UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

FRANCISCO VIEIRA DOS SANTOS

Desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína de seda visando aplicações biomédicas

São Carlos 2022

FRANCISCO VIEIRA DOS SANTOS

Desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína de seda visando aplicações biomédicas

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento e caracterização de materiais

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Cristina Branciforti

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka

São Carlos 2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP

S237d	Santos, Francisco Vieira dos Desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína de seda visando aplicações biomédicas / Francisco Vieira dos Santos; orientadora Márcia Cristina Branciforti; Co-orientador Sérgio Akinobu Yoshioka São Carlos, 2022.
	Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.
	 Fibroína de seda. 2. Filmes finos. 3. Glicerol. Biomateriais. 5. Engenharia tecidual. I. Titulo.

Elaborado por Elena Luzia Palloni - CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro FRANCISCO VIEIRA DOS SANTOS.

Título da dissertação: "Desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína de seda visando aplicações biomédicas".

Data da defesa: 15/02/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

novado

Profa. Associada Marcia Cristina Branciforti (Orientadora) (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Aprovado

Dr. Daniel Souza Corrêa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais:

Prof. Associado Rafael Salomão

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Titular Murilo Araujo Romero

Aos meus pais Maria de Lourdes Pereira e Francisco Vieira dos Santos Neto (in memoriam) pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha família pela paciência, apoio, incentivo, compreensão e suporte em todos os momentos da minha vida.

À professora Márcia Cristina Branciforti pela orientação, ensinamentos, apoio e incentivos em momentos importantes no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Sérgio Akinobu Yoshioka, pela coorientação, apoio e ensinamentos na área de biomateriais.

Ao técnico Ricardo Gomes Pereira por todo suporte na realização dos testes laboratoriais no departamento de Engenharia de Materiais da EESC/USP.

À Professora Ana Maria de Guzzi Plepis e a Dr. Virgínia da Conceição Amaro pelo apoio nas atividades de pesquisa desenvolvidas no laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC/USP.

Ao grande amigo Fernando Júnio Duarte pela amizade, suporte e incentivo nesta jornada.

Aos alunos do Grupo de Pesquisa e colaboradores, Aline Pauletto, Ana Lancarovici, Deliane Cabral, Daniel Cunha, Larissa Proença, Lucas Staffa, Marcos Nicolino, Paula Sanvezzo, Pedro Thiayamiti, Rafael Mazzaro, Sendy Soares e Vinicius de Oliveira pelo apoio, incentivo e sugestões que foram fundamentais nesta caminhada científica.

Aos funcionários da EESC/USP, do Departamento de Engenharia de Materiais (SMM/USP), aos amigos e todos aqueles que contribuíram de forma direita ou indireta para que este trabalho fosse concretizado.

Ao Convênio FAPESP/CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro referente ao processo FAPESP nº 2017/26194-7.

"O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas".

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

SANTOS, FV. Desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína de seda visando aplicações biomédicas [Dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo, 2022.

A fibroína de seda (Bombyx mori) é um polímero natural que nos últimos anos vem impulsionando o desenvolvimento de novos biomateriais. No entanto, poucos estudos relatam a fabricação de filmes de fibroína de grande dimensão macroscópica aplicados no tratamento de lesões cutâneas. Neste trabalho, filmes finos de fibroína com área de 1033 cm² foram produzidos por meio da técnica de *casting* visando o desenvolvimento de coberturas para o tratamento de lesões cutâneas. Cabe destacar que na literatura não há relatos do desenvolvimento de filmes de fibroína de grande dimensão para o tratamento de lesões cutâneas provocadas por queimaduras. Para isso, adaptou-se o equipamento de cromatografia de camada delgada para produzir filmes finos de fibroína com grande dimensão por dois métodos de fabricação. No primeiro método, a fibroína foi apenas degomada e solubilizada em ácido fórmico 98%, cloreto de cálcio (CaCl₂) 5% m/m com a adição de glicerol 40% m/m, enquanto no segundo método a fibroína foi degomada, dissolvida em CaCl₂:C₂H₆O:H₂O (1:2:8 M), dialisada, liofilizada, solubilizada em ácido fórmico 98% e adicionado glicerol 40% m/m. Os resultados de MEV mostraram que a etapa de degomagem não degradou a proteína, e que os filmes possuem superfície regular (sem bolhas), por outro lado, a adição do glicerol alterou a superfície de fratura e tornou os filmes mais espessos (50 µm), destacando que os métodos utilizados geram superfícies distintas. A análise de FTIR apontou a presenca das estruturas secundárias α -*hélice* (fase amorfa) e *folha*- β (domínios cristalinos), evidenciou também a lixiviação do glicerol, assim como a reticulação física da proteína pela imersão dos filmes em etanol. O DRX corroborou com os resultados observados no FTIR. O ângulo de contato mostrou que os filmes possuem boa molhabilidade, sendo eles hidrofílicos. O TGA, DTG e DMTA mostraram que os filmes possuem alta estabilidade térmica e mecânica. Diante do exposto, conclui-se que foi possível produzir filmes finos de fibroína com grande dimensão macroscópica e espessura abaixo de 50 µm, transparentes, flexíveis, hidrofílicos, resistentes termicamente e mecanicamente pela técnica de casting.

Palavras-chaves: Fibroína de seda. Filmes finos. Glicerol. Biomateriais. Engenharia tecidual.

ABSTRACT

SANTOS, FV. **Development and characterization of silk fibroin thin films aiming biomedical applications** [Dissertation]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo, 2022.

Silk fibroin (Bombyx mori) is a natural polymer that in recent years has been driving the development of new biomaterials. Nevertheless, few studies report the fabrication of fibroin films of large macroscopic dimensions applied in the treatment of cutaneous lesions. In this work, fibroin thin films with an area of 1033 cm^2 were produced using the casting technique, aiming at the development of coverings for the treatment of skin lesions. It should be noted that in the literature there are no reports of the development of large fibroin films for the treatment of skin lesions caused by burns. For this purpose, thin layer chromatography equipment was adapted to produce fibroin thin films with large dimensions by two manufacturing methods. In the first method, fibroin was only degummed and solubilized in 98% formic acid, 5% m/m calcium chloride (CaCl₂) with the addition of 40% m/m glycerol, while in the second method, fibroin was degummed, dissolved in CaCl₂:C₂H₆O:H₂O (1:2:8 M), dialyzed, lyophilized, solubilized in 98% formic acid and added 40% glycerol w/w. The SEM results showed that the degumming step did not degrade the protein and that the films had a regular surface (no bubbles), on the other hand, the addition of glycerol altered the fracture surface and made the films thicker (50 µm), highlighting the methods used to generate different surfaces. The FTIR analysis showed the presence of α -helix (amorphous phase) and β-sheet (crystalline domains) secondary structures. The XRD corroborated the results observed in the FTIR. The contact angle showed that the films have good wettability, being hydrophilic. TGA, DTG and DMTA showed that the films have high thermal and mechanical stability. Given the above, it is that it was possible to produce thin fibroin films with large macroscopic dimensions and thickness below 50 µm, transparent, flexible, hydrophilic, thermally and mechanically resistant by the casting technique.

Keywords: Silk fibroin. Thin films. Glycerol. Biomaterials. Tissue engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- (a) aranhas das espécies Araneus e Nephila clavipes e (b) bicho-da-seda da espécie
Bombyx mori
Figura 2 – Domínios hidrofóbicos (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala) presentes na fibroína
Figura 3 – Representação esquemática das estruturas α -hélice e folha- β presentes na fibroína
de seda
Figura 4 – Composição e estrutura molecular do casulo do bicho-da-seda da espécie Bombyx
<i>mori</i>
Figura 5 – Seção transversal da seda na presença das proteínas fibroína e sericina30
Figura 6 - (a) Imagem de MEV do eletrodo; (b) imagem do eletrodo enrolado; (c) superfície
do eletrodo destacado em (a) pelo retângulo branco; (d) biossensor construído sobre o filme
fino de fibroína; (e-f) utilização do biossensor na detecção in situ de biomarcadores entre
interfaces de tecido45
Figura 7 - Fluxograma das etapas de processamento, produção e caracterização dos filmes
finos de fibroína49
Figura 8 - Equipamento utilizado para produzir os filmes finos de fibroína: (a) imagem da
superfície de deposição e dispositivo de espalhamento da solução e (b) suporte de
acoplamento
Figura 9 - Etapas de extração da fibroína a partir dos casulos do bicho-da-seda: (a) início da
degomagem; (b) casulos imersos na solução aquosa de Na2CO3; (c) fibras de fibroína; (d)
início da dissolução da fibroína; (e) fibroína parcialmente dissolvida; (f) suspensão de fibroína
Figura 10 - (a) Imagens dos casulos do bicho-da-seda; (b) fibroína após degomagem; (c)
fibroína liofilizada
Figura 11 – Micrografia de MEV das fibras de fibroína após a etapa de degomagem
Figura 12 - Imagens (a) e (b) das soluções de fibroína degomada em cloreto de cálcio e
glicerol; (c) e (d) das soluções de fibroína liofilizada em ácido fórmico e glicerol59
Figura 13 – Imagens dos filmes (a) FD; (c) FDG; (e) FL; (g) FLG após a lavagem; (b) FD; (d)
FDG; (f) FL; (h) FLG parcialmente secos
Figura 14 - Micrografias de MEV da superfície dos filmes de fibroína (a) FD; (b) FL; (c)
FDG; (d) FLG, com aumento de 25000X63
Figura 15 – Micrografias da superfície de fratura dos filmes de fibroína (a) FD; (b) FL; (c)
FDG; (d) FLG com aumento de 20000X

Figura 16 – (a) Espectros de FTIR nas regiões de 3500 a 1000 cm ⁻¹ ; (b) de 1700 a 1000 cm ⁻¹
para os filmes FD; FDG; FL; FLG68
Figura 17 – (a) Espectros de FTIR dos filmes FD; FD_E; FDG; FDG_E; (b) FL; FL_E; FLG;
FLG_E
Figura 18 - (a) Difratogramas de raios-X para os filmes FD; FDG; FL; FLG; (b) FD_E;
FDG_E; FL_E; FLG_E
Figura 19 - Imagens das medidas de ângulo de contato gota d'água com a superfície dos
filmes (a) FD; (b) FL; (c) FDG; (d) FLG após 10 s de deposição75
Figura 20 – Curvas (a) TG e (b) DTG dos filmes FD; FL; FDG; FLG76
Figura 21 – (a) Curvas de módulo de armazenamento e (b) tan δ dos filmes FD; FDG; FL;
FLG

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas da seda, fibroína e outros polímeros	36
Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos materiais derivados de fibroína de seda	37
Tabela 3 – Valores médios de espessura dos filmes FD; FL; FDG; FLG	52
Tabela 4 – Valores de absorção no infravermelho para o glicerol	55
Tabela 5 - Valores de absorção no infravermelho dos grupamentos amidas presentes n	na
fibroína de seda	56
Tabela 6 – Números de onda característicos das estruturas secundárias folha- β e α -hélice n	na
fibroína de seda	57
Tabela 7 – Ângulo de contato médio dos filmes FD; FDG; FL; FLG	74
Tabela 8 – Temperaturas de transição vítrea dos filmes FD; FDG; FL; FLG	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Fibroína de seda	27
2.1.1 Estrutura	27
2.1.2 Processamento	
2.1.3 Propriedades mecânicas	35
2.1.4 Propriedades biomédicas	
2.2 Biomateriais	40
2.2.1 Biomateriais derivados de fibroína de seda	42
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivos gerais	47
3.2 Objetivos específicos	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Materiais	50
4.2 Métodos	50
4.2.1 Extração da fibroína de seda	50
4.2.2 Dissolução da fibroína	50
4.2.3 Diálise	51
4.2.4 Liofilização	51
4.2.5 Preparação das soluções de fibroína de seda	51
4.2.6 Produção dos filmes finos de fibroína	51
4.2.6.1 Filmes finos produzidos a partir da fibroína degomada	52
4.2.6.2 Filmes finos produzidos a partir da fibroína liofilizada	52
4.2.7 Espessura média dos filmes	53
4.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.2.9 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)	53
4.2.10 Análise termogravimétrica (TGA)	53
4.2.11 Ângulo de contato	54
4.2.12 Difração de raios-X (DRX)	54
4.2.13 Análise Térmica Dinâmico-Mecânica (DMTA)	54
4.2.14 Cristalização por imersão em etanol	55

4.2.15 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	57
5.1 Extração da fibroína	57
5.2 Preparo das soluções e dos filmes finos de fibroína de seda	59
5.3 MEV	63
5.4 FTIR-ATR	65
5.5 DRX	71
5.6 Ângulo de contato	73
5.7 TGA	75
5.8 DMTA	77
6 CONCLUSÕES	81
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A fibroína de seda é um material polimérico natural, que mesmo após milhares de anos da sua descoberta pelos Chineses e Indus, sendo usada na área têxtil há aproximadamente 2500 a.C, vem impulsionando nos dias atuais o desenvolvimento de materiais em diversas áreas como, biomateriais, engenharia tecidual, liberação controlada de fármacos, eletrônica, bioeletrônica, óptica e têxtil^{1–3}.

Cabe destacar que a seda mais utilizada e economicamente viável é sintetizada pelo bicho-da-seda da espécie *Bombyx-mori*, sendo essa também produzida por algumas espécies de aranhas, porém neste último caso a produção é baixa e não viável economicamente. Ainda cabe ressaltar que o Brasil é o 6º produtor mundial de seda, sendo o maior produtor da América Latina. Isso evidencia o grande potencial para explorar o desenvolvimento de materiais derivados de fibroína de seda.

No desenvolvimento filmes poliméricos aplicados como biomateriais para o tratamento de lesões cutâneas observa-se a utilização de polímeros naturais (ácido hialurônico, quitosana, alginato, colágeno, gelatina, fibroína)⁴ e/ou sintéticos (policaprolactona (PCL), poli(álcool vinílico (PVA), poli(óxido de etileno) (PEO) poli(ácido láctico) (PLA) e poliuretano)⁵ incorporados com compostos orgânicos e/ou inorgânicos⁶ produzidos pelas técnicas de casting, eletrofiação, *layer-by-layer* e spin-coating^{7–9}.

Entre os polímeros mencionados a fibroína de seda se destaca no desenvolvimento de coberturas cutâneas, pois a mesma é biocompatível, biodegradável, esterilizável, resistente termicamente e mecanicamente, permeável a vapor de água e oxigênio, além de permitir a produção de filmes finos com excelente transparência^{10–13}.

Lin et al.¹⁴ desenvolveram filmes de fibroína incorporados com fator de crescimento (IGF-1) visando o tratamento de feridas diabéticas crônicas. Os resultados *in vitro* mostraram que os filmes promoveram um aumento de aproximadamente 20% na taxa de proliferação de fibroblastos BALB/3T3 (~10 μ m) em relação ao filme sem a presença do IGF-1. Este resultado indicou que os filmes são candidatos promissores para o tratamento de feridas em pacientes diabéticos. Safonova et al.¹⁵ fabricaram por meio da técnica de eletrofiação filmes finos de fibroína incorporados com duas espidroínas recombinantes rS2/12 e rS2/12-RGDS que foram aplicadas no tratamento de feridas em ratos Wistar. Resultados Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de força atômica (AFM) mostraram que os filmes possuem fibras com diâmetro médio de 315 ± 26 nm, porosidade de 94,5 ±

1,4%, razão entre a superfície e volume das fibras foi de $25,4 \pm 4,2 \ \mu m^{-1}$, rugosidade de $3,8 \pm 0,6$ nm e espessura de 328 ± 57 nm. Ensaios *in vivo* apontaram que os filmes finos aceleraram a cicatrização da pele em 19 dias em comparação com o grupo controle. Yang et al.¹⁶ projetaram filmes finos de fibroína/poli(álcool vinílico) (PVA) incorporados com o peptídeo Cys-QHREDGS por meio da técnica de *spin-coating* visando a cicatrização de feridas em pacientes diabéticos. Os filmes produzidos em água ou hexafluoro-2-propanol (HFIP) possuem espessura de 95 e 98 nm, respectivamente. A resistência a tração, módulo de elasticidade e alongamento até a ruptura do filme utilizando HFIP foi de $50,35 \pm 0,25$ kPa, $24,89 \pm 0,46$ MPa e 50%. Por outro lado, o filme produzido em meio aquoso obteve $13,5 \pm 0,3$ kPa, $17,87 \pm 0,07$ MPa e 40%. Ensaios *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que a presença do Cys-QHREDGS permitiu ao filme aderir à superfície da ferida durante o processo de cicatrização, além de promover a adesão e proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), bem como a formação de vasos sanguíneos, raízes capilares e a remodelação da matriz de colágeno.

Patil et al.¹⁷ desenvolveram um filme de fibroína/álcool poli(vinílico) incorporado com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) visando o tratamento de feridas na pele. Resultado de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou que as nanopartículas de ZnO possuem diâmetro médio de 13 nm. A análise de difratometria de raios X (DRX) evidenciou que o filme possui regiões amorfas e domínios cristalinos associados aos planos (100), (002), (101), (102) e (110). A análise térmica realizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostrou que a incorporação das nanopartículas aumentou a temperatura de fusão (Tm) de 429 para 452 °C. O filme ainda apresentou resistência a tração de 3,80 MPa e alongamento até a ruptura de 207%, valores estes superiores ao filme sem a presença das nanopartículas. Ensaios antibacterianos apontaram que o filme possui atividade antimicrobiana contra as bactérias Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudômonas aeruginosa, Proteus mirabilis e Streptococcus pyogenes. Estudos de coagulação sanguínea e citotoxicidade apontaram que a presença de ZnO desnatura proteínas anticoagulantes reduzindo assim o tempo de coagulação, além disso, o filme não é tóxico aos fibroblastos L929. Alam e Shubhra¹⁸ produziram filmes finos de fibroína/gelatina incorporados com antibiótico ciprofloxacina e revestidos com poli(etileno glicol) (PEG), os quais foram aplicados no tratamento de feridas in vivo. Os resultados do ensaio mecânico de tração mostrou que os filmes nas proporções 0:1; 1:1; 1:2 e 2:1 apresentaram resistência à tração (MPa) de $10,5 \pm 2,3,35,8 \pm 4,5,16,2 \pm 3,9$ e $45,3 \pm 7,4$ MPa e alongamento na ruptura (%) de $16,1 \pm 2,1, 10,7 \pm 1,7, 12,4 \pm 1,9$ e $6,2 \pm 1,2\%$, respectivamente. O teste antibacteriano evidenciou que todos os filmes possuem boa atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudômonas aeruginosa*. O ensaio de liberação mostrou que o revestimento de PEG melhorou a liberação da ciprofloxacina (0,5%) após 50 horas, pois promoveu uma degradação mais lenta nos filmes. O estudo *in vivo* realizado com ratos *Sprague-Dawley* apontou que os filmes recobertos com PEG e contendo ciprofloxacina (0.5%) foram capazes de cicatrizar a ferida em uma semana, enquanto filmes não modificados não foram capazes de cicatrizar no mesmo período de tempo avaliado. Yerra e Mamatha¹⁹ desenvolveram filmes de fibroína incorporados com diversos antibióticos visando tratar infecções bacterianas desenvolvidas em feridas provocadas por queimaduras. O ensaio antibacteriano mostrou que filmes contendo amoxicilina (15 µg), ciprofloxacina (20 µg) possuem atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia* e *Escherichia coli*. Ensaio *in vitro* apontou que após 1, 2 e 3 h de semeadura, as células L929 aderiram de forma estável nos filmes. Além disso, foi observado um número maior de células aderidas nos filmes contendo antibióticos em relação ao filme composto apenas por fibroína.

