all sample concentrations tested. No mitodepressive effects of sericin could be observed. The antimicrobial tests showed potential activity against S. Aureus. Conclusion: The results gathered clearly suggest that the crude sericin extracts had both obvious radical scavenging effects and antibacterial activity, further suggesting that this protein might be a valuable addition for either food and biopharmaceutical applications.

*Keywords:* Sericin; *Bombyx mori* cocoons; extraction; antimicrobial and antioxidant activities; cyto- and genotoxicities; physico-chemical characterization

# Extraction and characterization of sericin from bombyx mori cocoons



HARADA, L.K.<sup>1</sup>,<sup>•</sup>; FAVARO, L.I.L.<sup>1</sup>; RIOS, A. C. <sup>1</sup>; SILVA, E. C.<sup>1</sup>; SILVA, W. F.<sup>1</sup>; OLIVEIRA JR, J.M.<sup>1</sup>; VILA, M.M.D.C.<sup>1</sup> and BALCÃO V. M.<sup>1,2</sup>.

Im and Bacteriophage Laboratory, i(bs)<sup>2</sup> – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group. University of Sorocaba. Sorocaba/SP, Brazil.

EB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

E-mail: liliam.harada@edu.uniso.br

### Introduction

Sericin is a globular protein that makes up about 25-30% of the silk proteins. Sericin is composed of 18 amino acids, most of which have strong polar side chains, such as hydroxyl, carboxyl and amine groups. Due to its biochemical and biophysical properties, sericin has been studied for several potential applications. Such properties include biocompatibility, biodegradability, antibiotic-antibacterial activity, anti-oxidant activity, anti-tyrosinase activity, anticancer effects, UV protective properties. The aim of this work, was to produce and characterize a crude sericin extract from the *Bombix mori* cocons.

#### Experimental procedures

The first step of this work, was to obtain the crude sericin extracts.



The second step was the extensive characterization of the crude extracts produced, shown in the flowchart below:



#### Experimental results and discussion

The sericin extractions carried out via both methods were assessed in terms of the yields produced. The extraction using the method of freezing/thawing (viz. A2 sample) produced a yield of 15% (w/w), whereas the extraction using the method of lyophilization (viz. A3 sample) produced a yield of 18% (w/w). The average moisture content of both crude sericin extracts was 10.5% (w/w), a value that compares with the same parameter of the standard sericin (viz. A1 sample).



egenci: ctant 1: disk plunged into an antibiotic cocktail solution; ctant 2: disk plunged into asterile ultrapure water; ctant 3: disk plunged into a A1 sample solution (10mg/mL); ctant 4: disk plunged into a A2 sample solution (20mg/mL); ctant 5: disk plunged into a A2 sample solution (20mg/mL); ctant 7: disk plunged into a A2 sample solution (20mg/mL); ctant 7: disk plunged into a A3 sample solution (20mg/mL); ctant 8: disk plunged into a A3 sample solution (20mg/mL).

Figure 3.Antimicrobial activity of standard sericin (A1) and crude sericin extracts (A2 and A3 samples).





Figure 6.Effect of the different sericin samples (20mg/mL) on the mitotic index oblained by Allum ceps assay. Uttragure water as negative. The mitotic index was calculated as the number of cells in mitosis divided by the total number of cells, whereas the damage index was calculated as the number of damages divided by the total number of cell divisions. • indicate statistically non-significant relative damages and +# indicate statistically significant

Table 1. Antioxidant activity (%) of the sericin samples, as free radical scavenging ability measured via the DPPH methodology.

	Free (relative) radical scavenging activity (%) [average $(n=3) \pm \sigma$ ]					
Concentration (mg/mL)						
	Ascorbic acid	Standard sericin	Freeze/Thaw	Lyophilized		
			extracted sericin	extracted serici		
0.5	96.50±0.23					
5		0.51±0.23				
15		8.01±0.20	3.40±1.85			
25				45.68±8.26		
60			0.81±1.96	44.18±16.85		
630						

ns (XRD) **(a** 

ples (orange curves), A2 e curves) and A3 sample

(b) of A1 sam

THE .

A3



Figure 10. Thermogravimetric curves (a) and 1st derivative of the weight loss curves (b) of A1, A2 and A3 samples.

Protein content in the crude sericin extracts Concentrations

A1 A2 A3 Figure 12. Protein quantification by modified Bradford colorimetric method

### Conclusion

Figure 11.Differential scanning calorimetry thermograms of A1, A2 and A3 samples.

- >> The antimicrobial assays showed potential activity against S. Aureus. The results gathered clearly suggest that the crude sericin extracts had both obvious radical scavenging effects and antibacterial activity, further suggesting that this protein might be a valuable addition for either food and biopharmaceutical applications.
- >> The two extraction methods assayed allowed to produce crude sericin extracts with the chemical aspect of sericin preserved, with an amorphous behavior without peaks of crystallinity.
- Both crude extracts displayed the thermal signatures of protein denaturation and carbonization. These same samples exhibited a wide range of molecular weights (37 kDa - 200 kDa), without any isolated bands standing out.
- >> The crude sericin extracts did not exhibit a high toxicity and presented a cell viability higher than 60% at all sample concentrations tested. No mitodepressive effects of sericin could be observed.

#### Acknowledgements

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazi); Refs. No. 2016/0884-3 (Project PneumoPhageColor) and 2016/122344 (Project TransAppLI)); is hereby grateluity advonvelegad. Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Ref. No. 2016/16464-3) in her form of Al São: Eclovahig paratelo to Lima Harada à teneby grateluity advonvelegad. Funding by the University of Socrada (UNSC), Socrada, Brazi) foi cuana Paravai o hereby grateluity advonvelegad. This work also received support from CMPR, National Council to Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of Research Productivity (Po) Elevolaria granted to VIII. Sido (FARE) National Council no Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of Research Productivity (Po) Elevolaria grante to VIII. Sido (FARE) National Council Nat





Figure 5.Relative DNA damage indexes of HUVEC cell line following exposure of cells to different mass concentrations (10 15 and 20 mg) of sericin for 24 h The inserted photos picture the Comet<sup>14</sup> tails produced by the different types of damaged cells encountered.  $\star \diamond$ , and  $\star$  indicate statistically non-significant relative DNA damage indexes, and  $\star \bullet$  and  $\star \star$  indicate statistically significant relative DNA damage indexes.







Figure 8.FTIR of A1 sample powder (a), A1 sample solution (b), A2 sample powder (c), A2 sample powder aqueous supernatant (d), A2 sample powder aqueous supernatant (d), and 43 sample powder aqueous supernatant (d) and 43 sample powder aqueous supernatant



Figure 13. Tomographic analyses via X-ray transmissio (XRT) of the wall of a Bombyx mori coccon. APÊNDICE C - Trabalho científico apresentado no Congresso Científico
 MICROBIOTEC 17 - CONGRESS OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
 (Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto,
 Portugal, 07 a 09 de Dezembro de 2017).

Id: 3475 Key: 00238EC9BA Symposium (1st option): Health Microbiology and Biotechnology Symposium (2nd option): Health Microbiology and Biotechnology Presentation: Poster

Title: Structural and functional stabilization of silk sericin: bio-origami for skin regeneration.

Author's: Liliam Harada<sup>1</sup>; Ludmilla Silva<sup>1</sup>; José Martins Oliveira Jr.<sup>1</sup>; Matthieu Tubino<sup>2</sup>; Marta Vila<sup>1</sup>; Victor Balcão<sup>1</sup> Affiliaton's: 1 - University of Sorocaba - PhageLab, Sorocaba/SP, Brazil; 2 - State University of Campinas, Institute of Chemistry Keyword's: Sericin from Bombyx mori, Bioorigami film, Antioxidant activity, Transdermal permeation, Kinetics of protein release, Skin regeneration

### Background

Development and optimization of a bioorigami film with impregnated silk sericin was pursued, for skin regeneration applications. The selected bioorigami exhibited a homogeneous and translucid appearance, and devoid of any fractures or cracks. Several formulations were produced, with varying integrated sericin contents, viz. 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>bioorigami</sub>. The optimized bioorigami presented antioxidant activity, as expected, indicating a potential utilization in skin regeneration with prolonged release of the bioactive protein.

### Method

The selected bioorigami exhibited a homogeneous and translucid appearance, and devoid of any fractures or cracks. Several formulations were produced, with varying integrated sericin contents, viz. 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>bioorigami</sub>. The optimized bioorigami presented antioxidant activity, as expected, indicating a potential utilization in skin regeneration with prolonged release of the bioactive protein. The infrared spectra of the bio-origami films integrating silk sericin indicated that the protein did not engage in any bonds with the polymeric matrix, which otherwise could have reduced its antioxidant activity.

### **Results & Conclusions**

The physico-chemical characteristics of the several bioorigami films produced were evaluated in detail, via FTIR, XRD, XRF, XRT, TGA, DSC, transdermal protein permeation, kinetics of protein release from the bioorigami films, and free radical scavenging activities. The results gathered clearly suggest that the optimized bioorigami films integrating crude sericin extract had both obvious radical scavenging effects with the 2.2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) assay, and exhibited prolonged release of the bioactive protein, further suggesting potential biopharmaceutical applications such as skin regeneration.

### **References & Acknowledgments**

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil; Refs. No. **2016/08884-3** (**Project PneumoPhageColor) and 2016/12234-4 (Project TransAppIL)**), is hereby gratefully acknowledged. Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP Ref. No. 2016/16641-3**) in the form of a M.Sc. fellowship granted to Liliam Katsue Harada is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of a Research Productivity (PQ) fellowship granted to Victor M. Balcão (**Ref. No. 306113/2014-7**). The authors have no conflicts of interest whatsoever to declare.

## Structural and functional stabilization of silk sericin: bio-origami for skin regeneration



HARADA, L.K.<sup>1, •</sup>; SILVA, L.R.<sup>1</sup>; TUBINO, M.<sup>2</sup>; OLIVEIRA JR., J.M.<sup>1</sup>; VILA, M.M.D.C.<sup>1</sup> and BALCÃO, V. M.<sup>1,3</sup>

ab – Biofilm and Bacteriophage Laboratory, University of Sorocaba, Sorocaba/S <sup>2</sup> Institute of Chemistry, State University of Campinas, Campinas/SP, Brazil. <sup>3</sup> CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.





#### Introduction

Considering the growing importance of hydrogels as pharmaceutical forms for the controlled release of drugs, the aim of the present research work was to develop and evaluate a biopolysaccharyde film, herein coined as a bioorigami film due to the intended characteristics and mode of use, using PVA, carrageenan and xanthan gums as raw materials, containing incorporated silk sericin extracted from *Bombyx mori* cocoons, for antioxidant/regenerative topical applications.

Sericin from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori* is a water-soluble globular glycoproten and is primarily amorphous. Sericin has been found to exhibit several biological (beneficial) activities, spanning from antityrosinase properties, promotion of collagen production (important in wound healing applications on both skin and corneal tissues), anti-inflammatory activity, antitumoural activity, anti-ageing and anti-wrinkle, antimicrobial, use in controlled drug-releasing biomaterials to promote stability and prolonged release, to antioxidant.

Due to the uniqueness of this globular protein (representing in fact a family of proteins), silk sericin has great potential to be used in biopharmaceutical products. Hence, silk sericin was considered in this research effort as a new potentially valuable skin regeneration product, following a previous research entailed with the major goal of extracting and fully characterizing this potential multipurpose protein. The optimized bioorigami film formulations integrating silk sericin were subsequently fully characterized physicochemically.

### Experimental procedures

The first step of this research work was to optimize the biopolysaccharide matrix for the bio-origami film (see Fig.1).



The second step was to produce films with different concentrations of the sericin protein. followed by characterization of the films produced, shown in the flowchart in Fig. 2.



Figure 2. Flowchart of the obtaining and characterization of the films with different

#### perimental results and discussi

The experimental factorial design undertaken to define the best biopolysaccharide composition and associated mechanical properties for the bioorigami films, yielded as best composition for the bioorigami films those of the level (+1)(0), that are 2.25% (w/w) carrageenan gum and 0.50% (w/w) xanthan gum.

Different concentrations of silk sericin in the bioorigami films allowed different abilities to quench the DPPH radicals. It was observed that the bioorigami films with 20 mg\_{sericin}/mL\_{film} and 50 mg\_{sericin}/mL\_{film} scavenged (19.50  $\pm$  0.00)% and (24.19  $\pm$  4.50)% of DPPH radicals, respectively.

#### Acknowledgements

ject funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil; Refs. No. 2016/08884-3 (Project Pneumo ado de São Paulo (FAPESP Ref. No. 2016/16841-3) in the form of a M.Sc. fellowship granted to Liliam Kalsue Harada is hereby gratefully acknow search Productivity (Po) fellowship granted to Victor M. Balado (Ref. No. 306/1320147-1). The autors have no conflicts of interest whatsever to dec hageColor) and 2016/12234-4 (Project TransAppIL)), is hereby gratefully acknowledged. Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do dged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientífic and Technological Development – Brazil, in the form of a



from the mechanical resistance tests p ni films evolving from the experimental fa mi films produced with varying loads of s s (+1) of carrageenan and (0) of xanthar



alyses via X-ray transmission of the bioorigami film cin/mLfilm, being (a) a slant profile image of the perpendicular to the surface of the bioorigami film



and (b) pe





- >> Since release of sericin from the biopolysaccharide matrix of the bioorigami film occurred by non-Fickian diffusion for sericin loads up to 20 mgsericin/mLfilm, it can be utilized in the occlusive regeneration of wound damages for long periods of time.
- >>The results gathered clearly suggest that the optimized bioorigami films integrating crude sericin extract had both obvious radical scavenging effects with the 2.2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) assay, and exhibited prolonged release of the bioactive protein, further suggesting potential biopharmaceutical exhibited protocode the series of the bioactive protein. applications such as in skin regeneration.







Figure 6. FESEM photo rariable amounts or server x100, a5: x500, a6: x250 Jsericin/mLfen, c4: x100, c5: d6: x2500; 10 mg<sub>sericin</sub>/m nifications (0 mg<sub>seri</sub> x100, b5: x500, b6: icin/mL<sub>film</sub>, a4: x100, a5: >
x2500; 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>,
00, d5: x500, d6: x2500;



0 20 30 Incentration in the Bioc rigami film (mg/mL) modelling of the serie mi films during a 12-h

APÊNDICE D - Artigo científico publicado: Liliam K. H. Rocha; Laura I. L. Favaro; Alessandra C. Rios; Erica C. Silva; Welida F. Silva; Tatiane P. Stigliani; Mariana Guilger; Renata Lima; José M. Oliveira Jr.; Norberto Aranha; Matthieu Tubino; Marta M. D. C. Vila; Victor M. Balcão (2017) Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications, *Process Biochemistry* 61: 163-177. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.019. Contents lists available at ScienceDirect

# ELSEVIER



journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Process Biochemistry

# Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemicalbiological characterization for biopharmaceutical applications



Liliam K.H. Rocha<sup>a</sup>, Laura I.L. Favaro<sup>a</sup>, Alessandra C. Rios<sup>a</sup>, Erica C. Silva<sup>a</sup>, Welida F. Silva<sup>a</sup>, Tatiane P. Stigliani<sup>a</sup>, Mariana Guilger<sup>a</sup>, Renata Lima<sup>a</sup>, José M. Oliveira Jr.<sup>a</sup>, Norberto Aranha<sup>a</sup>, Matthieu Tubino<sup>c</sup>, Marta M.D.C. Vila<sup>a</sup>, Victor M. Balcão<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> PhageLab – Laboratory of Biofilms and Bacteriophages of UNISO, i(bs)2 – Intelligent Biosensing and Biomolecule Stabilization Research Group, University of Sorocaba,

Sorocaba, SP, Brazil

<sup>b</sup> CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

Keywords: Sericin Bombyx mori Extraction Antimicrobial/antioxidant activity Cyto/genotoxicity Physico-chemical characterization

### ABSTRACT

In the present research effort, production of crude sericin extracts from *Bombyx mori* silk cocoons was attempted using two different approaches. Sericin was extracted from cocoons by high-temperature autoclaving followed either by lyophilization or freezing-thawing precipitation, to obtain a crude sericin powder. The physico-chemical and biological characteristics of the crude sericin extracts were evaluated in detail, via FTIR, XRD, XRF, XRT, UV–vis scanning, TGA and DSC, protein quantification, antimicrobial activity, free radical scavenging activity, cytotoxic activity, potential for inducing chromosomal aberrations via *Allium cepa* assays, and genotoxicity via Comet<sup>™</sup> analyses. The molecular weight distribution of the crude sericin extracts was also investigated, via sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), and the results duly compared to standard sericin. The results gathered clearly suggest that the crude sericin extracts had both obvious radical scavenging effects with the 2.2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) assay, and antibacterial activity, further suggesting that this protein might be a valuable addition for either food and biopharmaceutical applications.

### 1. Introduction

Sericin from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori* is a watersoluble globular glycoprotein, collectively representing a family of proteins with molecular weights ranging from ca. 10 kDa to ca. 310 kDa [1] or from 20 kDa to 400 kDa [2,3]. Sericin is primarily amorphous and water soluble, acting as a gum binder to maintain the structural integrity of the cocoon [4]. Sericin is rich in serine (ca. 32%), aspartic acid (ca. 16.8%) and glycine (ca. 8.8%), and thus possesses a high concentration of hydroxyl groups [5]. Sericin surrounds the fibroin fibers with successive sticky layers, forming the cocoon, and accounts for ca. 20%–30% of the total cocoon mass [6]. In its composition, sericin integrates 18 different types of aminoacids most of which display strong polar (hydroxyl, carboxyl and amino) side groups [1,2,7], strongly influencing its purported physical and biological properties. Sericin has been found to exhibit several biological (beneficial) activities, such as antioxidant and antityrosinase properties [2,8–10], promotion of

collagen production (important in wound healing applications on both skin and corneal tissues) [2,11-14], anti-inflammatory activity [2,15,16], antitumoural activity [2,16,17], anti-ageing and antiwrinkle [2,8,18-22], antimicrobial [2,23-28] and use in controlled drug-releasing biomaterials to promote stability and prolonged release [29,30]. Additionally, Kunz et al. [2] and Zhaorigetu et al. [17] reported that sericin exerts a surprising inhibitory activity upon UV radiation-induced acute damage and tumour promotion by reducing the oxidative stress in the skin of hairless mouse. Despite all these reported properties a major obstacle to the widespread use of sericin in biomedical applications remains, mainly related to reports pointing to hypersensitivity to this compound in medical uses. However, due to the unique properties of this globular protein (representing in fact a family of proteins), sericin has great potential to be used in food, cosmetic and biopharmaceutical products, provided that it is invisible to the immune system by encapsulation within stealth-like nanodevices and that the concentrations used are kept at low levels. Hence, sericin was

\* Corresponding author at: Universidade de Sorocaba (UNISO), Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba, SP, São Paulo, Brazil.

E-mail address: victor.balcao@prof.uniso.br (V.M. Balcão).

http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.019 Received 18 March 2017; Received in revised form 16 June 2017; Accepted 17 June 2017 Available online 27 June 2017

1359-5113/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

considered in this research effort as a new potentially valuable bioactive protein, and therefore attempts to produce crude sericin extracts departing from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori* were pursued together with an extensive physico-chemical and biological characterization of the crude extracts. The physico-chemical and biological characteristics of the crude sericin extracts produced were evaluated in detail.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All reagents used were of analytical grade or better, and were used without further purification. Tap water was purified in a Master System All (model MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brazil) to a final resistivity of ca. 18.18 M $\Omega$  cm and conductivity of 0.05  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>. Sericin (ref. SIGMA S5201-1G, referred as A1 sample from now on), Coomassie Brilliant Blue G250 (ref. SIGMA 27815-25G-F), *ortho*-phosphoric acid (85%, v/v; ref. SIGMA V000145-1L), UVASOL<sup>TM</sup> ethanol for spectroscopy (99.8%, v/v; ref. SIGMA 32205-1L), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (ref. SIGMA D9132-1G), and MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

### 2.2. Biological materials

The Bombyx mori cocoons were a kind gift from Fiação de Seda BRATAC S.A. (Londrina/PR, Brazil). The bacterial strains utilized in the antimicrobial assays were Staphylococcus aureus CCCD-S007, Pseudomonas aeruginosa CCCD-P004, and Escherichia coli CCCD-E003, supplied by CEFAR Diagnóstica (Jurubatuba/SP, Brazil). The microbiological growth media utilized were BHI (Brain Heart Infusion) from HiMedia Laboratories (Mumbai, India) and Bacteriological Agar from Prodimol Biotecnologia S.A. (São Paulo/SP, Brazil). The common onion seeds (Baia Periforme cultivar) utilized in the Allium cepa assays were acquired from FELTRIN<sup>®</sup> (Farroupilha/RS, Brazil). The HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cell line used in the genotoxicity (Comet<sup>™</sup>) and MTT assays were purchased from Sigma-Aldrich (ref. SIGMA S200-05N) (St. Louis MO, USA). The cells were maintained at 37 °C under moist atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing D-glucose (4.5 g/L), L-glutamine (584.0 mg/L), sodium pyruvate (100 mg/mL), and sodium bicarbonate (3.7 g/L) (Gibco Life Technologies, São Paulo/SP, Brazil), supplemented with 10% (w/w) fetal bovine serum and 1% (w/w) antibiotics (penicillin (100 IU/mL) and streptomycin sulfate (100  $\mu$ L/mL)).

### 2.3. Extraction of sericin

Approximately 15 g of *Bombyx mori* cocoons were weighed into a 2000 mL Erlenmeyer flask, added with 1000 mL of ultrapure water, and autoclaved at 120  $^{\circ}$ C during 60 min.

# 2.3.1. Extraction via high-temperature autoclaving followed by freezing-thaving

After autoclaving, sericin was extracted via precipitation according to the procedure described by Aguiar [31], with slight modifications. The excess cocoon mass was then withdrawn, the resulting solution was poured into a PET-bottle, and frozen at -20 °C during 24 h. Following the freezing period, the frozen solution was thawed at room temperature and vacuum-filtered through a 0.45 µm pore diameter filter using a Millipore filtration device, dried and grinded. Such resulting crude sericin extract powder is referred as A2 sample from now on.

### 2.3.2. Extraction via high-temperature autoclaving and lyophilization

After autoclaving, sericin was extracted according to the procedures described by Patel and Modasiya [32] and Dias et al. [33], with slight

modifications. The excess cocoon mass was then withdrawn and the resulting solution was vacuum-filtered through a 0.45  $\mu m$  pore diameter filter using a Millipore filtration device. The filtered solution was then distributed into several glass flasks and duly frozen at  $-86\ ^\circ C$  prior to lyophilization. After lyophilization, the crude extract was duly grinded. The resulting crude sericin extract powder is referred as A3 sample from now on.

