

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

IVAN CARLOS DA SILVA AGUIAR

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE
SERICINA RETICULADOS COM DIMETIOLURÉIA**

APUCARANA

2011

IVAN CARLOS DA SILVA AGUIAR

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE
SERICINA RETICULADOS COM DIMETIOLURÉIA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado a disciplina de TCC 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof. Dra. Franciele Rezende Barbosa Turbiani.

APUCARANA

2011

Ata da Defesa 003

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC

No dia 25 de Novembro de 2011, às 15:00 horas, nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana, ocorreu a banca de apresentação de trabalho de conclusão de curso (TCC) intitulada: "OBTENÇÃO DE SERICINA A PARTIR DE REÍDUOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL E APLICAÇÃO EM BIOFILMES" do aluno *Ivan Carlos da Silva Aguiar* sob orientação da professora *Dra. Franciele Rezende Barbosa Turbiani* referente ao TCC 2 do Curso de Tecnologia em Processos Químicos. A banca foi composta por:

Profª Dra. Franciele Rezende Barbosa Turbiani (orientadora)

Profª Msc. Fernanda Lini Seixas

Profª Msc. Patrícia Salomão Garcia

A nota obtida foi 8,9 (oito vírgula nove), sendo considerado o(a) aluno(a)

(x) aprovado.

() aprovado desde que atendidas as recomendações mencionadas.

() não foi aprovado.

Apucarana, _____ de _____ de 20____.

Orientador

Banca 1

Banca 2

Assinatura do(s) Aluno(s)



AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Franciele Rezende Barbosa Turbiani, pela orientação, paciência, incentivo, dedicação e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, prof. Franciele Rezende Barbosa Turbiani, prof. Patrícia Salomão Garcia e prof. Fernanda Lini Seixas.

À professora Patrícia Salomão Garcia, por ter contribuído para a realização deste trabalho, auxiliando em algumas análises.

À todos os professores do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR-Apucarana, pela paciência, dedicação, e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuindo para minha formação profissional.

Aos meus pais, Antonio e Maria, pelo apoio financeiro e por ter acreditado na conclusão deste curso

Agradeço a minha namorada Gisele, pela compreensão, incentivo e apoio.

.

RESUMO

AGUIAR, I. C. S. Desenvolvimento e Caracterização de Biofilmes de Sericina Reticulados com Dimetiloluréia 2011. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Programa de Graduação em Tecnologia, Universidade tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2011.

A sericina é uma proteína natural removida dos fios de seda pelo processo de degomagem. Nos casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori* estão presentes duas proteínas diferentes: a fibroína, que representa de 70 a 80% da massa total e a sericina com os 20-30% restantes. Sua utilização varia de acordo com a massa molar: peptídeos de alta massa molar são utilizados em biomateriais médicos, biomateriais degradáveis, fibras funcionais, hidrogéis entre outros; peptídeos de baixa massa molar, comumente, são destinados à indústria cosmética. O objetivo deste trabalho foi a, preparação de filmes formados a partir de sericina de alta massa molecular, analisando a influência do glicerol como plastificante e dimetiloluréia como agente reticulante e caracterizá-los quanto às suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água. A adição de glicerol promoveu um aumento significativo no teor de umidade em filmes de sericina com mesmo grau de reticulação, ao mesmo tempo, uma diminuição na resistência à tração e no módulo de elasticidade foi observada. As modificações químicas mediante adição de dimetiloluréia foram eficientes na diminuição da permeabilidade a vapor de água, efeito provocado através da introdução de ligações covalentes estáveis entre os grupos reativos presentes nas cadeias de sericina.

Palavras-chave: Sericina, biofilmes, reticulação.

ABSTRACT

AGUIAR, I. C. S. Desenvolvimento e Caracterização de Biofilmes de Sericina Reticulados com Dimetiloluréia 2011. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Programa de Graduação em Tecnologia, Universidade tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2011.

Sericin is a natural silk protein, which is removed from silk in a process called degumming. There are, in the *Bombyx mori* silkworm cocoon, two different proteins: fibroin, that represents 70-80% of total weight and sericin with that 20-30% remaining. Its application vary with its molecular weight: high molecular weight peptides are used in medical and biodegradable biomaterials, functional fibers, hydrogels and others; low molecular weight peptides are commonly used in cosmetics industry. The objective of this study was the preparation and the characterization of films formed from high molecular weight sericin, analyzing the influence of glycerol as plasticizer and dimetiloluréia as crosslinking agent in respect of their mechanical properties, water vapor permeability and solubility in water. The addition of glycerol promoted a significant increase in moisture content of sericin films with the same degree of crosslinking, while a decrease in tensile strength and modulus was observed. The chemical modifications by adding dimetiloluréia were effective in decreasing the permeability to water vapor, effect caused by the introduction of stable covalent bonds between the reactive groups present in sericin chains.