Singh et al.²⁰ desenvolveram um filme de fibroína/poli(óxido de etileno) PEO incorporado com o reagente Amplex[™], que foi produzido pela técnica de eletrofiação visando a detecção de peróxido de hidrogênio no processo de cicatrização de feridas. As micrografias de MEV mostraram que o filme é formado por nanofibras com diâmetro médio de 50 nm. A espectroscopia no infravermelho (FTIR) evidenciou que o AmplexTM foi incorporado com sucesso na estrutura semicristalina do filme. Ensaio in vitro apontou que o filme foi capaz de liberar o AmplexTM e detectar a presença de peróxido de hidrogênio (25-0,25 µg/mL) por meio da mudança de coloração de incolor para rosa. Testes de viabilidade celular realizado com queratinócitos da pele humana (HaCat) evidenciaram que o filme contendo o Amplex™ não foi tóxico aos queratinócitos. Ensaio in vivo mostrou que o filme com AmplexTM (1-5 mg/mL) foi capaz de detectar o estresse oxidativo promovido pela alta liberação de peróxido de hidrogênio em feridas realizadas em camundongos. Özen et al.²¹ produziram filmes de fibroína/ácido hialurônico/gelatina contendo ácido bórico pela técnica de casting visando o tratamento de feridas. Os resultados do ensaio de tração mostraram que o filme contendo 1% m/v de ácido bórico apresentou resistência à tração de 0,73 MPa e alongamento na ruptura de cerca de 86,4%. Estes valores evidenciaram um aumento de 156,7% e 119,3% em relação ao filme sem a presença de ácido bórico, respectivamente. O ensaio de absorção realizado em solução tampão fosfato-salino (PBS) (pH ~7,4) a 37°C por 24 h apontou que quanto maior a presença do ácido bórico a maior absorção de água do filme, valor de absorção máxima foi de 160%. O ensaio de viabilidade celular, realizado conforme a norma ISO 10993-5. evidenciou que a presença de ácido bórico não tornou os filmes citotóxicos. Ensaio *in vitro* mostrou que os filmes contendo ácido bórico permitiram a adesão e proliferação de células L929.

Cabe destacar que a deficiência na cicatrização de feridas devido à diabetes deverá acometer aproximadamente 205 milhões de pessoas até 2035²². Nos EUA o custo anual com o tratamento de feridas equivale US\$ 25 bilhões²³, na Europa aproximadamente € 6.650–10.000 por paciente, sendo este valor equivalente a 2–4% dos orçamentos europeus de saúde²⁴.

Diante do exposto, o presente trabalho apresentou o desenvolvimento e caracterização de filmes finos de fibroína com grande dimensão macroscópica por meio da técnica de casting adaptada ao equipamento de cromatografia de camada delgada. Cabe destacar que os filmes produzidos apresentam dimensões superiores aos filmes relatados na literatura, sendo esta uma contribuição importante deste estudo no desenvolvimento de filmes poliméricos derivados de fibroína de seda para coberturas cutâneas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fibroína de seda

2.1.1 Estrutura

A seda possui estrutura primária formada pela sequência de aminoácidos em blocos de glicina e alanina altamente repetitivos, sendo a mesma considerada um copolímero em bloco anfifílico natural^{25–27}, sendo produzida por meio de glândulas especializadas presentes em alguns artrópodes tais como: aranhas e o bicho-da-seda^{28–30}. Diante disso, a estrutura química e as propriedades físicas, químicas, térmicas, mecânicas e biológicas serão influenciadas pela espécie na qual produzirá a fibroína de seda. Destacando que, a seda mais usada é a da espécie *Bombyx mori*, a qual é extraída do casulo do bicho-da-seda. A Figura 1 apresenta os artrópodes produtores da seda: (a) Aranhas das espécies *Araneus* e *Nephila clavipes*; (b) Bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori*.

Figura 1– (a) aranhas das espécies Araneus e Nephila clavipes e (b) bicho-da-seda da espécie Bombyx mori



Fonte: Adptado de Nguyen et al.¹

Em termos de composição química, a fibroína é uma proteína fibrosa composta por pequenos resíduos de aminoácidos como a glicina (43-46%), alanina (25-30%) e serina (12%), tirosina (4-6%) e valina (2-3%)³¹⁻³³. De acordo com Marsh et al.³⁴ a glicina, alanina e serina são responsáveis pela formação de domínios altamente ordenados, enquanto que a tirosina é responsável pelos domínios amorfos. Segundo Inoue et al.³⁵ no casulo do bicho-da-seda coexistem duas proteínas, a fibroína (fibrosa) e a sericina (globular e hidrofílica) que reveste e mantém as fibras unidas, além disso, tem-se a glicoproteína P25 que mantém a

integridade. Neste sentido, a fibroína possui estrutura molecular composta por cadeias de baixa (25 kDa) e alta massa molar (350 kDa). As cadeias de baixa e alta massa molar se ligam via ligação dissulfídica³⁶. A Figura 2 apresenta a sequência de domínios hidrofóbicos (glicina-serina-glicina-alamina-glicina-alamina) presentes na cadeia de alta massa molar e que representa a estrutura secundária *folha-β*.

Figura 2 - Domínios hidrofóbicos (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala) presentes na fibroína



Estruturalmente, a fibroína de seda é formada por regiões amorfas (α -hélice e espirais aleatórias) compostas por resíduos de aminoácidos polares e volumoso e cristalinas (folha- β) formadas pela repetição dos aminoácidos alanina e glicina conectados as serina e tirosina em menor proporção na proteína³⁸.

Na região amorfa se encontra a α -*hélice* e bobinas aleatórias ambas hidrofílicas e solúveis em água devido à presença de grupos hidroxilas, além disso podem ser facilmente convertida em *folha-\beta*, por meio de processos físicos, químicos ou mecânicos³⁹. Essa conversão reduz a solubilidade da fibroína em meio aquoso e aumenta sua cristalinidade³³.

Nos domínios cristalinos se encontram as *folha-* β altamente organizadas, assimétricas e formada por cadeias laterais contendo os grupos hidrogênio e metila presentes na glicina e alanina, respectivamente⁴⁰. Nessa configuração, a fibroína é termodinamicamente estável, devido às ligações de hidrogênio e as forças de *van der Waals* existentes³³. Além disso, as cadeias estão ligadas por ligações de hidrogênio entre os grupos amina e carbonila (segmentos adjacentes das cadeias polipeptídicas)⁴¹. A Figura 3 ilustra de forma esquemática a estrutura molecular da fibroína da seda antes e depois da adição de Ca²⁺, mostrando o mecanismo de competição das ligações de hidrogênio entre as estruturas secundárias induzidas pelas moléculas de água.



Figura 3 – Representação esquemática das estruturas α -*hélice* e *folha-* β presentes na fibroína de seda



Compreender a estrutura molecular da fibroína se torna fator importante na produção desses materiais, uma vez que a mesma apresenta comportamento peculiar em meio aquoso devido à presença de blocos hidrofóbicos/hidrofílicos (caráter anfifílico). Essa compreensão permite controlar a solubilidade, assim como possíveis mudanças estruturais após certos tratamentos físicos e/ou químicos⁴³. A Figura 4 apresenta a estrutura da seda da espécie *Bombyx mori*, onde a fibroína é constituída de fibrilas, conectadas por uma única ligação dissulfídica, que ainda possui estrutura dimórfica com duas estruturas secundárias distintas a α -*hélice* e *folha-β* presentes em proteínas.





Fonte: Adaptado de Debari e Abbot⁴⁴

2.1.2 Processamento

Para obter a fibroína é preciso realizar o processo de extração da sericina (degomagem). Cabe destacar que essa etapa é importante para obter-se a fibroína, pois as propriedades estruturais, físicas, químicas, biológicas, mecânicas, térmicas e reológicas dos materiais derivados de fibroína irão depender dessa etapa. A Figura 5 mostra a micrografia MEV da seção transversal de uma fibra nativa do casulo do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori*, onde se observa a sericina (S) revestindo e a fibroína (B).



Figura 5 - Seção transversal da seda na presença das proteínas fibroína e sericina

Fonte: Adaptado de Allardyce et al.⁴⁵

O processo de degomagem consiste na imersão da seda em soluções orgânicas ou inorgânicas perante certas condições de temperatura, concentração, pressão e tempo^{46,47}. Tal procedimento visa retirar a sericina (20-310 kDa), proteína que reveste a fibroína dando o formato ovalado ao casulo e representa entre 20 e 30% em peso. A presença de sericina residual reduz a biocompatibilidade e as propriedades mecânicas (resistência à tração e o alongamento na ruptura) da fibroína⁴⁵.

Rastogi e Kandasubramanian⁴⁷ mostraram que os métodos mais empregados no processo de degomagem são soluções de laurato de sódio, carbonato de sódio (Na₂CO3), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e trissódico (Na₃PO₄), ácidos (tartárico, cítrico, oxálico, láctico, acético glacial), enzinas (tripsina, papaia, proteases) e aminas (metilamina, dimetilamina e trietilamina). Nultsch et al.⁴⁸ utilizaram oleato de sódio,

tripsina e líquido iônico (90% de brometo de 1-butil-3-metil-imidazólio). Debari et al.⁴⁹ destacaram que a tendência atual é a utilização de ácido cítrico, enzimas, fluido supercrítico como dióxido de carbono, hidróxido de sódio e ureia. Esses métodos verdes levam em consideração vários aspectos como meio ambiente, toxicidade, reuso, reciclagem, baixo consumo de energia e fontes renováveis. Além disso, devem ser capazes de manter as propriedades físicas, químicas, biológicas e mecânicas da fibroína.

Kim et al.⁵⁰ realizaram a degomagem da seda via autoclave (1 atm e 120 °C) utilizando para isso ureia, ácido cítrico, carbonato de sódio/oleato de sódio e carbonato de sódio visando a fabricação de filmes de fibroína por meio da técnica de *casting*. Os resultados mecânicos mostraram que os filmes que utilizaram a ureia na degomagem apresentaram os melhores resultados para resistência a tração e alongamento até a ruptura (60 MPa e de 7%, respectivamente). Por outro lado, os filmes que utilizaram o Na₂CO₃ apresentaram o pior desempenho (52 MPa e 5,5%) entre os solventes empregados. Wang et al.⁵¹ avaliaram o uso de NaHCO₃ no processo de degomagem em substituição ao Na₂CO₃. As análises mostram que a razão de degomagem foi de 28,60 e 27,76% para Na₂CO₃ e NaHCO₃, respectivamente. As micrografias de MEV evidenciaram a presença de resíduos de sericina nas fibras tratadas com NaHCO₃. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrou que a degomagem com NaHCO₃ gera bandas de massa molar média ponderal (MM) na faixa de 100-250 kDa, enquanto o Na₂CO₃ gerou MM = 50 kDa. Esse resultado se deve a maior alcalinidade do Na₂CO₃ em relação ao NaHCO_{3.} Testes reológicos mostraram que a degomagem com NaHCO₃ garante maior viscosidade à fibroína em solução. A resistência à tração (MPa) e alongamento até a ruptura (%) também foram avaliadas. Para os filmes a seco via NaHCO₃ foram obtidos valores de 69,9 MPa e 1,7% e via Na₂CO3 os valores foram 59,1 MPa e 1,6%. Já os filmes molhados via NaHCO₃ apresentaram valores de 7,3 MPa e 61,9% e via Na_2CO_3 valores de 5,7 MPa e 62,1%.

Yang et al.⁵² utilizaram à ureia (P1) para realizar a degomagem em substituição ao Na₂CO₃ (P2). Para isso, esponjas de fibroína foram produzidas (via liofilização) e avaliadas quanto às propriedades morfológicas, térmicas e mecânicas. A análise de DRX mostrou que degomagem via ureia produziu esponjas com maior cristalinidade relativa (49,33%), enquanto via Na₂CO₃ (P2) a cristalinidade foi de 38,54%. Em termos térmicos as esponjas (P1) possuem temperatura máxima de degradação de 307 °C, enquanto P2 degradou em 285 °C. Ensaios mecânicos mostraram que as esponjas P1 obtiveram resistência a compressão e módulo de compressão de 33 e 120 kPa, enquanto que, as esponjas P2 apresentaram 12 e 45 kPa, respectivamente.

Lu et al.⁵³ destacaram que a etapa de degomagem afeta as propriedades físicas, químicas, biológicas e mecânicas dos materiais derivados de fibroína. Neste sentido, os pesquisadores avaliaram os efeitos desse processo utilizando para isso o Na₂CO₃ nas seguintes concentrações: 0,05, 0,5 e 5 g.L⁻¹. Para tanto, avaliou-se a resistência a tração (MPa), deformação (%), biocompatibilidade e morfologia das fibras de fibroína. Em termos morfológicos, o uso de Na₂CO₃ (5 g.L⁻¹) promoveu danos severos a fibras (fibrilação visível), por outro lado Na₂CO₃ (0,05 g.L⁻¹) gerou fibras com superfície lisa (filamento puro de fibroína). O aumento da concentração de Na₂CO₃ também afetou a resistência à tração e a deformação das fibras, para Na₂CO₃ (0,05 g.L⁻¹) os resultados foram 485,3 MPa e 26%; Na₂CO₃ (5 g.L⁻¹) foi de 95,3 MPa e 3,1%. Os testes in vivo (ratos) após 2-4 semanas mostraram que a degomagem via Na₂CO₃ nas concentrações relatadas não promoveu resposta inflamatória grave, além disso, a coloração imunohistoquímica com CD68 mostrou que as fibras degomadas com Na₂CO₃ (0,5 e 5 g.L⁻¹) apresentaram pequenos sinais de degradação. Bucciarelli et al.⁵⁴ utilizaram o método estatístico planejamento de experimentos visando avaliar os efeitos provocados pela temperatura, tempo e concentração na degomagem da fibroína com Na₂CO₃. Os modelos estatísticos com 95% de confiança buscaram determinar as equações empíricas por meio da relação entre as propriedades da fibroína após a degomagem como, rendimento, diâmetro da fibra, cristalinidade, massa molar, índice polidispersidade, limite de resistência à tração, módulo de Young e tenacidade. Os modelos estatísticos mostraram que a degomagem realizada em banho único por 20 min independente da concentração de Na₂CO₃ não foi eficaz para retirar a sericina. O banho duplo com Na₂CO₃ $(0,1 \text{ g.L}^{-1})$ por 20 minutos foi ineficiente, por outro lado utilizando-se Na₂CO₃ $(1,1 \text{ g.L}^{-1})$ por 90 min a 70 °C foi eficiente. Os autores perceberam que a degomagem parcial promove relação inversa entre as propriedades mecânicas e a massa molar da fibra, ou seja, a melhoria das propriedades mecânicas ocorreu pela remoção da sericina que implicou na diminuição do peso molecular (degradação da proteína). Em contrapartida, para degomagem completa a tendência foi contrária, pois o aumento no peso molecular promoveu aumento nas propriedades mecânicas. Cabe destacar que não se observou nenhum efeito significativo da cristalinidade das fibras nas propriedades mecânicas. Por fim, observou-se que a degomagem é um sistema complexo, sendo sensível não apenas aos parâmetros individuais do processo, mas também aos efeitos mistos. Dessa forma, a otimização permitiu resolver algumas questões não triviais sobre como maximizar as melhores condições de degomagem na busca por métodos ecologicamente corretos.

Outro processo importante na fabricação de materiais derivados de fibroína é a dissolução das fibras após a degomagem. Esse processo consiste na solubilização da fibroína em solventes capazes de dissolver a mesma. Segundo Freddi et al.⁵⁵ o solvente empregado deve ser capaz de penetrar e dissolver as cadeias poliméricas (romper as ligações de hidrogênio) sem degradá-las e/ou induzi reações adversas. Observa-se ainda que os domínios cristalinos (folha- β) são mais difíceis de dissolver devido à reduzida acessibilidade ao solvente⁵⁶. Wang et al.⁵⁷ afirmaram que as propriedades físicas, químicas, térmicas, mecânicas e biológicas dos materiais derivados de fibroína estão diretamente associadas ao processo de dissolução. Além disso, os autores destacaram que os sais mais utilizados nesse processo são os de brometo de lítio (LiBr), tiocianato de lítio (LiSCN), tiocianato de sódio cloreto de zinco (ZnCl₂), solução ternária de cloreto de sódio/etanol/água (NaSCN), (NaCl:EtOH:H₂O), outros sistemas também já foram utilizados como, hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido fórmico (CH2O2), nitrato de cálcio/metanol Ca(NO₃)₂/CH₄O, cloreto de lítio/dimetilacetamida (LiCl/N,N-dimetilacetamida), ácido fosfórico (H₃PO₄) e hexafluoroisopropanol (HFIP), Cu(NH3)₄(OH) N-óxido de Nmetilmorfolina (NMO), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAc), tetrametilureia (TMU), hexafluoroacetona, 3-metil imidazólio, dioxano, soluções aquosas de hidróxido de cobre-amônia, hidróxido de cobre-álcali-amônia, hidróxido de cobre-álcali-glicerol e cobre etilenodiamina⁵⁷.

Medronho et al.⁵⁶ relataram uma nova abordagem para dissolver a fibroína em hidróxido de tetrabutilamônio em meio aquoso (TBAOH) e em temperatura ambiente. As análises reológicas e espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) foram usadas para avaliar o comportamento das soluções. A análise de SAXS revelou que a fibroína solubilizada em TBAOH se encontra na conformação α -hélice, contudo identificaram-se possíveis domínios cristalinos ligados a *folha-β*. Além disso, determinou-se o raio de giro das cadeias poliméricas em solução (17,5 nm), assim como MM = 450 KDa. A análise reológica mostrou que as soluções possuem comportamento newtoniano. Por fim, foi observado que a concentração crítica (C^{*}) estimada coincidiu com a transição entre os regimes diluído para semidiluído, além disso, o TBAOH promoveu baixo grau de despolimerização em comparação outros solventes.

Yue et al.⁵⁸ propuseram um método para solubilizar a fibroína visando evitar a etapa de solubilização em LiBr (9.3 M) ou $CaCl_2:C_2H_6O:H_2O$ (1:2:8 M). Para isso, preparou-se soluções de $CaCl_2$ e CH_2O_2 (20 e 25% m/v) que foram solubilizadas por 3 horas a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que a dissolução da fibroína foi caracterizada pela

simplicidade, alta eficiência, baixo custo e pela conservação da estrutura nanofibrilar da proteína. Kopp et al.⁵⁹ dissolveram as fibras de fibroína em soluções de CH₂O₂ e CaCl₂ e produziram filmes via casting. Os resultados de espessura (µm), limite de resistência à tração (MPa) e deformação na ruptura (%) mostram que os filmes de fibroína 6, 8, 10, 12 e 14% m/v apresentaram (145 μm, 1.16 MPa e 14%), (164 μm, 1,35 MPa e 29%), (208 μm, 1,40 MPa e 27%), (252 µm, 1,35 MPa e 28%) e (289 µm, 1,45 MPa e 23%), respectivamente. A análise de passagem de luz mostrou que os filmes de fibroína 10% m/v possuem maior grau de transparência, sendo estes mais permeáveis à radiação eletromagnética. Testes in vitro evidenciaram que os filmes de fibroína não são citotóxicos Wang et al.⁶⁰ utilizaram LiBr (9,3 M) e acetona (1:3 e 1:8 v/v) para dissolver a fibroína, visto que a dissolução e a dessalinização da mesma pelos métodos tradicionais gastam muito tempo. Os resultados mostraram que o método proposto gasta a metade de LiBr para dissolver a fibroína, quando comparado ao método tradicional, sendo possível reaproveitar o LiBr. Além disso, o tempo de dessalinização (diálise) foi reduzido pela metade. A SDS-PAGE mostrou que tanto o LiBr como a acetona não promoveram quebra de ligações peptídicas presentes na fibroína. As análises de DRX e FTIR revelaram que os materiais produzidos possuem estrutura predominantemente amorfa (α -hélice). Por fim, o estudo mostrou ainda que o método empregado se enquadra no conceito de métodos ecologicamente corretos, pois permite separar e reciclar a acetona e o LiBr.

Rizzo et al.⁶¹ avaliaram o uso de sais hidratados caotrópicos como cloreto de lantânio (LaCl₃.7H₂O), cério (CeCl₃·7H₂O), praseodímio (PrCl₃.7H₂O), neodímio (NdCl₃.6H₂O), samário (SmCl₃.6H₂O), európio (EuCl₃.6H₂O), gadolínio (GdCl₃.6H₂O), térbio (TbCl₃.6H₂O), disprósio (DyCl₃.6H₂O), hólmio (HoCl₃.6H₂O), érbio (ErCl₃·6H₂O), túlio (TmCl₃·6H₂O), itérbio (YbCl₃·6H₂O), lutécio (LuCl₃·6H₂O) em substituição ao método (CaCl₂:H₂O:EtOH 1:8:2 M) proposto por Ajisawa⁶². Os resultados de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (WAXS), FTIR e análise de birrefringência mostraram os cátions trivalentes de Pr⁺³, Ce⁺³, Tm⁺³, Yb⁺³, Lu⁺³ favorecem a formação de uma estrutura altamente orientada, rica em nanocristais de *folha-β*. Por outro lado, os cátions La⁺³, Dy⁺³ e Er⁺³ promovem a formação de estruturas amorfas sem qualquer orientação preferencial.