### 2.4. Moisture content analyses via infrared heating

Moisture content determination of the crude sericin extracts was carried out in an infrared moisture analyzer from Shimadzu (model MOC63U, Kyoto, Japan), equipped with a programmable timer, self-calibration and temperature adjusting between 50 °C and 200 °C, with parameters set at temperature of 60 °C in "slow" mode.

### 2.5. FTIR analyses

The FTIR spectra of pure sericin (A1) and of samples of crude sericin extracts (A2 and A3) were gathered using a Fourier Transform Infrared 100 Spectrophotometer from Agilent (model Cary 630, Santa Clara CA, U.S.A.), in the wavenumber range from 4000 cm<sup>-1</sup> to 400 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>, and using Happ-Genzel apodization.

### 2.6. XRD analyses

X-ray diffractograms of pure sericin (A1) and of samples of crude sericin extracts (A2 and A3) were gathered in a X-ray Diffractometer (XRD) from Shimadzu (model XRD7000, Kyoto, Japan), using X-ray radiation from a copper lamp with radiation K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$  Å) filtered through a Cu target. The X-ray scanning was performed at diffraction angles of 2-Theta (from 5° to 90°, with increments of 0.02° and rate of 2° min<sup>-1</sup>), with a voltage of 40 kV, electric current intensity of 30 mA, and X-ray power of 3 kW.

### 2.7. Thermal analyses via TGA and DSC

Thermogravimetric characterization of the crude sericin extracts was accomplished via TGA analysis whereas thermal analyses were pursued by DSC. The TGA analyses were carried out using a thermogravimeter from TA Instruments (model 2050, New Castle, U.S.A.), whereas the DSC analyses were carried out using a differential scanning microcalorimeter from TA Instruments (model MDSC 2910, New Castle, U.S.A.). Thermal characterization of pure sericin (A1) and of samples of crude sericin extracts (A2 and A3) was accomplished via both TGA and DSC, following the procedure described by Glasser et al. [34]. For both the TGA analyses and the calorimetric assays, samples (ca. 7 mg A1, 7 mg A2 or 7 mg A3) were weighed directly into the interior of highpressure aluminium pans, and duly sealed by pressure. A reference aluminium pan was also prepared by simply sealing air inside an empty case. The samples were then subjected to a linear temperature increase from ca. 20 °C up to 250 °C, at a constant heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, under an inert atmosphere maintained with a constant flow of argon of 50 mL min<sup>-1</sup>, during which the amount of heat absorbed by the hydrogel samples was recorded. During the analyses, data (heat absorption) was gathered at a sampling rate of 0.2 s per data point.

### 2.8. Electrophoretic (SDS-PAGE) analyses

The molar mass distribution of sericin was investigated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using a Mini-PROTEAN<sup>\*</sup> Tetra Cell 4-gel system for vertical electrophoresis from Bio-RAD (California CA, U.S.A.) coupled with a PowerPac<sup>IM</sup> HC power supply unit (Bio-RAD, California CA, U.S.A.) and a Digital Dry Bath also from Bio-RAD. To determine both the protein profile of pure sericin (A1) and of samples of crude sericin extracts (A2 and A3) and

their molecular weight distribution, 500 µL of crude sericin extract solution (containing either 50 mg<sub>extract</sub> (if staining with Coomassie was sought) or 120 mg<sub>extract</sub> (if silver staining was sought)) were added to one volume (500 µL) of disruption buffer (1.51% (m/v) Tris-Base, 0.5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 4% (m/v) sodium dodecyl sulfate, 10% (v/v) glycerol, and 0.012% (m/v) bromophenol blue) in an Eppendorf (with its lid punctured by a needle) and boiled for 10 min. Then, SDS-PAGE analysis of the sample supernatant (10 µL) and molecular weight markers (10 µL of Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards from Bio-RAD, with protein standards ranging from 10 kDa to 250 kDa) was performed, with the gels run at a voltage of 200 V, 20 mA per gel, 20 W, for 45 min, after which the gels (run in duplicate) were either stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (thus allowing detection of ca. 70 µg of protein) or developed by silver staining (thus allowing detection of as little as 7 µg of protein). Following staining, the gels were then photographed for analysis.

### 2.9. Protein quantification via modified Bradford method

A modification of the Bradford method for protein quantification was used according to the procedure described by Robyt and White [35] and Balcão et al. [36]. Both pure (A1 sample) and sericin extracts (A2 and A3 samples, in the form of crude powders) were diluted in ultrapure water and diluted as necessary. Aliquots of 500  $\mu$ L of the sericin solutions were added to 4.5 mL of the solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 (the working solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 was prepared according to the procedure described elsewhere [35,36]), incubated at room temperature for 5 min and absorbance was measured at 595 nm using disposable plastic cuvettes (Kartell) in a UV–vis Spectrophotometer from Perkin Elmer (model Lambda 3s, Waltham MA, U.S.A).

# 2.10. Evaluation of antimicrobial activity of sericin via the agar-diffusion method

The potential antimicrobial efficacy of both pure sericin (A1) and crude sericin extracts (A2 and A3) was determined via the agar diffusion technique for susceptibility to antimicrobials described by Bauer et al. [37] and Jorgensen and Ferraro [38], as well as according to the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute [39,40]. The assays were carried out in duplicate, using a strain of Staphylococcus aureus CCCD-S007, a strain of Pseudomonas aeruginosa CCCD-P004, and a strain of Escherichia coli CCCD-E003 (maintained at -80 °C in culture medium with 40% (v/v) glycerol). For revival of the bacterial strains, these were, individually, suspended in 50 mL of BHI nutritive broth (Brain Heart Infusion) and incubated in an orbital shaker at 100 rpm and 37 °C during 24 h, to allow for growth of the bacteria. Aqueous (sterile ultrapure) sericin (either pure (A1) or crude extracts (A2 and A3)) solutions were prepared, with concentrations of  $50 \text{ mg}_{crudextract}/mL$ , following exposure of pure and crude sericin powders to ultraviolet light during 15 min. After dilution, all sericin solutions were filtered through Chromafil<sup>m</sup> filters (0.20  $\mu$ m  $\times$  25 mm). The bacterial strains were, initially, inoculated in BHI nutritive broth (Brain Heart Infusion) and maintained at  $(37 \pm 0.5)$  °C during 24 h, to allow for growth of the bacteria. All bacterial cultures were standardized at 0.5 in the McFarland scale, containing ca.  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, by performing dilutions in sterile BHI broth until attaining a turbidity equivalent to the 0.5 standard in the McFarland scale. Following this time period, the bacterial cultures were inoculated by spreading on the surface of two Petri plates containing solidified TSA (Tryptic Soy Agar) as culture medium, and the samples to be tested were then immediately applied on the inoculated medium, in duplicate, with the aid of sterile tweezers near a Bunsen burner flame (sterile filter paper discs (ca. 7.0 mm in diameter) impregnated by plunging in the aqueous sericin solution). Upper left quadrant was applied with a disk impregnated with A1 sample solution, upper right quadrant was applied with a disk

impregnated with A2 sample solution, lower left quadrant was applied with a disk impregnated with A3 sample solution, and lower right quadrant was applied with a disk impregnated with antibiotic solution (penicillin (10000 U.I./mL)/streptomycin (10 mg/mL)). The Petri plates were then allowed to dry, inverted and incubated under aerobic conditions at (36  $\pm$  0.5) °C during 24 h. After this time period, the plates were visually inspected for observation (or not) of any growth inhibition halos.

# 2.11. Evaluation of the free radical scavenging activity via the DPPH method

The potential for free radical scavenging activity of sericin samples A1, A2 and A3, using the DPPH reagent, was evaluated by a method described by Wu et al. [7] and Amarowicz et al. [41], with slight modifications. To 500 µL of crude sericin extract dissolved in ultrapure water (A1 sample: 5 mg/mL and 15 mg/mL; A2 sample: 15 mg/mL and 60 mg/mL; A3 sample: 25 mg/mL and 60 mg/mL) or ascorbic acid dissolved in ultrapure water (0.5 mg/mL), 3500 µL of freshly prepared DPPH radical in a methanol solution  $(1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L})$  was added and vortexed. After reaction for 25 min at room temperature (25 °C), in the dark, the reaction mixtures were centrifuged at 6400 rpm for 5 min. The decolorizing result of the supernatant was then assayed spectrophotometrically at 517 nm and compared with a blank control containing the sericin (either A1, A2 or A3) solution and pure methanol instead of DPPH. In addition, a blind control containing methanol and ultrapure water instead of sericin solution (500 µL ultrapure water added to 3500 µL of methanol) was also assayed. Calculation of free radical scavenging activity was carried out using the equation Scavenging activity (%) =  $\left(1 - \frac{Abs_{sample}}{Abs_{blind}}\right)$  $\times$  100, where scavenging activity refers to the free radical scavenging percentage, Abs<sub>sample</sub> refers to the absorbance of the sample at 517 nm, and Abs<sub>blind</sub> refers to the absorbance of the blind control at 517 nm. The spectrophotometer was

# 2.12. Determination of the cytotoxicity potential of sericin, via the MTT assay

zeroed with plain ultrapure water.

Evaluation of the cytotoxicity potential of sericin to HUVEC (permanent) cell lines (endothelial cells withdrawn from the human umbilical vein) (assessment of cellular viability) was carried out using the MTT assay. For cell proliferation, one used specific cell culture bottles containing DMEM culture medium supplemented with bovine fetal serum (10%, w/w) and antibiotic (100 UI<sub>penicillin</sub>/mL plus 100  $\mu L_{streptomycisulfate})$  (1%, w/w), at pH 7.4, and incubated at 37  $^\circ C$ under a humid atmosphere containing 5% CO2. Upon reaching confluence, the cells were disadhered by using trypsin and used in accordance with the test methodology. In these assays, plating out was performed by inoculating approximately  $0.5 \times 10^4$  viable cells in each well of a 96-well microplate, using a cell suspension volume of 100 µL, followed by incubation for 48 h until semi-confluence was reached. Cell viability analysis using the MTT technique began with plating of a cell suspension containing  $0.5 \times 10^5$  cells/mL. After 24 h (time needed for cell adherence and stability) the cells were placed in contact with A1, A2 and A3 samples (in the amounts of 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, and  $20.0\ mg_{sample}/mL_{DMEMculturemedium})$  for an extra 24 h, followed by centrifugation. A negative control (plain DMEM medium) was also prepared, without addition of sericin sample. The plates were then kept for 24 h in a heating cabinet set at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After this step, the samples were washed away two times with sterile PBS buffer and the cells exposed to MTT (0.5 mg/mL, 100 µL). Cellular viability was determined using reduction of MTT. After 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the number of viable cells was determined by measuring the amount of MTT converted to formazan (a purple compound) by the mitochondrial dehydrogenases. For this, the MTT solution was removed from the wells and 100  $\mu$ L DMSO were added to each well and, after 5–10 min, absorbance readings performed at 540 nm using an ELISA microplate reader from Robonik India Private Ltd. (model *Readwell PLATE*, Maharashtra, India). All tests were performed in sextuplets for each concentration of sample tested. The analysis of results was carried out assuming as 100% of cell viability the average of the absorbance values obtained for the untreated control. Departing from this assumption, calculations of cell viability (%) relative to the negative control were performed for each sample concentration.

# 2.13. Evaluation of the DNA damage potential of sericin, via the Comet^ $\mbox{\tiny M}$ assay

HUVEC cells were placed in contact with the samples (A1, A2 and A3 samples, at mass concentrations 10 mg/mL, 15 mg/mL and 20 mg/ mL for each sample, with the negative being plain DMEM medium in contact with the HUVEC cells) during a period of 1 h. For preparing the slides, each treatment group (A1 sample, A2 sample and A3 sample) involved 15 µL of cells (HUVEC, following contact with the samples) in 100  $\mu$ L of low melting point agarose (0.8%, w/v), with the mixtures being placed onto microscope slides that had been pre-coated with normal melting point agarose (1.5%, w/v). Tests were carried out in duplicate for each group. Coverslips were positioned over the samples in the microscope slides, and the slides were placed under refrigerating conditions during 10 min for polymerization to occur. Following polymerization, the coverslips were carefully removed so as not to damage the gel, and the slides were treated in a container with an ice-cold (4 °C) lysis solution (NaCl 2.5 mol dm<sup>-3</sup>, EDTA 0.1 mol dm<sup>-3</sup>, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) 10 mmol dm<sup>-3</sup>, and 1% Triton X-100<sup>™</sup>, pH 10), completely wrapped with aluminium foil, during 60 min. The treatment groups were then incubated in an electrophoresis buffer (NaOH 0.3 mol dm<sup>-3</sup> and EDTA 1 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 13) during 20 min, followed by electrophoretic analysis for 20 min at 22 V, 300 mA and 10 W, at 1.3 V/cm. After electrophoresis, the slides were removed from the electrophoresis container and covered with a neutralizing solution (Tris 0.4 mol dm  $^{-3},\,pH$  7.5) for 5 min, washed three times with distilled water, and allowed to stand overnight at room temperature. Prior to staining, the dry slides were left in a fixing solution (trichloroacetic acid 15% w/v, zinc sulfate 5% (w/v), and glycerol 5% (v/v)) for 10 min, after which they were further washed three times with ultrapure water. Following these procedures, the slides were allowed to stand at room temperature for 1.5 h, after which they were rehydrated with ultrapure water and stained for approximately 35 min with a silver staining solution consisting of solution A (ammonium nitrate 0.2% (w/ v), silver nitrate 0.2% (w/v), tungstosilicic acid 0.5% (w/v), formaldehyde 0.15% (v/v), and sodium carbonate 5% (w/v)) and solution B (sodium carbonate 5% (w/v)) (34:66, v/v). Subsequently, the slides were bathed in a stop solution (acetic acid, 1% (v/v)) and then washed with ultrapure water. Finally, the slides were again gently washed with ultrapure water and allowed to dry at room temperature. Silver staining is analogous to fluorescence, during which the positive charge of the silver cations enables them to bind to DNA and DNA fragments, producing the characteristic color. Throughout the procedures involving cellular materials, both natural light and light from fluorescent lamps were avoided so as to prevent their possible influence upon the results. Optical microscopy analyses were performed using a Zeiss Axiovert-60 optical microscope from Carl-Zeiss (Göschwitzer Str., Jena, Germany), and at least 50 cells were counted on each slide, with 2 slides for each test (approximately 100 cells). The analyses were carried out in duplicate, totalizing 100 cells for the analysis of each sericin (A1, A2 and A3) sample solution tested. The Comet assay analyses were performed by assigning a score from 0 to 4, according to both the amount of DNA in the tail and the length of the tail, as follows: score 0, corresponding to intact cells (no scattering whatsoever, or below 5% damage); score 1, corresponding to cells with minimal damage (light scattering, with a very short tail, 5–20% damage); score 2, corresponding to those cells with average damage (mild scattering and large tail, 20–40% damage); score 3, corresponding to those cells with severe damage (large scattering and large tail, 40–95% damage); and score 4, corresponding to those cells with maximum damage (minimal nucleus, large scattering and large tail, more than 95% damage) [42]. For this visual method, the number of cells found for each score was multiplied by the value of the score; all the values were summed at the end of the analysis of each slide. Because the score depended on the number of cells observed, an index of tail damage (or DNA damage) was created by normalizing the score given to the slide by the number of cells analyzed on the slide. The statistical analysis performed to the data gathered from the Comet<sup>™</sup> test was carried out using the software GraphPad Prism v. 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, U.S.A.), by applying the statistical Tukey test with multiple comparisons between the samples.

# 2.14. Analysis of potential chromosomal aberrations induced by sericin, via the Allium cepa assay

Evaluation of the potential of A1, A2 and A3 samples to induce chromossomal aberrations also proceeded via using common onion seeds (Baia Periforme cultivar from FELTRIN<sup>®</sup> seeds (Farroupilha/RS, Brazil)), through the Allium cepa assay, allowing to observe chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of Allium Cepa. Allium cepa is one of the most suitable plants for detecting the genotoxic potential of target compounds. The test enables the assessment of different genetic endpoints, making possible damage to the DNA of humans to be predicted. Common onion (Allium cepa L.) has eight pairs of relatively large chromosomes (2n = 16) that allows for the easy detection of chromosomal aberrations [43]. The size of chromosomes makes Allium cepa tips as favourable material for the study of the effects of chemicals on frequency of chromosomal aberrations which are biomarkers of damage of genetic material. The root tip cells have a very low spontaneous aberration frequency and a stable chromosome number. For this test, seeds of Allium cepa were allowed to germinate on top of moist (sterile) paper filter within Petri dishes. Following germination, the roots were collected by the time they attained ca. 20 mm in length. The roots were then placed in contact with the sericin samples to be tested (A1, A2 and A3 sample solutions at a concentration of 20 mg/mL), using a minimum sample volume so as to cover the roots, for a period of 24 h. Ultrapure water was used as negative. Following this time period, the Allium cepa roots were removed from the sample solution tested, washed with ultrapure water and added with fixing solution (absolute ethanol: glacial acetic acid, 3:1). The flasks were then left at room temperature during 6-8 h, and stored under refrigerating conditions. For preparation of the microscope slides, the Allium cepa roots were removed from the fixing solution, duly washed three times with ultrapure water and subjected to acid hydrolysis (1 mol/dm<sup>3</sup> HCl at 60 °C for 9 min). Following the hydrolysis step, the roots were washed three times with ultrapure water for 5 min. The excess water was then removed from the roots using filter paper, and the roots were dipped in Schiffs reagent (in the dark) for a period of 2 h. Following this period, the roots were removed from the Schiff's reagent and washed with ultrapure water until removal of the excess dye. The meristematic region of the roots (stained tip) were cut over a glass slide, added with a drop of acetic Carmine (2%, w/v) (cytoplasmatic dye), and covered with a laminula, gently tapped with a tweezer for smashing the roots and spreading the cells. The preparations were then analyzed under an optical microscope.

# 2.15. Determination of elemental composition by X-ray fluorescence (XRF) analyses

The elemental composition of both A1, A2 and A3 samples and plain *Bombyx mori* cocoon was determined using a X-ray fluorescence spectrometer with energy dispersion (EDXRF) from Amptek (Bedford, Massachusetts, U.S.A.), which comprised an Ag anode and a  $25 \text{ mm}^2$  SDD X-ray detector with a resolution of 128 eV at the Mn-K $\alpha$  line. The voltage applied to the X-ray tube was of 30 kV, 10  $\mu$ A of current, with 10% lag time in the detector. All measurements were carried out using atmospheric air, and the measuring time was set at 300 s (live time) for each sample. A collimator with an aperture of 1 mm was used in the exit of the X-ray source. The spectra were gathered sequentially, with a resolution of 0.02 keV, from 0 keV to 30 keV.

### 2.16. Tomographic analyses via X-ray transmission (XRT)

The tomographic images of the cocoon wall were gathered using a 3rd generation computed X-ray transmission tomograph [44] from Bruker microCT (model SkyScan 1174, Kontich, Belgium). The cocoon samples were placed inside the tomograph chamber, and image slices were gathered using the following configurations of the tomographic system: operating voltage set at 35 kV and electric current with 661 µA. The technique employed for obtaining the tomographic image involved acquisition of a large number of radiographs of the object (image slices), obtained by measuring the intensity of X-rays transmitted through the cocoon sample, at different angular positions. The cocoon samples were rotated 180°, with angular increments of 0.8°, producing 225 radiographs (projections) per image, each containing  $1304 \times 1304$ (width  $\times$  height) pixels with a spatial resolution of 6.92  $\mu$ m. The exposure time per projection was 5000 ms. At the outlet of the X-ray source one utilized an Al filter with 0.25 mm thickness. Appropriate mathematical algorithms were then used to reconstruct the three-dimensional (3D) tomographic images of the cocoon samples, through the appropriate composition of bi-dimensional (2D) images. The 3D images possessed  $652 \times 652 \times 652$  pixels and the same spatial resolution of the 2D images, and thus the volume of data generated for each cocoon sample is isotropic with relation to the spatial resolution. Having all the projections (radiographs gathered at each angular position), one utilized the software NRecon<sup>™</sup> from Bruker (version 1.6.9.4, Kontich, Belgium), which uses the algorithm of Feldkamp et al. [45] in the process of reconstructing the tomographic images, and the software CTVox<sup>™</sup> (version 2.6.0 r908-64bit, from Bruker microCT), CTan<sup>™</sup> (version 1.13.5.1-64bit, from Bruker microCT) and CTvol (version 2.2.3.0-64bit, from Bruker microCT) for processing the tomographic images.

### 2.17. Field emission scanning electron microscopy analyses (FESEM)

The surface and morphology of the *Bombyx mori* cocoon were observed in a field emission scanning electron microscope (FESEM) from FEI (model QUANTA FEG 250, FEI Company, Hillsboro, U.S.A.) equipped with a field emission source microscopy. Samples of cocoon wall were cut and sputter-coated with a Au/Pd film (80%/20%) via cathodic pulverization on a carbon layer produced by evaporation in a metalizing device from BAL-TEC (model BAL-TEC MED 020, BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein). Microphotographs were gathered using electron beams with acceleration speeds of 10–20 keV via random scanning.

### 3. Results and discussion

The sericin extractions carried out via both methods were assessed in terms of the yields produced. The extraction using the method of freezing/thawing produced a yield of 15% (w/w), whereas the extraction using the method of lyophilization produced a yield of 18% (w/w). The average moisture content of both crude sericin extracts (viz. A2 and A3 samples) was 10.5% (w/w), a value that compares with the same parameter of the standard sericin (viz. A1 sample), and is in agreement with results published elsewhere [8].



**Fig. 1.** FTIR spectra of A1 sample powder (**a**), A1 sample solution (**b**), A2 sample powder (**c**), A2 sample powder aqueous supernatant (**d**), A2 sample powder aqueous pellet (**e**), A3 sample powder (**f**), A3 sample powder aqueous supernatant (**g**), and A3 sample powder aqueous pellet (**h**).