Keywords: Sericin, biofilms, crosslinking.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição de Aminoácidos na Solução de Sericina (% mol).....	11
Tabela 4.1. Planejamento fatorial 2^2 para produção de filmes de sericina reticulados com dimetiloluréia.....	24
Tabela 5.1. Efeito de diferentes formulações, no teor de umidade (ω) e solubilidade em água (S_w) de filmes de sericina.....	25
Tabela 5.2. Espessura e permeabilidade ao vapor de água de filmes de sericina com diferentes concentrações de DMU e glicerol.....	28
Tabela 5.3. Espessura e propriedades mecânicas para diferentes formulações de filmes de sericina.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. (a) Lagarta construindo casulo (b) Casulo (c) Pupa no interior do casulo.....	9
Figura 3.2. Metamorfose do inseto.....	10
Figura 4.1. Incubadora utilizada nos ensaios de solubilidade.....	22
Figura 4.2. Célula de teflon utilizada nos testes de permeabilidade ao vapor de água.....	23
Figura 5.1. Superfície de resposta para o conteúdo de umidade (W): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	26
Figura 5.2. Superfície de resposta para a solubilidade em água (S_w): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	27
Figura 5.3. Superfície de resposta para o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (K_{vap}): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	29
Figura 5.4. Superfície de resposta para a espessura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	31
Figura 5.5. Superfície de resposta para a tensão na ruptura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	32
Figura 5.6. Superfície de resposta para o alongamento na ruptura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	33
Figura 5.7. Superfície de resposta para o módulo de elasticidade dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

UR – Umidade Relativa

DMU – Dimetiloluréia

Kvap – Coeficiente de permeabilidade ao vapor de água

T – Tensão na ruptura

ε – Alongamento na ruptura

Y – Módulo de Young

ω – Conteúdo de umidade

S_w – Solubilidade em água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. A SEDA	12
3.1.1 Composição do Casulo	13
3.1.2. Processo de Fiação	15
3.2. SERICINA	15
3.2.1. Extração e Separação	15
3.2.2. Aplicações	19
3.3. BIOFILMES	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. MATERIAIS	22
4.2. MÉTODOS	22
4.2.1. Extração da Sericina	22
4.2.2. Recuperação da Sericina	22
4.2.2.1. Precipitação por Congelamento	22
4.2.3. Preparação dos filmes de sericina	23
4.2.4. Caracterização dos filmes	23
4.2.4.1. Espessura	24
4.2.4.2. Conteúdo de umidade	24
4.2.4.3. Massa solubilizada em água	24
4.2.4.4. Permeabilidade ao vapor de água	25
4.2.4.5. Propriedades mecânicas	26
4.2.4.6. Análise estatística dos resultados	27
4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Conteúdo de umidade e solubilidade em água	29
5.2. Permeabilidade ao vapor de água	32
5.3. Propriedades mecânicas	34
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A produção dos casulos (sericicultura) envolve tanto o cultivo das amoreiras para prover a alimentação, quanto a criação dos bichos-da-seda (FREDERICO, 1997). No contexto mundial o Brasil ocupa o quinto lugar na produção de casulos verdes em fios de seda. Sendo a produção de casulos no Paraná, estado com a maior produção nacional de casulos verdes, de 4,5 mil toneladas em 2009, que corresponde a 92,17% de toda produção nacional (BNDES, 2010).

O processo industrial de produção do fio da seda a partir do casulo do *Bombyx Mori* (bicho-da-seda) envolve uma série de etapas distintas. Sendo necessária de início a interrupção do desenvolvimento da pupa (crisálida) para que esta não venha a se tornar uma mariposa fazendo com que ocorra o rompimento dos fios do casulo impossibilitando sua posterior fiação. As etapas seguintes são degomagem e fiação do casulo.

Efluentes da indústria de seda são fontes abundantes de sericina uma vez que é removida do fio de seda pelo processo de degomagem. A composição do efluente é diferente no que diz respeito à técnica de degomagem aplicada. A degomagem convencional gera efluentes contendo sericina, sabão, detergentes e soda. No entanto, efluentes alternativos de degomagem contêm apenas sericina como resíduo, é o caso da degomagem realizada sem produtos químicos (CAPAR et al., 2009). Estes resíduos causam grandes quantidades de matéria orgânica nos efluentes de seda (AYGÜN, 2008). Esses efluentes contendo altos níveis de carga orgânica, quando lançados sem tratamento em corpos hídricos, reduzem a quantidade de oxigênio dissolvido, promovendo um aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em água. Estes efeitos, por sua vez, podem causar a eutrofização das massas de água receptoras.