Samie et al.⁶³ investigaram o uso de solventes iônicos e Na₂CO₃ (0,02 M) perante agitação constante (200 rpm) por 2 horas a 50 °C para dissolver a fibroína. As análises de FTIR, espectrometria Raman e ressonância nuclear magnética (RNM) mostraram que o solvente proposto não afetou os picos característicos relacionados à fibroína. Contudo, a análise de DRX evidenciou a redução da cristalinidade foi associada ao desalinhamento entre

as cadeias polipeptídicas. A estabilidade térmica da fibroína foi ligeiramente reduzida de 328 para 320 °C. Zhang et al.⁶⁴ afirmaram que o processo de dissolução da fibroína em CaCl₂:C₂H₆O:H₂O (1:2:8 M) requer outros processos como a diálise. Diante disso, os pesquisadores propuseram a dissolução da fibroína em acetona, acetato de etila, clorofórmio, etanol, éter, éter de petróleo, hexafluoroisopropanol, isopropanol e metanol. Para isso, misturou-se 3 mL de cada solvente em 1 mL de CaCl₂:C₂H₆O:H₂O/isopropanol. Ao comparar os resultados observou-se que a dissolução usando o isopropanol em 3:1 v/v foi o melhor sistema, pois o tempo de diálise foi reduzido pela metade. Além disso, a análise de SDS-PAGE mostrou que o isopropanol não provoca a quebra das cadeias polipeptídicas. Os resultados de FTIR mostraram que os picos de absorção das amidas I, II e III presentes em proteínas não foram afetados, além disso, o DRX evidenciou que os filmes possuem estrutura amorfa (α -hélice).

Rizzo et al.⁶⁵ propuseram para um protocolo para solublizar a fibroína em CeCl₃.7H₂O/água/etanol, visando a produção géis. As análises de difração de raios X – a amplo ângulo (WAXS), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), RMN, MEV e FTIR, mostraram que os íons Ce⁺³ foram incorporados tanto na fase amorfa como na cristalina, presentes na fibroína. Além disso, os íons de Ce⁺³ interagem principalmente com o oxigênio presente na carbonila (C=O) das ligações peptídicas ou das cadeias laterais de Serina (Ser), Tirosina (Tyr), Treonina (Thr), Aspartato (Asp) e Glutamato (Glu). Esse resultado evidenciou a possibilidade de incorporar íons lantanídeos trivalentes e produzir materiais luminescentes derivados de fibroína.

2.1.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (resistência a tração e módulo de elasticidade) da seda estão associadas às ligações de hidrogênio intermoleculares ocorridas nos domínios cristalinos $(folha-\beta)^{66}$. Em contrapartida, o alongamento e a tenacidade são atribuídas à região amorfa $(\alpha-hélice)$. Essas duas regiões são responsáveis pelo comportamento mecânico em pequenas e grandes deformações perante esforços de tração^{67–70}. A Tabela 1 apresenta os valores de módulo de elasticidade, limite de resistência à tração e alongamento na ruptura para a seda nativa extraída de aranhas, bicho-da-seda, fibroína e outros polímeros usados na área biomédica.

Material	Módulo de elasticidade (GPa)	Limite de resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Ref.
Bombyx mori c/sericina	5-12	500	19	71
Bombyx mori s/sericina	15-17	610-690	4-16	71
Bombyx mori	10	740	20	72
Araneus	10	1100	27	73
N. clavipes silk	11-13	875-972	17-18	72
Colágeno	0,0018-0,046	0,9-7,4	24-68	74
Colágeno reticulado	0,4-0,8	47-72	12-16	75
Poli(ácido láctico)	1,2 -3,0	28-50	2-6	76

Tabela 1 – Propriedades mecânicas da seda, fibroína e outros polímeros

Fonte: Adaptado de Vepari e Kaplan⁷⁷

Em termos mecânicos Koh et al.³¹ destacaram em seu estudo que as baixas propriedades mecânicas da fibroína em comparação com as fibras de seda nativas são frequentemente atribuídas aos processos de degomagem e dissolução de proteínas, que inevitavelmente promovem a hidrólise das cadeias poliméricas, sendo esse um fator crítico para o baixo desempenho mecânico dos materiais derivados de fibroína. Contudo, estratégias como reticulação física, química, funcionalização e uso de blendas podem aprimorar essa baixa performance em termos mecânicos.

Lu et al.⁷⁸ produziram filmes de fibroína com morfologia predominantemente amorfa. Os resultados mecânicos do ensaio de tração mostraram que os filmes secos lentamente apresentaram módulo de elasticidade de 4,6 MPa, resistência a tração de 1,4 MPa e alongamento até a ruptura de 260%. Por outro lado, os filmes secos sob fluxo controlado de ar apresentaram módulo de elasticidade de 10,5 MPa, resistência a tração de 3,1 MPa e alongamento até a ruptura de 200%. Os filmes imersos em metanol obtiveram módulo de elasticidade de 17,6 MPa, resistência a tração de 3,9 MPa e alongamento até a ruptura de 200%. Os filmes imersos em metanol obtiveram módulo de elasticidade de 17,6 MPa, resistência a tração de 3,9 MPa e alongamento até a ruptura de 142%. Wang et al.⁷⁹ avaliaram as propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, resistência a tração e alongamento na ruptura) dos filmes de fibroína preparados por meio da técnica de *casting* com a incorporação de 20% m/m de glicerol (GL) ou reticulados com 12,5% m/m de genipina (GE). Os filmes contendo GL apresentaram módulo de elasticidade, resistência à tração e alongamento na ruptura de 0,46 GPa; 54,4 MPa e 171,1%, respectivamente. Por outro lado, os filmes reticulados com GE apresentaram módulo de elasticidade e resistência à tração de 1,08 Gpa e 83,3 MPa, respectivamente. Cabe destacar que os filmes reticulados com GE se
apresentaram quebradiços no estado seco. Os resultados encontrados sugerem que os filmes contendo GP possam ser aplicados no tratamento de lesões cutâneas. Pei et al.⁸⁰ produziram materiais 3D de fibroína por meio da combinação das técnicas de eletrofiação e liofilização. O resultado do ensaio de compressão mostrou que os materiais contendo 20, 30 e 40% m/m de glicerol apresentaram módulo de compressão de 15, 11 e 6 kPa, respectivamente. Os autores destacaram que scaffolds com módulos de elasticidade entre 8-17 kPa podem favorecer a diferenciação de células do estroma da medula óssea (BMSCs) em células musculares, enquanto scaffolds com módulos entre 1-7 kPa pode facilitar a diferenciação das BMSCs em células endoteliais. Mehrabani et al.⁸¹ produziram nanocompósitos de fibroína/quitina incorporados com nanopartículas de prata (NPsAg) nas concentrações de 0,001; 0,01 e 0,1% m/m resultaram em compósitos com resistência à tração de 0,001; 0,01 e 0,1% m/m e glicerol 50% m/m visando o tratamento de lesões cutâneas. O resultado do ensaio de tração revelou que a resistência à tração da fibroína pura foi de 0,33 MPa, quitina de 0,54 MPa e do nanocompósito de fibroína/quitina de 0,49 MPa. Incorporando as NPsAg em 0,001; 0,01 e 0,1% m/m resistência à tração foi de 0,55; 0,59 e 0,65 MPa, respectivamente. Narita et al.⁸² produziram filmes de fibroína e nanofibras de celulose (CNF) visando futuras aplicações biomédicas. Os resultados mostraram que a presença da CNF favoreceu as propriedades mecânicas como módulo de elasticidade, resistência à tração e deformação na ruptura, conforme ilustra a Tabela 2.

Material	Módulo de elasticidade (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Deformação na ruptura (%)
Fibroína	3,01	43	2,3
Fibroína/CNF (80:20)	7,20	134	2,7
Fibroína/CNF (50:50)	9,19	230	11,0
Fibroína/CNF (20:80)	9,35	249	8,0
CNF	10,60	270	10,5

Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos materiais derivados de fibroína de seda

Fonte: Adaptado de Narita et al.⁸²

Yusoff et al.⁸³ produziram filmes de fibroína incorporados com 0,1; 0,5 e 1,0% m/m de grafeno e 20% m/m de glicerol visando aplicações biomédicas e eletrônicas. Os resultados do ensaio de tração mostraram que o filme contendo apenas fibroína possui resistência a tração de 2,5 MPa e alongamento na ruptura de 7,5%. O filme com glicerol apresentou

resistência de 3,5 MPa e alongamento de 23%. Já os filmes contendo fibroína/glicerol/grafeno (0,1; 0,5 e 1,0%) apresentaram 1,6 MPa e 35%; 1,8 MPa e 40%; 1,4 e 45%, respectivamente.

2.1.4 Propriedades biomédicas

Na área biomédica, a fibroína de seda demonstrou que sua biocompatibilidade está associada a sua estrutura molecular e composição química⁸⁴. Porém, alguns eventos imunológicos adversos (hipersensibilidade) colocou em dúvida essa propriedade da proteína^{38,85}. Na literatura, diversos relatos mostraram que essa baixa biocompatibilidade da fibroína em contato com células, tecidos e órgãos estava associada à outra proteína, a sericina a qual reveste a fibroína^{86–90}. A saída para este problema foi à remoção da sericina por meio da degomagem, isso aumentou a biocompatibilidade e uso da fibroína em aplicações biomédicas⁹¹. Em 1993 o departamento americano de saúde (FDA) reconheceu o uso da fibroína como biomaterial, sendo ela amplamente usada como sutura, malha bioreabsorvível e coberturas cutâneas^{92–94}.

Cabe destacar que estudos recentes mostram que materiais (filmes, membranas ou esponjas) contendo sericina não provocam reações adversas em contato com células, tais como: fibroblastos embrionários de camundongos, queratinócitos, fibroblastos dérmicos humanos, fibroblastos de camundongo (L929) e células MG63⁹⁵⁻⁹⁷.

Diante do exposto, a fibroína tem despertado grande interesse nos mais diversos fins biomédicos, como regeneração dos tecidos ósseo, conjuntivo, nervoso, cartilaginoso, lesões cutâneas e liberação controlada de fármacos^{3,44,98–101}. Chouhan e Mandal¹⁰² destacaram a fabricação de biomateriais derivados de fibroína por meio das técnicas de eletrofiação e impressão 3D que permitiu a construção de *scaffolds* aplicados na regeneração tecidual. Ribeiro et al.¹⁰³ produziram materiais a base de fibroína pela combinação da técnicas de lixiviação e liofilização visando a regeneração do tecido cartilaginoso. Os resultados mostraram que os *scaffolds* possuem alta porosidade (89,3 ± 0,6%) e poros interconectados. Além disso, possui grande capacidade de intumescimento e taxa de degradação favorável por até 30 dias. Os estudos *in vitro* evidenciaram que os *scaffolds* permitiram a adesão, proliferação e a síntese de glicosaminoglicanos de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hASCs) sob condições condrogênicas. Arthe, Arivuoli e Ravi⁸ fabricaram filmes compostos por fibroína e/ou carboidrato *paramylon* pela técnica de *casting* visando a cicatrização de feridas crônicas. Os resultados mostraram que o filme de fibroína/*paramylon* (25:75) apresentou alta estabilidade térmica, boa hidrofilicidade (52°) e absorção de água (70%). Além disso, são atóxicos e hemocompátiveis. Kundu et al.¹⁰⁴ mostraram em seu estudo que materiais derivados de fibroína são biocompatíveis, biodegradáveis, possuem boa estabilidade térmica e mecânica, além disso, são compatíveis com tecidos moles e duros. Vyas et al.¹⁰⁵ projetaram compósitos de policaprolactona (PCL) e micropartículas de fibroína (10, 20 e 30% m/m) via impressão 3D visando a regeneração óssea. A análise reológica mostrou que o módulo de armazenamento aumenta com o aumento da concentração de fibroína. As micrografias de MEV e microtomografia de raios-X mostram que as estruturas projetadas possuem poros altamente interconectados. Ensaios mecânicos evidenciaram que a adição de fibroína melhorou significativamente o módulo de compressão dos compósitos. O ângulo de contato mostrou que com o aumento de fibroína a molhabilidade dos materiais é reduzida. Ensaios *in vitro* (células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano) apontaram que 10% de fibroína no compósito favoreceu a adesão, proliferação e migração celular, por outro lado 30% torna o material citotóxico.

Farokhi et al.¹⁰⁶ mostraram que a fibroína ganhou grande atenção como transportadora de drogas devido à facilidade de purificação, esterilização, processabilidade sem o uso de reticuladores químicos, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade e alta capacidade de estabilizar as drogas carregadas. Huang et al.¹⁰⁷ afirmaram que filmes de fibroína possuem características importantes no que se refere à liberação controlada de drogas. Os autores analisaram o comportamento de liberação controlada de filmes de fibroína em relação à quatro tipos de cloridratos (ciprofloxacina, cisdiltiazem, tetraciclina e tetrahidroína), usando para isso os parâmetros de permeabilidade e difusividade. Os resultados mostraram que os filmes se comportam de forma semelhante a outros materiais aplicados para liberação controlada e que ainda possuem grande potencial na produção de biomateriais aplicados na liberação controlada de fármacos. Gil et al.¹⁰⁸ mostraram que materiais derivados de fibroína têm propriedades físicas, químicas, morfológicas e biológicas que permitem mimetizar a matriz extracelular (ECM) dos tecidos musculares, neurais e da córnea. Harkin e Chirila¹⁰⁹ demonstraram que membranas de fibroína possuem propriedades específicas como transparência, espessura, permeabilidade e biocompatibilidade permitindo assim seu uso na reconstrução da córnea. Hajiabbas et al.¹¹⁰ produziram materiais nanoestruturados contendo fibroína/alginato/gelatina capazes de mimetizar a ECM. Para isso, os scaffolds foram fabricados por meio da combinação das técnicas de eletrofiação, lixiviação e reticulação in situ e liofilização. As estruturas construídas mostraram grau de reticulação de 44-55%, porosidade de 65-85% e tamanho de poro de 165-187 μm. Além disso, os mesmos são atóxicos e permitem a migração e proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AMSC).

2.2 Biomateriais

Ao longo da história percebe-se que dominar e compreender as propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas dos materiais são essenciais para o avanço da ciência, tecnologia e inovação.

Neste contexto, cada estágio de desenvolvimento das civilizações foi representado pelo domínio dos materiais. Nos dias atuais, médicos, engenheiros, físicos, químicos e biólogos trabalham no desenvolvimento de materiais (metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos) capazes de tratar doenças e/ou substituir órgãos^{111,112}.

Diante disso, Langer¹¹³ destacou que a área de biomateriais se apresenta bastante promissora, uma vez que novos materiais precisarão ser projetados para atender a demanda e os avanços biomédicos. Outro ponto importante se refere ao grande desafio para compreender a interação entre biomateriais, células e tecidos, visto que em pleno século XXI os biomateriais são amplamente utilizados em diversas aplicações na área médica. Cabe ressaltar que a ciência dos biomateriais é uma área nova e de grande importância na melhoria da qualidade de vida¹¹⁴. De acordo com Lloyd¹¹⁵ os biomateriais são utilizados em diversas aplicações, contudo o foco da pesquisa de biomateriais tem sido o desenvolvimento de materiais usados na substituição funcional, como próteses artificiais, lentes intraoculares e cateteres. Além disso, o surgimento dos biomateriais integrou uma ampla gama de áreas como a engenharia de polímeros, bioquímica, biologia, física, química e a ciência e engenharia de materiais no intuito de facilitar a fabricação de novos materiais.

Para Boretos e Eden¹¹⁶ biomateriais são quaisquer substâncias (que não sejam drogas) ou uma combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que possam ser utilizadas durante um período de tempo como parte ou todo de um sistema que trate, recupere ou substitua quaisquer tecidos, órgãos ou função do corpo. Williams¹¹⁷ define biomaterial como uma substância projetada para atuar de forma isolada, ou como parte de um sistema complexo, capaz de controlar as interações entre as células dos sistemas vivos, que permitirá realizar qualquer diagnóstico ou procedimento terapêutico tanto em humanos como em animais. Ainda conforme Williams¹¹⁷ os biomateriais avançaram de tal forma que os novos dispositivos médicos atuarão nos sistemas de liberação de medicamentos e genes, engenharia tecidual e terapias celulares, impressão de órgãos e padrões celulares, sistemas de diagnóstico

e imagem baseados no progresso da nanotecnologia e microeletrônica. Para Macneil¹¹⁸ os biomateriais projetados precisarão ser biocompatíveis. Neste sentido, para Williams¹¹⁹ o termo biocompatibilidade refere-se à capacidade que o material possui ao desempenhar a função na qual foi projetado, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejados após a sua inserção no local da injúria.

Em relação às propriedades apropriadas dos materiais utilizados em aplicações biomédicas, O'Brien¹²⁰ afirma que a biocompatibilidade trata da capacidade que o material possui em provocar reação imune desprezível, a fim de evitar que o mesmo ao ser implantado não cause resposta inflamatória grave que leve a rejeição do biomaterial pelo organismo. Em outro estudo Williams¹²¹ destacou que os biomateriais em escala nanométrica afetam profundamente a biocompatibilidade dos mesmos, visto que as interações entre células/biomateriais ocorrem na superfície do dispositivo implantado, além disso, essas interações são mediadas por moléculas que estão presentes nas membranas celulares e no citoplasma. Segundo Biswal et al.¹²² os materiais projetados e desenvolvidos para interagir com os sistemas biológicos são chamados biomateriais. Eles são comumente usados em sistemas de liberação de medicamentos, engenharia tecidual, fabricação de partes do corpo e outras aplicações de biomédicas. Até a presente data, vários biomateriais foram projetados, desenvolvidos e aplicados com sucesso em diferentes campos biomédicos. Além do mais, eles são usados com sucesso no tratamento médico de terapia de câncer, reparo de ligamentos, tendões, nervos, vasos sanguíneos, aplicações ortopédicas, oftalmológicas, cicatrização de feridas, implantes mamários entre outros.

Engel et al.¹²³ destacaram que a produção de biomateriais em escala nanométrica é uma perspectiva desafiadora que oferece alto retorno. Contudo, Para que isso aconteça, novas metodologias terão que ser desenvolvidas para manter a integridade química e mecânica dos materiais. Embora a criação de materiais de valor agregado para a biomedicina não exija o mesmo valor econômico que outras aplicações, ainda assim, o valor econômico será fator importante no desenvolvimento de novos biomateriais. Gilbert e Budinskaya¹²⁴ mostraram que os avanços no campo dos biomateriais se encontram em plena atividade. Os autores ressaltam a importância das gerações passadas no desenvolvimento da nova geração de biomateriais, que se baseia na utilização de moléculas bioativas capazes de promover resposta celular específica no tratamento de lesões que necessitam ser regeneradas.

No que tange a atuação dos biomateriais nos processos de cicatrização e regeneração de tecidos lesionados, Castaño et al.¹²⁵ enfatizaram que o sucesso dessa nova geração de bioamteriais se encontra na capacidade que os mesmos terão de assemelhar-se a ECM.

Segundo Xu et al.¹²⁶ a engenharia tecidual permite projetar biomateriais tridimensionais (3D) com propriedades mecânicas, químicas e biológicas apropriadas no que se refere à migração, adesão e proliferação celular. Em particular, os autores destacaram que a combinação entre células-tronco e biomateriais foi capaz de regenerar os tecidos nervoso, cardiovascular, pancreático, hematopoiético e musculoesquelético. O estudo realizado por Kargozar et al.¹²⁷ mostrou que o desenvolvimento de biomateriais está em pleno andamento. Neste sentido, a compreensão da química de superfície desempenha papel crítico no que se refere à adsorção de proteínas, assim como as interações subsequentes de células e tecidos com a superfície dos biomateriais (metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos).

Datta et al.¹²⁸ abordaram em estudo as inovações recentes aplicadas no desenvolvimento de biomateriais derivados de biomoléculas tais como: proteínas, peptídeos, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídeos visando futuras aplicações nas áreas de biossensores, liberação controlada de fármacos, engenharia tecidual e medicina regenerativa. Além disso, os autores destacaram o uso de materiais bio-hibrídos na fabricação de biomateriais, assim como a integração de forma sinérgica entre as biomoléculas citadas e materiais sintéticos visando obter materiais inteligentes com boas propriedades químicas, físicas, mecânicas, térmicas e biológicas. Kumar et al.¹²⁹ relataram os avancos notáveis ocorridos no desenvolvimento de biomateriais aplicados na regeneração óssea. Os autores destacaram que os nanomateriais podem melhorar à topografia, química, energia e molhabilidade da superfície dos biomateriais. Neste contexto, a nanofuncionalização superficial tem sido amplamente investigada visando melhorar a adesão, proliferação, diferenciação e migração celular, assim com a atividade antimicrobiana e a resistência a corrosão. Além disso, o estudo mostra que a tendência futura passa pelo desenvolvimento de biomateriais inteligentes (3D) com estruturas porosas que sejam capazes promover estímulos responsivos e que ainda sejam de custo acessível, qualidade e eficientes na regeneração óssea.