### 3.1. FTIR analyses

The infrared spectra of A1 sample powder (a), A1 aqueous solution (b), A2 sample powder (c), A2 aqueous solution supernatant (d), A2 aqueous solution pellet (e), A3 sample powder (f), A3 aqueous solution supernatant (g), and A3 aqueous solution pellet (h), are displayed in Fig. 1. Comparing the spectrum of A1 sample powder (see Fig. 1a) with the spectra of both A2 and A3 sample powders (see Fig. 1c and f) and the spectra of their pellets following centrifugation of aqueous (A2 and

A3) sericin solutions (see Fig. 1e and h), the same peaks can be observed with only minor variations in peak intensity. This clearly suggests that the chemical aspect of sericin was preserved [46] during either extraction process.

According to Gupta et al. [47], protein molecules may present such characteristic energy absorption between wavenumbers 1650 cm<sup>-1</sup> to  $1630 \text{ cm}^{-1}$  for primary amides, between wavenumbers  $1540 \text{ cm}^{-1}$  to  $1520 \text{ cm}^{-1}$  for secondary amides and between wavenumbers  $1270 \text{ cm}^{-1}$  to  $1230 \text{ cm}^{-1}$  for tertiary amides. From inspection of the transmittance spectra depicted in Fig. 1, one can observe peaks within the wavenumber range probably representing primary amides at approximately 1600  $\text{cm}^{-1}$  due to the stretch of the carbonyl group (C= O), secondary amides at approximately 1540  $\text{cm}^{-1}$  and tertiary amides in the region of 1230 cm<sup>-1</sup> due to the stretch of the bond C-N. Additionally, the positions of these peaks confirm the protein, such as  $1650 \text{ cm}^{-1}$  (random coil), and  $1630 \text{ cm}^{-1}$  (beta-sheet), for primary amide, 1540 cm<sup>-1</sup> (random coil) and 1520 cm<sup>-1</sup> (beta-sheet) for secondary amide, and 1270 cm<sup>-1</sup> (beta-sheet) and 1230 cm<sup>-1</sup> (random coil) for the tertiary amide [47]. A1 sample (see Fig. 1a) and A2 and A3 sample powders (see Fig. 1c and f) produced very similar infrared spectra and are in close agreement with those reported by Gupta et al. [47]. To see if the crude sericin extracts (A2 and A3 samples) would produce similar solutions to that of the standard sericin (A1 sample), one produced aqueous solutions which were subjected to centrifugation so as to remove any solids in suspension. The results produced from FTIR analyses performed to the supernatants (see Fig. 1b, d and g) were quite similar to one another, with a major peak produced between 3284 cm<sup>-1</sup> and 3309 cm<sup>-1</sup>, corresponding to OH groups in water, and another major peak at 1639 cm<sup>-1</sup>, corresponding to a stretch of the C= O group of primary amides, most likely due to the strong hydrophilic character of primary amides. Regarding the pellets of the A2 and A3 sample solutions following centrifugation (see Fig. 1e and h), the FTIR spectra revealed exactly the same peaks as those for the sericin powders. Although lower in intensity, the peaks exhibited by both A2 and A3 samples were exactly the same as those produced by A1 sample, thus confirming the identity of the sericin extracted by both extraction processes tested. The stretching vibrations observed in the wavenumber region between 3272 and 3309  $\text{cm}^{-1}$  [48], accounting for the large peaks observed is most likely accounted for by hydroxyl groups from water molecules. Characteristic peaks indicative of protein lie between  $1390 \text{ cm}^{-1}$  to  $1250 \text{ cm}^{-1}$  for C–N bonds, between  $1640 \text{ cm}^{-1}$  and  $1500 \text{ cm}^{-1}$  for N–H groupings, and between  $3500 \text{ cm}^{-1}$  and  $3300 \text{ cm}^{-1}$  corresponding to OH groups in water [49].

### 3.2. XRD analyses

The results obtained from the X-ray diffraction analyses (XRD) performed to both A1 sample and A2 and A3 samples are displayed in Fig. 2b in the form of normalized diffractograms, and allows to observe an amorphous behavior without peaks of crystallinity.

Normalization of intensity in all diffractograms was performed by dividing the intensity values by the maximum intensity value in each diffractogram (see Fig. 2a), thus allowing a better comparison between the X-ray diffractograms of the three sericin powders. The diffractograms of A1 sample and A2 and A3 samples exhibited a wide noisy with more well-defined peaks in the region band, of  $18.00 \le 2\theta \le 26.00$ . The X-ray diffactogram patterns displayed characteristic peaks of crystallinity at  $2\theta \cong 19^{\circ}$  (higher intensity),  $2\theta \cong 22^{\circ}$ (less defined and shallow) and a wide range of low intensity signals, indicating the dominance of amorphous material in the sericin powders [50]. When comparing the diffractograms of both A2 and A3 samples, the one pertaining to freeze/thaw-extracted (A2 sample) sericin resembles more that of the standard sericin (A1 sample, see Fig. 2a and b, purple and orange curves). The lyophilization process involves freezing



**Fig. 2.** X-ray diffractograms (XRD) (**a**) and normalized intensity diffractograms (**b**) of A1 samples (orange curves), A2 samples (purple curves) and A3 samples (green curves). The X-ray diffractograms were gathered using Cu target-filtered X-rays. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the liquid formulation matrix to a temperature at which the ice nucleation occurs and the solution freezes. During the freezing process, the protein in solution is exposed to the stress of temperature changes as well as changes in concentration induced due to cryoconcentration. This most likely produced the aforementioned resemblance in the X-ray diffraction patterns.

### 3.3. Thermal analyses via TGA and DSC

The mass decrements during sample heating were determined from thermogravimetric curves, whereas the temperature of the maximum rate of mass change (T<sub>max</sub>) was determined from the maximum of the 1st derivative of the weight loss curves [51]. According to Dandurand et al. [51], the global trend of the three thermogravimetric plots corresponds to the classical thermal behavior of freeze-dried proteins. The first stage, occurring between 25 °C and 200 °C (see Fig. 3a), is generally linked to the evaporation of water adsorbed to the protein moieties, and corresponds to ca. 10% of the total sample mass, meaning that freezing/thawing and lyophilization are equally efficient. The second stage, occurring between 200 °C and 680 °C (see Fig. 3a) is associated with the degradation of the protein samples, namely the progressive deamination, decarboxylation and depolymerization arising from breaking of (poly)peptide bonds, and concomitant carbonization of the primary structure (between ca. 450 °C and 680 °C). The degradation of A1 sample consists of three well-marked steps as shown by three maxima on the 1 st derivative of the weight loss curve (see Fig. 3b) at  $T_{max1} \approx 250$  °C,  $T_{max2} \approx 320$  °C and  $T_{max3} \approx 550$  °C, in contrast with the degradation of A2 and A3 crude sericin extract samples that occurs in a narrower temperature range with two maxima on



**Fig. 3.** Thermogravimetric curves (**a**) and 1st derivative of the weight loss curves (**b**) of A1 samples (blue lines), A2 samples (pink lines), and A3 samples (gray lines). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the 1 st derivative of the weight loss curve (see Fig. 3b) at  $T_{max1}\approx 270~^{\circ}C$  and  $T_{max2}\approx 320~^{\circ}C$  (A2 sample) and at  $T_{max1}\approx 330~^{\circ}C$  and  $T_{max2}\approx 580~^{\circ}C$  (A3 sample). Our results are in agreement with the results published by Dandurand et al. [51] pertaining to the thermogravimetric analysis of peptide fragments. The 1st derivative of the weight loss curve (i.e., the rate of mass change, see Fig. 3b) can be used to tell the points at which weight loss is most apparent (inflection points), viz. ca. 250 °C, 320 °C and 550 °C for A1 sample, ca. 270 °C and 320 °C for A2 sample, and 330 °C and 580 °C for A3 sample.

The results from DSC analyses of A1, A2 and A3 samples, recorded under heating mode between 25 °C and 250 °C, are displayed in Fig. 4. The endothermic peak observed at 49.35 °C (A1 sample), 57.60 °C (A2 sample) and 58.81 °C (A3 sample) may be considered as the first order transition commonly observed in a broad class of hydrated biopolymers. By analogy with the work by Dandurand et al. [51], this endothermic event is attributable to the evaporation of bound water molecules. As already observed by TGA, degradation of the protein moieties began above 200 °C. In the case of A1 sample, the enthalpy of the endothermic event associated with the evaporation of water molecules is ca. 50 times weaker ( $\Delta H = 0.06967 \text{ J/g}$ ) than the same event produced for the crude sericin extracts (viz.  $\Delta H = 3.183 \text{ J/g}$  in the case of A2 sample and  $\Delta H = 3.549 \text{ J/g}$  in the case of A3 sample). However, the ratios between these enthalpies are of the same order of magnitude. The second major endothermic events are the sharp endothermic peaks at 134.61 °C (A1 sample, with associated melting enthalpy of 1.932 J/ g), 126.34 °C (A2 sample, with associated melting enthalpy of 168.6 J/ g) and 123.64 °C (A3 sample, with associated melting enthalpy of 146.8 J/g), associated to order  $\rightarrow$  disorder transitions, which can be considered as thermal signatures of protein (irreversible) denaturation. The third major endothermic events are the shallow endothermic peaks



Fig. 4. Differential scanning calorimetry thermograms of A1, A2 and A3 samples.

at 213.32 °C (A1 sample, with associated melting enthalpy of 0.09251 J/g), 214.73 °C (A2 sample, with associated melting enthalpy of 2.597 J/g) and 219.87 °C (A3 sample, with associated melting enthalpy of 28.06 J/g), associated to degradation phenomena, which can be considered as thermal signatures of protein carbonization.

Clearly, between order→disorder transition and degradation phenomena, when comparing both crude sericin extracts (A2 and A3 samples), the one produced by freezing/thawing (A2 sample) exhibits a melting profile range of  $\Delta T = 88.39$  °C, a value that is ca. 1.10 x the one produced by lyophilization (A3 sample) (viz.  $\Delta T = 96.23$  °C). These results are in close agreement with the data gathered from XRD analyses (see Fig. 2), allowing to conclude that the A2 sample is in fact less amorphous (see Fig. 2) than A3 sample, thus implying an increased crystallinity of the A2 sample which compares with A1 sample.

### 3.4. Protein content in the crude sericin extracts

A calibration curve for protein was prepared using solutions of bovine serum albumin (BSA) in ultrapure water at several concentrations in the range 0–1000  $\mu$ g/mL. Using this widely used colorimetric method for protein quantification, the A1 sample exhibited a mass protein concentration of 2.665% (w/w), whereas the A2 sample exhibited a mass protein concentration of 0.436% (w/w) and the A3 sample exhibited a mass protein concentration of 1.255% (w/w). Taking into consideration that the second extraction procedure utilized autoclaving of cocoons in aqueous suspension prior to lyophilization, a higher protein content was in fact expected for this crude extract (i.e. A3 sample) since it might probably contain some residual fibroin in



Fig. 5. Coomassie-stained (a) and silver-stained (b) electrophoretograms of A1 sample (lane 1), A2 sample (lane 2), A3 sample (lane 3) and wide-range molecular weight markers (lanes M).

addition to sericin. The method of extraction via freezing/thawing promotes precipitation of the (higher molecular weight) fibroin present in the cocoons, and therefore the lower protein content in the supernatant associated to (lower molecular weight) sericin was also expected.

### 3.5. SDS-PAGE analysis of crude sericin extracts

Fig. 5 depicts the results from the SDS-PAGE analysis of the supernatants, obtained after boiling A1, A2 and A3 sample solutions in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol and sodium dodecyl sulfate (lane M, wide range molecular weight markers; lane 1, A1 sample; lane 2, A2 sample; lane 3, A3 sample). Crude sericin extracts produced by different extraction methods (see lanes 2 (A2) and 3 (A3) in Fig. 5) displays not so different molecular weight ranges. The heat treatment of the cocoon suspensions attacked the peptide bonds of the primary structure of the protein, and therefore the A2 and A3 samples show broader bands due to the mixture of different molecular weight peptides, an observation that is in agreement with results published by Zhang et al. [52] and Teramoto and Miyazawa [53].

As can be observed from inspection of the Coomassie-stained electrophoretogram in Fig. 5 (upper image), the standard sericin (A1 sample in lane 1) exhibited a wide range of molecular weights, from ca. 10 kDa to ca. 100 kDa, without any isolated band standing out, whereas the crude sericin extracts (samples A2 in lane 2 and sample A3 in lane 3) exhibited not so wider ranges of molecular weights, in the range 37 kDa–200 kDa, also without any isolated bands standing out, in close agreement with the results published by Zhang et al. [52]. Regarding the silver-stained electrophoretogram in Fig. 5 (lower image), a

calibration curve performed to the proteins in the molecular weight markers lane (lane M) resulted in the linear equation Log<sub>10</sub>(MW,kDa)  $= -1.4817 \times R_f + 2.3727$  (r<sup>2</sup> = 0.93326). A close inspection of the silver-stained electrophoretogram allows observation of two bands, one appearing in lane 2 (A2 sample) and one appearing in lane 3 (A3 sample). Following calculation of the relative mobility of these two bands and application of the calibration curve, the following molecular weights were obtained: 22.15 kDa for the band in lane 2 and 21.17 kDa for the band in lane 3. Although these molecular weights are consistent with the results published by Takasu et al. [54], it is noteworthy to remember that Coomassie-staining allows determination/visualization of protein bands with amounts higher than 70 ug, whereas silver staining allows determination/visualization of protein bands with amounts as little as 7  $\mu$ g. Hence, the two bands appearing in lanes 2 and 3 in the silver-stained SDS-PAGE electrophoretogram could be the result of two small proteins in tiny amounts in A2 and A3 samples, respectively. The appearance of a very high number of bands or smear in a lane may be due to incomplete unfolding of the proteins upon heating with SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol. Since we analyzed protein extracts isolated from silk cocoons, maybe some degradation occurred giving rise to a range of protein species. According to Takasu et al. [54], the sericin extracted from the cocoons of Bombyx mori was found to consist mainly of three polypeptides with molecular weights of 400 kDa, 250 kDa, and 150 kDa, as estimated by SDS-PAGE, corresponding to the sericin present in the middle, anterior, and posterior parts of the middle silk gland. According to other researchers [2,3,55,56,74], the molecular weight of sericin ranges from 20 kDa to 400 kDa. Overall, the results obtained in the SDS-PAGE analysis of both standard sericin (A1 sample) and crude sericin extracts (A2 and A3 samples) are in agreement with the observation by several other researchers that the protein sericin is in fact a family of proteins with molecular weights spanning from quite low to high values.

### 3.6. Antimicrobial activity of sericin

The antimicrobial properties of the A1 sample (octants 3 and 4) are quite different depending on the bacteria tested, as apparent from the varying growth inhibition halo diameters produced (see Fig. 6). The A1 sample exhibited nearly the same antibacterial activity against *S. aureus* irrespective of the mass concentration (see Fig. 6b, octants 3 and 4) but did not exert any antibacterial effects against *P. aeruginosa* (see Fig. 6c, octants 3 and 4), while displaying only a marginal antimicrobial activity against *E. coli* (see Fig. 6a, octants 3 and 4).

Regarding the crude sericin extracts, the A2 sample displayed a slight antibacterial activity against *S. aureus* (see Fig. 6b, octants 5 and 6) but had no effect whatsoever against *P. aeruginosa* (see Fig. 6c, octants 5 and 6) and *E. coli* (see Fig. 6a, octants 5 and 6). The A3 sample displayed a slight positive antibacterial activity against *S. aureus* (see Fig. 6b, octants 7 and 8) but had no effect whatsoever against *P. aeruginosa* (see Fig. 6c, octants 7 and 8) and *E. coli* (see Fig. 6a, octants 7 and 8). Regarding the antibiotic cocktail assayed (octant 1), it was more effective in the order *S. aureus* > *E. coli* > *P. aeruginosa*. It may be concluded that the crude sericin extracts exhibit varying degrees of antimicrobial activity against *S. aureus*, an infectious agent usually present in skin wounds derived or not from burns [57]. Hence, the crude sericin extracts exhibit the potential to be used in the treatment of skin infections.

# 3.7. Determination of the cytotoxicity potential of sericin, via the MTT assay

For the cell viability assays using HUVEC cell line (permanent cell line, endothelial cells withdrawn from the human umbilical vein), A1, A2 and A3 samples were dispersed in DMEM culture medium. Plain DMEM medium was used as control.

The MTT assays show cell viability (relative means of six



Fig. 6. Results obtained from the antimicrobial activity of standard sericin (A1 sample) and crude sericin extracts (A2 and A3 samples). Octant 1: sterile filter paper disk plunged into an antibiotic cocktail solution (penicillin (10,000 U.I./mL)/streptomycin (10 mg/mL)); Octant 2: sterile filter paper disk plunged into sterile ultrapure water; Octant 3: sterile filter paper disk plunged into a A1 sample solution (10 mg/mL); Octant 4: sterile filter paper disk plunged into a A1 sample solution (20 mg/mL); Octant 5: sterile filter paper disk plunged into a A2 sample solution (10 mg/mL); Octant 6: sterile filter paper disk plunged into a A2 sample solution (20 mg/mL); Octant 7: sterile filter paper disk plunged into a A3 sample solution (10 mg/mL); Octant 8: sterile filter paper disk plunged into a A3 sample solution (20 mg/mL). The impregnated disks were applied directly on the surface of TSA culture medium innoculated via smearing with a suspension of Escherichia coli (a), Staphylococcus aureus (b) or Pseudomonas aeruginosa (c).



Fig. 7. Results from cellular viability (via MTT assays) tests using HUVEC cell line cultured in DMEM medium to evaluate the cytotoxicity of A1, A2 and A3 samples, following exposure of cells to different mass concentrations of sericin for 24 h. Values are the means of three experiments (n = 3), with associated standard deviations less than 0.1 in all cases.

determinations and associated standard deviations) found after exposure to increasing sericin concentrations, irrespective of the extraction procedure utilized, allowing to observe that the half maximal inhibitory concentration (IC50, a measure of the effectiveness of a substance in inhibiting a specific biological or biochemical function, which determines the concentration of product needed to kill 50% of the cells) was not attained for all sericin samples assayed (see red line in Fig. 7). Hence, such quantitative measure indicates how much of a particular substance is needed to inhibit a given biological process by half. At the sample concentrations tested in cells HUVEC, both A1 and A2 and A3 samples did not exhibit a high toxicity, with these cells presenting a viability higher than 60% at all sample concentrations

tested. Although a drop of ca. 30% in cell viability (see Fig. 7) was noticed for the smaller A2 and A3 sample concentrations, cell viability was maintained high for all samples. HUVEC cells presented a higher resistance to the treatment with A1 sample. In fact, the A1 sample was the one that killed cells to the lowest extent, as apparent from inspection of Fig. 7, but it was also the one that imparted the highest level of damages to the same cells both in the Comet<sup>™</sup> and in the Allium cepa analyses, as will be discussed indepth below. Treatment with both A2 and A3 samples did not present significative differences with respect to the maintenance of cell viability, but for the highest crude sericin extract (A2 sample) concentration it was possible to verify a slightly higher toxicity upon treatment of the HUVEC cells (see Fig. 7). The results obtained clearly show a slight decline of cell viability for all sample concentrations, which might indicate that sericin itself is not toxic to the HUVEC cells. For the contact of A3 sample with the cells, a recovery of mitochondrial activity was observed for the highest concentration, indicating cell recovery. In spite of the concentration of micro- and macronutrients in DMEM medium, the DMEM medium alone promoted maintenance of full cell viability (data not shown), thus indicating that no stress whatsoever was induced to the cells by the culture medium.

### 3.8. Analysis of potential chromosomal aberrations induced by sericin, via the Allium cepa assay

The analysis of mitotic index (obtained as Mitotic index = Number of cells in mitosis/Total number of cells) variations and chromosomal aberrations (obtained as Damage index = Number of damages/Total number of cell divisions) were carried out in order to establish the cytotoxic and genotoxic effects of crude sericin extracts produced from Bombyx mori cocoons. No mitodepressive effects of sericin could be observed (see Fig. 8), regardless of the extraction procedure and the



**Fig. 8.** Effect of the different sericin samples (viz. A1, A2 and A3) on the mitotic index obtained from cytogenetic analyses using HUVEC cells exposed to the sericin sample solutions at a concentration of 20 mg/mL, and using ultrapure water as negative. The mitotic index was calculated as the number of cells in mitosis divided by the total number of cells, whereas the damage index was calculated as the number of damages divided by the total number of cell divisions. \* Indicate statistically non-significant relative damages and \*\* indicate statistically significant relative damages.

concentration of aqueous sericin solutions used for imersion of the adventitious *Allium cepa* roots formed by seed germination, with all samples tested stimulating cell division. Compared to the negative (ultrapure water) only A1 sample exhibited a slightly high damage index, most likely due to any preservatives added to stabilize the commercial standard lyophilized powder. On the contrary, both A2 and A3 samples imparted minimal damages to the cells, well below to that of the negative (see Fig. 8).

From the statistical analyses performed to the mitotic index data, when comparing the different sericin samples (viz. A1, A2 and A3) between them and even when compared with the negative, no statistically significant differences were found at the level of significance of 5% (95% confidence interval). Regarding the relative damage index, the A1 sample exhibited a statistically significant difference when compared with either the remaining sericin samples or the negative, as pinpointed in Fig. 8. Moreover, the immersion of Allium cepa roots in the same aqueous sample concentrations during 24 h promoted mitotic activity for all sericin samples, with the vast majority of the cells observed in the prepared slides being in interphase (data not shown: 87.5% of the cells in interphase for the cells treated with the negative, 84.5% of the cells in interphase for the cells treated with A1 sample solution, 82.2% of the cells in interphase for the cells treated with the A2 sample solution, and 80.8% of the cells in interphase for the cells treated with the A3 sample solution). Hence, no intracellular stress (including DNA damage) could be observed, which otherwise could have prevented the cells from entering mitosis (see Fig. 8). Mitodepressive action may be a consequence of a negative interference of the active substances under testing with specific proteins and enzymes which mediate DNA polymerase [58], DNA synthesis, microtubule formation, impaired nucleoprotein synthesis and reduced level of ATP to provide energy for spindle elongation, microtubule dynamics and chromosomal movement [59,60]. The low damage indexes produced by the A2 and A3 sericin samples (see Fig. 8) were directly related to a low number of chromosomal aberrations in the chromosomes of meristematic root tip cells of Allium cepa, with a low frequency of prometaphases, bridges and fragments (see Fig. 9). On the contrary, the A1 sample promoted the highest levels of prometaphases and fragments (see Fig. 9). Our observations are in agreement with results published elsewhere [61].