2.2.1 Biomateriais derivados de fibroína de seda

O primeiro relato da utilização da fibroína como biomaterial ocorreu em 1995 no estudo proposto por Minoura et al.¹³⁰ que avaliaram a adesão e proliferação celular (fibroblastos L929) na superfície de materiais derivados de fibroína. Atualmente, a fibroína têm sido usada na fabricação de biomateriais em diversos formatos como esponjas, nanofibras, tubos, nanopartículas, membranas, filmes e géis aplicados na cicatrização de feridas, regeneração de ossos, córnea, cartilagens, tendões e ligamentos^{77,131–134}. Lawrence et

al.¹³⁵ mostraram em seu estudo que filmes de fibroína possuem transparência, resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade lenta, sendo esses requisitos importantes para o desenvolvimento de biomateriais aplicados na regeneração da córnea. Os resultados mostraram que os filmes produzidos tinham poros variando de 500 nm a 5 μ m, espessura 2 μ m, essa compatível com as lamelas de colágenos presentes na córnea humana. Ensaios *in vitro* com queratinócitos e fibroblastos (coelhos) mostraram que os filmes de fibroína são biocompatíveis e ainda permitiram a proliferação celular. Melke et al.⁹⁴ mostraram também que materiais derivados de fibroína possuem boa resistência mecânica, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além disso, são suportes (*scaffolds*) que permitem a diferenciação celular de células-troncos mesenquinais.

Tomoda et al.¹³⁶ produziram filmes de fibroína incorporados com diclofenaco de sódio por meio da técnica de *casting* visando obter biomateriais aplicados a liberação controlada de fármacos no tratamento de lesões cutâneas. Os resultados cinéticos de liberação mostraram que o anti-inflamatório empregado pode ser liberado de forma controlada. Além disso, a presença do fármaco inibiu o crescimento de bactérias como *S. aureus*, *P. aeuruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* e não afetou ou prejudicou a biocompatibilidade dos filmes. No entanto, os autores ressaltaram a necessidade de novos estudos visando o aprimoramento da liberação controlada do medicamento. Zhu et al.¹³⁷ desenvolveram uma cobertura cutânea composta por fibroína e nanopartículas de ouro funcionalizadas com 4,6-diamino-2-pirimidinotiol (DAPT). O ângulo de contato apontou que os filmes de fibroína são hidrofílicos. Ensaios de liberação controlada mostrou que a liberação das nanopartículas de ouro foi altamente eficaz. A atividade antibacteriana foi mantida independentemente da suscetibilidade antimicrobiana. Os testes *in vitro* mostraram que a cobertura cutânea promoveu a cicatrização de feridas em rato infectadas por bactérias multirresistentes (*E. coli*).

Kim et al.¹³⁸ fabricaram filmes de fibroína incorporados com betacaroteno visando à regeneração de células endoteliais da córnea. Os resultados mostraram que os filmes são biocompatíveis, transparentes, hidrofílicos e ainda permitem a adesão e proliferação celular. Yan et al.¹³⁹ produziram *scaffolds* de fibroína por meio das técnicas de lixiviação e liofilização. Os resultados mostraram que os materiais possuem estrutura macro/microporosa. Além disso, aumentando a concentração de fibroína de 8 para 16%, a porosidade média diminuiu de 90,8 \pm 0,9 para 79,8 \pm 0,3%, e a interconectividade média dos poros diminuiu de 97,4 \pm 0,5 para 92,3 \pm 1,3%, respectivamente. As propriedades mecânicas também exibiram dependência com a concentração. Neste sentido, módulo de compressão (material seco) aumentou de 0,81 \pm 0,29 para 15,14 \pm 1,70 MPa, por outro lado módulo de armazenamento

dinâmico (material úmido) aumentou cerca de 20 a 30 vezes, conforme a concentração de fibroína aumentou de 8 para 16%.

Tian et al.¹⁴⁰ produziram esponjas de fibroína incorporados com íons Ca⁺² nas concentrações 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2% m/m. Ensaios *in vivo* em coelhos mostraram que as esponjas possuem boa adesão plaquetária quando comparado à gelatina e alginato de cálcio, em especial a esponja incorporado com 3,6% de Ca⁺². Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que os materiais são biocompatíveis e possuem boa atividade antibacteriana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Lau et al.¹⁴¹ utilizaram a técnica de revestimento por imersão (*dip-coating*) para produzir biomateriais derivados de fibroína funcionalizados com o proteoglicano de heparan sulfato II (proteína específica da membrana basal). Os ensaios de trombogenicidade de sangue total, isolamento de hemocomponente, espectrometria de massas, análise de imobilização por espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície e MEV mostraram que os dispositivos desenvolvidos são compatíveis com o sangue em termos de interações entre plaquetas e sangue total. Os resultados evidenciaram que a fibroína é uma plataforma promissora no desenvolvimento de dispositivos que precisam estar em contato com o sangue.

Zhao et al.¹⁴² fabricaram *scaffolds* de fibroína incorporados com hidroxiapatita e recobertos com uma camada de cartilagem calcificada pela combinação das técnicas de separação de fase induzida por temperatura (TIPS) e lixiviação. Defeitos osteocondrais foram feitos em joelhos de coelhos para investigar os efeitos dos materiais com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs). A regeneração osteocondral foi avaliada por meio das análises histológicas, imunohistoquímicas e imagens de tomografia microcomputadorizada após 4, 8 e 12 semanas da cirurgia. Os resultados de rugosidade mostraram que a integridade da superfície dos materiais com ADSCs favoreceu os níveis de produção de glicosaminoglicano e colágeno tipo II, refletindo assim o importante desempenhado desse material derivado de fibroína na regeneração da cartilagem e do osso subcondral. Gupta e Mandal¹⁴³ destacaram que a engenharia tecidual se esforça para encontrar soluções inovadoras para a reconstrução vascular de vasos de pequeno diâmetro (menor que 6 mm) a partir da fibroína, devido ao fato da mesma apresentar hemocompatibilidade, compatibilidade imunológica e células vasculares, resistência mecânica, adaptável a vários formatos (filmes, nanofibras, géis, membranas, tubos), biodegradabilidade e formação de novos tecidos. Os autores destacaram diversos trabalhos que estão sendo desenvolvidos visando a construção de vasos de pequeno diâmetro. Xu e Yadavalli¹⁴⁴ relataram a produção de biossensores pela combinação das técnicas de casting e fotolitografia a partir do uso de filmes finos de fibroína (2-3 μm, espessura) como substrato capazes de monitorar e diagnosticar a cicatrização de feridas por meio do bioreconhecimento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os resultados de impedância eletroquímica, estabilidade mecânica sob flexão e ensaios *in vitro* mostraram que os biossensores projetados são mecanicamente compatíveis e adaptáveis aos tecidos mole. Além disso, uma gama de fluidos biologicamente relevantes (tampão, soro e urina) foram testados e os biossensores mostraram alta seletividade e sensibilidade (pg.mL⁻¹). A Figura 6 (a) mostra em destaque a micrografia de imagem de MEV do eletrodo construído; (b) imagem do eletrodo enrolado; (c) superfície do eletrodo evidenciada em (a) pelo retângulo branco; (d) apresenta o biossensor construído sobre o filme fino de fibroína; (e-f) destacam a utilização do biossensor na detecção *in situ* de biomarcadores entre interfaces de tecido.

Figura 6 – (a) Imagem de MEV do eletrodo; (b) imagem do eletrodo enrolado; (c) superfície do eletrodo destacado em (a) pelo retângulo branco; (d) biossensor construído sobre o filme fino de fibroína; (e-f) utilização do biossensor na detecção *in situ* de biomarcadores entre interfaces de tecido



Fonte: Adaptado de Xu e Yadavalli¹⁴⁴

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo produzir filmes finos de fibroína de seda com grande área superficial partindo da fibroína degomada ou liofilizada (*casting*) com uso do equipamento de cromatografia de camada delgada visando aplicações biomédicas.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair a fibroína de seda a partir do casulo do bicho-da-seda (Bombyx mori);
- Verificar a morfologia da fibroína após a etapa de degomagem;
- Produzir filmes finos de fibroína por meio de dois métodos via *casting* com uso do equipamento de cromatografia de camada delgada para formação dos filmes finos;
- Caracterizar as propriedades morfológicas, estruturais, físicas, químicas, térmicas e mecânicas dos filmes finos de fibroína quanto aos métodos de produção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) e no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma das etapas de processamento, produção e caracterização dos filmes finos de fibroína



Fonte: próprio autor

4.1 Materiais

Para extrair a fibroína de seda, foram utilizados casulos do bicho-da-seda da espécie Bombyx mori fornecidos pela empresa Fiação de seda Bratac de Bastos/SP. Os solventes utilizados foram ácido fórmico 98% PA (*Panreac*); cloreto de cálcio anidro PA (*Química Vetec*), álcool etílico PA (*EMSURE*), carbonato de sódio PA (*Dinâmica*), glicerol (*Sigma-Aldrich*) e Água Mili-Q. As membranas semipermeáveis de celulose (45 mm de diâmetro) para diálise foram fornecidas pela empresa *Viskase*.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração da fibroína de seda

A etapa de extração, também conhecida como degomagem, visa obter a fibroína pura por meio da remoção de outra proteína presente nos casulos do bicho-da-seda, que é a sericina. Para isso, incialmente aqueceu-se 2 litros de água Mili-Q até a ebulição, em seguida adicionou-se 10 g de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Após a solubilização do Na₂CO₃ adicionou-se 10 g de casulo do bicho-da-seda que foram mantidos em ebulição e agitação por um período de 30 minutos. Após esse tempo, a fibroína obtida foi lavada em água deionizada três vezes por 30 minutos. Tal procedimento visa remover qualquer resíduo de sericina e impurezas que possam ter ficado após a imersão dos casulos em Na₂CO₃. Após essas etapas as fibras foram mantidas em estufa a 50 °C por 24 horas para secagem.

4.2.2 Dissolução da fibroína

Para dissolver a fibroína preparou-se uma solução ternária contendo 111 g de CaCl₂; 92,14 g de etanol (C₂H₆O) e 144,2 g de água Mili-Q, na proporção molar de 1:2:8, respectivamente. Em 200 mL de solução ternária adicionou-se 20 g de fibroína e a mistura foi aquecida a 70 °C até dissolução completa da fibroína. Após a dissolução das fibras a solução foi filtrada visando retirar possíveis impurezas.

4.2.3 Diálise

Depois de realizada a etapa de dissolução, a suspensão salina foi submetida ao processo de diálise. Esta etapa visa retirar o excesso de CaCl₂ acumulado após a dissolução da fibroína. Para tanto, a solução de fibroína foi colocada em uma membrana semipermeável de celulose de 45 mm de diâmetro, a qual foi inserida em um béquer contendo 2 L de água Mili-Q, a temperatura ambiente. Esse processo durou 72 horas e água da diálise foi trocada por seis vezes, após 1, 6, 12, 24, 48 e 72h do início da diálise.

4.2.4 Liofilização

O processo de liofilização foi realizado no liofilizador *Modulyo Freeze Dryer*, *Edwards, UK.* Para isso, as amostras foram congeladas no freezer a -20 °C por aproximadamente 24 horas, sendo posteriormente imersas em nitrogênio líquido e liofilizadas durante três dias. Posteriormente, as amostras (esponjas de fibroína) foram armazenadas à temperatura ambiente em um dessecador à vácuo.

4.2.5 Preparação das soluções de fibroína de seda

As soluções de fibroína da seda com concentração de 15% m/m foram preparadas por meio da solubilização da fibroína apenas degomada ou liofilizada em 30 mL de ácido fórmico 98% à temperatura ambiente perante agitação constante por 3 horas. Após a solubilização completa adicionou-se às soluções 40 % m/m de glicerol perante agitação constante de 60 minutos.

4.2.6 Produção dos filmes finos de fibroína

Os filmes finos de fibroína foram produzidos pela técnica de *casting* utilizando o equipamento de cromatografia de camada delgada (adaptado) apresentado na Figura 8 (a) e (b) o qual é formado pelo suporte, lâmina de vidro (comprimento de 59 cm e largura de 17,5 cm) e espalhador (controle da espessura). Foram produzidos filmes a partir da solubilização da fibroína apenas degomada e a partir da fibroína liofilizada.

Figura 8 – Equipamento utilizado para produzir os filmes finos de fibroína: (a) imagem da superfície de deposição e dispositivo de espalhamento da solução e (b) suporte de acoplamento



Fonte: próprio autor

4.2.6.1 Filmes finos produzidos a partir da fibroína degomada

Primeiramente adicionou-se em um béquer 30 mL de ácido fórmico 98% e CaCl₂ na proporção de 5% m/m perante agitação constante e a temperatura ambiente até solubilização completa. Em seguida, adicionou-se a fibroína degomada e aguardou a solubilização completa da mesma para adicionar 40% m/m de glicerol sob agitação constante e temperatura ambiente por 60 minutos. Ao final obteve-se uma solução de concentração de 15% m/m. Após esse processo a solução foi espalhada sobre a superfície de uma lâmina de vidro de (59 cm x 17,5 cm), por meio de um espalhador de 0,05 mm de espessura e colocada em uma capela de fluxo até evaporação completa do solvente. Ao final os filmes foram removidos da superfície de vidro com água destilada e nomeados como FD e FDG, ou seja, fibroína degomada sem e com glicerol, respectivamente.

4.2.6.2 Filmes finos produzidos a partir da fibroína liofilizada

Adicionou-se em um béquer 30 mL de ácido fórmico 98% e a fibroína liofilizada, com agitação magnética constante e temperatura ambiente até solubilização completa. Em seguida, adicionou-se 40% m/m de glicerol sob agitação constante e temperatura ambiente por 60 minutos, obtendo-se uma solução de concentração de 15% m/m. Após esse processo a solução obtida foi espalhada sobre a superfície de uma lâmina de vidro, seca e os filmes produzidos

FL e FLG, fibroína liofilizada sem e com glicerina, foram retirados do vidro com água destilada.

A ideia de produzir os filmes pelos dois métodos apresentados visou comparar as etapas de produção (tempo gasto, uso de solventes, equipamentos), bem como as propriedades físicas, químicas, térmicas e mecânicas dos materiais produzidos.

4.2.7 Espessura média dos filmes

A espessura média dos filmes foi determinada usando micrômetro *Mitutoyo* M110-25 que opera na faixa de 0-25 mm com precisão de 0,01 mm. Para tanto, foram realizadas 10 medições em diferentes posições a partir dos filmes secos.

4.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os aspectos morfológicos (superfície e região de fratura) dos filmes finos de fibroína foram analisados por meio do microscópio eletrônico de varredura (*ZEISS LEO* 440, Inglaterra) operando em 10kV e 200pA. Os filmes foram recobertos com uma camada de 6nm de ouro por meio do metalizador *Balzers Sputter Coater* SCD 004 e mantidos em dessecador até o momento de análise.

4.2.9 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada visando verificar possíveis influências dos métodos empregados na obtenção dos filmes finos no que se refere os aspectos estruturais da fibroína (possíveis alterações moleculares, transformação da estrutura secundária α -hélice em folha- β), além da incorporação do glicerol. A análise foi realizada pelo equipamento *Spectrum* 1000 da *PerkinElmer* com uso do acessório de refletância atenuada na faixa de 4000-550 cm⁻¹ e resolução de ± 4 cm⁻¹ com 32 varreduras para cada espectro.

4.2.10 Análise termogravimétrica (TGA)

A influência dos métodos de produção no comportamento térmico dos filmes finos de fibroína (perda de massa e degradação da proteína) foi analisada pela técnica

termogravimétrica, utilizando-se o equipamento TGA *PerkinElmer* modelo Piris. A análise foi realizada nas seguintes condições: faixa de temperatura de 20°C a 800°C, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹. Para todos os filmes foram geradas as curvas termogravimétricas (TG) e a TG derivada (DTG).

4.2.11 Ângulo de contato

O comportamento de molhabilidade dos filmes finos de fibroína foram avaliados por meio da medida de ângulo de contato da água deionizada com a superfície dos mesmos, utilizando-se para isso o tensiômetro (*Attension*) equipado com o *software OneAttension*. Os filmes com dimensões de 20 x 10 mm foram fixados em uma lâmina de vidro e por meio de uma microsseringa depositou-se uma gota de água deionizada (5 μ L) por 10 s. A medida foi realizada após a estabilização do valor de ângulo de contato da gota sobre a superfície. Cada filme foi avaliado em cinco posições diferentes em temperatura ambiente e o resultado foi expresso como valor médio ± desvio padrão.

4.2.12 Difração de raios-X (DRX)

A análise de difração de raios-X foi utilizada para determinação da estrutura cristalina dos filmes finos de fibroína. Para isso, utilizou-se o difratômetro *RIGAKU* modelo RU200B operando a 50 kV e 100 mA com radiação Cu-K α (1,5406 Å) radiação. As medições foram realizadas em temperatura ambiente (25 °C) e com ângulos 2 θ entre 3 e 40° à uma velocidade de 2°.min⁻¹. O espaçamento interplanar (d) foi calculado por meio da lei de Bragg, conforme equação 1.

$$d = \frac{\lambda}{2\sin(\theta)} \tag{1}$$

4.2.13 Análise Térmica Dinâmico-Mecânica (DMTA)

Para avaliar o comportamento viscoelástico dos filmes finos de fibroína utilizou-se a técnica de análise térmica dinâmico mecânica por meio do equipamento *PerkinElmer* modelo DMA8000 no modo de tração. Os parâmetros utilizados foram taxa de aquecimento de 1

°C.min⁻¹, faixa de temperatura de (-10 a 250 °C), frequência de 1,0 Hz, força estática constante e dimensão dos filmes de 50 x 10 mm.

4.2.14 Cristalização por imersão em etanol

Para avaliar possíveis alterações na estrutura molecular (transformação da estrutura secundária α -*hélice* em *folha-* β) os filmes foram cortados (30 x 30 mm) e imersos em etanol 99% por 60 minutos. Os filmes imersos foram identificados como FD_E, FDG_E, FL_E e FLG_E. Esse procedimento visa aumentar estabilidade dos materiais derivados de fibroína em meio aquoso.

4.2.15 Análise estatística

Todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho foram conduzidas pelo software *OriginPro* 8.5 *One-way* (ANOVA). Os resultados foram expressos como média \pm erros. As diferenças estatisticamente significativas $p \le 0,05$ foram analisadas por ANOVA com teste *post-hoc* de *Tukey*.

5 RESULTADOS

5.1 Extração da fibroína

A extração da fibroína é uma etapa relevante visto que as propriedades estruturais, físicas, químicas, biológicas, mecânicas, térmicas e reológicas irão depender das etapas de processamento de degomagem e dissolução. Diante disso, parâmetros como tipo de solvente, concentração, temperatura e tempo são cruciais na extração da fibroína do casulo do bicho-da-seda. A Figura 9 apresenta as etapas de extração da fibroína a partir dos casulos do bicho-da seda: (a) casulos do bicho-da seda da espécie *Bombyx mori* em solução aquosa de Na₂CO₃; (b) casulos imersos em solução perante aquecimento; (c) fibras de fibroína em solução; (d) fibras de fibroína dissolvidas em solução ternária; (e) fibroína parcialmente solubilizada; e (f) solução obtidas após completa dissolução da fibroína.

Figura 9 – Etapas de extração da fibroína a partir dos casulos do bicho-da-seda: (a) início da degomagem; (b) casulos imersos na solução aquosa de Na_2CO_3 ; (c) fibras de fibroína; (d) início da dissolução da fibroína; (e) fibroína parcialmente dissolvida; (f) suspensão de fibroína



Fonte: próprio autor

Após todas as etapas de processamento foi possível extrair a fibroína com rendimento de 70% m/m, ou seja, a partir de 10 g de casulo do bicho-da-seda obteve-se 7 g de fibroína e 3

g de sericina (30% m/m). A Figura 10 (a) apresenta os casulos do bicho-da-seda, (b) a fibroína após degomagem e (c) após liofilização, respectivamente.

Figura 10 – (a) Imagens dos casulos do bicho-da-seda; (b) fibroína após degomagem; (c) fibroína liofilizada



Fonte: próprio autor

No presente trabalhou utilizou-se o Na₂CO₃ em meio aquoso para remoção da sericina, a qual reveste as fibras de fibroína. Esse sal é bastante empregado na extração da fibroína de seda. Vale destacar que outras soluções aquosas como NaHCO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, LiBr ou ácidos acético, tartárico, cítrico, oxálico e láctico podem ser empregadas na extração. Estudos recentes mostram que novos métodos estão sendo empregados para extrair a fibroína, entre esses se destacam o ácido cítrico, enzimas, fluido supercrítico como dióxido de carbono (CO₂) e hidróxido de sódio (NaOH). Esses métodos ditos como "verdes" levam em consideração vários aspectos como, meio ambiente, toxicidade, reuso, reciclagem, baixo consumo de energia e fontes renováveis. Além disso, devem se capazes de manter as propriedades físicas, químicas, biológicas e mecânicas da fibroína⁴⁹. A Figura 11 apresenta micrografia MEV das fibras de fibroína produzidas após a etapa de degomagem.



Figura 11 – Micrografia de MEV das fibras de fibroína após a etapa de degomagem

Fonte: próprio autor

Por meio da micrografia de MEV observa-se as fibras de fibroína possuem aspecto regular e não estão danificadas, isso evidencia que a degomagem via Na₂CO₃ não degradou a fibroína de seda.

5.2 Preparo das soluções e dos filmes finos de fibroína de seda

As Figuras 12 (a) e (b) mostram o aspecto das soluções de fibroína (apenas degomada) em ácido fórmico, CaCl₂ e glicerol, enquanto as Figuras 12 (c) e (d) destacam as soluções de fibroína (liofilizada) em ácido fórmico e glicerol, respectivamente.

Figura 12 – Imagens (a) e (b) das soluções de fibroína degomada em cloreto de cálcio e glicerol; (c) e (d) das soluções de fibroína liofilizada em ácido fórmico e glicerol



Fonte: próprio autor

Pode-se observar que após solubilizada completamente e sem a presença do glicerol as soluções que originaram os filmes FD e FL são transparentes e sua turbidez permaneceu constante, porém com a incorporação do glicerol houve alteração da coloração das soluções que geraram os filmes FDG e FLG, sendo essa mudança mais intensa para FLG, conforme Figura 14 (d). Também cabe destacar que não houve sinais de gelificação ou agregação molecular após armazenamentos das soluções.

Diante do resultado, observou-se que a fibroína possui comportamento distinto quando adicionado o glicerol. Cabe ressaltar que na literatura não há relatos sobre esse comportamento da proteína solubilizada em ácido fórmico, CaCl₂ e glicerol. Acredita-se que esse comportamento esteja associado às dimensões micro ou nanométrica das fibras de fibroína em meio ácido. Na literatura há trabalhos que mostram a capacidade da fibroína de absorver certos comprimentos de onda na região do visível quando dissolvida em soluções contendo íons lantanídeos trivalentes⁶¹. As Figuras 13 (a); (c); (e); e (g) representam os filmes FD, FDG, FL e FLG após a etapa de lavagem, respectivamente. Por outro lado, as Figuras (b); (d); (f); e (h) mostram o aspecto dos filmes FD, FDG, FL e FLG após secagem parcial, respectivamente.

Figura 13 – Imagens dos filmes (a) FD; (c) FDG; (e) FL; (g) FLG após a lavagem; (b) FD; (d) FDG; (f) FL; (h) FLG parcialmente secos





Fonte: próprio autor

Analisando as imagens pode-se observar que no momento da retirada dos filmes da superfície de vidro os mesmos são altamente flexíveis, contudo com o andamento da secagem foi observado que os mesmos foram perdendo essa flexibilidade e quando completamente secos, principalmente FD apresentou aspecto frágil, Figura 13 (b). Por outro lado, os filmes FDG e FLG apresentaram-se flexíveis, conforme ilustra a Figuras 13 (d) e (h). Pressupõem que o aspecto mais frágil do filme FD em relação aos demais filmes pode estar associado a geração de cadeias de baixa massa molar durante a etapa de degomagem.

Esse comportamento observado para FDG e FLG sugere que o glicerol possa ter atuado como plastificante devido sua capacidade de realizar interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas e amidas presentes na estrutura da proteína. Essas interações acontecem nos domínios hidrofílicos dentro das regiões amorfas¹⁴⁵. De acordo com Silva et al.¹⁴⁶ o glicerol é um plastificante bastante utilizado em materiais derivados de fibroína pois aumenta o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas, garantindo assim a fibroína maior elasticidade. Além disso, o glicerol é bastante solúvel em água e pode ser lixiviado após imersão em água. Cabe destacar a tentativa de utilizar os ácidos oleico e linoleico como possíveis plastificantes no desenvolvimento dos filmes, no entanto os plastificantes citados não foram viáveis na fabricação dos filmes e os resultados não constam neste trabalho.

Em relação a etapa de lavagem dos filmes em água, vale ressaltar a possível lixiviação do glicerol nos filmes FDG e FLG. No caso em questão, a etapa de lavagem dos filmes com água é essencial em ambas os métodos de produção, visto que os mesmos só são retirados da superfície de vidro com o auxílio da lavagem e como os filmes obtidos apresentam elevada área (1033 cm²), essa etapa é longa e, portanto acredita-se que a lixiviação do glicerol seja ainda maior se comparada a filmes menores. Allardyce et al.¹⁴⁷ produziram filmes de fibroína

incorporados com 40% m/m glicerol pela técnica de *casting* e com área de 24 cm², porém os autores não relataram possíveis indícios do fenômeno de lixiviação do glicerol nos filmes.

Além disso, cabe destacar possíveis alternativas para evitar esse processo de lixiviação do glicerol, que seria a utilização de outra superfície para depositar os filmes como o teflon. Assim, não seria preciso lavar os filmes, pois o teflon não reage quimicamente com outras substâncias e é antiaderente, isso facilitaria a retirada dos materiais sem a utilização da água. Pensando na aplicação do filme como cobertura cutânea, outra saída seria a utilização de blendas poliméricas entre fibroína e outros polímeros naturais ou sintéticos como colágeno, gelatina, alginato, PCL, PEO ou PVA visando a estabilização e não lixiviação do glicerol.

A Tabela 3 mostra a espessura média dos filmes FD, FL, FDG e FLG com seus respectivos desvios padrões. As médias seguidas da mesma letra não diferiram no teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Filme	Espessura (µm)
FD	$35,5 \pm 4,2^{\mathrm{a}}$
FL	$43.8\pm4.7^{\rm b}$
FDG	$41,6\pm5,4^{\rm c}$
FLG	$50{,}5\pm5{,}2^{\rm d}$

Tabela 3 - Valores médios de espessura dos filmes FD; FL; FDG; FLG

Fonte: próprio autor

A presença de glicerol aumentou a espessura dos filmes em ambos os métodos, conforme a Tabela 3. Allardyce et al.¹⁴⁷ também produziram filmes de fibroína em ácido fórmico incorporados com 40% m/m de glicerol com espessura média de 50 µm. Um et al.¹⁴⁸ também produziram filmes de fibroína em ácido fórmico por meio de dois métodos, o primeiro a partir da fibroína dialisada e outro a partir da fibroína degomada. Em ambas as condições os filmes apresentaram valores médio de espessura de 50 µm. Cabe destacar que os filmes FD, FL e FDG estão abaixo de 50 µm, demonstrando assim que foi possível produzir filmes de fibroína com espessura abaixo da mencionada^{147,148}. Outro aspecto favorável dos filmes é transparência dos mesmos, isso sugere que são candidatos promissores na cicatrização de lesões cutâneas, onde acompanhar a cicatrização da lesão é fundamental.

As micrografias de MEV mostram que as superfícies dos filmes apresentam aspecto liso e regular, conforme ilustra a Figura 14, onde observa-se as superfícies dos filmes FD (a), FL (b), FDG (c) e FLG (d), respectivamente. Durante a formação dos filmes, ocorreu a evaporação do ácido fórmico na interface entre o ar e a superfície do filme, além disso a difusão das moléculas de ácido fórmico ocorreu do interior do filme para a superfície¹⁴⁹.

Figura 14 – Micrografias de MEV da superfície dos filmes de fibroína (a) FD; (b) FL; (c) FDG; (d) FLG, com aumento de 25000X.



Fonte: próprio autor

Sobre a incoporação do glicerol observa-se que o mesmo não tornou a superfície dos filmes irregulares como propôs Silva et al.¹⁴⁶ em seu estudo ao comparar os efeitos da incorporação do glicerol e da imersão dos filmes de fibroína em etanol.

Analisando as imagens percebe-se que os filmes FD e FL possuem certa rugosidade, porém a presença do glicerol tornou as superfícies dos filmes FDG e FLG mais regulares. Diante disso, as micrografias de MEV sugerem que a incorporação do glicerol possa ter influenciado as características de automontagem da nanoestrutura da fibroína, conforme Lu et al.¹⁴⁵ observou em seu estudo.

Visualmente foi observado que a incorpação do glicerol tornou os filmes FDG e FLG menos transparentes quando comparados a FD e FL, porém ainda os filmes possuem boa transparência. Esse resultado evidencia novamente que os filmes FD, FDG, FL e FLG possuem boa transparência. Para avaliar o impacto do glicerol nos filmes, a caracterização morfológica via MEV foi realizada por meio da análise das seções tranversais de fratura em nitrogênio líquido. A Figura 15 apresenta a superfície de fratura dos filmes: (a) FD; (b) FL; (c) FDG; e (d) FLG, respectivamente.

Figura 15 – Micrografias da superfície de fratura dos filmes de fibroína (a) FD; (b) FL; (c) FDG; (d) FLG com aumento de 20000X.



Fonte: próprio autor

Analisando a superfície de fratura observa-se que os filmes FD e FL apresentam morfologias distintas. No caso do filme FD Figura 15 (a), observou-se que a estrutura nanofibrilar da fibroína foi mantida. De acordo com Zhang et al.⁵⁸ ao dissolver a fibroína degomada em ácido fórmico/CaCl₂ promove a quebra das ligações de hidrogênio presentes na região cristalina, porém a estrutura nativa é conservada. Por outro lado, no filme FL, Figura

15 (b), observa-se regiões irregulares com porosidade que podem ser interessantes em certas aplicações biomédicas, já que os poros podem favorecer a adesão e proliferação celular. Essas diferenças observadas podem ser associadas ao modo de preparação dos filmes, visto que o filme FD não passou pelas etapas de dissolução, diálise e liofilização, enquanto que o filme FL passou por essas etapas. Em contrapartida, as Figuras 15 (c) e (d) mostraram que os filmes FDG e FLG, possuem superfícies de fratura mais irregulares devido à presença de glicerol, que atuou como plastificante, conforme discutido anteriormente. Cabe destacar que a presença do glicerol não promoveu separação de fases nos filmes, isso sugere que o glicerol e fibroína de seda são compatíveis quimicamente. Além disso, as micrografias de MEV sugerem novamente que a incorporação do glicerol possa ter influenciado as características molecular da fibroína.

5.4 FTIR-ATR

Por meio da técnica de espectroscopia de FTIR foi possível obter informações sobre a conformação molecular da fibroína, que está relacionada às bandas de absorção associadas aos grupos amida (A, B, I, II e III) antes e após a incorporação de glicerol. A Tabela 4 apresenta os valores de absorção no infravermelho associados ao glicerol entre 3500-3000 (O-H), 2930-2880 (C-H), 1460-1440 (C-O-H), 1110-1000 (CO e CH) e 920 cm⁻¹ (O-H). A Tabela 5 mostra que as bandas de absorção no infravermelho das amidas A e B correspondem ao estiramento da ligação N-H em 3300 e 3100 cm⁻¹, respectivamente¹⁵⁰. A região entre 1700-1600 cm⁻¹ refere-se à amida I, sendo associado ao estiramento da carbonila (C=O) e N-H⁷⁸. A região entre 1600–1500 cm⁻¹ refere-se à amida II, sendo associado aos grupos N-H e C-N (estiramento e deformação)¹⁵¹. Por fim, a região entre 1300-1200 cm⁻¹ refere-se à amida III, sendo associado ao C-N e N-H (deformação e estiramento)^{152–154}.

Tabela 4 - Valores de absorção no infravermelho para o glicerol

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo	Modo vibracional
3500-3000	O-H	Estiramento
2930-2880	C-H	Estiramento
1460-1440	С-О-Н	Flexão
1110-1000	C-O e C-H	Estiramento
920	О-Н	Flexão

Fonte: Adaptado de Indran et al.¹⁵⁵; Geão et al.¹⁵⁶

Sabe-se que o glicerol por ter pequeno tamanho molecular consegue penetrar entre as cadeias poliméricas e romper as forças secundárias existentes entre elas, como as ligações de hidrogênio¹⁵⁷. As proteínas possuem grupos (CO⁻, OH⁻, COO⁻ e NH₃⁺) capazes de fazer tais ligações¹⁵⁸. No caso da fibroína as estruturas secundárias α -hélice são formadas por ligações de hidrogênio intramoleculrares, enquanto a *folha-β* por intermoleculares. Neste sentido, se o glicerol enfraquecer com sucesso as ligações de hidrogênio presentes na fibroína, a estrutura molecular será modificada. Geralmente, associa-se o aumento da flexibilidade dos materiais derivados de fibroína a adição de plastificantes, que por sua vez induz o aumento do volume livre das cadeias poliméricas, ou seja, aumento do raio hidrodinâmico das moléculas e consequentemente aumento das regiões amorfas nos materiais de fibroína^{145,157}.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo	Atribuição	Modo vibracional
3300	N-H	Amida A	Estiramento
3100	N-H	Amida B	Estiramento
1699	C=O	Amida I, <i>folha-β</i>	Estiramento
1642	C-N	Amida I,	Estiramento
1620	N-H e C=O	Amida I, <i>folha-β</i>	Estiramento
1547	N-H	Amida II	Estiramento
1515	N-H, C-N	Amida II, <i>folha-β</i>	Flexão e Estiramento
1270	C-N, N-H	Amida III, <i>α-hélice</i>	Estiramento e Flexão
1260	C-N, N-H, C=O	Amida III, $folha$ - β	Estiramento e Flexão
1237-45	N-H	Amida III, bobina aleatória	Flexão
1230	C-N, N-H	Amida III, <i>folha-β</i>	Estiramento e Flexão
1164	C-N	Tirosina	Estiramento
1083	C-N	Alamina	Estiramento
1065	CH ₃ , C-N	-	Flexão e Estiramento
997	CH ₃	Glicina-Alamina	Flexão
977	C-C	Glicina-Glicina, Glicina-Alamina	Estiramento

Tabela 5 – Valores de absorção no infravermelho dos grupamentos amidas presentes na fibroína de seda

Fonte: Adaptado de Ling et al.¹⁵³; Kong e Yu¹⁵⁰; Koperska et al.¹⁵⁹; Boulet-Audet et al.¹⁶⁰

A Tabela 6 apresenta os valores de absorção no infravermelho associados as estruturas secundárias *folha-\beta*, *a-hélice* e bobina aleatória presentes na fibroína de seda. Observa-se que as bandas entre 1703-1697, 1637-1628, 1621-1616, 1515 e 1260 cm⁻¹ fazem referência a *folha-\beta*, as bandas entre 1662-1656 e 1230 cm⁻¹ referem-se a estrutura *α*-hélice, por fim as bandas entre 1655-1647 e 1646-1638 cm⁻¹ fazem referência a espiral aleatória.

Estrutura secundária	Número de onda (cm ⁻¹)	
Folha-β	1703-1697	
α -hélice	1662-1656	
Bobina aleatória	1655-1647	
Bobina aleatória	1646 -1638	
Folha-β	1637-1628	
Folha-β	1627-1622	
Folha-β	1621-1616	
α-hélice	1543	
Folha-β	1515	
Folha-β	1260	
α -hélice	1230	

Tabela 6 – Números de onda característicos das estruturas secundárias *folha-\beta* e α -*hélice* na fibroína de seda

Fonte: Adaptado de Carissimi et al.¹⁶¹; Tretinnikov e Tamada¹⁶²

A Figura 16 (a) apresenta os espectros de FTIR para os filmes finos de fibroína FD, FDG, FL e FLG evidenciando-se as regiões de absorção entre 3500-1000 cm⁻¹, enquanto (b) destaca a região entre 1700-1000 cm⁻¹, conforme indicado pelas linhas tracejadas¹⁶³.

De modo geral observa-se que os filmes apresentaram bandas características associadas à *folha-\beta* em 1621 e 1515 cm⁻¹ e a *a-hélice* 1230 cm⁻¹. Observa-se que a incorporação do glicerol em FDG provocou a redução da intensidade da banda em 3280, cm⁻¹, por outro lado promoveu o aumento da intensidade da mesma banda em FLG, conforme apresenta a Figura 16 (a). A alteração observada em 3280 cm⁻¹ sugere que as ligações de hidrogênio intermoleculares tenham aumentado em FLG e reduzido em FDG. Este resultado aponta o efeito plastificante do glicerol nos filmes FDG e FLG, bem como o comportamento mais rígido dos filmes FD e FL quando secos. Além disso, a análise de FTIR permitiu avaliar a possível lixiviação do glicerol após a etapa de lavagem. Wang et al.⁷⁹ produziram filmes de fibroína com glicerol 20% m/m via *casting*. Os resultados de FTIR mostraram que o deslocamento e a redução da intensidade da banda em 3400 cm⁻¹ (absorbância) podem estar associados ao aumento das ligações de hidrogênio entre fibroína e glicerol. Portanto, cabe

destacar novamente que os resultados de FTIR sugerem que o glicerol atua como plastificante.

Sabe-se que as moléculas de glicerol interagem com as cadeias de fibroína por meio de forças intermoleculares, possivelmente ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila do glicerol e grupos amida da seda¹⁶⁴. Essa interação provavelmente muda o estado de hidratação das cadeias hidrofóbicas presentes na fibroína que são representadas pelo alto teor de repetições entre glicina-alanina⁴³.

Figura 16 – (a) Espectros de FTIR nas regiões de 3500 a 1000 cm⁻¹; (b) de 1700 a 1000 cm⁻¹ para os filmes FD; FDG; FL; FLG



Ainda no que diz respeito à flexibilidade dos filmes, cabe destacar outro ponto importante na produção dos filmes que foi a utilização do ácido fórmico como solvente. De acordo com Um et al.¹⁵⁸, o ácido fórmico é um bom solvente para solubilizar a fibroína, pois permite obter soluções estáveis e materiais derivados de fibroína, como filmes. Além disso, o ácido fórmico possui caráter mais polar do que os álcoois, sendo possível realizar fortes

ligações de hidrogênio com grupos polares presentes nas cadeias laterais da fibroína como CO^{-} , OH^{-} , COO^{-} e NH_{3}^{+} .

O ácido fórmico ainda possui funções opostas sobre as moléculas de fibroína em solução, como a estabilidade e cristalização. A estabilidade da solução e o comportamento de cristalização da fibroína são fatores importantes no desenvolvimento de materiais derivados de fibroína¹⁵⁸. Em solução, a fibroína assume as estruturas secundárias bobina aleatória e α -*hélice*, no entanto, em estado sólido após evaporação do solvente α -*hélice* adquire a estrutura *folha-β*³⁹ ou ainda *folha-β* antiparalela (mais frágil), essa última geralmente é atribuída à agregação molecular da proteína por meio de interações intermoleculares^{162,165}.

Os resultados de FTIR mostram que os filmes finos de fibroína possuem as estruturas α -*hélice* e *folha-\beta*. Além disso, sugere possível cristalização da fibroína provocada pelas etapas de lavagem, evaporação do ácido fórmico e incorporação do glicerol. Cabe destacar novamente que, após a lavagem em água, todos os filmes eram altamente flexíveis; no entanto, após a secagem, principalmente FD e FL eram rígidos e frágeis.