Allium cepa root tip cells treated with both A2 and A3 samples exhibited higher average numbers of prophases, anaphases and telophases, when compared to the cells treated with the A1 sample. These



Fig. 9. Examples of normal mitotic phases in *Allium cepa* cells (prophase; metaphase; anaphase; telophase) and types of chromosomal abnormalities (prometaphases, bridges, fragments) found in *Allium cepa* cells exposed to A1, A2 and A3 samples.

observations are in clear agreement with the higher damage index promoted by the A1 sample. The mitotic index is a reliable parameter to identify cytotoxicity and genotoxicity, and therefore the cytotoxicity levels of a given compound can be determined by the increase or decrease in the mitotic index. Mitotic indexes lower than that of the negative control may indicate that the growth and development of exposed cells have been affected by the test compound. On the other hand, increasing mitotic indexes are the result of the induction of cell division, and may be characterized as detrimental events to the cells by leading to both uncontrolled proliferation and tumour formation [62]. However, the mitotic indexes observed in the research effort entertained herein increased at a maximum 50% relative to the negative control, for the cells treated with the A2 sample. These results indicate that both crude sericin extracts do not possess the potential to induce significant chromosomal aberrations.

# 3.9. Determination of the DNA damage potential of sericin, via Comet™ assay

The Comet<sup>m</sup> assay is able to quantitatively detect the DNA damage (genotoxic effects) caused by alkylating or oxidizing and intercalating agents. The DNA damage indexes were calculated according to the sizes of the cell tails produced. The tails were scored in five levels (0, 1, 2, 3 and 4), where zero and four represent the lowest and the highest comet tail sizes respectively, with the DNA damage index (DI) being calculated as

 $DI = \left[ (0 \times \sum \text{cells with score } 0) + (1 \times \sum \text{cells with score } 1) + (2 \times \sum \text{cells with score } 2) + \left/ total number of cells (3 \times \sum \text{cells with score } 3) + (4 \times \sum \text{cells with score } 4) \right\}$ 

The slides were analyzed using a single-blind-review in order to minimize variability. To evaluate any possible genetic damage to the cells imparted by the A1, A2 and A3 samples, the Comet<sup>™</sup> test was carried out with HUVEC cell line, allowing to observe significant differences between the control and the HUVEC cell line that was exposed to the A1 (20 mg/mL) and A3 (15 mg/mL) (see Fig. 10).

In the statistical analysis performed to each of the samples tested, when comparing each of the different mass concentrations, no statistical different results were found. Regarding the analysis performed to compare between samples (including the control), only the A1 sample at its concentration of 20 mg/mL and the A3 sample at its concentration of 15 mg/mL exhibited statistically relevant differences, where the A1 sample at the aforementioned concentration displayed an adjusted *p*-value of 0.0262 and the A3 sample at the aforementioned concentration displayed an adjusted *p*-value of 0.0060, as pinpointed in Fig. 10, when these samples and respective mass concentrations were compared with the negative. The odd result obtained for the intermediate mass



**Fig. 10.** Relative DNA damage indexes of HUVEC cell line following exposure of cells to different mass concentrations of sericin for 24 h. Means of three experiments with associated  $\sigma$ : HUVEC (control, 1.000  $\pm$  0.104; Standard (A1 sample: 10 mg, 1.374  $\pm$  0.085; 15 mg: 1.288  $\pm$  0.242; 20 mg: 1.466  $\pm$  0.026); Freeze/Thaw-extracted (A2 sample: 10 mg, 1.289  $\pm$  0.228; 15 mg: 1.181  $\pm$  0.004; 20 mg: 1.150  $\pm$  0.142); Lyophilized-extracted (A3 sample: 10 mg, 1.313  $\pm$  0.057; 15 mg: 1.584  $\pm$  0.165; 20 mg: 1.313  $\pm$  0.179)). The inserted photos picture the Comet<sup>™</sup> tails produced by the different types of damage cells encountered.  $\bigcirc$ ,  $\bigcirc$ , and  $\checkmark$  Indicate statistically non-significant relative DNA damage indexes, and  $\bigcirc$  $\bigcirc$  and  $\bigstar$  indicate statistically significant relative DNA damage indexes.

concentration of A3 sample might be attributed to a more loose matrix in this crude sericin extract releasing a higher amount of bioactive protein when compared to the highest mass concentration of crude extract that might have hampered the release of bioactive sericin. The results obtained for the relative damage indexes (see Fig. 8) produced by the Allium cepa test performed to A1 sample (using a concentration of 20 mg/mL), are in clear agreement with the results produced by the Comet<sup>™</sup> test for the A1 sample at the same concentration, since in the Allium cepa test a higher relative damage index was produced when compared with both the negative and A2 and A3 samples. A statistically significant difference was obtained between the control and A1 sample at 20 mg/mL, meaning that a possible (although not to a great extent) genotoxic effect may be attributed to the A1 sample. The A3 sample at 15 mg/mL also presented a statistically significant difference when compared with the control, as mentioned above. The high relative DNA damage index imparted by the intermediate mass amount (15 mg) of A3 sample to the HUVEC cells (see Fig. 10) was due to a high count of cells with type 2 damage. No type 4 damages were found for the HUVEC cells treated with any of the samples tested for all of the mass concentrations assayed. All samples (including the control) promoted a higher level of type 1 and type 2 damages irrespective of the mass concentration assayed. Low levels of type 3 damages were produced by the samples for all concentrations tested. This means that the sericin samples tested do not possess characteristics that promote lesions in the DNA to a great extent, as apparent from the very low levels of type 3 damages encountered. However, the Comet<sup>™</sup> evaluation is performed

with a cellular exposition of 1 h, because it is a pre-testing procedure without the need of any cellular divisions. These results are in clear agreement with the complete lack of cytotoxic effects observed for this cell line (see Fig. 7). Hence, the lack of cytotoxic effects is in line with the lack of extense DNA damages, which in turn is in clear agreement with results published by Seabra et al. [42]. These findings were in close correlation with the absence of significant chromosomal aberrations produced by the A1, A2 and A3 samples (see mitotic indexes in Fig. 8), demonstrating a narrow range of chromosomal distortions at the different phases of the HUVEC cell cycle (see Fig. 9).

### 3.10. Free radical scavenging activity of sericin

The results obtained for the DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid and both A1 and A2 and A3 samples is displayed in Table 1.

The crude sericin extracts showed different levels of DPPH radical scavenging activity over the range of concentrations from 5 to 60 mg/ mL (see Table 1). The sericin extracted via the lyophilization methodology (A3 sample) exhibited the strongest DPPH radical scavenging activity compared to both the A2 sample and the A1 sample. Ascorbic acid was used as antioxidant standard at a concentration of 0.5 mg/mL and its free radical scavenging power was found to be 96.5%. Hence, the results obtained in the present research effort suggest that the A2 and A3 samples are capable of scavenging the free radicals (although at different extensions) and prevent the initiation of free radicals by stabilizing them to participate in any deleterious reactions. These results are in clear agreement with the results previously published by Rangi and Jajpura [8] and Dehpour et al. [63]. Different concentrations of silk sericin possessed different abilities to quench the DPPH radicals. It was observed that 15, 25 and 60 mg/mL of crude silk sericin extract scavenged  $(3.40 \pm 1.85)\%$ ,  $(45.7 \pm 8.26)\%$  and  $(44.2 \pm 16.9)\%$  of DPPH radicals, respectively (see Table 1). Fan et al. [64] refer in their work that the functional groups present in the aminoacid moieties Cys, Tyr and His that compose the primary structure of sericin reduce and decolorize DPPH via their hydrogen-donating ability. Hence, it is not surprising to conclude that silk sericin contains electron donors that react with free radicals to convert them to more stable products and terminate the radical chain reaction.

### 3.11. EDXRF analyses

The mulberry (*Bombyx mori*) silk cocoon is an insect-engineered biomaterial structure. Several wild silk cocoon species as well as spider silk have been found to possess higher elemental contents (Na, K, Cl, Mg, S, Cu, Ca, P, Zn) [65]. Copper has also been shown to be involved in the silk formation process by *Bombyx* mori [65]. It has been suggested that Na, Cl and K ions do play a role in the formation of spider silk [66,67]. Some of the wild silk cocoon species possess calcium oxalate crystals on their outer surfaces [68,65]. Calcium oxalate crystals are not, however, present to a large extent in the *Bombyx mori* cocoon surface [65]. Fig. 11 shows the typical X-ray fluorescence spectrum of a

Table 1

Antioxidant activity (%) of the sericin samples, as free radical scavenging ability measured via the DPPH methodology.

Concentration (mg/mL)	Free (relative) radical scavenging activity (%) [average (n = 3) $\pm \sigma$ ]				
	Ascorbic acid	Standard sericin	Freeze/Thaw extracted sericin	Lyophilized extracted sericin	
0.5	$96.50 \pm 0.23$	-	-	-	
5	-	$0.51 \pm 0.23$	-	-	
15	-	$8.01 \pm 0.20$	$3.40 \pm 1.85$	-	
25	-	-	-	45.68 ± 8.26	
60	-	-	$0.81 \pm 1.96$	$44.18 \pm 16.85$	

*Bombyx mori* cocoon (a) and the fluorescence spectra of A1, A2 and A3 samples (b). The major chemical elements found are pinpointed in Fig. 11.

The measured spectra were analyzed with the XRS-FP<sup>™</sup> software package provided by Amptek Inc., taking into account both escape peaks and sum peaks, and representing the background with a polynomial function. In the plain cocoon (see Fig. 11a), one found a large amount of Ca and K and trace amounts of sulfur S, Cl, Cr, Fe, Ni and Cu. In the fluorescence spectrum of the A1 sample, the major chemical elements found were sulfur and chloride, and a minimal amount of



**Fig. 11.** EDXRF spectra of both whole *Bombyx mori* cocoons (**a**) and A1 (black lines), A2 (red lines) and A3 (blue lines) samples (**b**). The YY axis represents the number of characteristic X-ray counts that reached the detector, while the XX axis represents the energy of the characteristic X-rays. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

calcium (see Fig. 11b). Regarding the crude sericin extracts (A2 and A3 samples), low amounts of S and iron were found in the same proportions. The crude sericin extract produced by lyophilization (A3 sample) displayed, however, higher amounts of Ca and K. Ca was found in relatively large amounts in *Bombyx mori* cocoons, and also in higher amounts in the A2 and A3 samples, most likely due to concentration during the extraction procedure. Since calcium oxalate crystals are usually not present in the *Bombyx mori* cocoon surface [65], they were not observed in the field emission scanning electron microscopy (FESEM) analyses. The presence of Cu in the *Bombyx mori* cocoons is in clear agreement with the results published by Tulachan et al. [65], Wilaiwan et al. [69], Zong et al. [70] and Zhou et al. [71].

### 3.12. XRT analyses

A cocoon is a natural polymer (protein) composite shell exhibiting a very special hierarchical porous microstructure that enables the cocoon to possess outstanding mechanical properties [72]. The *Bombyx mori* silkworm cocoon naturally "breaths", due to its superior heat and moisture transport capabilities as well as oxygen transportation [72]. From the tomographic analyses via X-ray transmission performed to a section of the *Bombyx mori* cocoon wall (see Fig. 12), a homogeneous surface can be observed.

Due to absorbing more radiation, because of its higher atomic density, the fibers (in green on Fig. 12) are in greater evidence, whereas

void spaces appear in black. A comparative porosity analysis of the *Bombyx mori* cocoon wall can be found in Table 2.

Anisotropy can be defined as a difference, when measured along different axes, in a material's physical or mechanical properties (e.g. absorbance). The degree of anisotropy, calculated as **Degree of anisotropy** = (1 - [min Eigenvalue/max Eigenvalue]), is 0 for total isotropy and 1 for total anisotropy. Hence, as can be seen from inspection of the data in Table 2, the degree of anisotropy is 0.790 for the cocoon wall, a value that is more close to anisotropy than to isotropy in the aforementioned scale. Being the silk cocoon an insect-engineered



Fig. 12. Images obtained by tomographic analyses via X-ray transmission (XRT) of the *Bombyx mori* cocoon, being (a) a cross-cut profile image of the cocoon wall, and (b) slant profile image of the surface of the cocoon. Three-dimensional image slices were gathered using an operating voltage set at 29 kV and electric current with  $415 \,\mu$ A.

biomaterial with an woven structure, this result is easily understandable under the light of the FESEM images displayed in Fig. 13a. When analyzing the structure of the cocoon wall, one finds that it has a low volume of closed pores (viz.  $1.55 \times 10^{-3}$  mm<sup>3</sup>) corresponding to an open porosity of 51.83% and a total porosity of 51.89% (see Table 2). These results are in clear agreement with the high porosity observed for *Bombyx mori* silk cocoons [65,72,73].

### 3.13. FESEM analyses

The FESEM images of the (smooth) outer surface of *Bombyx mori* silk cocoon wall allows to observe a woven fibrous matrix (see Fig. 13).

Calcium oxalate crystals were not found in the *Bombyx mori* cocoon surface, a results that is in agreement with results published by Tulachan et al. [65]. The silk fiber threads of the *Bombyx mori* cocoons were found to be slightly thicker ( $\approx$  30 microns, see Fig. 13b) than

#### Table 2

Results obtained from the tomographic analyses via X-ray transmission performed to the plain *Bombyx mori* cocoons.

Parameter	Bombyx mori cocoons
Number of layers	201
Pixel size (µm)	6.918
Total VOI (volume of interest), TV (mm3)	2.627
Object volume, Obj.V (mm <sup>3</sup> )	1.264
Percent object volume, Obj.V/TV (%)	48.112
Total VOI surface, TS (mm <sup>2</sup> )	25.370
Object surface, Obj.S (mm <sup>2</sup> )	138.688
Intersection surface, i.S (mm <sup>2</sup> )	8.840
Object surface/volume ratio, Obj.S/Obj.V (mm <sup>-1</sup> )	109.715
Object surface density, Obj.S/TV (mm <sup>-1</sup> )	52.787
Degree of anisotropy, DA	4.768 (0.790)
Eigenvalue 1	-0.187
Eigenvalue 2	0.276
Eigenvalue 3	0.892
Number of closed pores, Po.N(cl)	1993
Volume of closed pores, Po.V(cl) (mm <sup>3</sup> )	0.00155
Surface of closed pores, Po.S(cl) (mm <sup>2</sup> )	0.824
Closed porosity (percent), Po(cl) (%)	0.123
Volume of open pore space, Po.V(op) (mm <sup>3</sup> )	1.362
Open porosity (percent), Po(op) (%)	51.829
Total volume of pore space, Po.V(tot) (mm <sup>3</sup> )	1.363
Total porosity (percent), Po(tot) (%)	51.888
Euler number, Eu.N	-22606
Connectivity, Conn	28196
Connectivity density, Conn.Dn (mm <sup>-3</sup> )	10731.817

those analyzed by Tulachan et al. [65] for the same type of silk cocoon origin, as can be seen from inspection of the FESEM photomicrographs depicted in Fig. 13, with pores quite visible in the *Bombyx mori* silk cocoon biostructure, a result that is also in close agreement with those published by Tulachan and colleagues [65]. Additionally, a close inspection of the photomicrographs in Fig. 13 allows to clearly observe the fibroin fibers (see inserted red arrows in Fig. 13b–d) surrounded by the glue that keeps them in place, i.e., the protein sericin (see inserted

green arrows in Fig. 13b–d).

### 4. Conclusions

The two extraction methods assayed allowed to produce crude sericin extracts with the chemical aspect of sericin preserved, with an amorphous behavior without peaks of crystallinity. Both crude extracts displayed the thermal signatures of protein denaturation and carbonization. However, the A2 sample was found to be less amorphous than its A3 counterpart, thus implying an increased crystallinity of the A2 sample, which compared to the commercial sericin standard. The A2 sample exhibited a mass protein concentration of ca. 30% that of the A3 sample, but with a higher sericin content than the later. The crude sericin extracts exhibited a wide range of molecular weights (37 kDa-200 kDa), as apparent from the smears in the SDS-PAGE gel, without any isolated bands standing out. The IC<sub>50</sub> value was not attained for any of the crude sericin extracts, with these samples not exhibiting a high toxicity to HUVEC cells and presenting a cell viability higher than 60% at all sample concentrations tested. No mitodepressive effects of sericin could be observed regardless of the extraction procedure and the concentration of aqueous sericin solutions. The A2 and A3 samples were capable of scavenging free radicals (althoug to different extents). In the plain Bombyx mori cocoons, one found a large amount of Ca and K and trace amounts of S, Cl, Cr, Fe, Ni and Cu. Regarding A2 and A3 samples, low amounts of S and Fe were found. The A3 sample displayed, however, higher amounts of Ca and K. Ca was found in relatively large amounts in the cocoons, and also in higher amounts in A2 and A3 samples, most likely due to concentration during the extraction procedures. Since calcium oxalate crystals are usually not present in the Bombyx mori cocoon surface, they were not observed in the FESEM analyses. The crude sericin extracts produced were found to be suitable for biopharmaceutical applications, a conclusion fully supported by the results gathered from the physico-chemical and biological characterization that was entailed.



**Fig. 13.** FESEM photomicrographs of the *Bombyx mori* cocoon, at several magnifications (a:  $\times 100$ ; b:  $\times 2000$ ; c:  $\times 600$ ; d:  $\times 2000$ ). Inserted red arrows point to fibroin whereas inserted green arrows point to sericin (acting as the glue that keeps fibroin fibers together in place). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### **Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest whatsoever to declare.

#### Acknowledgements

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil; Refs. No. **2016/08884-3** (**Project PneumoPhageColor) and 2016/12234-4 (Project TransAppIL)**), is hereby gratefully acknowledged. Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Ref. No. **2016/16641-3)** in the form of a M.Sc. fellowship granted to Liliam Harada is hereby gratefully acknowledged. Funding by the University of Sorocaba (UNISO, Sorocaba, Brazil) for Laura Favaro is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (Ref. No. **306113/2014-7)** and Renata Lima (Ref. No. **303967/2015-3)**.

#### References

- W. Tao, M. Li, R. Xie, Preparation and structure of porous silk sericin materials, Macromol. Mater. Eng. 290 (2005) 188–194.
- [2] R.I. Kunz, R.M.C. Brancalhão, L.F.C. Ribeiro, M.R.M. Natali, Silkworm sericin: properties and biomedical applications, BioMed Res. Int. (2016) Article ID 8175701: 19 pages.
- [3] M.L. Gimenes, V.R. Silva, M.G.A. Vieira, M.G.C. Silva, A.P. Scheer, High molecular sericin from *Bombyx mori* cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration, Int. J. Chem. Eng. Appl. 5 (2014) 266–271.
- [4] S. Chopra, M.L. Gulrajani, Comparative evaluation of the various methods of degumming silk, Indian J. Fibre Text. Res. 19 (1994) 76–83.
- [5] K.Y. Cho, J.Y. Moon, Y.W. Lee, K.G. Lee, J.H. Yeo, H.Y. Kweon, K.H. Kim, C.S. Cho, Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles, Int. J. Biol. Macromol. 32 (2003) 36–42.
- [6] M. Sasaki, H. Yamada, N. Kato, Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats, Nutr. Res. 20 (2000) 1505–1511.
- [7] J.-H. Wu, Z. Wang, S.-Y. Xu, Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater, Food Chem. 103 (2007) 1255–1262.
- [8] A. Rangi, L. Jajpura, The biopolymer sericin: extraction and applications, J. Text. Sci. Eng. 5 (2015) 1–5.
- [9] P. Aramwit, S. Damrongsakkul, S. Kanokpanont, T. Srichana, Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods, Biotechnol. Appl. Biochem. 55 (2010) 91–98.
- [10] R. Dash, C. Acharya, P.C. Bindu, S.C. Kundu, Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts, BMB Rep. 41 (2008) 236–241.
- [11] P. Aramwit, A. Sangcakul, The effects of sericin cream on wound healing in rats, Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 (2007) 2473–2477.
- [12] P. Aramwit, S. Kanokpanont, W. De-Eknamkul, K. Kamei, T. Srichana, The effect of sericin with variable amino-acid content from different silk strains on the production of collagen and nitric oxide, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 20 (2009) 1295–1306.
- [13] P. Aramwit, S. Kanokpanont, T. Nakpheng, T. Srichana, The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production, Int. J. Mol. Sci. 11 (2010) 2200–2211.
- [14] N. Nagai, T. Murao, Y. Ito, N. Okamoto, M. Sasaki, Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats as a model of human type 2 diabetes, Biol. Pharm. Bull. 32 (2009) 1594–1599.
- [15] P. Aramwit, P. Towiwat, T. Srichana, Anti-inflammatory potential of silk sericin, Nat. Prod. Commun. 8 (2013) 501–504.
- [16] S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, N. Kato, Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha, Oncol. Rep. 10 (2003) 537–543.
- [17] S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, N. Kato, Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 71 (2003) 11–17.
- [18] K.B. Kim, A. Jo, H.J. Cha, S.H. Shin, J.-J. Lee, H.K. Lee, I.-S. An, Synergetic effects of sericin and alpha-mangostin on anti-wrinkle effects, Kor. J. Aesthet. Cosmetol. 13 (2015) 729–734.
- [19] T. Kitisin, P. Maneekan, N. Luplertlop, *In-vitro* characterization of silk sericin as an anti-aging agent, J. Agric. Sci. 5 (2013) 54–62.
- [20] S.C. Kundu, Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Woodhead Publishing/Elsevier, 2014, pp. 27–30.
- [21] M.N. Padamwar, A.P. Pawar, Silk sericin and its applications: a review, J. Sci. Ind. Res. 63 (2004) 323–329.
- [22] A. Basu, Advances in Silk Science and Technology, Woodhead Publishing/Elsevier,

2015, pp. 266-269.