Visando compreender esse comportamento molecular da fibroína realizou-se a imersão dos filmes em etanol (99%). Na literatura há diversos relatos sobre possíveis alterações moleculares (cristalização) ocorridas por meio da conversão da estrutura secundária α -*hélice* em *folha-* β presentes, que visam aumentar a resistência dos materiais derivados de fibroína em meio aquoso^{78,79,145,146,152,154,166}. As Figuras 17 (a) e (b) mostram as bandas de absorção dos filmes FD, FDG, FL, FLG, FD_E, FDG_E, FL_E e FLG_E antes e após a imersão em etanol, respectivamente.



Figura 17 – (a) Espectros de FTIR dos filmes FD; FD_E; FDG; FDG_E; (b) FL; FL_E; FLG; FLG_E

Para avaliar o comportamento dos filmes após imersão em etanol as bandas de FTIR foram normalizadas. Conforme destacado nas Figura 17 (a) e (b) observa-se que o filme FD_E apresentou pequeno estreitamento da banda em 3280 cm⁻¹ quando comparado ao FD. Por outro lado, FDG_E apresentou aumento de intensidade das bandas em 3280 cm⁻¹ em comparação ao FDG. Já os filmes FL e FL_E exibiram comportamento semelhante. Por outro lado, o etanol promoveu o estreitamento e a redução da banda para o filme FLG_E em 3280, cm⁻¹ quando comparado ao FLG.

Analisando os resultados de FTIR observou-se que o etanol provocou alterações no estreitamento, aumento e redução na banda 3280, cm⁻¹, isso indica possível processo de reticulação física da proteína. Brown et al.¹⁶⁷ mostraram em seu estudo que a imersão da fibroína em metanol aumenta a estabilidade mecânica da mesma em meio aquoso, pois induziu a cristalização da proteína e/ou lixiviação do glicerol. Além disso, essa cristalização reduz o número de sítios disponíveis para ligações de hidrogênio, uma vez que as cadeias moleculares estão mais próximas, isso pode ser evidenciado pelo estreitamento das bandas no espectro FTIR.

O etanol é um solvente bastante utilizado para promover a cristalização da fibroína, pois o mesmo consegue atrair as moléculas de água contidas na proteína, com isso ocorre a agregação (menor volume hidrodinâmico), de aminoácidos hidrofóbicos, como alanina e glicina, visto que esses são os principais componentes da região cristalina¹⁵⁸.

Os resultados de FTIR indicam que a imersão em etanol possa ter provocado a cristalização da fibroína via reticulação física. Neste sentido, os espectros sugerem que a cristalização possa ter ocorrido de forma mais efetiva no FLG do que no FDG. Afim de verificar essa afirmação e compreender melhor a estrutura molecular dos filmes finos de fibroína, os mesmos foram analisados por meio da técnica de DRX.

5.5 DRX

Por meio da técnica de DRX analisou-se o comportamento das estruturas secundárias α -hélice e folha- β presentes na fibroína antes e após a imersão dos filmes em etanol. Do ponto de vista bioquímico, as proteínas possuem as estruturas primária (sequências de aminoácidos), secundária (α -hélice e folha- β), terciária (forma tridimensional) e quaternária (múltiplas cadeias)¹⁶⁸. O comportamento molecular da fibroína é marcado pela presença das fases amorfa (α -hélice e espiral aleatória) e cristalina (folha- β)¹⁶⁹. O tamanho das regiões cristalinas nas proteínas pode ser pequeno (10 nm) quando comparado aos agregados cristalinos presentes em polímeros sintéticos (esferulitos), isso geralmente resulta baixo contraste e sensibilidade do feixe de elétrons para cristais de proteína⁴⁰. A Figura 18 (a) apresenta os difratogramas dos filmes FD, FDG, FL, FLG antes da imersão e (b) FD_E, FDG_E, FL_E e FLG_E após imersão em etanol.



Figura 18 – (a) Difratogramas de raios-X para os filmes FD; FDG; FL; FLG; (b) FD_E; FDG_E; FL_E; FLG_E

Observa-se que FD, FDG, FL apresentaram um pico de menor intensidade em 2θ equivalente a 8,7° e outro de intensidade moderada em 18,7°, os quais correspondem as distâncias interplanares de 9,92 e 4,74 Å, respectivamente. Por outro lado, FLG só apresentou o pico em 18,7°.

Os difratogramas mostram que os filmes antes da imersão em etanol, Figura 18(a), possuem regiões cristalinas (*folha-\beta*) e amorfa, resultado condizente com a literatura para a fibroína de seda^{148,170,171}. De acordo com Wang e Zhang¹⁷¹, a fibroína é um polímero semicristalino que possui domínios cristalinos interconectados com regiões amorfas, além disso as etapas de degomagem e dissolução podem afetar a estrutura molecular da fibroína.

Neste sentido, observa-se que o método de produção dos filmes gerou materiais semicristalinos. Analisando os difratogramas observa-se que o comportamento mais flexível para FLG pode ser associado a ausência do pico em 2 θ igual à 8,7°, além disso o pico em 18,7° foi praticamente reduzido.
A Figura 18 (b) apresenta os difratogramas dos filmes FD_E, FDG_E, FL_E e FLG_E após a imersão em etanol. Comparando as Figuras 18 (a) e (b) observou-se que não houve mudança entre de FD e FD_E, porém entre FDG e FDG_E foi visto que etanol provocou pequeno aumento do pico em 20 igual à 8,7°. Entre FL e FL_E notou-se pequena redução em 8,7° para FL_E, por outro lado, entre FLG e FLG_E ocorreu o surgimento do pico 20 em 8,7° (baixa intensidade) e 18,7°. Esse resultado sugere que a imersão dos filmes em etanol promova uma reorganização das cadeias poliméricas nas regiões amorfas.

A análise de FTIR sugeriu que o etanol promova mudanças nas cadeias poliméricas da fibroína por meio do processo de cristalização. Esse processo provoca um alinhamento parcial das cadeias moleculares, levando a padrões de difração cristalinos baixos, com picos largos sobrepostos atribuídos a regiões não ordenadas. Materiais de fibroína exibem picos de difração típicos em $2\theta = 8-9^{\circ}$, $18-19^{\circ}$, $20-21^{\circ}$ e $24-25^{\circ}$, que correspondem à *folha-β*^{148,170,171} e picos em $12-13^{\circ}$, $14-15^{\circ}$ e $>28^{\circ}$ são atribuídos à *α-hélice*¹⁷².

Os resultados de DRX após imersão dos filmes em etanol sugerem que os métodos de produção empregados podem induzir um nível de ordenação (domínios cristalinos) que são associados a *folha-* β . Sabe que materiais compostos por regiões amorfas (α -*hélice*) são mais flexíveis. Esse comportamento peculiar da proteína permite controlar as propriedades associadas a fibroína por meio das técnicas de produção e incorporação de plastificantes. De modo geral os resultados de DRX permitiu junto com as análises de FTIR avaliar o comportamento molecular da fibroína quanto os métodos de produção, incorporação do glicerol e imersão dos filmes em etanol.

5.6 Ângulo de contato

A capacidade da superfície do material de interagir com uma gota d'água reflete o quanto essa pode ser umedecida pela água. Essa propriedade intrínseca fornece informações importantes sobre a molhabilidade da superfície em contato com a água. Esse resultado é um dos parâmetros importantes para avaliar resposta biológica de biomateriais em meio fisiológico, pois afeta fortemente a resposta biológica de adsorção de proteínas, adesão/ativação plaquetária e coagulação do sangue^{173,174}. De acordo com Wang et al.¹⁷⁵ superfícies com ângulo de contato superiores a 65° tendem a facilitar as proteínas a se aderirem e interagirem com a superfície do biomaterial devido a maior força de adesão nessas condições.

Para avaliar as características de molhabilidade dos filmes FD, FDG, FL e FLG, determinou-se o ângulo de contato da água sobre a superfície dos mesmos. A Tabela 7 mostra o ângulo de contato médio dos filmes FD, FDG, FL e FLG. As médias seguidas da mesma letra não diferiram no teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%.

Tabela 7 – Ângulo de contato médio dos filmes FD; FDG; FL; FLG

Filme	Ângulo de contato médio (°)	
FD	$67\pm0,8^{\mathrm{a}}$	
FDG	$64\pm0,6^{ m b}$	
FL	$75\pm0,8^{ m c}$	
FLG	$43\pm0,8^{ m d}$	

Fonte: Próprio autor

De acordo com a Tabela 7, observa-se que a variação nos valores do ângulo de contato entre FD e FL foi aproximadamente 11%. Por outro lado, observou-se variação de 43% entre os filmes FDG e FLG. Esses resultados sugerem que os métodos empregados na produção dos filmes, assim como a incorporação do glicerol podem influenciar a molhabilidade dos mesmos em contato com a água. A Figura 19 (a), (b), (c) e (d) apresenta as imagens das gotas de água em contato com as superfícies dos filmes FD, FL, FDG e FLG após 10 s, respectivamente.

Figura 19 – Imagens das medidas de ângulo de contato gota d'água com a superfície dos filmes (a) FD; (b) FL; (c) FDG; (d) FLG após 10 s de deposição

Fonte: próprio autor

De modo geral, FLG apresentou menor ângulo de contato (43°), consequentemente possui maior hidrofilicidade que FDG (64°), FD (67°) e FL (75°). Faucheux et al.¹⁷⁶ que superfícies moderadamente hidrofílicas (48-62°) permitem maior crescimento celular (fibroblastos), pois a molhabilidade da superfície afeta significativamente a adesão de proteínas (fibronectina e vitronectina). De acordo com Tzoneva et al.¹⁷⁷ superfícies parcialmente hidrofóbicas (86°) promovem mudanças conformacionais nas proteínas, que provocam uma diminuição da acessibilidade de possíveis locais que permitem a adesão e proliferação celular pela formação de monocamadas de células endoteliais.

Os resultados de ângulo de contato sugerem que os filmes finos produzidos são candidatos promissores no desenvolvimento de materiais derivados de fibroína seda como biomateriais.

5.7 TGA

A estabilidade térmica dos filmes de fibroína foi investigada por meio da TGA. As Figuras 20 (a) e (b) mostram as curvas TG e DTG, respectivamente, para os filmes FD, FL, FDG e FLG.



Figura 20 - Curvas (a) TG e (b) DTG dos filmes FD; FL; FDG; FLG

Fonte: Próprio autor

A fibroína é uma proteína que por possuir regiões amorfa e cristalina se assemelha aos polímeros semicristalinos em termos térmicos (temperatura de transição vítrea (Tg), fusão cristalina (Tm) e degradação). As regiões amorfas se tornam móveis acima de Tg, em Tm ocorre a fusão dos cristalitos ou desparecimento das regiões cristalinas e acima da temperatura

de degradação as cadeias poliméricas são degradadas. Essas transições fornecem informações relevantes sobre o processamento de materiais a base de proteínas¹⁶⁸.

Inicialmente pode-se observar pelas curvas de TG e DTG que há três estágios principais que caracterizam diferentes perdas de massa para os filmes de fibroína. O primeiro estágio se encontra entre 30 e 100 °C, sendo caracterizado por um pico na curva de DTG em aproxidamente 50 °C, correspondendo à evaporação de água e outros possíveis solventes presentes entre nas cadeias poliméricas. O segundo estágio, entre 150-210 °C, e o terceiro, entre 250-370 °C, são caracterizados pelas perdas de massa mais intensa, associadas à degradação térmica da fibroína.

Para as proteínas observa-se que no intervalo entre 120-260 °C os principais compostos de degradação são H₂O, CO₂, NH₃ e alguns compostos com grupos carboxila (RCOOH)¹⁷⁸. De acordo com Um et al.¹⁴⁸, a degradação da fibroína ocorre acima de 200 °C, nessa temperatura as ligações peptídicas e os grupos de cadeias laterais de aminoácidos residuais são quebrados, isso leva a produção de moléculas de baixo peso molecular como NH₃, CO e CO₂¹⁷⁹. Cabe destacar que na literatura^{167,180} há relatos da evaporação gradual de água e glicerol na faixa entre 100-300 °C e início da degradação térmica da fibroína em aproximadamente 240 °C. O uso de plastificantes em proteínas reduz o número de ligações de hidrogênio, permitindo assim maior movimentação das cadeias poliméricas¹⁸¹.

Analisando as curvas de TG e DTG percebe-se que os filmes possuem comportamento térmico semelhante, o que sugere que os métodos de produção e a incorporação do glicerol não afetaram a estabilidade térmica dos mesmos. Além disso, os resultados também sugerem que os filmes possuem boa estabilidade térmica, sendo esses propícios para o desenvolvimento de biomateriais a partir de materiais derivados de fibroína de seda.

5.8 DMTA

Por meio da técnica de DMTA foi possível avaliar os processos de relaxações moleculares dos filmes pela análise dos módulos de armazenamento (E'), perda (E'') e tan delta (δ). Na literatura estudos relatam que a análise de DMTA é uma técnica sensível^{182,183} capaz de detectar possíveis mudanças estruturais moleculares ocorridas nos materiais poliméricos por meio de transições térmicas¹⁶⁸, como a transição vítrea (Tg = T α – relaxamento α), temperatura de relaxamento β ($T\beta$) e relaxamento γ ($T\gamma$)^{184,185}. As Figuras 21

(a) e (b) apresenta comportamento dos filmes FD, FDG, FL e FLG por meio das curvas do módulo de armazenamento e tan δ .



Figura 21 – (a) Curvas de módulo de armazenamento e (b) tan δ dos filmes FD; FDG; FL; FLG

Fonte: próprio autor

Observa-se que os todos os filmes obtidos mostraram resultados típicos para filmes de fibroína obtidos por *casting*^{167,180,185}. As curvas referentes a E' são caracterizadas por uma queda acentuada em aproximadamente 150-230 °C, o que está associada as transições estruturais presentes na fibroína, relaxamento α , e dada pelo pico máximo das curvas δ tan, conforme ilustra as Figuras 21 (a) e (b). Na Figura 21 (a) pode ser visto o aumento do módulo de armazenamento antes de Tg para os filmes FD, FLG e FDG, o que indica que pode ter ocorrido a cristalização das cadeias poliméricas durante a realização do ensaio. Além disso, na Figura 21(b) observa-se pequena variação na curva de δ tan em aproximadamente 80 °C para todos os filmes. Esse comportamento está associado ao certo grau de liberdade que as cadeias poliméricas possuem antes de Tg que podem ser atribuídas as transições $T\beta$ e/ou $T\gamma$, detectadas via DMTA, sendo associadas as interações entre água-proteína ocorridas em temperatura inferior a 100 °C^{168,186}.

Os resultados de DMTA sugerem possível plastificação da fibroína pela ação da água e glicerol¹⁶⁸, além disso, evidenciam o comportamento mais flexível dos filmes FL, FDG e FLG em comparação com FD. Os filmes FD, FL, FDG e FLG apresentaram valores de Tg em 207, 200, 198 e 184 °C, respectivamente conforme a Tabela 8. Esses valores de Tg foram obtidos pelo pico máximo de Tan δ , conforme apresentado na Figura 21 (b).

Filme	Temperatura de transição vítrea (Tg) °C
FD	207
FDG	200
FL	198
FLG	184

Tabela 8 - Temperaturas de transição vítrea dos filmes FD; FDG; FL; FLG

Fonte: próprio autor

Comparando os filmes FD e FDG observa-se uma redução em E' e na Tg devido à presença do glicerol, porém para FL e FLG foi visto comportamento contrário em relação ao E'. Os resultados de DMTA corroboram com comportamento flexível dos filmes discutidos anteriormente nas análises de FTIR e DRX. Neste sentido, os filmes, FL, FDG e FLG possuem características atraentes para o desenvolvimento de coberturas cutâneas, pois são transparentes, resistentes termicamente e mecanicamente, estáveis em meio aquoso, hidrofílicos e podem ser esterilizados via autoclave. Por outro lado, o filme FD se apresentou bastante quebradiço após secagem completa.

O resultado apresentado para E' mostrou que a presença do glicerol permite as cadeias poliméricas certa liberdade de movimentação, tal comportamento se deve a redução da Tg nos filmes FDG e FLG, conforme valores apresentado na Tabela 8.

Observa-se pela Tabela 8 que FLG apresentou menor valor para Tg, enquanto FDG e FL possuem valores próximos e FD o maior valor. Novamente os resultados sugerem a maior flexibilidade dos filmes FDG e FLG em relação aos filmes FD e FL. A temperatura de transição vítrea na fibroína está associada as regiões amorfas formadas por ligações de hidrogênio entre amida-amida^{148,167,187}.

Como já discutido anteriormente, o glicerol possui essa característica de penetrar entre as moléculas e romper as forças secundárias existentes fazendo com que as cadeias poliméricas ganhem liberdade¹⁸¹. Desse modo, FDG e FLG possuem maior flexibilidade em comparação a FD e FL, sendo esse fato condizente com as análises de FTIR e DRX que também evidenciaram esse comportamento.

A temperatura de transição vítrea é o valor médio de temperatura que permite as cadeias poliméricas presentes na fase amorfa certa liberdade de movimentação, isto é, as mesmas agora podem se encontrar em outras conformações. Além disso, permite inferir informações sobre o coeficiente de expansão, calor específico, índice de refração e módulo de elasticidade, sendo essas transições termodinâmicas de segunda ordem¹⁸⁸.

Cabe destacar que a fibroína possui Tg superior a outros polímeros bastantes usados no desenvolvimento de biomateriais como policaprolactona, quitosana, colágeno, alginato e gelatina. Esta propriedade permite, por exemplo, esterilizar os materiais a base de fibroína por meio da técnica de autoclave, a qual é simples e de menor custo quando comparada as técnicas de esterilização utilizadas para materiais poliméricos tais como: radiação gama, óxido de etileno e radiação ultravioleta. Isso evidencia uma vantagem relevante dos materiais derivados de fibroína em relação aos polímeros citados no desenvolvimento de biomateriais.

6 CONCLUSÕES

As análises realizadas e apresentadas neste trabalho evidenciaram as possibilidades em obter filmes finos de fibroína por meio da técnica de *casting* com propriedades morfológicas, físicas, químicas, térmicas e mecânicas compatíveis com uso desses como biomateriais.

Os resultados mostraram que foi possível produzir filmes finos de fibroína com elevada dimensão macroscópica (1033 cm²), área essa bem superior a maioria dos filmes de fibroína relatados na literatura (95 cm²). Além disso, os filmes não apresentaram bolhas, possuem espessura abaixo de 50 μ m, são transparentes e flexíveis. Cabe destacar que a técnica empregada na produção dos filmes é simples, rápida, eficiente e de baixo custo.

Em termos morfológicos os resultados de MEV mostraram que a morfologia dos filmes está associada ao tipo de matéria-prima, ou seja, se é proveniente de material degomado ou liofilizado. Observou-se que a estrutura nanofibrilar da proteína foi preservada ao usar a fibroína apenas degomada. Por outro lado, os filmes, produzidos a partir da fibroína liofilizada, apresentaram regiões com porosidade, as quais por sua vez são interessantes para a adesão e proliferação celular. Além disso, a incorporação do glicerol tornou as superfícies dos filmes mais regulares, porém reduziu parcialmente a transparência dos mesmos.

A análise de FTIR mostrou que os filmes de fibroína são compostos por fases amorfas e cristalinas. Além disso, permitiu associar o comportamento flexível dos filmes FDG e FLG a incorporação do glicerol (efeito plastificante), como também evidenciou que o mesmo foi lixiviado após a etapa de lavagem, sendo esse processo mais pronunciado em FDG. A imersão dos filmes em etanol apontou a conversão da estrutura secundária α -*hélice em folha*- β , comportamento associado a reticulação física (cristalização) da proteína pelo poder desidratante desse álcool.

A técnica de DRX corroborou com os resultados de FTIR, pois confirmou que os filmes possuem fases amorfas e cristalinas, também evidenciou o comportamento mais flexível do filme FLG, assim como mostrou que a imersão dos filmes em etanol produz a cristalização dos mesmos, efeito esse mais pronunciado para os filmes contendo glicerol.

Em relação ao ângulo de contato, foi visto que todos os filmes exibiram superfícies com boa molhabilidade, sendo o filme FLG o mais hidrofílico, porém FD, FDG e FL também exibem propriedades interessantes na adsorção de proteínas. A análise de TGA evidenciou que os filmes de fibroína possuem elevada estabilidade, pois o pico de degradação destes são próximos de 300 °C. Além disso, os resultados de DMTA mostraram que as cadeias moleculares possuem certa liberdade de movimentação abaixo de Tg que pode ser associada

as temperaturas de relaxamento T γ e/ou T β . Os filmes possuem ainda Tg entre 184-207 °C e os resultados de módulo de armazenamento e tan δ evidenciaram que os filmes são mecanicamente resistentes.

Dessa maneira, os resultados desse trabalho evidenciam a produção de filmes finos de fibroína a partir de uma técnica simples, rápida, eficiente e de baixo custo que permitiu obter materiais com grande dimensão macroscópica (1033 cm²), transparentes, resistentes termicamente e mecanicamente, estáveis em meio aquoso, hidrofílicos e que podem ser esterilizados via autoclave. Porém etapas adicionais como ensaios *in vitro* (citotoxicidade, biocompatibilidade e proliferação celular) e *in vivo* são necessários para conduzir a utilização desses filmes no tratamento de lesões cutâneas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar a obtenção de blendas poliméricas entre a fibroína/polímeros sintéticos e/ou naturais visando obter materiais com boas propriedades mecânicas;
- Avaliar a citotoxicidade, biocompatibilidade, adesão e proliferação celular (queratinócitos, fibroblastos, melanócitos) dos filmes *in vitro* e in *vivo;*
- Verificar a permeabilidade a vapor d'água e oxigênio dos filmes visando a aplicação dos mesmos no tratamento de lesões cutâneas;
- Analisar os efeitos da incorporação e liberação controlada nos filmes de fármacos (antibióticos, antioxidantes, fatores de crescimento e anti-inflamatórios); assim como de compostos inorgânicos (Ag, ZnO, TiO₂ e vitrocerâmicas) visando aplicações antimicrobianas e regeneração celular;
- Averiguar a funcionalização dos filmes por meio da imobilização de anticorpos, proteínas e enzinas no intuito de desenvolver dispositivos capazes de detectar certas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Nguyen TP, Nguyen QV, Nguyen V, Le T, Le Q Van. Silk fibroin-based biomaterials for biomedical. Polymers (Basel). 2019;11(12):1–25. doi: https://doi:10.3390/polym11121933.

2. Koh LD, Yeo J, Lee YY, Ong Q, Han M, Tee BCK. Advancing the frontiers of silk fibroin protein-based materials for futuristic electronics and clinical wound-healing (Invited review). Mater Sci Eng C. 2018;86(8):151–72. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.007.

3. Holland C, Numata K, Rnjak-Kovacina J, Seib FP. The Biomedical use of silk: past, present, future. Adv Healthc Mater. 2019;8(1):1-26. doi: https://doi:10.1002/adhm.201800465.

4. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. Int J Pharm. 2014;463(2):127–36. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.

5. Dabrowska AK, Rotaru GM, Derler S, Spano F, Camenzind M, Annaheim S, et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. Ski Res Technol. 2016;22(1):3–14. doi: https://doi.org/10.1111/srt.12235.

6. Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. Adv Drug Deliv Rev. 2018;123:33–64. doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001.

7. Lee JM, Chae T, Sheikh FA, Ju HW, Moon BM, Park HJ, et al. Three dimensional poly(εcaprolactone) and silk fibroin nanocomposite fibrous matrix for artificial dermis. Mater Sci Eng C. 2016;68:758–67. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.019.

8. Arthe R, Arivuoli D, Ravi V. Preparation and characterization of bioactive silk fibroin/paramylon blend films for chronic wound healing. Int J Biol Macromol. 2020;154:1324-1331. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.010.

9. Shao J, Cui Y, Liang Y, Liu H, Ma B, Ge S. Unilateral silver-loaded silk fibroin difunctional membranes as antibacterial wound dressings. ACS Omega. 2021;6(27):17555–65. doi: https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02035.

10. Park YR, Sultan MT, Park HJ, Lee JM, Ju HW, Lee OJ, et al. NF-κB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. Acta Biomater . 2018;67:183–95. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.006.

11. Liu J, Qian Z, Shi Q, Yang S, Wang Q, Liu B, et al. An asymmetric wettable chitosan-silk fibroin composite dressing with fixed silver nanoparticles for infected wound repair:: In vitro and in vivo evaluation. RSC Adv. 2017;7(69):43909–20. doi: https://doi.org/10.1039/C7RA07588J.

12. Srivastava CM, Purwar R, Kannaujia R, Sharma D. Flexible silk fibroin films for wound dressing. Fibers Polym. 2015;16(5):1020–30. doi: https://doi.org/10.1007/s12221-015-1020-y.

13. Wang R, Ruan L, Li P, Liu T, Jiang G. Silk fibroin and κ -carrageenan composite films containing zinc-doped bioactive glass for wound closure. J Bionic Eng 2021;18(6):1400–12. doi: https://doi.org/10.1007/s42235-021-00105-9.

14. Lin MJ, Lu MC, Chan YC, Huang YF, Chang HY. An insulin-like growth factor-1 conjugated bombyx mori silk fibroin film for diabetic wound healing: fabrication,

physicochemical property characterization, and dosage optimization in vitro and in vivo. Pharmaceutics. 2021;13:1–20. doi: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091459.

15. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Davydova L, Tenchurin T, Bogush V, et al. Silk fibroin/spidroin electrospun scaffolds for full-thickness skin wound healing in rats. Pharmaceutics. 2021;13(10):1–13. doi: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101704.

16. Yang H, Lai C, Xuan C, Chai M, Liu X, Chen Y, et al. Integrin-binding pro-survival peptide engineered silk fibroin nanosheets for diabetic wound healing and skin regeneration. Chem Eng J. 2020;398:125617. doi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125617.

17. Patil PP, Meshram J V., Bohara RA, Nanaware SG, Pawar SH. ZnO nanoparticleembedded silk fibroin-polyvinyl alcohol composite film: a potential dressing material for infected wounds. New J Chem. 2018;42(17):14620–9. doi: https://doi.org/10.1039/C8NJ01675E.

18. Alam AKMM, Shubhra QTH. Surface modified thin film from silk and gelatin for sustained drug release to heal wound. J Mater Chem B. 2015;3:6473–9. doi: http://dx.doi.org/10.1039/C5TB00920K.

19. Yerra A, Mamatha DM. Antibiotic-based silk fibroin films for burn wound healing. Polym Adv Technol. 2021;32(2):861–71. doi: https://doi.org/10.1002/pat.5137.

20. Singh S, Cortes G, Kumar U, Sakthivel TS, Niemiec SM, Louiselle AE, et al. Silk fibroin nanofibrous mats for visible sensing of oxidative stress in cutaneous wounds. Biomater Sci. 2020;8:5900–10. doi: https://doi.org/10.1039/D0BM01325K.

21. Özen N, Özbaş Z, İzbudak B, Emik S, Özkahraman B, Bal-Öztürk A. Boric acid-impregnated silk fibroin/gelatin/hyaluronic acid-based films for improving the wound healing process. J Appl Polym Sci. 2022;139(9):e51715. doi: https://doi.org/10.1002/app.51715.

22. Sayampanathan AA. Systematic review of complications and outcomes of diabetic patients with burn trauma. Burns. 2016;42(8):1644–51. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2016.06.023.

23. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound Repair Regen. 2009;17(6):763–71. doi: https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2009.00543.x.

24. Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. J Wound Care. 2009;18(4):154–61. doi: https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.4.41607.

25. Hinman MB, Lewis R V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. J Biol Chem. 1992;267(27):19320–4. doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41777-2.

26. Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K, Waga S, Kikuchi A, Ohtomo K, et al. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by Bombyx mori. Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol. 1999;1432:92–103. doi: https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00088-6.

27. Zhang Q, Yan S, Li M. Silk fibroin based porous materials. Materials (Basel). 2009;2(4):2276–95.doi:https://doi:10.3390/ma2042276.

28. Madsen B, Shao ZZ, Vollrath F. Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: Interspecific, intraspecific and intraindividual. Int J Biol Macromol. 1999;24(2–3):301–6. doi: https://doi.org/10.1016/s0141-8130(98)00094-4.

29. Shao Z, Vollrath F. Surprising strength of silkworm silk. Nature. 2002;418(8):741. doi: https://doi.org/10.1038/418741a.

30. Liu Y, Shao Z, Vollrath F. Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk. Nat Mater. 2005;4(12):901–5. doi: https://doi:10.1038/nmat1534.

31. Koh LD, Cheng Y, Teng CP, Khin YW, Loh XJ, Tee SY, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. Prog Polym Sci. 2015;46:86–110. doi: https://doi: org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001.

32. Lotz B, Colonna Cesari F. The chemical structure and the crystalline structures of Bombyx mori silk fibroin. Biochimie. 1979;61(2):205–14. doi: https://doi.org/10.1016/s0300-9084(79)80067-x.

33. Kaplan D, Bayley H, Birge RR, Mann S. Protein-Based Materials. Boston: Kevin McGrath; 1996.

34. Marsh RE, Corey RB, Pauling L. An investigation of the structure of silk fibroin. Biochim Biophys Acta. 1955;16(1936):1–34. doi: https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90178-5.

35. Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. J Biol Chem. 2000;275(51):40517–28. doi: https://doi: 10.1074/jbc.M006897200.

36. Zhou, C. Z; Confalonieri, F; Medina, N; Zivanovic, Y; Esnault, C; Yang, T; Jacquet, M; Janin, J; Duguet, M; Perasso, R; Li ZG. Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. Nucleic Acids Res. 2000;28(12):2413–9. doi: https://doi.org/10.1093/nar/28.12.2413.

37. Meng Z, Zheng X, Tang K, Liu J, Qin S. Dissolution of natural polymers in ionic liquids: a review. E-Polymers. 2012;(028):1–29. doi: https://doi.org/10.1515/epoly.2012.12.1.317.

38. Altman, G. H. Diaz, F. Jakuba, C. Calabro, T. Horan, R. L. Chen, J. Lu, H. Richmond, J. Kaplan DL. Silk-based biomaterials. Biomaterials. 2003;24:401–16. doi: https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00353-8.

39. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. Prog Polym Sci. 2007;32(8–9):991–1007. doi: https://doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.

40. Jin HJ, Kaplan DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. Nature. 2003;424(6952):1057–61. doi: https://doi.org/10.1038/nature01809.

41. Kaplan D, Adams WW, Farmer B, Viney C. Silk polymers: materials science and biotechnology. Washington: American Chemical Society; 1993. doi: https://doi:10.1021/bk-1994-0544.

42. Liu H, Wei W, Zhang L, Xiao J, Pan J, Wu Q, et al. Shape-Engineerable Silk Fibroin Papers for Ideal Substrate Alternatives of Plastic Electronics. Adv Funct Mater. 2021;2104088:1–10.

43. Bini E, Knight DP, Kaplan DL. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. J Mol Biol. 2004;335(1):27–40. doi: https://doi:10.1016/j.jmb.2003.10.043.

44. DeBari MK, Abbott RD. Microscopic considerations for optimizing silk biomaterials. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology. 2018;11:1–9. doi: https://doi: 10.1002/wnan.1534.

45. Allardyce BJ, Rajkhowa R, Dilley RJ, Atlas MD, Kaur J, Wang X. The impact of degumming conditions on the properties of silk films for biomedical applications. Text Res J. 2016;86(3):275–87. doi: https://doi: 10.1177/0040517515586166.

46. Perea GB, Solanas C, Marí-Buyé N, Madurga R, Agulló-Rueda F, Muinelo A, et al. The apparent variability of silkworm (Bombyx mori) silk and its relationship with degumming. Eur Polym J. 2016;78:129–40. doi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.03.012.

47. Rastogi S, Kandasubramanian B. Processing trends of silk fibers: silk degumming, regeneration and physical functionalization. J Text Inst. 2020;111(12):1794–810. doi: https://doi: 10.1080/00405000.2020.1727269.

48. Nultsch K, Bast LK, Näf M, Yakhlifi S El, Bruns N, Germershaus O. Effects of silk degumming process on physicochemical, tensile, and optical properties of regenerated silk fibroin. Macromol Mater Eng. 2018;303(12):1–10. doi: https://doi: 10.1002/mame.201800408.

49. Debari MK, King CI, Altgold TA, Abbott RD. Silk fibroin as a green material. ACS Biomater Sci Eng. 2021;7(8):3530–44. doi: https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00493.

50. Kim HJ, Kim MK, Lee KH, Nho SK, Han MS, Um IC. Effect of degumming methods on structural characteristics and properties of regenerated silk. Int J Biol Macromol. 2017;104:294–302. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.019.

51. Wang L, Luo Z, Zhang Q, Guan Y, Cai J, You R, et al. Effect of degumming methods on the degradation behavior of silk fibroin biomaterials. Fibers Polym. 2019;20(1):45–50. doi: https://doi 10.1007/s12221-019-8658-9.

52. Yang H, Wang Z, Wang M, Li C. Structure and properties of silk fibroin aerogels prepared by non-alkali degumming process. Polymer (Guildf). 2020;192(11):122298. doi: https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122298.

53. Lu S, Tang X, Lu Q, Huang J, You X, Zhang F. In vitro and in vivo degradation of silk fibers degummed with various sodium carbonate concentrations. Mater Today Commun. 2021;27(4):102369. doi: https:// doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102369.

54. Bucciarelli A, Greco G, Corridori I, Pugno NM, Motta A. A design of experiment rational optimization of the degumming process and its impact on the silk fibroin properties. ACS Biomater Sci Eng. 2021;7(4):1374–93. doi: https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01657.

55. Freddi G, Pessina G, Tsukada M. Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide. Int J Biol Macromol. 1999;24(2–3):251–63.

56. Medronho B, Filipe A, Napso S, Khalfin RL, Pereira RFP, De Zea Bermudez V, et al. Silk fibroin dissolution in tetrabutylammonium hydroxide aqueous solution. Biomacromolecules. 2019;20(11):4107–16. doi: https://doi: 10.1021/acs.biomac.9b00946.

57. Wang HY, Zhang YQ, Wei ZG. Dissolution and processing of silk fibroin for materials science. Crit Rev Biotechnol. 2021;41(3):406–24. doi: https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1853030.

58. Yue X, Zhang F, Wu H, Ming J, Fan Z, Zuo B., et al. A novel route to prepare dry-spun silk fibers from $CaCl_2$ -formic acid solution. Mater Lett. 2014;128:175–8. doi: https://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.116.

59. Kopp A, Schunck L, Gosau M, Smeets R, Burg S, Fuest S, et al. Influence of the casting concentration on the mechanical and optical properties of Fa/CaCl₂-derived silk fibroin membranes. Int J Mol Sci. 2020;21(18):1–17. doi: https://doi:10.3390/ijms21186704.

60. Wang HY, Zhang YQ, Wei ZG. Excess acetone extraction in silk protein solution greatly accelerates the regeneration progress of silk fibroin for desalting and purification. Int J Biol Macromol. 2020;146:588–95. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.274.

61. Rizzo G, Lo Presti M, Giannini C, Sibillano T, Milella A, Guidetti G, et al. Bombyx mori silk fibroin regeneration in solution of lanthanide ions: a systematic investigation. Front Bioeng Biotechnol. 2021;9(6):1–15. doi: https://doi:10.3389/fbioe.2021.653033.

62. Ajisawa A. Dissolution aqueous of silk fibroin with calciumchloride/ethanol solution. J
SericulturalSciJapan.1997;67(2):91–4.doi: https://doi.org/10.11416/KONTYUSHIGEN1930.67.91.

63. Samie M, Muhammad N, Yameen MA, Chaudhry AA, Khalid H, Khan AF. Aqueous solution of a basic ionic liquid: a perspective solvent for extraction and regeneration of silk powder from bombyx mori silk cocoons. J Polym Environ. 2020;28(2):657–67. doi: https://doi.org/10.1007/s10924-019-01634-5.

64. Zhang M, Weng YJ, Zhang YQ. Accelerated desalting and purification of silk fibroin in a CaCl₂-EtOH-H₂O ternary system by excess isopropanol extraction. J Chem Technol Biotechnol. 2021;96(5):1176–86. doi: https://doi:10.1002/jctb.6629.

65. Rizzo G, Lo Presti M, Giannini C, Sibillano T, Milella A, Matzeu G, et al. Silk fibroin processing from CeCl₃ aqueous solution: fibers regeneration and doping with Ce(III). Macromol Chem Phys. 2020;221(13):1–11. doi: https://doi.org/10.1002/macp.202000066.

66. Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, Savage KN. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. J Exp Biol. 1999;202(23):3295–303. doi: https://doi.org/10.1242/jeb.202.23.3295.

67. Xiao S, Stacklies W, Cetinkaya M, Markert B, Gräter F. Mechanical response of silk crystalline units from force-distribution analysis. Biophys J. 2009;96(10):3997–4005. doi: https://doi:10.1016/j.bpj.2009.02.052.

68. Nova A, Keten S, Pugno NM, Redaelli A, Buehler MJ. Molecular and nanostructural mechanisms of deformation, strength and toughness of spider silk fibrils. Nano Lett. 2010;10(7):2626–34. doi: https://doi:10.1021/nl101341w.

69. Keten S, Xu Z, Ihle B, Buehler MJ. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of B-sheet crystals in silk. Nat Mater. 2010;9(4):359–67. doi: https://doi:10.1038/NMAT2704.

70. Péreź-Rigueiro J, Viney C, Llorca J, Elices M. Silkworm silk as an engineering material. J Appl Polym Sci. 1998;70(12):2439–47. doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19981219)70:12<2439::AAID-APP16>3.0.CO;2-J.

71. Wang X, Kim HJ, Wong C, Vepari C, Matsumoto A, Kaplan DL. Fibrous proteins and tissue engineering. Mater Today. 2006;9(12):44–53. doi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(06)71742-4.

72. Cunniff PM, Fossey SA, Auerbach MA, Song JW, Kaplan DL, Adams WW, et al. Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider Nephila clavipes. Polym Adv Technol. 1994;5(8):401–10. doi: https://doi.org/10.1002/pat.1994.220050801.

73. Fujimoto M, Mihara S, Okabayashi T, Sugase T, Tarui S. Rapid radioimmunoassay for guanosine 3',5'cyclic monophosphate using tritiated ligand. J Biochem. 1975;78(1):131–7. PMID: 374.

74. Yang L, Van Der Werf KO, Fitié CFC, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. Mechanical

properties of native and cross-Linked type i collagen fibrils. Biophys J. 2008;94(6):2204–11. doi: https://doi:10.1529/biophysj.107.111013.

75. Pins GD, Christiansen DL, Patel R, Silver FH. Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. Biophys J. 1997;73(4):2164–72. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78247-X.

76. Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. Biomaterials. 1991;12(3):292–304. doi: https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90037-B.

77. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. Progress in Polymer Science (Oxford). 2007; 32(8/9):991–1007. doi: https://doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.

78. Lu Q, Hu X, Wang X, Kluge JA, Lu S, Cebe P, et al. Water-insoluble silk films with silk I structure. Acta Biomater. 2010;6(4):1380–7. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.041.

79. Wang Y, Wang X, Shi J, Zhu R, Zhang J, Zhang Z. Flexible silk fibroin films modified by genipin and glycerol. RSC Adv. 2015;5(123):101362–9. doi: https://doi.org/10.1039/C5RA19754F.

80. Pei Y, Liu X, Liu S, Lu Q, Liu J, Kaplan DL, et al. A mild process to design silk scaffolds with reduced β -sheet structure and various topographies at the nanometer scale. Acta Biomater. 2015;13:168–76. doi: https://doi:10.1016/j.actbio.2014.11.016.

81. Mehrabani MG, Karimian R, Mehramouz B, Rahimi M, Kafil HS. Preparation of biocompatible and biodegradable silk fibroin/chitin/silver nanoparticles 3D scaffolds as a bandage for antimicrobial wound dressing. Int J Biol Macromol. 2018;114:961–71. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.128.

82. Narita C, Okahisa Y, Yamada K. A novel technique in the preparation of environmentally friendly cellulose nanofiber/silk fibroin fiber composite films with improved thermal and mechanical properties. J Clean Prod. 2019;234:200–7. doi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.215.

83. Yusoff NISM, Wahit MU, Jaafar J, Wong TW. Characterization of graphene-silk fibroin composites film. Materials Today: proceedings. 2018;5:21853–60. doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.07.042.

84. Bloch A, Messores AS. ACM SIGGRAPH computer graphics. United States Patent Office US3424164A, 1969.

85. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(4):457–70. doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043.

86. Rossitch E, Bullard DE, Oakes WJ. Delayed foreign-body reaction to silk sutures in pediatric neurosurgical patients. Child's Nerv Syst. 1987;3(6):375–8. doi: https://doi:10.1007/bf00270712.