- [23] S. Nuchadomrong, W. Senakoon, S. Sirimungkararat, T. Senawong, P. Kitikoon, Antibacterial and antioxidant activities of sericin powder from eri silkworm cocoons correlating to degumming processes, Int. J. Wild Silkmoth Silk 13 (2009) 69–78.
- [24] W. Senakoon, S. Nuchadomrong, S. Sirimungkararat, T. Senawong, P. Kitikoon, Antibacterial action of eri (*Samia ricini*) sericin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Asian J. Food Agro-Ind. 2009 (2009) S222–S228.
- [25] K.N. Jassim, O.J. Al-Saree, Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*, Iraqi J. Community Med. 23 (2010) 130–133.
- [26] C. Savitha, B. Satheeswaran, A comparative study on antibacterial activity of sericin and its nanoparticles, Int. J. Extensive Res. 1 (2015) 14–17.
- [27] R. Rajendran, C. Balakumar, R. Sivakumar, T. Amruta, N. Devaki, Extraction and application of natural silk protein sericin from *Bombyx mori* as antimicrobial finish for cotton fabrics, J. Text. Inst. 103 (2011) 1–5.
- [28] J. Divya, J. Srinivasan, B.G. Manohari, FT-IR analysis and antibacterial activity of silk sericin, Int. J. Pharm. Bio Sci. 7 (B) (2016) 113–119.
- [29] B.B. Mandal, S.C. Kundu, Self-assembled silk sericin/poloxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery, Nanotechnology 20 (2009) 355101.
- [30] A. Nishida, T. Naganuma, T. Kanazawa, Y. Takashima, M. Yamada, H. Okada, The characterization of protein release from sericin film in the presence of an enzyme: towards fibroblast growth factor-2 delivery, Int. J. Pharm. 414 (2011) 193–202.
- [31] I.C.S. Aguiar, Desenvolvimento e caracterização de biofilmes de sericina reticulados com dimetilolureia (Development and characterization of sericin biofilms crosslinked with dimethylolurea). M.Sc-Thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana PR, Brazil, 2011.
- [32] R.J. Patel, M.K. Modasiya, Sericin pharmaceutical applications, Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci. 2 (2011) 913–917.
- [33] D.B. Dias, A.P. Sone, F.R.B. Turbiani, M.G.C. Silva, M.G.A. Vieira, M.L. Gimenes, Characterization of sericin films modified with polyethyleneglycol (caracterização de filmes de sericina modificados com polietilenoglicol), Blucher Chem. Eng. Proc. 1 (2015) 8932–8939.
- [34] C.A. Glasser, M.M.D.C. Vila, J.C. Pereira, M.V. Chaud, J.M. Oliveira Júnior, M. Tubino, V.M. Balcão, Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part II: process and product characterization, Drug Dev. Ind. Pharm. 42 (2016) 1990–2000.
- [35] J.F. Robyt, B.J. White, Biochemical Techniques Theory and Practice, Waveland, Chicago, IL, 1990.
- [36] V.M. Balcão, M.C. Vieira, F.X. Malcata, Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module, Biotechnol. Prog. 12 (1996) 164–172.
- [37] A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, Am. J. Clin. Pathol. 45 (1966) 493–496.
- [38] J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro, Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices, Clin. Infect. Dis. 49 (2009) 1749–1755.
- [39] CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, 8th edition, (2003) NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6].
- NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
   [40] CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement 2011. CLSI Document M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2011.
- [41] R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J.A. Weil, Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, Food Chem. 84 (2004) 551–562.
- [42] A.B. Seabra, T. Pasquôto, A.C. Ferrarini, M.C. Santos, P.S. Haddad, R. Lima, Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolated- and s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment, Chem. Res. Toxicol. 27 (2014) 1207–1218.
- [43] H. Nefic, J. Musanovic, A. Metovic, K. Kurteshi, Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium Cepa* L. induced by alprazolam, Med. Arch. 67 (2013) 388–392.
- [44] J.M. Oliveira Junior, A.C.G. Martins, Construction and test of low cost X-ray tomography scanner for physical, chemical analysis and nondestructive inspections, AIP Conf. Proc. 1139 (2009) 102–105.
- [45] L.A. Feldkamp, L.C. Davis, J.W. Kress, Practical cone-beam algorithm, J. Opt. Soc. Am. A 1 (1984) 612–619.
- [46] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, 6th ed., Thomson, Canada, 2007.
- [47] D. Gupta, A. Agrawal, A. Rangi, Extraction and characterization of silk sericin, Indian J. Fibre Text. Res. (IJFTR) 39 (2014) 364–372.
- [48] E.F. Reis, F.S. Campos, A.P. Lage, R.C. Leite, L.G. Heneine, W.L. Vasconcelos, Z.I.P. Lobato, H.S. Mansur, Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption, Mater. Res. 9 (2006) 185–191.
- [49] P. Mehta, D. Sharma, A. Dashora, D. Sahu, R.K. Garg, P. Agrawal, D.N. Kapoor, Design, development and evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and wounds, Innovare J. Life Sci. 1 (2013) 38-44.
- [50] A.L. Young, Powder X-ray diffraction and its application to biotherapeutic formulation development, Am. Pharm. Rev. 15 (2012) 01 available online at: http:// www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38371-Powder-X-ray-Diffraction-and-its-Application-to-Biotherapeutic-Formulation-Development/.
- [51] J. Dandurand, V. Samouillan, M.H. Lacoste-Ferre, C. Lacabanne, B. Bochicchio, A. Pepe, Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic

fragment inspired from human tropoelastin: signature of the amyloid fibers, Pathol. Biol. (Paris) 62 (2014) 100–107.

- [52] Y.-Q. Zhang, M.-L. Tao, W.-D. Shen, Y.-Z. Zhou, Y. Ding, Y. Ma, W.-L. Zhou, Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters, Biomaterials 25 (2004) 3751–3759.
- [53] H. Teramoto, M. Miyazawa, Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy, Biomacromolecules 6 (2005) 2049–2057.
- [54] Y. Takasu, H. Yamada, K. Tsubouchi, Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (2002) 2715–2718.
- [55] T.L. Da Silva, A.C. da Silva Junior, M. Ribani, M.G.A. Vieira, M.L. Gimenes, M.G.C. Da Silva, Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing, Chem. Eng. Trans. 38 (2014) 103–108.
- [56] T.V. Chirila, S. Suzuki, L.J. Bray, N.L. Barnett, D.G. Harkin, Evaluation of silk sericin as a biomaterial: *in vitro* growth of human corneal limbal epithelial cells on *Bombyx mori* sericin membranes, Prog. Biomater. 2 (2013) 14–25.
- [57] K. Chiller, B.A. Selkin, G.J. Murakawa, Skin microflora and bacterial infections of the skin, J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 6 (2001) 170–174.
- [58] A. Hidalgo, J.A. Gonzalez-Reyes, P. Navas, G. Garcia-Herdugo, Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by propham and chlorpropham, Cytobios 57 (1989) 7–14.
- [59] A. Majewska, E. Wolska, E. Sliwinska, M. Furmanowa, N. Urbanska, A. Pietrosuk, A. Zobel, M. Kuras, Antimitoic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhadiola rosea* roots, Caryology 56 (2003) 337–351.
- [60] Ş. Türkoğlu, Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in Allium cepa root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay, Pestic. Biochem. Physiol. 103 (2012) 224–230.
- [61] A. Dragoeva, V. Koleva, N. Hasanova, S. Slanev, Cytotoxic and genotoxic effects of diphenyl-ether herbicide GOAL (oxyfluorfen) using the *Allium cepa* test, Res. J. Mutagen. 2 (2012) 1–9.

- [62] A. Boumaza, K. Lalaoui, M. Khallef, H. Sbayou, H. Talbi, A. Hilali, Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of clodinafop-propargyl commercial formulation on *Allium cepa* 1, J. Mater. Environ. Sci. 7 (2016) 1245–1251.
- [63] A.A. Dehpour, M.A. Ebrahimzadeh, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Antioxidant activity of methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, Grasas Aceites 60 (2009) 405–412.
- [64] J.-B. Fan, L.-P. Wu, L.-S. Chen, X.-Y. Mao, F.-Z. Ren, Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*, J. Food Biochem. 33 (2009) 74–88.
- [65] B. Tulachan, S.K. Meena, R.K. Rai, C. Mallick, T.S. Kusurkar, A.K. Teotia, N.K. Sethy, K. Bhargava, S. Bhattacharya, A. Kumar, R.K. Sharma, N. Sinha, S.K. Singh, M. Das, Electricity from the silk cocoon membrane, Sci. Rep. 4 (2014) 1–15.
- [66] F. Vollrath, D.P. Knight, Liquid crystalline spinning of spider silk, Nature 410 (2001) 541–548.
- [67] D.P. Knight, F. Vollrath, Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider, Naturwissenschaften 88 (2001) 179–182.
- [68] H. Akai, Calcium crystals deposited in cocoons of wild silkmoths, Int. J. Wild Silkmoth Silk 6 (2001) 33–42.
- [69] S. Wilaiwan, B. Chirapha, S. Yaowalak, S. Prasong, Screening of some elements in different silk cocoon varieties, J. Appl. Sci. 10 (2010) 575–579.
- [70] X.H. Zong, P. Zhou, Z.Z. Shao, S.M. Chen, X. Chen, B.W. Hu, F. Deng, W.H. Yao, Effect of pH and copper (II) on the conformation transitions of silk fibroin based on EPR, NMR, and Raman spectroscopy, Biochemistry 43 (2004) 11932–11941.
- [71] L. Zhou, X. Chen, Z. Shao, P. Zhou, D.P. Knight, F. Vollrath, Copper in the silk formation process of *Bombyx mori* silkworm, FEBS Lett. 554 (2003) 337–341.
- [72] D.-D. Fei, F.-J. Liu, O.-N. Cui, J.-H. He, Fractal approach to heat transfer in silkworm cocoon hierarchy, Therm. Sci. 17 (2013) 1546–1548.
- [73] F. Chen, T. Hesselberg, D. Porter, F. Vollrath, The impact behaviour of silk cocoons, J. Exp. Biol. 216 (2013) 2648–2657.
- [74] T.V. Chirila, S. Suzuki, N.C. McKirdy, Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from Bombyx mori silk cocoons, Prog. Biomater. 5 (2016) 135–145.

APÊNDICE E - Artigo científico em fase de submissão para publicação: <u>Liliam K.</u> <u>Harada</u>, Ludmilla R. Jorge, José M. Oliveira Jr., Matthieu Tubino, Marta M. D. C. Vila and Victor M. Balcão (2017) Structural and functional stabilization of sericin from *Bombyx mori* cocoons in a biopolysaccharide film: bio-origami for skin regeneration, *Process Biochemistry* [under submission].

1	Structural and functional stabilization of sericin from <i>Bombyx</i>
2	<i>mori</i> cocoons in a biopolysaccharide film:
3	bio-origami for skin regeneration
4	
5 6	Liliam K. Harada <sup>1</sup> , Ludmilla R. Jorge <sup>1</sup> , José M. Oliveira Jr. <sup>1</sup> , Matthieu Tubino <sup>2</sup> , Marta M. D. C. Vila <sup>1</sup> and Victor M. Balcão <sup>1,3,*</sup>
7	$\frac{1}{2}$ Phage Lab Laboratory of Piofilms and Pasterionhages of UNISO $(h_{c})^{2}$ intelligent biosensing and biomelecula
0	riageLab – Laboratory of Biofinnis and Bacteriophages of UNISO, <b>(US)</b> – Interingent biosensing and bioinforecure
0	stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil [Victor.baicao( $apror.uniso.br$ ].
9	3
10	CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.
11	
12	
13 14	
15	Abstract: Development and optimization of a bioorigami film with impregnated silk sericin was pursued, for skin regeneration
16	applications. The selected bioorigami exhibited a homogeneous and translucid appearance, and devoid of any fractures or cracks.
17 18	Several formulations were produced, with varying integrated sericin contents, viz. 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>bioorigami</sub> . The entimized biogrammic processes of the enti
19	prolonged release of the bioactive protein. The infrared spectra of the bioarigami films integrating silk sericin indicated that the
20	protein did not engage in any bonds with the polymeric matrix, which otherwise could have reduced its antioxidant activity. The
21	mechanical resistance tests produced good results, indicating that the bioorigami may be utilized in different locations of the human
22	body with skin lesions. The physico-chemical characteristics of the several bioorigami films produced were evaluated in detail, via
23 24	FTIR, XRD, XRF, XRT, TGA, DSC, transdermal protein permeation, kinetics of protein release from the bioorigami films, and free radical scavenging activities. The results gathered clearly suggest that the optimized bioorigami films integrating crude series
25	extract had both obvious radical scavenging effects with the 2.2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) assay, and exhibited prolonged
26	release of the bioactive protein, further suggesting potential biopharmaceutical applications such as skin regeneration.
27	
28	Keywords: Sericin from Bombyx mori; bioorigami film; antioxidant activity; transdermal permeation;
29	kinetics of protein release; skin regeneration; chemical characterization
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	*Author to whom all correspondence should be addressed at Universidade de Sorocaba (UNISO), Cidade
37	Universitaria Proj. Aldo Vannucchi, Koa. Kaposo Tavares Km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba/SP, Sao
38	гашо, brazu <u>[vicior.baicao(aproj.uniso.br</u> ; 1ei.: 00 55 (15) 2101 /029; Fax: 00 55 (15) 2101 /000].
39	
40	This manuscript has been submitted for publication in <i>Process Biochemistry</i> .
41	It is not to be reproduced or cited without the written permission from the authors.

### 42 **1. Introduction**

43

44 Biopolysaccharyde films can be considered controlled release systems for drugs of topical application, 45 depending on both the type of formulation and application in which they are used (Andrews *et al.*, 2009), 46 being three-dimensional networks of hydrophilic biopolymers which, upon contact with a moist surface, 47 swell and may release the drug by different mechanisms (Ganji et al., 2010). Hence, biopolysaccharyde 48 films are of particular interest in the treatment of damaged skin due to their intrinsic low toxicity, potential 49 for extended release of drugs and ability to keep the skin hydrated (Yan and Pochan, 2010; Murphy et al., 50 2012; Song et al., 2012). Poly(vinyl alcohol), also known as polyvinyl alcohol (PVA) (extensively used to 51 produce hydrogels aiming at the treatment of topical ulcers), is a non-toxic, biocompatible polymer which 52 has excellent film forming properties and ease of processability, as well as mechanical, thermal and 53 chemical resistances (Liu et al., 2009; Hwang et al., 2010; Song et al., 2012; Gupta et al., 2002). 54 Considering the growing importance of hydrogels as pharmaceutical forms for controlled release of drugs, 55 the aim of the present research work was to develop and evaluate a biopolysaccharyde film, herein coined as 56 a bioorigami film due to the intended characteristics and mode of use, using PVA, carrageenan and xanthan 57 gums as raw materials, containing incorporated silk sericin extracted from Bombyx mori cocoons, for 58 antioxidant topical applications. Sericin from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori* is a water-soluble 59 globular glycoprotein, collectively representing a family of proteins with molecular weights ranging from 60 ca. 10 kDa to ca. 310 kDa (Tao et al., 2005) or from 20 kDa to 400 kDa (Kunz et al., 2016; Gimenes et al., 61 2014). Sericin is primarily amorphous and water soluble, acting as a gum binder to maintain the structural 62 integrity of the cocoon (Chopra and Gulrajani, 1994). Sericin is rich in serine (ca. 32%), aspartic acid (ca. 63 16.8%) and glycine (ca. 8.8%), and thus possesses a high concentration of hydroxyl groups (Cho et al., 64 2003). Sericin has been found to exhibit several biological (beneficial) activities, spanning from 65 antityrosinase properties, promotion of collagen production (important in wound healing applications on 66 both skin and corneal tissues), anti-inflammatory activity, antitumoural activity, anti-ageing and anti-67 wrinkle, antimicrobial, use in controlled drug-releasing biomaterials to promote stability and prolonged 68 release, to antioxidant (Rocha et al., 2017). Due to the uniqueness of this globular protein (representing in 69 fact a family of proteins), silk sericin has great potential to be used in biopharmaceutical products (Rocha et 70 al., 2017). Hence, silk sericin was considered in this research effort for a new potentially valuable skin 71 regeneration product, following a previous research entailed with the major goal of extracting and fully 72 characterizing this potential multipurpose protein. The optimized bioorigami film formulations integrating 73 silk sericin was subsequently fully characterized physicochemically, encompassing determination of pore 74 size and porosity via X-ray tomography, surface morphology via Field Emission Scanning Electron 75 Microscopy (FESEM), thermal analyses via Thermogravimetry (TGA) and Differential Scanning 76 Calorimetry (DSC), infrared spectrophotometry with Fourier transform (FTIR), X-ray computed 77 tomography, X-ray fluorescence (EDXRF), X-ray diffraction analyses (XRD), transdermal permeation 78 studies and kinetics associated with the sericin release process.

- 79 2. Materials and methods
- 80

### 81 2.1. Materials

82

83 2.1.1. Chemicals. All reagents used were of analytical grade or better, and were used without further 84 purification. Tap water was purified in a Master System All (model MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brazil) to a final resistivity of ca. 18.18 M $\Omega$ .cm and conductivity of 0.05  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>. Sericin (ref. SIGMA S5201-1G), 85 86 Coomassie Brilliant Blue G250 (ref. SIGMA 27815-25G-F), ortho-phosphoric acid (85%, v/v; ref. SIGMA 87 V000145-1L), UVASOL<sup>™</sup> ethanol for spectroscopy (99.8%, v/v; ref. SIGMA 32205-1L), methylparaben 88 (ref. SIGMA 47889) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (ref. SIGMA D9132-1G), were purchased 89 from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Polyvinyl alcohol (PVA) with an hydrolysis degree of 98% 90 (PVA98) was purchased from Neon Comercial Ltda. (Suzano/SP, Brazil). Glycerol was purchased from 91 Cinética (Jandira/SP, Brazil). Carrageenan (GENUVISCO® CG-131) and xanthan (XANTURAL® 180) 92 gums were a kind gift from CPKelco (Limeira/SP, Brazil). Methylparaben was acquired from Synth 93 (Diadema/SP, Brazil).

94

2.1.2. Biological materials. The *Bombyx mori* cocoons were a kind gift from Fiação de Seda BRATAC
S.A. (Londrina/PR, Brazil). The bacterial strains utilized in the antimicrobial assays were *Staphylococcus aureus* CCCD-S007, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, and *Escherichia coli* CCCD-E003, supplied by
CEFAR Diagnóstica (Jurubatuba/SP, Brazil). The microbiological growth media utilized were BHI (Brain
Heart Infusion) from HiMedia Laboratories (Mumbai, India) and TSA (Tryptic Soy Agar) from KASVI
(Curitiba/PR, Brazil).

101

102 **2.2. Experimental procedures** 

103

**2.2.1. Extraction of sericin.** Sericin was extracted from the cocoons of *Bombyx mori* following the
 procedure described in detail elsewhere (Rocha et al., 2017).

106

107 2.2.2. Experimental factorial design for optimization of plain bioorigami films with appropriate mechanical properties. A 3<sup>2</sup> full factorial design approach (encompassing two variables 108 109 each one set at three levels), thus requiring a total of nine formulations producing nine experiments, was 110 applied to fully maximize the experimental efficiency with a minimum of experiments. The two different 111 variables (carrageenan and xanthan gum concentrations) at three levels each, low (-1), medium/central (0) 112 and high (+1), and their influence upon the mechanical properties of the biopolysaccharydic films produced (BPFi) were duly studied. The independent variables were carrageenan and xanthan gum concentration, 113 114 whereas the established dependent variables under scrutiny were the mean mechanical properties, viz. 115 resistance to traction, resistance to perforation and resilience. For each independent variable, the low, 116 medium and high values of the lower, central and upper levels were assigned a (-1), (0) and (+1) sign, 117 respectively (see Table 1). 118

119

### **Insert Table 1 here**

120

All formulations were produced according to the experimental factorial design depicted in Table 1, integrating constant amounts of PVA (1.25%, w/w; to induce polymerization), glycerol (2.50%, w/w; to induce plasticity) and methylparaben (0.1%, w/w; to inhibit fungal growth), thus yielding nine (plain) biopolymeric film formulations (see Table 2).

- 125
- 126

### **Insert Table 2 here**

127

128 2.2.3. Production of bioorigami films with varying sericin concentrations, departing from the 129 optimum formulation arising from the experimental factorial design. After determination of the 130 optimal biopolyssacharydic levels leading to a suitable film in terms of mechanical properties (viz. adequate 131 resistance to traction and perforation, and resilience) while maintaining a good level of malleability, such 132 levels were used for production of different films with varying amounts of sericin. Hence, a total of seven 133 films were produced integrating sericin according to the data included in Table 3.

134

135

### Insert Table 3 here

136

All bioorigami film formulations were produced departing from the optimum levels of carrageenan and xanthan gums (see Table 2), with added constant amounts of PVA (1.25%, w/w; to induce polymerization), glycerol (2.50%, w/w; to induce plasticity) and methylparaben (0.1%, w/w; to inhibit fungal growth), and further integrating sericin at different levels.

141

142 2.2.4. Moisture content analyses via infrared heating. Moisture content determination of the 143 bioorigami films was carried out in an infrared moisture analyzer from Shimadzu (model MOC63U, Kyoto, 144 Japan), equipped with a programmable timer, self-calibration and temperature adjusting between 50 °C and 145 200 °C, with parameters set at temperature of 60 °C in "slow" mode. For the moisture determinations, 20 mg 146 samples of the bioorigami films were heated up to 120 °C.

147

148 2.2.5. Fourier Transform Infrared spectrophotometry (FTIR) analyses. The FTIR spectra of all
149 bioorigami films integrating sericin were gathered using a Fourier Transform Infrared 100
150 Spectrophotometer from Agilent (model Cary 630, Santa Clara CA, U.S.A.), in the wavenumber range from
151 4000 cm<sup>-1</sup> to 400 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>, and using Happ-Genzel apodization.

152

**2.2.6. X-ray diffraction (XRD) analyses.** X-ray diffractograms of all bioorigami films integrating sericin were gathered in a X-ray Diffractometer from Shimadzu (model XRD7000, Kyoto, Japan), using Xray radiation from a copper lamp with radiation K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$  Å) filtered through a Cu target. The X-ray scanning was performed at diffraction angles of 2-Theta (from 5° to 90°, with increments of 0.02 degrees and rate of 2°.min<sup>-1</sup>), with a voltage of 40 kV, electric current intensity of 30 mA, and X-ray power of 3 kW.

158

# 159 2.2.7. Thermal analyses via thermogravimetry (TGA) and differential scanning calorimetry

160 (DSC). Thermogravimetric characterization of all bioorigami films integrating sericin was accomplished 161 via TGA analysis whereas thermal analyses were pursued by DSC. The TGA analyses were carried out 162 using a thermogravimeter from TA Instruments (model 2050, New Castle, U.S.A.), whereas the DSC 163 analyses were carried out using a differential scanning microcalorimeter from TA Instruments (model 164 MDSC 2910, New Castle, U.S.A.). Thermal characterization of all bioorigami films integrating sericin was 165 accomplished via both TGA and DSC, following the procedure described by Rocha et al. (2017). Samples 166 (DSC calorimetric assays: ca. 4.46 mg Bioo1, 5.60 mg Bioo2, 11.22 mg Bioo3, 5.52 mg Bioo4, 10.25 mg 167 Bioo5, 5.01 mg Bioo6 or 3.99 mg Bioo7; TGA analyses: ca. 9.10 mg Bioo1, 10.09 mg Bioo2, 5.61 mg 168 Bioo3, 6.29 mg Bioo4, 13.61 mg Bioo5, 13.31 mg Bioo6 or 4.89 mg Bioo7) were weighed directly into the 169 interior of high-pressure aluminium pans, and duly sealed by pressure. A reference aluminum pan was also 170 prepared by simply sealing air inside an empty case. The samples were then subjected to a linear 171 temperature increase from ca. 20 °C up to 250 °C, at a constant heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, under an inert atmosphere maintained with a constant flow of argon of 50 mL min<sup>-1</sup>, during which the amount of heat 172 173 absorbed by the bioorigami samples was recorded. During the analyses, data (heat absorption) was gathered 174 at a sampling rate of 0.2 seconds per data point.

175

176 2.2.8. Protein quantification via modified Bradford method. A modification of the Bradford 177 method for protein quantification was used according to the procedure described by Robyt and White (1990) 178 and Balcão et al. (1996). Aliquots of 500 µL of the receiving fluid (phosphate buffer, pH 7.4) in the Franz 179 cells were added to 4.5 mL of the working solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 (prepared according 180 to the procedure described elsewhere (Robyt and White, 1990; Balcão et al., 1996)), incubated at room 181 temperature for 5 min and absorbance was measured at 595 nm using disposable plastic cuvettes (Kartell) in 182 a UV-Vis Spectrophotometer from Agilent (model Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, U.S.A). A calibration 183 curve for protein was prepared using solutions of bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffer (pH 7.4) at several concentrations in the range 0-1000  $\mu$ g/mL: Abs<sub>595nm</sub> = 1.6554 x C<sub>prot</sub> / (0.1922 + C<sub>prot</sub>) (r = 184 185 0.99529).

186

**2.2.9. Evaluation of the free radical scavenging activity via the DPPH method.** The potential for free radical scavenging activity of the bioorigami films integrating variable amounts of sericin, using the DPPH reagent, was evaluated by a method described by Wu et al. (2007), Amarowicz et al. (2004) and Caetano et al. (2015) with slight modifications. To (10 x 10) mm square samples of the bioorigami films, 3500  $\mu$ L of freshly prepared DPPH radical in a methanol solution (1.0x10<sup>-4</sup> mol/L) was added. After 192 reaction for 25 min at room temperature (25 °C), in the dark, the reaction mixtures were centrifuged at 6400 193 rpm for 5 min. The decolorizing result of the supernatant was then assayed spectrophotometrically at 517 194 nm and compared with a blank control containing bioorigami film and pure methanol instead of DPPH. In 195 addition, a blind control containing methanol and ultrapure water instead of bioorigami film (500 µL 196 ultrapure water added to 3500 µL of methanol) was also assayed. Calculation of free radical scavenging activity was carried out using the equation Scavenging activity  $(\%) = \left(1 - \frac{Abs_{sample}}{Abs_{blind}}\right) \times 100$ , where scavenging 197 198 activity refers to the free radical scavenging percentage, Abs<sub>sample</sub> refers to the absorbance of the bioorigami 199 film at 517 nm, and Abs<sub>blind</sub> refers to the absorbance of the blind control at 517 nm. The spectrophotometer 200 was zeroed with plain ultrapure water.

201

202 2.2.10. Mechanical resistance properties. Mechanical properties of the bioorigami films were
203 evaluated using a texturometer from Stabile Micro Systems (model TA-TX Plus, Godalming, United
204 Kingdom), evaluating parameters such as resistance to perforation, resistance to traction, and resillience.
205 The determination parameters were set as distance of 5 mm for the perforation resistance tests, distance of 2
206 mm for both resillience and relaxation tests, and a maximum force of 5 kg for all tests. All determinations
207 were performed in triplicate. Sample dimensions were 2cm x 5 cm for resistance to traction, and 2cm x 2 cm
208 for resistance to perforation and resilience.

209

210 2.2.11. Transdermal permeation and kinetics of protein release from the bioorigami films. The 211 sericin release capability of the several bioorigami films was evaluated via transdermal permeation studies 212 in a DHC-6T Transdermal System from LOGAN INSTRUMENTS CORP. (Somerset NJ, U.S.A.). For these 213 assays, thawed porcine ear skin (previously prepared according to the procedure described by Salerno et al. 214 (2010)) disks (0.5 mm thick x 30 mm  $\phi_{ext}$ ) were cut and clamped in place between the acceptor and donor 215 chambers on top of the Franz diffusion cell support (possessing a central hole with 15 mm  $\phi_{ext}$ ). On top of these porcine ear skin disks, a disk of bioorigami film with the same external diameter (30 mm  $\phi_{ext}$ ) was 216 217 carefully placed eliminating any air bubbles, and 3 droplets of phosphate buffer (pH 7.4) were added so as to 218 moisturize the bioorigami film. To the bottom glass receptacle of the Franz diffusion cell (possessing a 219 small cylindrical teflon-coated magnetic stirring bar), 8 mL of (degassed) phosphate buffer (pH 7.4) were
carefully injected until touching the lower surface of the porcine ear skin disk. Care was taken to ensure that no air bubbles resided in the acceptor chamber, and skin was stretched to minimize the presence of furrows. At pre-determined time intervals (viz. 0, 0.25, 0.50, 1, 3, 6, 9, and 12 h), 2 mL-samples were withdrawn from the receiving fluid beneath the porcine ear skin disk, and 2-mL of fresh phosphate buffer (pH 7.4) were duly added so as to reset the volume. Each sample was then assayed for protein quantification via the modified Bradford method, as described earlier.

226

2.2.12. Study of the kinetics of protein release (bioavailability) from the bioorigami films. 227 228 Bioactive protein release experiments were carried out by measuring the concentration of protein in a 229 phosphate buffer (pH 7.4) medium contacting the lower surface of bioorigami films. Bioorigami disks (0.5 230 mm thick x 30 mm  $\phi_{ext}$ ) were cut, containing 0.0325 mg protein (bioorigami with 1 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), 0.1108 231 mg protein (bioorigami with 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), 0.2685 mg protein (bioorigami with 5 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), 0.3940 232 mg protein (bioorigami with 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), 1.6180 mg protein (bioorigami with 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), and 233 2.565 mg protein (bioorigami with 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), and their lower surfaces were placed in contact with 8 234 mL of phosphate buffer (pH 7.4) at room temperature (25 °C  $\pm$  0.1 °C). At pre-determined time intervals, 235 aliquots from the phosphate buffer (pH 7.4) contacting the bioorigami films were withdrawn and assayed for 236 protein content via the modified Bradford method as described earlier. The experiments were terminated 237 when a protein concentration plateau was reached.

238

239 2.2.13. Determination of elemental composition by X-ray fluorescence (XRF) analyses. The 240 elemental composition of selected bioorigami films loaded with variable amounts of sericin was determined 241 using a X-ray fluorescence spectrometer with energy dispersion (EDXRF) from Amptek (Bedford, Massachusetts, U.S.A.), which comprised an Ag anode and a 25 mm<sup>2</sup> SDD X-ray detector with a resolution 242 243 of 128 eV at the Mn-Ka line. The voltage applied to the X-ray tube was of 30 kV, 10 µA of current, with 244 10% lag time in the detector. All measurements were carried out using atmospheric air, and the measuring 245 time was set at 300s (live time) for each sample. A collimator with an aperture of 1 mm was used in the exit 246 of the X-ray source. The spectra were gathered sequentially, with a resolution of 0.02 keV, from 0 keV to 30 247 keV.

249 2.2.14. Tomographic analyses via X-ray transmission (XRT). The tomographic images of the 250 cocoon wall were gathered using a 3rd generation computed X-ray transmission tomograph (Oliveira Jr. et 251 al., 2009) from Bruker microCT (model SkyScan 1174, Kontich, Belgium). The bioorigami film samples 252 were fixed in a hollow support and placed inside the tomograph chamber, and image slices were gathered 253 using the following configurations of the tomographic system: operating voltage set at 35 kV and electric 254 current with 661 µA. The technique employed for obtaining the tomographic image involved acquisition of 255 a large number of radiographs of the object (image slices), obtained by measuring the intensity of X-rays 256 transmitted through the bioorigami films, at different angular positions. The bioorigami film samples were 257 rotated 180°, with angular increments of 0.8°, producing 225 radiographs (projections) per image, each 258 containing  $1304 \times 1304$  (width x height) pixels with a spatial resolution of 6.92 µm. The exposure time per 259 projection was 5000 ms. At the outlet of the X-ray source one utilized an Al filter with 0.25 mm thickness. 260 Appropriate mathematical algorithms were then used to reconstruct the three-dimensional (3D) tomographic 261 images of the bioorigami film samples, through the appropriate composition of bi-dimensional (2D) images. 262 The 3D images possessed  $652 \times 652 \times 652$  pixels and the same spatial resolution of the 2D images, and thus 263 the volume of data generated for each bioorigami film sample is isotropic with relation to the spatial 264 resolution. Having all the projections (radiographs gathered at each angular position), one utilized the 265 software NRecon<sup>™</sup> from Bruker (version 1.6.9.4, Kontich, Belgium), which uses the algorithm of Feldkamp 266 et al. (1984) in the process of reconstructing the tomographic images, and the software CTVox<sup>TM</sup> (version 267 2.6.0 r908-64bit, from Bruker microCT), CTan<sup>™</sup> (version 1.13.5.1-64bit, from Bruker microCT) and CTvol 268 (version 2.2.3.0-64bit, from Bruker microCT) for processing the tomographic images.

269

270 2.2.15. Dispersive Energy Scanning Electron Microscopy analyses (DESEM). The surface and 271 morphology of the bioorigami films were observed in a dispersive energy scanning electron microscope 272 (DESEM) from LEO Electron Microscopy/Oxford (model Leo 440i, Cambridge, United Kingdom) 273 equipped with a EDS detector (model 6070, Cambridge, United Kingdom). Samples of the bioorigami 274 films were cut and sputter-coated with a Au film (92 Å thickness) via cathodic pulverization on a carbon 275 layer produced by evaporation in a metalizing device (Sputter Coater POLARON) from VG Microtech 276 (model SC7620, Uckfield, United Kingdom). Microphotographs were gathered using electron beams with 277 acceleration speeds of 10-20 keV via random scanning.

# **3. Results and discussion**

280

281 Sericin extraction from the silk cocoons of *Bombyx mori* was carried out as described in detail elsewhere 282 (Rocha et al., 2017). The experimental factorial design undertaken to define the best biopolysaccharide 283 composition and associated mechanical properties for the bioorigami films (see Table 1) yielded as best 284 composition for the bioorigami films those of the level (+1)(0) [(carrageenan gum)(xanthan gum)] (see 285 Table 2). Departing from this (optimal) composition leading to bioorigami films with the highest values of 286 resilience, resistance to perforation and resistance to traction, six bioorigami films were produced (see Table 287 3) integrating the same factorial level of (carrageenan gum)(xanthan gum) (viz. (+1)(0)) and variable 288 amounts of sericin (viz. 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>). In a review paper by Baker et al. (2012), 289 these researchers claim that it is possible to produce soft hydrogels with ca. 10% (w/w) PVA and rigid 290 hydrogels with ca. 50% to 60% (w/w) PVA. The major purpose of the research effort described herein was 291 to produce a bioorigami biopolysacharide film with malleability, although with a certain resistance so that it 292 could be utilized for topical applications. The average moisture content of the several bioorigami films 293 produced ranged between (56.81  $\pm$  0.44) % (w/w) and (32.28  $\pm$  1.47) % (w/w) for the bioorigami films 294 integrating 0 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, respectively.

295

296 **3.1. Fourier Transform Infrared (FTIR) analyses.** A plot of intensity versus radiation frequency, 297 known as infrared spectrum, allow to characterize the functional groups in a given material, making FTIR 298 spectrophotometry widely used in the analysis of the structure of (bio)polymeric systems. FTIR 299 spectrophotometry may allow to clarify possible interactions between the loaded protein and the 300 biopolymeric matrix of the bioorigami film, via analysis of the functional groups present in the different 301 constituents involved in the process. The infrared spectra of (a) lyophilized crude sericin extract, (b) plain 302 bioorigami film, (c) bioorigami film loaded with 1 mg/mL sericin, (d) bioorigami film loaded with 2 mg/mL 303 sericin, (e) bioorigami film loaded with 5 mg/mL sericin, (f) bioorigami film loaded with 10 mg/mL sericin, 304 (g) bioorigami film loaded with 20 mg/mL sericin, and (h) bioorigami film loaded with 50 mg/mL sericin, 305 are displayed in Fig. 1.

## Insert Fig. 1 here

308

309 Comparing the spectrum of lyophilized crude sericin extract (see Fig. 1a) with the spectrum of the plain 310 bioorigami film (see Fig. 1b) and the spectra of the bioorigami films loaded with sericin (see Figs. 1c-h), the 311 same characteristic peaks can be observed with only minor variations in peak intensity, viz. at wavenumbers 1398 cm<sup>-1</sup>, 1423 cm<sup>-1</sup>, and 1409 cm<sup>-1</sup>. This clearly suggests that the chemical aspect of sericin was preserved 312 313 during integration into the bioorigami films. According to Gupta et al. (2014), protein molecules may present characteristic energy absorption between wavenumbers 1650 cm<sup>-1</sup> to 1630 cm<sup>-1</sup> for primary amides, 314 between wavenumbers 1540 cm<sup>-1</sup> to 1520 cm<sup>-1</sup> for secondary amides and between wavenumbers 1270 cm<sup>-1</sup> 315 to 1230 cm<sup>-1</sup> for tertiary amides. From inspection of the transmittance spectra depicted in Fig. 1a, one can 316 317 observe peaks within the wavenumber range probably representing primary amides at approximately 1620 cm<sup>-1</sup> due to the stretch of the carbonyl group (C=O), secondary amides at approximately 1519 cm<sup>-1</sup> and 318 tertiary amides in the region of 1238 cm<sup>-1</sup> due to the stretch of the bond C-N. Additionally, the positions of 319 these peaks confirm the protein, such as 1650 cm<sup>-1</sup> (random coil), and 1613 cm<sup>-1</sup> (beta-sheet), for primary 320 amide, 1540 cm<sup>-1</sup> (random coil) and 1520 cm<sup>-1</sup> (beta-sheet) for secondary amide, and 1270 cm<sup>-1</sup> (beta-sheet) 321 and 1230 cm<sup>-1</sup> (random coil) for the tertiary amide (Gupta et al., 2014). The bioorigami films (see Figs. 1b-322 323 h) produced very similar infrared spectra, irrespective of the presence of protein in the film, with a major 324 peak produced between 3274 cm<sup>-1</sup> and 3308 cm<sup>-1</sup>, corresponding to OH groups in water, and another major 325 peak at 1648 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1b), 1650 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1c), 1650 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1d), 1650 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1e), 1655 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1f), 1655 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1g), and 1639 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1h) corresponding to a stretch of the C=O group of primary 326 327 amides, most likely due to the strong hydrophilic character of primary amides. The stretching vibrations observed in the wavenumber region between 3274-3308 cm<sup>-1</sup> (Reis et al., 2006), accounting for the large 328 329 peaks observed is most likely accounted for by hydroxyl groups from water molecules. Characteristic peaks indicative of protein lie between 1390 cm<sup>-1</sup> to 1250 cm<sup>-1</sup> for C-N bonds, between 1640 cm<sup>-1</sup> and 1500 cm<sup>-1</sup> 330 for N-H groupings, and between 3500 cm<sup>-1</sup> and 3300 cm<sup>-1</sup> corresponding to OH groups in water (Mehta et 331 332 al., 2013). The infrared spectra displayed in Fig. 1 clearly suggest that the chemical aspect of the protein 333 moiety was preserved during production of the bioorigami films, allowing to conclude that the sericin 334 protein did not engage in any chemical interactions with the bioorigami components, only being carried by 335 the film, which otherwise could have reduced its antioxidant activity.

337 3.2. Thermal analyses via TGA and DSC. Mass decrements during heating were evaluated from 338 thermogravimetric curves, whereas the temperature of the maximum rate of mass change  $(T_{max})$  was 339 determined from the maximum of the 1st derivative of the weight loss curves. According to Dandurand et al. 340 (2014), the global trend of the thermogravimetric plot depicted in purple in Fig. 2a (viz. lyophilized sericin) 341 corresponds to the classical thermal behaviour of a freeze-dried protein. The first stage, occurring between 342 25 °C and 100 °C (see Fig. 2a), is generally linked to the evaporation of water adsorbed to the protein 343 moieties, and corresponds to ca. 10% of the total sericin sample mass. The second stage, occurring between 344 200 °C and 400 °C (see Fig. 2a) is associated with the degradation of the protein moieties in the sericin 345 sample, namely the progressive deamination, decarboxylation and depolymerization arising from breaking 346 of (poly)peptide bonds, and concomitant carbonization of the primary structure (between ca. 500 °C and 600 347 °C).

- 348
- 349

### Insert Fig. 2 here

350

351 The degradation of sericin consists of three well-marked steps as shown by three maxima on the 1st 352 derivative of the weight loss curve (see Fig. 2b) at  $T_{max1} \approx 260$  °C,  $T_{max2} \approx 320$  °C and  $T_{max3} \approx 570$  °C. These 353 results are in agreement with results published by Rocha et al. (2017), pertaining to thermogravimetric 354 analysis of crude sericin extracts from plain Bombyx mori cocoons, and Dandurand et al. (2014), pertaining 355 to the thermogravimetric analysis of peptide fragments. The 1st derivative of the weight loss curve (i.e., the 356 rate of mass change, see Fig. 2b) can be used to tell the points at which weight loss is most apparent 357 (inflection points), viz. ca. 60 °C, 260 °C, 320 °C and 570 °C for lyophilized sericin, ca. 60 °C, 180 °C, 270 358 °C and 430 °C for the plain bioorigami film, ca. 60 °C, 170 °C, 270 °C and 430 °C for the bioorigami film 359 loaded with 1 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, ca. 60 °C, 175 °C, 265 °C and 430 °C for the bioorigami film loaded with 2 360 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, ca. 50 °C, 175 °C, 280 °C and 430 °C for the bioorigami film loaded with 5 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, 361 ca. 70 °C, 190 °C, 290 °C and 430 °C for the bioorigami film loaded with 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, ca. 70 °C, 180 362 °C, 290 °C and 430 °C for the bioorigami film loaded with 20 mgsericin/mLfilm, and ca. 60 °C, 170 °C, 290 °C 363 and 430 °C for the bioorigami film loaded with 50 mgsericin/mLfilm. In general, thermal analyses are useful 364 tools in developing formulations since they allow evaluating the compatibility between components of a

365 formulation and the stability and thermal decomposition of bioactive moieties. The data obtained by thermal 366 analysis is directly related to the final quality of a (bio)pharmaceutical product, allowing to infer aspects of 367 therapeutic efficacy of the product or the stability of the product throughout the shelf life (or validity) 368 period. Thermogravimetric analysis (TGA) accompany the variation in sample mass as a function of a linear 369 increase in temperature during a predetermined time interval, allowing to determine the thermal profile of 370 the bioorigami films prepared. As can be observed from inspection of the curves in Fig. 2b, the thermal 371 behavior is guite similar for all bioorigami films, with a small mass loss around ca. 60 °C indicating loss of 372 water. Between 160 °C and 190 °C one can notice a higher loss of mass, indicating a massive loss of water. 373 Between 260 °C and 300 °C, a significative loss of mass indicated degradation of the biopolysaccharide 374 components in the bioorigami films. The results from DSC analyses of lyophilized sericin and plain and 375 sericin-loaded bioorigami film samples, recorded under heating mode between 25 °C and 250 °C, are 376 displayed in Fig. 3. The endothermic peak observed at 58.81 °C (lyophilized sericin sample sample, with 377 associated melting enthalpy of 3.549 J/g) may be considered as the first order transition commonly observed 378 in a broad class of hydrated biopolymers such as proteins. By analogy with the work by Dandurand et al. 379 (2014), this endothermic event is attributable to the evaporation of bound water molecules. As already 380 observed by TGA, degradation of the protein moieties began above 200 °C. In the case of lyophilized 381 sericin sample, the second major endothermic event is the sharp endothermic peak at 123.64 °C (with 382 associated melting enthalpy of 146.8 J/g), associated to order $\rightarrow$  disorder transitions, which can be considered 383 as thermal signatures of protein (irreversible) denaturation (Rocha et al., 2017). The third major endothermic 384 event is the shallow endothermic peak at 219.87 °C (with associated melting enthalpy of 28.06 J/g), 385 associated to degradation phenomena, which can be considered as thermal signature of protein 386 carbonization.

- 387
- 388

#### Insert Fig. 3 here

389

The DSC technique of analysis measures the enthalpy of the samples, and may indicate the glass transition temperature and endothermic and/or exothermic events in the samples under scrutiny. The plain bioorigami film produced according to the experimental factorial design, as well as the bioorigami films loaded with varying amounts of sericin, possessed in their composition 1.25% (w/w) PVA with a degree of hydrolysis of 394 98%, 2.50% (w/w) glycerol, and 0.1% (w/w) methylparaben. The thermograms obtained (see Fig. 3) 395 presented one endothermic event, at 122.76 °C (bioorigami film without sericin), at 114.13 °C (bioorigami 396 film loaded with 1 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), at 132.72 °C (bioorigami film loaded with 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), at 131.83 397 °C (bioorigami film loaded with 5 mgsericin/mLfilm), at 132.04 °C (bioorigami film loaded with 10 398 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), at 127.46 °C (bioorigami film loaded with 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), and at 103.81 °C (bioorigami 399 film loaded with 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>). Since the several bioorigami films just differed in the amount of loaded 400 sericin extract and added water, the data obtained from the DSC analyses indicated that the differences in 401 the thermal behavior of the several bioorigami films arised mainly from the protein added, and also that 402 incorporation of sericin at very high levels do compromise the stability of the bioorigami film for the 403 intended use. The presence of protein in the bioorigami films promoted a slight shift of the endothermic 404 event close at 122.76 °C in the plain bioorigami film, of -8.63 °C in the bioorigami film loaded with 1 405 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, of +9.96 °C in the bioorigami film loaded with 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, of +9.07 °C in the 406 bioorigami film loaded with 5 mgsericin/mLfilm, of +9.28 °C in the bioorigami film loaded with 10 407 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, of +4.70 °C in the bioorigami film loaded with 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, and of -18.95 °C in the 408 bioorigami film loaded with 50 mgsericin/mLfilm. Increasing loadings of sericin in the bioorigami film also led 409 to decreasing variations in the melting enthalpies (viz.  $\Delta\Delta H$ ), of -51.8 J/g in the bioorigami film loaded with 410 1 mgsericin/mLfilm, of -32.1 J/g in the bioorigami film loaded with 2 mgsericin/mLfilm, of -96.5 J/g in the 411 bioorigami film loaded with 5 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, of -41.9 J/g in the bioorigami film loaded with 10 412 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, of -0.7 J/g in the bioorigami film loaded with 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, and of -141.5 J/g in the 413 bioorigami film loaded with 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, which is in clear agreement with the increasing amounts of 414 loaded sericin and concomitant decreasing amounts of water in the bioorigami films. Unfortunately, for very 415 high amounts of sericin in the bioorigami film, thermal stability of the film decreases (which can be 416 concluded by the high decrease in the temperature peak, associated with the high decrease in the melting 417 enthalpy value). The addition (impregnation) of crude sericin extract promoted a slight increase in the 418 melting temperature peak at lower levels of addition (see Fig. 3), and a higher decrease in the melting 419 temperature peak at higher levels of addition (see Fig. 3), denoting a decreased stability of the bioorigami 420 film at higher loadings with sericin. The decrease in the melting temperature verified at higher loadings of 421 the bioorigami with crude sericin extract might be due to amorphization of the system. The results obtained 422 from the DSC thermal analyses carried out with both sericin-loaded and unloaded bioorigami films (see Fig.