87. Kurosaki S, Otsuka H, Kunitomo M, Koyama M, Pawankar R, Matumoto K. Fibroin allergy IgE mediated hypersensitivity to silk suture materials. J Nippon Med Sch. 1999;66(1):41–4. doi: https://doi:10.1272/jnms.66.41.

88. Soong HK, Kenyon KR. Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery. Ophthalmology. 1984;91(5):479–83. doi: https://doi:10.1016/s0161-6420(84)34273-7.

89. Morrow FA, Kogan SJ, Freed SZ, Laufman H. In vivo comparison of polyglycolic acid,

chromic catgut and silk in tissue of the genitourinary tract: an experimental study of tissue retrieval and calculogenesis. J Urol. 1974;112(5):655–8. doi: https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)59821-3.

90. Nebel L, Rosenberg G, Tobias B, Nathan H. Autograft suture in peripheral nerves. Eur Surg Res. 1977;9(3):224–34. doi: https://doi:10.1159/000127941.

91. Wray LS, Hu X, Gallego J, Georgakoudi I, Omenetto FG, Schmidt D, et al. Effect of processing on silk-based biomaterials: reproducibility and biocompatibility. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;99(1):89–101. doi: https://doi:10.1002/jbm.b.31875.

92. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. Int J Mol Sci. 2009;10(4):1514–24. doi: https://doi:10.3390/ijms10041514.

93. Wharram SE, Zhang X, Kaplan DL, Mccarthy SP. Electrospun silk material systems for wound healing. Macromol Biosci. 2010;10:246–57. doi: https://doi.org/10.1002/mabi.200900274.

94. Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2016;31:1–16. doi: https:// doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005.

95. Lin N, Zuo B. Silk sericin/fibroin electrospinning dressings: a method for preparing a dressing material with high moisture vapor transmission rate. J Biomater Sci Polym Ed. 2021;1–24. doi: https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1952383.

96. Das G, Shin HS, Campos EVR, Fraceto LF, del Pilar Rodriguez-Torres M, Mariano KCF, et al. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications. J Nanobiotechnology . 2021;19(1):1–22. doi: https://doi.org/10.1186/s12951-021-00774-y.

97. Siavashani AZ, Mohammadi J, Rottmar M, Senturk B, Nourmohammadi J, Sadeghi B, et al. Silk fibroin/sericin 3D sponges: the effect of sericin on structural and biological properties of fibroin. Int J Biol Macromol. 2020;153:317–26. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.316.

98. Shera SS, Kulhar N, Banik RM. Silk and silk fibroin-based biopolymeric composites. Materials for Biomedical Engineering: Biopolymer Fibers. 1st ed. Romania: 2019. p. 339–74. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00012-1.

99. Maghdouri-White Y, Bowlin GL, Lemmon CA, Dréau D. Bioengineered silk scaffolds in 3D tissue modeling with focus on mammary tissues. Mater Sci Eng C. 2016;59:1168–80. doi: https://doi:10.1016/j.msec.2015.10.007.

100. Farokhi M, Mottaghitalab F, Fatahi Y, Khademhosseini A, Kaplan DL. Overview of silk fibroin use in wound dressings. Trends Biotechnol. 2018;36(9):907–22. doi: https://doi:10.1016/j.tibtech.2018.04.004.

101. Sun W, Gregory DA, Tomeh MA, Zhao X. Silk fibroin as a functional biomaterial for
tissue engineering. Int J Mol Sci. 2021;22(1499):1–28.
doi: https://doi.org/10.3390/ijms22031499.

102. Chouhan D, Mandal BB. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. Acta Biomater. 2020;103:24–51.

103. Ribeiro VP, da Silva Morais A, Maia FR, Canadas RF, Costa JB, Oliveira AL, et al. Combinatory approach for developing silk fibroin scaffolds for cartilage regeneration. Acta Biomater. 2018;72:167–81. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.047.

104. Kundu B, Kurland NE, Bano S, Patra C, Engel FB, Yadavalli VK, et al. Silk proteins for

biomedical applications: Bioengineering perspectives. Prog Polym Sci. 2014;39(2):251–67. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.09.002.

105. Vyas C, Zhang J, Øvrebø Ø, Huang B, Roberts I, Setty M, et al. 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. Mater Sci Eng C. 2021;118:111433. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111433.

106. Farokhi M, Mottaghitalab F, Reis RL, Ramakrishna S, Kundu SC. Functionalized silk fibroin nanofibers as drug carriers: Advantages and challenges. J Control Release. 2020;321:324–47. doi: https://doi:10.1016/j.jconrel.2020.02.022.

107. Huang Y, Bailey K, Wang S, Feng X. Silk fibroin films for potential applications in controlled release. React Funct Polym. 2017;116(2):57–68. doi: https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.05.007.

108. Gil ES, Park SH, Marchant J, Omenetto F, Kaplan DL. Response of human corneal fibroblasts on silk film surface patterns. Macromol Biosci. 2010;10(6):664–73. doi: https://doi.org/10.1002/mabi.200900452.

109. Harkin DG, Chirila T V. Silk fibroin in ocular surface reconstruction: what is its potential as a biomaterial in ophthalmics? Future Med Chem. 2012;4(17):2145–7. doi: https://doi.org/10.4155/fmc.12.155.

110. Hajiabbas M, Alemzadeh I, Vossoughi M. A porous hydrogel-electrospun composite scaffold made of oxidized alginate/gelatin/silk fibroin for tissue engineering application. Carbohydr Polym. 2020;245(5):116465. doi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116465.

111. Burny F, Donkerwolcke M, Muster D. Biomaterials education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s. Mater Sci Eng A. 1995;199(1):53–9. doi: https://doi.org/10.1016/0921-5093(95)09907-7.

112. Ågren MS. Wound healing biomaterials. United Kingdom: Elsevier; 2016. Volume 2: Functional biomaterials.

113. Langer R. Biomaterials and biomedical engineering. Chem Eng Sci. 1995;50(24):4109–21. doi: https://doi.org/10.1016/0009-2509(95)00226-X.

114. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd ed; 1996. p.1-881.

115. Lloyd AW. Biomaterials - where are we going? Pharm Sci Technol Today. 1998;1(9):363–4. PII: S1461-5347(98)00101-1.

116. Boretos, J. W., Eden, M., & National Institutes of Health (U.S.). Contemporary biomaterials: material and host response, clinical applications, new technology, and legal aspects. Park Ridge: Noyes Publications, 1994.

117. Williams DF. On the nature of biomaterials. Biomaterials. 2009;30(30):5897–909. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.

118. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. Mater Today. 2008;11(5):26–35. doi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70087-7.

119. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008;29(20):2941–53. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

120. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater Today. 2011;14(3):88–95. doi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

121. Williams D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. Biomaterials.

2008;29(12):1737-8. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.003.

122. Biswal T, Kumar S, Pradhan D. Sustainable biomaterials and their applications: a short review. Mater Today Proc. 2020;30:274-82. doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.437.

123. Engel Y, Schiffman JD, Goddard JM, Rotello VM. Nanomanufacturing of biomaterials. Mater Today. 2012;15(11):478–85. doi: https://doi:10.1016/S1369-7021(12)70217-1.

124. Gilbert Triplett R, Budinskaya O. New frontiers in biomaterials. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2017;29(1):105–15. doi: https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.011.

125. Castaño O, Pérez-Amodio S, Navarro-Requena C, Mateos-Timoneda MÁ, Engel E. Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. Adv Drug Deliv Rev. 2018;129:95–117. doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.012.

126. Xu Y, Chen C, Hellwarth PB, Bao X. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. Bioact Mater. 2019;4(11):366–79. doi: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.11.002.

127. Kargozar S, Ramakrishna S, Mozafari M. Chemistry of biomaterials: future prospects. Curr Opin Biomed Eng. 2019;10:181–90. doi: https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.07.003.

128. Datta LP, Manchineella S, Govindaraju T. Biomolecules-derived biomaterials. Biomaterials.2020;230(11):119633. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119633.

129. Kumar S, Nehra M, Kedia D, Dilbaghi N, Tankeshwar K, Kim KH. Nanotechnologybased biomaterials for orthopaedic applications: recent advances and future prospects. Mater Sci Eng C. 2020;106(8):110154. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110154.

130. Minoura N, Aiba SI, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. Biochem Biophys Res Commun 1995; 208(2):511-6. doi: https://doi.org/10.1002/jbm.820291008.

131. Song JE, Sim BR, Jeon YS, Kim HS, Shin EY, Carlomagno C, et al. Characterization of surface modified glycerol/silk fibroin film for application to corneal endothelial cell regeneration. J Biomater Sci Polym Ed. 2019;30(4):263–75. doi: https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1535819.

132. Farokhi M, Mottaghitalab F, Fatahi Y, Saeb MR, Zarrintaj P, Kundu SC, et al. Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: possibilities for future clinical applications. Eur Polym J. 2019;115(3):251–67. doi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.035.

133. Gholipourmalekabadi M, Sapru S, Samadikuchaksaraei A, Reis RL, Kaplan DL, Kundu SC. Silk fibroin for skin injury repair: where do things stand? Adv Drug Deliv Rev. 2020;153:28–53. doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.09.003.

134. Kim DK, In Kim J, Sim BR, Khang G. Bioengineered porous composite curcumin/silk scaffolds for cartilage regeneration. Mater Sci Eng C. 2017;78:571–8. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.067.

135. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. Biomaterials. 2009;30(7):1299–308. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.018.

136. Tomoda BT, Corazza FG, Beppu MM, Lopes PS, de Moraes MA. Silk fibroin membranes with self-assembled globular structures for controlled drug release. J Appl Polym Sci. 2020;137(16):1–9. doi: https://doi.org/10.1002/app.48763.

137. Zhu G, Sun Z, Hui P, Chen W, Jiang X. Composite film with antibacterial gold nanoparticles and silk fibroin for treating multidrug-resistant E. Coli-Infected Wounds. ACS Biomater Sci Eng. 2021;7(5):1827–35. doi: https:// 10.1021/acsbiomaterials.0c01271.

138. Kim DK, Sim BR, Kim JI, Khang G. Functionalized silk fibroin film scaffold using β -Carotene for cornea endothelial cell regeneration. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2018;164:340–6. doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.052.

139. Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. Acta Biomater. 2012;8(1):289–301. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.037.

140. Tian W, Wang Y, Xu J, Li H, Song G, Ding M, et al. Evaluation of the biomedical properties of a Ca^+ conjugated silk fibroin porous material. Mater Sci Eng C. 2019;104:110003. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110003.

141. Lau K, Waterhouse A, Akhavan B, Gao L, Kim HN, Tang F, et al. Biomimetic silk biomaterials: perlecan-functionalized silk fibroin for use in blood-contacting devices. Acta Biomater. 2021;132:162–75. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.014.

142. Zhao Y, Ding X, Dong Y, Sun X, Wang L, Ma X, et al. Role of the calcified cartilage layer of an integrated trilayered silk fibroin scaffold used to regenerate osteochondral defects in rabbit knees. ACS Biomater Sci Eng. 2020;6(2):1208–16. doi: https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01661.

143. Gupta P, Mandal BB. Silk biomaterials for vascular tissue engineering applications. Acta Biomater. 2021;134:79–106. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.004.

144. Xu M, Yadavalli VK. Flexible biosensors for the impedimetric detection of protein targets using silk-conductive polymer biocomposites. ACS Sensors. 2019;4(4):1040–7.

145. Lu S, Wang X, Lu Q, Zhang X, Kluge JA, Uppal N, et al. Insoluble and flexible silk films containing glycerol. Biomacromolecules. 2010;11(1):143–50. doi: https://doi.org/10.1021/bm900993n.

146. Silva MF, De Moraes MA, Nogueira GM, Rodas ACD, Higa OZ, Beppu MM. Glycerin and ethanol as additives on silk fibroin films: insoluble and malleable films. J Appl Polym Sci. 2013;128(1):115–22. doi: https://doi.org/10.1002/app.38139.

147. Allardyce BJ, Rajkhowa R, Dilley RJ, Redmond SL, Atlas MD, Wang X. Glycerolplasticised silk membranes made using formic acid are ductile, transparent and degradationresistant. Mater Sci Eng C. 2017;80:165–73. doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.112.

148. Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. Int J Biol Macromol. 2001;29(2):91–7. doi: https://doi.org/10.1016/s0141-8130(01)00159-3.

149. Huang Y, Bailey K, Wang S, Feng X. Silk fibroin films for potential applications in controlled release. React Funct Polym. 2017;116(5):57–68. doi: https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.05.007.

150. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2007;39(8):549–59. doi: https://doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.

151. Hu X, Kaplan D, Cebe P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. Macromolecules. 2006;39(18):6161–70. doi: doi.org/10.1021/ma0610109.

152. Jin HJ, Park J, Karageorgiou V, Kim UJ, Valluzzi R, Cebe P, et al. Water-stable silk films with reduced β -sheet content. Adv Funct Mater. 2005;15(8):1241–7. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.041.

153. Ling S, Qi Z, Knight DP, Shao Z, Chen X. Synchrotron FTIR microspectroscopy of single natural silk fibers. Biomacromolecules. 2011;12(9):3344–9. doi: https://doi.org/10.1021/bm2006032.

154. Zhang C, Song D, Lu Q, Hu X, Kaplan DL, Zhu H. Flexibility regeneration of silk fibroin in vitro. Biomacromolecules. 2012;13(7):2148–53. doi: https://doi.org/10.102//bm300541g.

155. Indran VP, Syuhada Zuhaimi NA, Deraman MA, Maniam GP, Yusoff MM, Yun Hin TY, et al. An accelerated route of glycerol carbonate formation from glycerol using waste boiler ash as catalyst. RSC Adv. 2014;4(48):25257–67. doi: https://doi: 10.1039/C4RA02910K.

156. Geão C, Costa-Pinto AR, Cunha-Reis C, Ribeiro VP, Vieira S, Oliveira JM, et al. Thermal annealed silk fibroin membranes for periodontal guided tissue regeneration. J Mater Sci Mater Med. 2019;30(27):1-19. doi: https://doi.org/10.1007/s10856-019-6225-y.

157. Yun H, Kim MK, Kwak HW, Lee JY, Kim MH, Lee KH. The role of glycerol and water in flexible silk sericin film. Int J Biol Macromol. 2016;82:945–51. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.016.

158. Um IC, Kweon HY, Lee KG, Park YH. The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer. Int J Biol Macromol. 2003;33(4–5):203–13. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.08.004.

159. Koperska MA, Pawcenis D, Bagniuk J, Zaitz MM, Missori M, Łojewski T, et al. Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy. Polym Degrad Stab. 2014;105(1):185–96. doi: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.04.008.

160. Boulet-Audet M, Terry AE, Vollrath F, Holland C. Silk protein aggregation kinetics revealed by Rheo-IR. Acta Biomater. 2014;10:776–84. doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.032.

161. Carissimi G, Lozano-Pérez AA, Montalbán MG, Aznar-Cervantes SD, Cenis JL, Víllora G. Effect of degumming in the characteristics of silk fibroin nanoparticles. Prime Arch Polym Technol. 2020;1–38.

162. Tretinnikov ON, Tamada Y. Influence of casting temperature on the near-surface structure and wettability of cast silk fibroin films. Langmuir. 2001;17(23):7406–13. doi: https://doi.org/10.1021/la010791y.

163. Chen X, Knight DP, Shao Z, Vollrath F. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. Polymer (Guildf). 2001;42(25):9969–74. doi: https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01) 00541-9.

164. Dai L, Li J, Yamada E. Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends. J Appl Polym Sci. 2002;86(9):2342–7. doi: https://doi.org/10.1002/app.11260.

165. Taddei P, Monti P. Vibrational infrared conformational studies of model peptides representing the semicrystalline domains of Bombyx mori silk fibroin. Biopolymers.

2005;78(5):249-58. doi: https://doi.org/10.1002/bip.20275.

166. Fan L, Cai Z, Zhang K, Han F, Li J, He C, et al. Green electrospun pantothenic acid/silk fibroin composite nanofibers: Fabrication, characterization and biological activity. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2014;117:14–20. doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.030.

167. Brown JE, Davidowski SK, Xu D, Cebe P, Onofrei D, Holland GP, et al. Thermal and structural properties of silk biomaterials plasticized by glycerol. Biomacromolecules. 2016;17(12):3911–21. doi: https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01260.

168. Bier JM, Verbeek CJR, Lay MC. Thermal transitions and structural relaxations in protein-based thermoplastics. Macromol Mater Eng. 2014;299(5):524–39. doi: https://doi.org/10.1002/mame.201300248.

169. Hu X, Lu Q, Kaplan DL, Cebe P. Microphase separation controlled β -sheet crystallization kinetics in fibrous proteins. Macromolecules. 2009;42(6):2079–87. doi: https://doi.org/10.1021/ma802481p.

170. Li M, Lu S, Wu Z, Tan K, Minoura N, Kuga S. Structure and properties of silk fibroinpoly(vinyl alcohol) gel. Int J Biol Macromol. 2002;30(2):89–94. doi: https://doi.org/10.1016/s0141-8130(02)00007-7.

171. Wang HY, Zhang YQ. Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization. Soft Matter. 2013;9(1):138–45. doi: https://doi.org/10.1039/C2SM26945G.

172. Tamada Y. New process to form a silk fibroin porous 3-D structure. Biomacromolecules. 2005;6(6):3100–6. doi: https://doi.org/10.1021/bm050431f.

173. Raffaini G, Ganazzoli F. Understanding the performance of biomaterials through molecular modeling: Crossing the bridge between their intrinsic properties and the surface adsorption of proteins. Macromol Biosci. 2007;7(5):552–66. doi: https://doi.org/10.1002/mabi.200600278.

174. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. Biomaterials. 2007;28(22):3273–83. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.032.

175. Wang YX, Robertson JL, Spillman WB, Claus RO. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. Pharm Res. 2004;21(8):1362–73. doi: https://doi.org/10.1023/b:pham.0000036909.41843.18.

176. Faucheux N, Schweiss R, Lützow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. Biomaterials. 2004;25(14):2721–30. doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.069.

177. Tzoneva R, Faucheux N, Groth T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-ell adhesions. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2007;1770(11):1538–47. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.07.008.

178. Chen P, Tian H, Zhang L, Chang PR. Structure and properties of soy protein plastics with ϵ -caprolactone/ glycerol as binary plasticizers. Ind Eng Chem Res. 2008;47(23):9389–95. doi: https://doi.org/10.1021/ie800371f.

179. Da Silva RR, Cavicchioli M, Lima LR, Otoni CG, Barud HS, Santagneli SH, et al. Fabrication of biocompatible, functional, and transparent hybrid films based on silk fibroin and epoxy silane for biophotonics. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9(33):27905–17. doi: https://doi.org/10.1021/acsami.7b06061.

180. Motta A, Fambri L, Migliaresi C. Regenerated silk fibroin films: thermal and dynamic mechanical analysis. Macromol Chem Phys. 2002;203(10–11):1658–65. doi: https://doi.org/10.1002/1521-3935(200207)203:10/113.0.CO;2-3.

181. Vieira MGA, Da Silva MA, Dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. European Polymer Journal. 2011;47:254–63. doi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011.

182. Lei Z, Xing W, Wu J, Huang G, Wang X, Zhao L. The proper glass transition temperature of amorphous polymers on dynamic mechanical spectra. J Therm Anal Calorim. 2014;116(1):447–53. doi: https://doi.org/101007/s10973-013-3526-0.

183. Bier JM, Verbeek CJR, Lay MC. Identifying transition temperatures in bloodmeal-based thermoplastics using material pocket DMTA. J Therm Anal Calorim. 2013;112(3):1303–15. doi:https://doi.org/10.1007/s10973-012-2680-0.

184. Liu Q, Wang F, Gu Z, Ma Q, Hu X. Exploring the structural transformation mechanism of chinese and Thailand silk fibroin fibers and formic-acid fabricated silk films. Int J Mol Sci. 2018;19(11):2–16. doi: https://doi.org/10.3390/ijms19113309.

185. Yuan Q, Yao J, Huang L, Chen X, Shao Z. Correlation between structural and dynamic mechanical transitions of regenerated silk fibroin. Polymer (Guildf). 2010;51(26):6278–83. doi: https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.10.046.

186. Guan J, Porter D, Vollrath F. Thermally induced changes in dynamic mechanical properties of native silks. Biomacromolecules. 2013;14(3):930–7.

187. Hu X, Kaplan D, Cebe P. Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. Thermochim Acta. 2007;461(1–2):137–44. doi: https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.12.011.

188. Canevarolo Jr, S V. Ciência dos polímeros. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006. 1-277.