3) are in close agreement with those obtained from X-ray diffraction studies (see Fig. 4), since as can be seen from inspection of the DSC thermograms, impregnation of the bioorigami films with crude sericin extract led to a decreased crystallinity. Remarkably, the thermal events depicted in Fig. 3 and the X-ray diffractograms depicted in Fig. 4 denote a clear transition from a (more) crystalline state of the blank bioorigami film (see Fig. 4, gray curve) to a (more) amorphous counterpart (see Fig. 4, bioorigami film loaded with the highest amount of crude sericin extract, light pink curve).

429

**3.3. X-ray diffraction (XRD) analyses.** The results obtained from the X-ray diffraction analyses (XRD)
performed to both the bioorigami films and their isolated constituents, are displayed in Fig. 4 in the form of
normalized diffractograms, and allows to observe a generalized amorphous behavior with two small peaks
of crystallinity for the bioorigami films.

- 434
- 435

### Insert Fig. 4 here

436

437 Normalization of intensity in all diffractograms was performed by dividing the intensity values by the 438 maximum intensity value in each diffractogram (see Fig. 4), thus allowing a better comparison between the 439 X-ray diffractograms of all samples assayed. The diffractograms of the sericin-loaded and unloaded 440 bioorigami films shared a common feature, exhibiting a wide noisy band (less defined and shallow) between 441  $16.00 \le 2\theta \le 29.00$  with more well-defined (crystallinity) peaks in the regions of  $6.00 \le 2\theta \le 7.00$  and 12.00442  $\leq 2\theta \leq 14.00$ , indicating the dominance of amorphous material in the bioorigami films (Young, 2012), 443 clearly imparted by sericin, xanthan gum and carrageenan gum. The two small peaks of crystallinity in the 444 bioorigami films most likely originated from the methylparaben and PVA utilized in the formulation. When 445 comparing the diffractograms of the unloaded bioorigami film (see gray curve in Fig. 4) and the bioorigami 446 film loaded with the highest amount of sericin (see light pink curve in Fig. 4), a widening and flattening of 447 the broad noisy band between  $16.00 \le 2\theta \le 29.00$  is most noticed, due to amorphization of the system to a 448 higher extent promoted by the high sericin payload. These results corroborate the results obtained via 449 FESEM, which indicated the formation of an essentially amorphous film. The decisive advantage of the 450 methods of analysis by X-ray diffraction over other analytical techniques is based on the uniqueness of the 451 diffraction patterns of crystalline substances, on the ability to distinguish between elements and their oxides,

and on the possibility of identifying chemical compounds, polymorphic forms and mixed crystals, via nondestructive analyses. Peaks having high intensity and narrow base width are related to crystalline materials
while wide base peaks are related to amorphous materials.

455

**3.4. Free radical scavenging activity of the bioorigami films integrating variable amounts of sericin.** The results obtained for the DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid and all bioorigami
films integrating variable amounts of sericin are displayed in Table 4.

- 459
- 460

### **Insert Table 4 here**

461

462 For very low levels of sericin in the bioorigami films no antioxidant activity could be detected and, for those 463 with the highest levels of sericin load, different levels of DPPH radical scavenging activity were observed 464 (see Table 4). The bioorigami film integrating the highest load of sericin exhibited the strongest DPPH 465 radical scavenging activity. Ascorbic acid was used as antioxidant standard at a concentration of 0.5 mg/mL 466 and its free radical scavenging power was found to be 96.5%. Hence, the results obtained in the present research effort suggest that both bioorigami films integrating 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> are 467 468 capable of scavenging the free radicals (although at different extensions) and prevent the initiation of free 469 radicals by stabilizing them to participate in any deleterious reactions. These results are in clear agreement 470 with the results previously published by Rocha et al (2017) and Rangi and Jajpura (2015). Different 471 concentrations of silk sericin in the bioorigami films allowed different abilities to quench the DPPH radicals. 472 It was observed that the bioorigami films with 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> scavenged (19.50  $\pm$ 473 0.00)% and  $(24.19 \pm 4.50)$ % of DPPH radicals, respectively (see Table 4). Fan et al. (2009) refer in their 474 work that the functional groups present in the aminoacid moieties Cys, Tyr and His that compose the 475 primary structure of sericin reduce and decolorize DPPH via their hydrogen-donating ability. Hence, it is not 476 surprising to conclude that the silk sericin that was released form the bioorigami films contains electron 477 donors that react with free radicals to convert them to more stable products and terminate the radical chain 478 reaction.

**3.5. Mechanical resistance of the bioorigami films.** Evaluation of the mechanical properties of the bioorigami films produced without sericin, according to the factorial design depicted in Tabe 1 and composition displayed in Table 2, encompassed resistance to perforation, resistance to traction and resilience (see Fig. 5).

- 484
- 485

## Insert Fig. 5 here

486

487 According to the results displayed in Fig. 5a, the best results produced in terms of resistance to perforation, 488 resistance to traction and resilience were obtained for the levels (+1) of carrageenan gum and (0) of xanthan 489 gum. The ability of the bioorigami film to spring back into shape following deformation caused by straining 490 was an especially important attribute, since its elasticity (i.e., its resilience) is an important characteristic for 491 skin applications. Hence, this set of biopolysacharyde levels was followed for the production of bioorigami 492 films loaded with sericin (see Fig. 5b). The mechanical properties of the bioorigami films are mainly related 493 with the biopolymer's ability to form bonds in polymer chains, difficulting their separation when subject to 494 mechanical forces (Yang, 2012). The plasticizer used (glycerol, in this case) also has an influence on these 495 properties (Bourtoom, 2008). The results produced during evaluation of the mechanical resistance of the 496 bioorigami films with different sericin loads, with respect to perforation, traction and resilience, are 497 displayed in Fig. 5b. From inspection of the data displayed in Fig. 5b, increasing sericin loads in the 498 bioorigami film produced increasing resistance to perforation and resilience and decreasing resistance to 499 traction for sericin loads up to 2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>. For higher sericin loads in the bioorigami film, this trend 500 was somehow inverted, and the bioorigami film loaded with 10 mgsericin/mLfilm produced the best results in 501 terms of resilience, resistance to perforation and resistance to traction, when compared with all other 502 bioorigami films and also with its counterpart without sericin. Hence, it may be concluded that the presence 503 of sericin in higher amounts improved the viscoelastic characteristics of deformation and molecular 504 relaxation (viz. return of the bioorigam film from strained conditions back into equilibrium). The bioorigami 505 film produced with the highest sericin load (see Fig. 5b) presented a decrease in resilience and a marked 506 decrease in resistance to traction. The major goal of the research work undertaken was to develop a 507 bioorigami film based on biopolysaccharides and impregnated with silk sericin, suitable for application in 508 skin regeneration. In our perspective, the bioorigami film applied directly to a damaged skin should not 509 strongly adhere, allowing regeneration and re-epithelialization of damaged skin. Thus, perforation, traction 510 and resillience were the mechanical resistance parameters evaluated, whereas adhesiveness or 511 bioadhesiveness were not at all considered important in the research work developed. The optimized 512 bioorigami film is intended to be applied to a damaged skin and maintained in place by a bandage, and not 513 to stick or adhere to the wounded skin. Our perspective is supported by literature references (Rippon et al., 514 2007; Pal et al., 2009). The bioorigami film is also intended to help in maintaining a suitable microclimate 515 on the damaged skin surface, of utmost importance for the biosynthetic reactions necessary for cellular 516 activities. Skin dressings allow the creation of a moist and warm environment beneath the bioorigami film, 517 thus bringing benefits to the regeneration process (Boateng et al., 2008). The developed bioorigami films 518 possess PVC in their composition, which is a hydrophobic polymer with a low surface free energy 519 (Asadinezhad et al., 2012) that do not favor attraction of the water molecules present in the dispersion 520 containing the polymers. As a consequence, this promotes the non-adherence of the bioorigami film to the 521 damaged skin.

522

523 3.6. Transdermal permeation of sericin from bioorigami films. The results obtained from the
524 transdermal permeation of sericin from the different bioorigami films are displayed in Fig. 6.

- 525
- 526

### Insert Fig. 6 here

527

528 As can be observed from inspection of Fig. 6a, increasing loadings of sericin in the bioorigami film led to

increased average permeated protein per skin area. Performing non-linear (hyperbolic,  $y = \frac{(m_1 \cdot x)}{(m_2 + x)}$ 529 530 ) fittings to the results obtained from transdermal permeation of protein from bioorigami films loaded with 531 1, 2, 5 and 10 mgsericin/mLfilm, one obtained the maximum average protein permeated per skin area 532 (parameter  $m_1$ , see Table 5) and the time required to achieve half of the maximum average protein 533 permeated per skin area (parameter m<sub>2</sub>, see Table 5), with excellent correlation coefficients. Regarding 534 higher sericin loadings, at 20 mgsericin/mLfilm and 50 mgsericin/mLfilm, the sigmoidal trend of the protein permeation data was best described by a non-linear fit of the Gompertz function ( $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$ , see Fig. 535 536 6a and Table 5), allowing to obtain the value of the asymptote  $(m_1, i.e., the maximum attainable permeated$ 

537	protein per skin area, see Table 5), the displacement of the data trend along the timeframe studied (viz. $m_2$ ,
538	see Table 5) and the data growth rate (viz. $m_3$ , see Table 5), with excellent correlation coefficients. The
539	Gompertz function is a sigmoid function, where growth is slowest at both start (where protein concentration
540	was initially high, so skin uptake was slow) and end (due to slowing of protein permeation as saturation was
541	reached in the skin) of a given time period.
542	
543	Insert Table 5 here
544	
545	As can be observed from inspection of Fig. 6a and the data in Table 5, the bioorigami film with the highest
546	sericin load allowed the highest average permeated protein per skin area, viz. 1.7022 $\mu g_{protein}/mm^2_{skin}$ .
547	However, this highest amount of permeated protein from bioorigami film with the highest load of sericin
548	translated only to ca. 11.73% of the total protein content in this bioorigami film after 12 h (see Fig. 6b and
549	Table 6).
550	
550 551	Insert Table 6 here
550 551 552	Insert Table 6 here
550 551 552 553	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin
550 551 552 553 554	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to
550 551 552 553 554 555	Insert Table 6 here Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub>
550 551 552 553 554 555 556	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807
550 551 552 553 554 555 556 557	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807 $\mu$ g <sub>protein</sub> /mm <sup>2</sup> <sub>skin</sub> (see Table 5). In a real skin application, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub>
550 551 552 553 554 555 556 557 558	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807 $\mu$ g <sub>protein</sub> /mm <sup>2</sup> <sub>skin</sub> (see Table 5). In a real skin application, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would advocate an ideal situation, but the low sericin load would make it unpracticable. On the other hand,
550 551 552 553 554 555 556 557 558 559	Insert Table 6 here Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807 µg <sub>protein</sub> /mm <sup>2</sup> <sub>skin</sub> (see Table 5). In a real skin application, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would advocate an ideal situation, but the low sericin load would make it unpracticable. On the other hand, and also considering its mechanical properties as discussed before, the bioorigami film loaded with 10
550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807 μg <sub>protein</sub> /mm <sup>2</sup> <sub>skin</sub> (see Table 5). In a real skin application, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would advocate an ideal situation, but the low sericin load would make it unpracticable. On the other hand, and also considering its mechanical properties as discussed before, the bioorigami film loaded with 10 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would be ideal since in a 12-h timeframe (considered adequate) ca. 50% of all the bioactive
550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561	<b>Insert Table 6 here</b> Clearly this is not at all an ideal situation in a real skin application, since patching this bioorigami in the skin would lead to a waste of protein paramounting to ca. 88.27% of the protein load in the film, due to saturating conditions in the skin. On the other hand, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> allowed release of virtually all protein into the skin during a 12-h timeframe, which translated into 0.807 μg <sub>protein</sub> /mm <sup>2</sup> <sub>skin</sub> (see Table 5). In a real skin application, the bioorigami film loaded with 2 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would advocate an ideal situation, but the low sericin load would make it unpracticable. On the other hand, and also considering its mechanical properties as discussed before, the bioorigami film loaded with 10 mg <sub>protein</sub> /mL <sub>film</sub> would be ideal since in a 12-h timeframe (considered adequate) ca. 50% of all the bioactive protein in the bioorigami film would be released into the skin. On the contrary, the bioorigami films loaded

563 even for longer timeframes (see Table 6).

565 3.7. Mathematical modelling of sericin release from bioorigami films. To shed light on the release 566 profile of protein (sericin) from the bioorigami films, and because after the 12 h timeframe of assays the 567 amount of protein released (that effectively permeated through the skin membrane into the receiving 568 phosphate buffer) reached a plateau, one applied the mathematical models of first order (  $Ln Q_t = Ln Q_0 + k_1 \times t$ , where  $Q_t$  is the amount of protein released at time t,  $Q_0$  is the initial amount of 569 protein in dosage form,  $k_l$  is a release rate constant, and t is time), Higuchi ( $Q_t = k_H \cdot \sqrt{t}$ , where  $Q_t$  is the 570 571 amount of protein released at time t,  $k_H$  is the Higuchi constant and t is time) and Korsmeyer-Peppas (  $Q_t / Q_\infty = k_{KP} \cdot t^n$ , where  $Q_t$  is the amount of protein released at time t,  $Q_\infty$  is the total amount of protein 572 573 permeated when the dosage form (bioorigami film) is exhausted,  $k_{KP}$  is the Korsmeyer-Peppas kinetic 574 constant, n is the diffusion or release exponent, ant t is time) to protein drug release (permeation) data. The 575 protein determinations undertaken clearly showed (see Figs. 6a and 6b) that the protein release (permeation) 576 profile reached increasing plateaus with increasing loads of sericin in the bioorigami films. In fact, for 577 sericin loadings of 2 mgsericin/mLfilm and 50 mgsericin/mLfilm, protein release from the bioorigami films did not 578 occur by diffusion but by erosion of the biopolymeric matrix instead (see Fig. 7b), whereas for sericin loadings of 1 mgsericin/mLfilm, 10 mgsericin/mLfilm and 20 mgsericin/mLfilm protein release from the bioorigami 579 580 films did occur by diffusion (see Fig. 7b). This is in fact supported by the model fittings performed to the 581 experimental protein release data from the bioorigami films, which produced a correlation coefficient  $(r^2)$  of 582 0.23904 (1 mgsericin/mLfilm), 0.66186 (2 mgsericin/mLfilm), 0.32995 (5 mgsericin/mLfilm), 0.57894 (10 583 mgsericin/mLfilm), 0.43007 (20 mgsericin/mLfilm) and 0.68887 (50 mgsericin/mLfilm) for the first-order model, a 584 correlation coefficient of 0.08711 (1 mgsericin/mLfilm), 0.16249 (2 mgsericin/mLfilm), 0.16684 (5 mgsericin/mLfilm), 585 0.94777 (10  $mg_{sericin}/mL_{film}$ ), 0.74003 (20  $mg_{sericin}/mL_{film}$ ) and 0.83605 (50  $mg_{sericin}/mL_{film}$ ) for the Higuchi 586 model, and a correlation coefficient 0.70704 (1 mgsericin/mLfilm), 0.89503 (2 mgsericin/mLfilm), 0.84241 (5 587 mgsericin/mLfilm), 0.93728 (10 mgsericin/mLfilm), 0.83899 (20 mgsericin/mLfilm) and 0.92070 (50 mgsericin/mLfilm) for the Korsmeyer-Peppas model (see Fig. 7a). The fittings performed clearly show a poorer r<sup>2</sup> for both first-588 order and Higuchi models and a much better  $r^2$  for the Korsmeyer-Peppas model. Additionally, the diffusion 589 590 or release exponent (n) in the Korsmeyer-Peppas model produced by fitting the model to the protein release 591 data (see Figs. 7a and 7b) was n=0.55673 (1 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), n=1.19010 (2 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>), n=0.20758 (5 592 mgsericin/mLfilm), n=0.58699 (10 mgsericin/mLfilm), n=0.75754 (20 mgsericin/mLfilm) and n=1.15200 (50

593 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>) (in the Korsmeyer-Peppas drug release model, n=0.45 suggests Fickian diffusion, 594 0.45<n<0.89 suggests anomalous diffusion or non-Fickian diffusion, and n≥0.89 suggests erosion of the 595 polymeric chain), which clearly suggests that protein release from the bioorigami films loaded with 2 596 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> did not occur by diffusion but by erosion of the biopolymeric matrix 597 instead (see Fig. 7b), whereas for sericin loadings of 1 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> and 20 598 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> protein release from the bioorigami films did occur by anomalous diffusion or non-Fickian 599 diffusion (see Fig. 7b).

- 601

#### Insert Fig. 7 here

602

603 The linear fittings performed to the transformed protein permeation (release) data using the Korsmeyer-604 Peppas model (see Fig. 7a) allow to see that nearly perfect fittings were produced, further supporting the 605 conclusion that protein release from the bioorigami films occurred by anomalous diffusion or non-Fickian 606 diffusion for very low and intermediate sericin loadings, and by erosion of the biopolymeric matrix for low 607 and very high sericin loadings (see Fig. 7b). Although a slower bioactive protein liberation is intended for 608 real skin applications, where the bioorigami film is intended for application in a skin where the normal 609 exsudation produced is not as abundant as the conditions implemented in the laboratory, erosion of the 610 bioorigami film with concomitant release of protein should happen to a much lower extent.

611

612 **3.8. XRT analyses.** The optimized bioorigami film developed may be considered a natural polymer 613 composite exhibiting a very special porous microstructure that enables the film to possess outstanding 614 mechanical properties. From the tomographic analyses via X-ray transmission performed to a square section 615 of the bioorigami film loaded with 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> (see Fig. 8), a homogeneous surface can be observed.

- 616
- 617

## Insert Fig. 8 here

618

Due to absorbing more radiation, because of its higher atomic density, the biopolysaccharide matrix network (in green in Fig. 8) in in greater evidence, whereas void spaces appear in black. These results are in close agreement with those obtained by infrared spectrophotometry (see Figure 1) which indicated that sericin probably did not engage in any chemical bonding with the biopolymeric matrix. This is clearly an important and positive data, since by not engaging in any chemical bonding with the biopolymeric matrix, sericin becomes readily available and maintains its antioxidant activity. A comparative porosity analysis of the bioorigami film loaded with 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub> can be found in Table 7, resulting from 2D and 3D morphological analyses.

- 627
- 628

#### **Insert Table 7 here**

629

Anisotropy is the property of being directionally dependent, as opposed to isotropy, which implies identical properties in all directions. Anisotropy may be defined as a difference, when measured along different axes, in the mechanical or physical properties of a material. The degree of anisotropy, calculated as Degree of anisotropy =  $1 - \left(\frac{\text{Eigenvalue}_{min}}{\text{Eigenvalue}_{max}}\right)$ , is 0 for total isotropy and 1 for total anisotropy. Hence,

634 as can be seen from inspection of the data in Table 7, the degree of anisotropy is 0.75480 for the bioorigami 635 film loaded with 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, a value that is more close to anisotropy than to isotropy in the 636 aforementioned scale. Being the bioorigami film loaded with sericin from Bombyx mori cocoons an 637 engineered biomaterial with a woven structure, this result is easily understandable under the light of the 638 FESEM images displayed in Fig. 10. When analyzing the structure of the bioorigami film loaded with 10 639 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, one finds that it has an open porosity of 50.61% and an equal value of total porosity (see 640 Table 7). Additionally, the mean fragmentation index (see Table 7) gives an index of connectivity and 641 calculates an index of relative convexity or concavity of the total object surface, on the principle that 642 concavity indicates connectivity (and the presence of "nodes"), and convexity indicates isolated 643 disconnected structures (struts). Lower fragmentation indexes mean better connected lattices while higher 644 fragmentation indexes means a more disconnected structure. Scarce enclosed cavities and concave surfaces 645 can push the fragmentation index to (large) positive values, which was in fact determined in the analyses 646 performed (see Table 7). These results are quite important since due to the fact that sericin was 647 homogeneously dispersed throughout the biopolymeric structure of the bioorigami film during the 648 polymerization process, the bioorigami can be applied with either of its surfaces towards the skin.

650	3.9. EDXRF analyses. Fig. 9 shows the typical X-ray fluorescence spectra of several of the bioorigami
651	films produced with variable amounts of sericin from Bombyx mori cocoons. The major chemical elements
652	found are pinpointed in Fig. 9.
653	
654	Insert Fig. 9 here
655	
656	The measured spectra were analyzed with the XRS-FP <sup>TM</sup> software package provided by Amptek Inc., taking
657	into account both escape peaks and sum peaks, and representing the background with a polynomial function.
658	The same elements were found in all bioorigami films, but in bioorigami films loaded with higher amounts
659	of sericin (see Fig. 9), one found larger amounts of Ca, S and K and trace amounts of sulfur P, Cr, Nd, Mn
660	and Ni, results that are consistent and in clear agreement with results published elsewhere for crude sericin
661	extracts from Bombyx mori cocoons (Rocha et al., 2017).
662	
663	3.10. Structural microanalysis of bioorigami films integrating sericin, via DESEM analyses.
664	The dispersive energy scanning electron microscopy (DESEM) images of both the surface and fracture
665	cross-section of the bioorigami films loaded with variable amounts of sericin allows observing a rugged
666	surface with generalized absence of cracks (see Fig. 10).
667	
668	Insert Fig. 10 here
669	
670	Probably due to the process involved in preparation of the samples prior to sputter coating with colloidal
671	Au, fixation of the films in the carbon supports by stretching them might have produced the microscopic
672	cracks observable in some of the photomicrographs in Fig. 10, especially for higher magnifications.
673	Nevertheless, from the results gathered in the scanning electron microscopy analyses performed to the
674	selected bioorigami films, a uniform morphology could be observed, at three high magnifications (viz. x500,
675	x5000, x10000). The fractured cross-section of the bioorigami films exhibit a highly homogeneous matrix of
676	the biopolymeric structures, which facilitate sericin release upon contact of the film with damaged skin. It
677	can be observed that the topography in the film biostructure displayed in Fig. 10 is highly uniform.
678	

## 679 4. Conclusions

680

In the research effort just described, development and optimization of a bioorigami film concept loaded with 681 682 variable amounts of sericin from *Bombyx mori* cocoons was pursued, aiming at antioxidant and regenerative 683 topical applications. The bioorigami films developed displayed a good characteristic in relation to release of 684 the active antioxidant moiety, verified through transdermal permeation studies and kinetics associated with 685 the sericin release process, and since release of sericin from the biopolysaccharide matrix of the bioorigami 686 film occurred by non-Fickian diffusion for sericin loads up to 20 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, it can be utilized in the 687 occlusive regeneration of wound damages for long periods of time. The bioorigami films loaded with crude 688 sericin extracts from Bombyx mori cocoons were found to be suitable for biopharmaceutical and skin 689 regeneration applications, a conclusion fully supported by the results gathered from the physico-chemical 690 characterization that was entailed.

691

### 692 **5. Acknowledgements**

693

694 Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil; 695 Refs. No. 2016/08884-3 (Project PneumoPhageColor) and 2016/12234-4 (Project TransAppIL), is 696 hereby gratefully acknowledged. Funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 697 (FAPESP Ref. No. 2016/16641-3) in the form of a M.Sc. fellowship granted to Liliam Katsue Harada is 698 hereby gratefully acknowledged. Funding by the University of Sorocaba (UNISO, Sorocaba, Brazil) for 699 Laura Favaro is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National 700 Council for Scientific and Technological Development – Brazil, in the form of a Research Productivity (PQ) 701 fellowship granted to Victor M. Balcão (Ref. No. 306113/2014-7). The authors have no conflicts of interest 702 whatsoever to declare.

7	03	
1	0J	

## 704 **6. References**

- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and
  antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry 2004; 84:
  551-562.
- Andrews, G. P.; Laverty, T. P.; Jones, D. S. (2009) Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug
  delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (3): 505-518.
- Asadinezhad, A.; Lehocký, M.; Sáha, P.; Mozetic, M. (2012) Recent progress in surface modification of
  polyvinyl chloride. *Materials* 5: 2937-2959.
- Baker, M. I.; Walsh, S. P.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. (2012) A review of polyvinyl alcohol and its uses in
  cartilage and orthopedic applications, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 100 (5): 1451-1457.
- Balcão VM, Vieira MC, Malcata FX. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations
  onto a hollow-fiber membrane module. Biotechnology Progress 1996; 12: 164-172.
- Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. (2008) Wound healing dressings and
  drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (8): 2892-2923.
- Bourtoom, T. (2008) Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starchchitosan, *Songklanakarin Journal Science Technology* **30** (Suppl.1): 149-165.
- Caetano, K. S.; Morais, C. P.; Flôres, S. H.; Cladera-Olivera, F. (2015) Atividade antioxidante de filmes
  biodegradáveis de amido de mandioca com adição de extrato de casca de abóbora e óleo de orégano,
- *In:* Anais do 5° Simpósio de Segurança Alimentar Alimentação e Saúde, 26-29 May 2015, Bento
   Gonçalves/ RS, Brazil.
- Cho KY, Moon JY, Lee YW, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim KH, Cho CS. Preparation of selfassembled silk sericin nanoparticles. Int J Biol Macromol 2003; 32: 36-42.
- Chopra S, Gulrajani ML. Comparative evaluation of the various methods of degumming silk. Indian Journal
  of Fibre & Textile Research 1994; 19: 76-83.

- 730 Dandurand J, Samouillan V, Lacoste-Ferre MH, Lacabanne C, Bochicchio B, Pepe A. Conformational and
- thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature
  of the amyloid fibers. Pathologie Biologie 2014; 62: 100-107.
- Fan J-B, Wu L-P, Chen L-S, Mao X-Y, Ren F-Z. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. Journal of Food Biochemistry 2009; 33: 74-88.
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. J Opt Soc Am A 1984; 1: 612-619.
- Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. (2010) Theoretical description of hydrogel
  swelling: a review, *Iranian Polymer Journal* 19 (5): 375-398.
- Gimenes ML, Silva VR, Vieira MGA, Silva MGC, Scheer AP. High Molecular Sericin from *Bombyx mori* Cocoons: Extraction and Recovering by Ultrafiltration. International Journal of Chemical Engineering
   and Applications 2014; 5: 266-271.
- Gupta D, Agrawal A, Rangi A. Extraction and characterization of silk sericin. Indian Journal of Fibre &
  Textile Research (IJFTR) 2014; 39: 364-372.
- Gupta, P.; Vermani, K.; Garg, S. (2002) Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery,
   *Drug Discovery Today* 7 (10): 569-579.
- 745 Hwang, M.-R.; Kim, J. O.; Lee, J. H.; Kim, Y. I.; Kim, J. H.; Chang, S. W.; Jin, S. G.; Kim, J. A.; Lyoo, W.
- 746 S.; Han, S. S.; Ku, S. K.; Yong, C. S.; Choi, H.-G. (2010) Gentamicin-Loaded Wound Dressing With
- Polyvinyl Alcohol/Dextran Hydrogel: Gel Characterization and *In Vivo* Healing Evaluation, *AAPS Pharmaceutical Science & Technology* 11 (3): 1092-1103.
- Kunz RI, Brancalhão RMC, Ribeiro LFC, Natali MRM. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical
   Applications. BioMed Research International 2016; Article ID 8175701: 19 pages.
- Liu, Y.; Vrana, N. E.; Cahill, P. A.; McGuinness, G. B. (2009) Physically crosslinked composite hydrogels
  of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell
  compatibility. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **90** (2): 492-502.
- Mehta P, Sharma D, Dashora A, Sahu D, Garg RK, Agrawal P, Kapoor DN. Design, development and
  evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and
  wounds. Innovare Journal of Life Science 2013; 1: 38-44.

- 757 Murphy, D. J.; Sankalia, M. G.; Loughlin, R. G.; Donnelly, R. F.; Jenkins, M. G.; McCarron, P. A. (2012)
- Physical characterisation and component release of poly(vinyl alcohol)-tetrahydroxyborate hydrogels
  and their applicability as potential topical drug delivery systems, Int. J. Pharm. 423 (2): 326-334.
- Oliveira Junior JM, Martins ACG. Construction and test of low cost X-ray tomography scanner for physical,
   chemical analysis and nondestructive inspections. AIP Conf Proc 2009; 1139: 102-105.
- Pal, K.; Banthia, A. K.; Majumdar, D. K. (2009) Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical
   Applications A mini review, Designed Monomers and Polymers 12: 197-220.
- Rangi A, Jajpura L. The Biopolymer Sericin: Extraction and Applications. J Textile Sci Eng 2015; 5: 1-5.
- Reis EF, Campos FS, Lage AP, Leite RC, Heneine LG, Vasconcelos WL, Lobato ZIP, Mansur HS.
  Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein
  adsorption. Materials Research 2006; 9: 185-191.
- Rippon, M.; White, R.; Davies, P. (2007) Skin adhesives and their role in wound dressings, *Wounds UK* 3
  (4): 76-86.
- Robyt JF, White BJ. Biochemical Techniques Theory and Practice. Chicago IL: Waveland; 1990.
- 771 Rocha. L. K. H.; Favaro, L. I. L.; Rios, A. C.; Silva, E. C.; Silva, W. F.; Stigliani, T. P.; Guilger, M.; Lima, 772 R.; Oliveira Jr, J. M.; Aranha, N.; Tubino, M.; Vila, M. M. D. C.; Balcão, V. M. (2017) Sericin from 773 Bombyx mori cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for 774 biopharmaceutical applications, **Biochemistry 61**: 163-177, Process doi: 775 10.1016/j.procbio.2017.06.019.
- Salerno, C.; Carlucci, A. M.; Bregni, C. (2010) Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of
  fluconazole from topical dosage forms, AAPS PharmSciTech 11 (2): 986-993.
- Song, A.; Rane, A. A.; Christman, K. L. (2012) Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and
  poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing, *Acta Biomaterials* 8 (1): 4150.
- Tao W, Li M, Xie R. Preparation and structure of porous silk sericin materials. Macromolecular Materials
  and Engineering 2005; 290: 188-194.
- Wu J-H, Wang Z, Xu S-Y. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry
  wastewater. Food Chemistry 2007; 103: 1255-1262.

785	Yan C.; Pochan, D. J. (2010) Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other
786	applications, Chemical Society Reviews 39 (9): 3528-3548.

Yang, T. (2012) Mechanical and swelling properties of hydrogels, *KTH Ytbehandlingsteknik*, Doctoral
thesis, p. 77.

789	Young AL. Powde	r X-ray Diffraction ar	nd its Applicat	ion to Bioth	erapeutic Formul	ation Develop	oment.
790	American	Pharmaceutical	Review	2012	(available	online	at:
791	http://www.ar	mericanpharmaceutical	review.com/Fe	atured-Articl	es/38371-Powder	-X-ray-Diffrac	tion-
792	and-its-Appli	cation-to-Biotherapeuti	ic-Formulation-	Developmen	t/).		
793							

- 794
- 795

# 796 FIG. CAPTIONS

797

Fig. 1: FTIR spectra of (a) lyophilized crude sericin extract, (b) plain bioorigami film, (c) bioorigami
film with 1 mg/mL sericin, (d) bioorigami film with 2 mg/mL sericin, (e) bioorigami film with
5 mg/mL sericin, (f) bioorigami film with 10 mg/mL sericin, (g) bioorigami film with 20
mg/mL sericin, and (h) bioorigami film with 50 mg/mL sericin.

- 802
- Fig. 2: Thermogravimetric curves (a) and 1st derivative of the weight loss curves (b) of lyophilized
  sericin extract (purple curve), blank bioorigami film (gray line), bioorigami film with 1 mg/mL
  sericin (light blue curve), bioorigami film with 2 mg/mL sericin (orange curve), bioorigami
  film with 5 mg/mL sericin (brown curve), bioorigami film with 10 mg/mL sericin (red curve),
  bioorigami film with 20 mg/mL sericin (green curve), and bioorigami film with 50 mg/mL
  sericin (light pink curve).
- 809

810 Fig. 3: Differential scanning calorimetry thermograms of lyophilized sericin extract and bioorigami811 films loaded with variable amounts of sericin.

812

813 Normalized intensity X-ray diffractograms (XRD) of lyophilized sericin extract (purple curve), Fig. 4: 814 methylparaben (yellow curve), glycerol (pink curve), PVA (red curve), xanthan gum (dark 815 brown curve), carrageenan gum (dark blue curve), blank bioorigami film (gray line), 816 bioorigami film with 1 mg/mL sericin (light blue curve), bioorigami film with 2 mg/mL sericin 817 (orange curve), bioorigami film with 5 mg/mL sericin (light brown curve), bioorigami film with 818 10 mg/mL sericin (dark pink curve), bioorigami film with 20 mg/mL sericin (green curve), and 819 bioorigami film with 50 mg/mL sericin (light pink curve). The X-ray diffractograms were 820 gathered using Cu target-filtered X-rays.

821

Fig. 5: Results gathered from the mechanical resistance tests performed to the (a) plain bioorigami films evolved from the experimental factorial design, and (b) bioorigami films produced with varying loads of sericin having as base the levels (+1) of carrageenan and (0) of xanthan gums. Fig. 6: Results gathered from transdermal permeation studies, as (a) average permeated protein per skin area, and (b) percent protein released from bioorigami films relative to the amount of sericin loaded in the films, during a 12 h-timeframe assay. Values are the means of three experiments (n=3), with associated standard deviations less than 0.01 in all cases. Solid lines represent nonlinear fittings performed to the data, viz. hyperbolic for those bioorigami films loaded with sericin amounts between 0 and 10 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>, and Gompertz function for those bioorigami films loaded with sericin amounts between 20 and 50 mg<sub>sericin</sub>/mL<sub>film</sub>.

833

825

Fig. 7: Results obtained from the mathematical modelling of the sericin release assays from the sericin-loaded bioorigami films during a 12-h timeframe assay. The linear fittings performed to transformed experimental data, using the linearized Korsmeyer-Peppas model are displayed as figure (a), whereas in figure (b) the diffusion or release exponent (n) in the Korsmeyer-Peppas model as a function of sericin load in the bioorigami film allows observation of the change in the sericin release pattern.

840

- 841Fig. 8:Images obtained by tomographic analyses via X-ray transmission of the bioorigami film loaded842with 10 mg\_{sericin}/mL\_{film}, being (a) a slant profile image of the bioorigami film, (b) image843perpendicular to the surface of the bioorigami film, and (c) leaning surface view of the844bioorigami film. Three-dimensional image slices were gathered using an operating voltage set845at 29 kV and electric current with 415 μA.
- 846

Fig. 9: EDXRF spectra of selected bioorigami films loaded with variable amounts of sericin. The YY
axis represents the number of characteristic X-ray counts that reached the detector, while the
XX axis represents the energy of the characteristic X-rays.

850

Fig. 10: FESEM photomicrographs of the bioorigami films loaded with variable amounts of sericin, at
several magnifications (plain bioorigami film surface, a1: x500, a2: x5000, a3: x10000, plain
bioorigami fracture cross-section, a4: x100, a5: x500, a6: x2500; bioorigami film surface

854	loaded with 1 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , <b>b1</b> : x500, <b>b2</b> : x5000, <b>b3</b> : x10000, bioorigami film surface loaded
855	with 1 $mg_{sericin}/mL_{film}$ fracture cross-section, b4: x100, b5: x500, b6: x2500; bioorigami film
856	surface loaded with 2 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , c1: x500, c2: x5000, c3: x10000, bioorigami film surface
857	loaded with 2 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> fracture cross-section, c4: x100, c5: x500, c6: x2500; bioorigami
858	film surface loaded with 5 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , d1: x500, d2: x5000, d3: x10000, bioorigami film
859	surface loaded with 5 $mg_{sericin}/mL_{film}$ fracture cross-section, d4: x100, d5: x500, d6: x2500;
860	bioorigami film surface loaded with 10 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , e1: x500, e2: x5000, e3: x10000,
861	bioorigami film surface loaded with 10 $mg_{sericin}/mL_{film}$ fracture cross-section, e4: x100, e5:
862	x500, e6: x2500; bioorigami film surface loaded with 20 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , f1: x500, f2: x5000,
863	f3: x10000, bioorigami film surface loaded with 20 $mg_{sericin}/mL_{film}$ fracture cross-section, f4:
864	x100, <b>f5</b> : x500, <b>f6</b> : x2500; and bioorigami film surface loaded with 50 mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> , <b>g1</b> : x500,
865	g2: x5000, g3: x10000, bioorigami film surface loaded with 50 mg_{sericin}/mL_{film} fracture cross-
866	section, g4: x100, g5: x500, g6: x2500), gathered using the electron back-scattered diffraction
867	(EBSD) technique.



Figure 1



Figure 2



Figure 3





Figure 5



Figure 6



Figure 7



Figure 8





**Table 1.** Full 3<sup>2</sup> factorial design, providing the lower (-1), central (0) and upper (+1) level values for each variable.

	Levels				
Independent variables	Low level Central level		Upper level		
	(-1)	(0)	(+1)		
Carrageenan gum (%, w/w)	0.750	1.500	2.250		
Xanthan gum (%, w/w)	0.250	0.500	0.750		

Levels / mass			PVA	Glycerol	Methylparaben	Ultranure water	
Carrageenan gum		Xantl	han gum	(g)	(g)	(g)	(g)
(g)			(g)	(6)	(6)	(5)	(8)
(-1)	0.075	(-1)	0.025	0.125	0.250	0.010	9.515
(-1)	0.075	(0)	0.050	0.125	0.250	0.010	9.490
(-1)	0.075	(+1)	0.075	0.125	0.250	0.010	9.465
(0)	0.150	(-1)	0.025	0.125	0.250	0.010	9.440
(0)	0.150	(0)	0.050	0.125	0.250	0.010	9.415
(0)	0.150	(+1)	0.075	0.125	0.250	0.010	9.390
(+1)	0.225	(-1)	0.025	0.125	0.250	0.010	9.365
(+1)	0.225	(0)	0.050	0.125	0.250	0.010	9.340
(+1)	0.225	(+1)	0.075	0.125	0.250	0.010	9.315

**Table 2.** Composition of the plain bioorigami films for optimization of the appropriate mechanical properties.
Bioorigami #	Carrageenan gum (g)	Xanthan gum (g)	PVA (g)	Glycerol (g)	Methylparaben (g)	Sericin (g)	Ultrapure water (g)
Bioo1	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.000	9.340
Bioo2	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.010	9.330
Bioo3	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.020	9.320
Bioo4	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.050	9.290
Bioo5	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.100	9.240
Bioo6	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.200	9.140
Bioo7	0.225	0.050	0.125	0.250	0.010	0.500	8.840

**Table 3.** Composition of the several bioorigami films integrating variable amounts of sericin.

**Table 4.** Antioxidant activity (%) of the several bioorigami films integrating varying amounts of sericin, asfree radical scavenging ability measured via the DPPH methodology.

Sericin load in the bioorigami	Free (relative) radical scavenging activity (%) [average $(n=3) \pm \sigma$ ]				
(mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> )	Ascorbic acid	Bioorigami film			
0	96.50±0.23	0.00±0.00			
1		0.00±0.00			
2		0.00±0.00			
5		0.00±0.00			
10		0.00±0.00			
20		19.50±0.00			
50		24.19±4.50			

**Table 5.** Results obtained from the non-linear fittings performed to the average permeated protein per skin area ( $\mu g_{protein} / mm_{skin}^2$ ) as a function of permeation time, for the several bioorigami films integrating

Sericin load in the bioorigami film (mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> )	Hyperbolic function: $y = \frac{m_1 \cdot x}{m_2 + x}$		Gompertz function: $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$			r
	<b>m</b> <sub>1</sub>	<b>m</b> <sub>2</sub>	<b>m</b> <sub>1</sub>	<b>m</b> <sub>2</sub>	<b>m</b> <sub>3</sub>	
1	0.03400	0.35955				0.52251
2	0.80669	4.83650				0.99616
5	0.55243	0.20255				0.82172
10	1.53480	1.92380				0.99699
20			0.62395	12.748	1.86340	0.93200
50			1.70220	16.362	0.78679	0.99892

varying amounts of sericin.

**Table 6.** Results obtained from the non-linear fittings performed to the average protein released from

 bioorigami film (%) as a function of permeation time, for the several bioorigami films integrating varying

 amounts of sericin.

Sericin load in the bioorigami film (mg <sub>sericin</sub> /mL <sub>film</sub> )	Hyperbolic function: $y = \frac{m_1 \cdot x}{m_2 + x}$		Gompertz function: $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$			r
	<b>m</b> <sub>1</sub>	<b>m</b> <sub>2</sub>	<b>m</b> <sub>1</sub>	<b>m</b> <sub>2</sub>	<b>m</b> <sub>3</sub>	
1	26.589	0.35864				0.90344
2	128.68	4.83850				0.99616
5	47.225	0.34991				0.98566
10	68.840	1.92380				0.99699
20			6.81460	12.7470	1.86330	0.93200
50			11.7270	16.3630	0.78680	0.99892

	Bioorigami film loaded with 10 $mg_{sericin}/mL_{film}$			
Parameter	<b>Bi-dimensional (2D)</b>	Three-dimensional (3D)		
	morphological analysis	morphological analysis		
Number of layers		101.000		
Pixel size (µm)		20.7991		
Total VOI (volume of interest), TV (mm <sup>3</sup> )	0.07810	0.07076		
Object volume, Obj.V (mm <sup>3</sup> )	0.04102	0.03495		
Percent object volume, Obj.V/TV (%)	52.5216	49.3932		
Total VOI surface, TS (mm <sup>2</sup> )	5.54313	5.08429		
Object surface, Obj.S (mm <sup>2</sup> )	4.02444	3.68457		
Intersection surface, i.S (mm <sup>2</sup> )		1.42233		
Object surface / volume ratio, Obj.S/Obj.V (mm <sup>-1</sup> )	98.1101	105.426		
Crossectional thickness, Cs.Th (mm)	0.02584			
Object surface density, Obj.S/TV (mm <sup>-1</sup> )		52.0735		
Degree of anisotropy, DA		4.07826 (0.75480)		
Eigenvalue 1		0.02233		
Eigenvalue 2		0.06913		
Eigenvalue 3		0.09109		
Number of closed pores, Po.N(cl)		0.00000		
Volume of closed pores, Po.V(cl) (mm <sup>3</sup> )		0.00000		
Surface of closed pores, Po.S(cl) (mm <sup>2</sup> )		0.00000		
Closed porosity (percent), Po(cl) (%)	0.00000	0.00000		
Mean fragmentation index, Fr.I (mm <sup>-1</sup> )	11.9519	15.3358		
Mean fractal dimension, FD	0.78338	1.71086		
Volume of open pore space, Po.V(op) (mm <sup>3</sup> )		0.03581		
Open porosity (percent), Po(op) (%)		50.6068		
Total volume of pore space, Po.V(tot) (mm <sup>3</sup> )		0.035810		
Total porosity (percent), Po(tot) (%)		50.6068		
Euler number, Eu.N		-54.0000		
Connectivity, Conn		151.000		
Connectivity density, Conn.Dn (mm <sup>-3</sup> )		2134.06		

## **Table 7.** Results obtained from the tomographic analyses via X-ray transmission performed to the bioorigami films integrating variable amounts of sericin from *Bombyx mori* cocoons.