Embora a sericina tenha sido tradicionalmente descartada no beneficiamento da seda, suas propriedades úteis, bem como a grave poluição ambiental causada pela indústria de transformação de seda levou a um crescente interesse na recuperação da sericina de efluentes de seda nos últimos anos (CAPAR et al., 2008). O potencial de recuperação anual de sericina para o mundo inteiro esta na ordem de 50.000 toneladas (ZHANG, 2002). O uso de sericina recuperada de processos da indústria de seda (enrolamento de seda e degomagem) agrega mais valor a sericina. Além disso, a recuperação da sericina irá minimizar a DBO e DQO presentes nas águas residuais (SOTHORNVIT, 2010).

Sericina é uma proteína solúvel em água. Quando o peptídeo de sericina é dissolvido em um solvente polar, hidrolisado em soluções ácidas ou alcalinas, ou degradado por uma

protease, as moléculas de sericina resultantes apresentam ampla distribuição de massa, que são dependentes de fatores tais como temperatura, pH e tempo de processamento. Peptídeos de sericina com baixo peso molecular (≤ 20 kDa) ou hidrolisados são utilizados em cosméticos, incluindo produtos para cuidados da pele e dos cabelos, produtos de saúde e medicamentos. Os peptídeos de sericina com alto peso molecular (≥ 20 kDa) são utilizados principalmente como biomateriais na medicina, biomateriais biodegradáveis, polímeros compostos, biomembranas funcionais, hidrogéis e fibras funcionais (ZHANG, 2002).

Sericina possui um uso interessante como um filme de biopolímero. Filmes de biopolímeros geralmente são feitos de folhas finas de biomateriais, como proteínas, carboidratos, gorduras e biomassa (SOTHORNVIT et al., 2010). Para a produção de materiais com propriedades melhoradas, sericina pode ser reticulada, copolimerizada e misturada com outros materiais macromoleculares, especialmente polímeros sintéticos (AYGÜN, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Preparar e caracterizar filmes formados a partir de sericina de alta massa molecular, analisando a influência do glicerol como plastificante e dimetiloluréia como agente reticulante. Os filmes foram caracterizados em relação à umidade, solubilidade em água, propriedades mecânicas e coeficiente de permeabilidade ao vapor de água.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Extração de sericina dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx Mori*);
- ❖ Precipitação da sericina por congelamento;
- ❖ Filtragem a vácuo para obtenção do precipitado;
- ❖ Preparo dos biofilmes a base de sericina, com diferentes proporções de glicerol como plastificante e dimetiloluréia como agente reticulante;
- ❖ Avaliar a relação plastificante/reticulante dos filmes através da determinação do teor de umidade e solubilidade em água;
- ❖ Avaliar as propriedades mecânicas através de medidas de tensão de ruptura, alongamento na ruptura e módulo de Young (elasticidade);
- ❖ Avaliar a permeabilidade de vapor de água nos filmes em ambiente de umidade relativa controlada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A SEDA

A fibra têxtil mais utilizada é a secretada pelos insetos pertencentes à família *Bombycidae* que inclui a domesticada mariposa *Bombyx mori* (MAUERSBERGER, 1954), com a finalidade de protegê-lo dentro do casulo (Figura 3.1) durante a sua transformação em pupa e subsequentemente em mariposa (Figura 3.2). Ao contrário de outras espécies, o *Bombyx mori* não sobrevive por muito tempo sozinho no ambiente. Portanto, a sua criação deve ser feita em ambiente fechado, chocando os ovos colocados na estação precedente e alimentando as lagartas com as folhas de amoreira.

O *Bombyx mori*, durante sua vida, passa por quatro estágios: ovo, larva, pupa (crisálida) e imago (mariposa). A larva, nascida de um ovo, com menos de 0,5 mg de peso, alimentando-se com folhas de amoreira, dentro de mais ou menos quatro semanas, cresce mais de 10 mil vezes em relação ao seu peso inicial (HOLANDA et al., 2004). Após esse período se inicia a construção gradual do casulo. Esse processo dura em média de 3 a 6 dias. Para a formação do casulo a larva secreta dois componentes principais: a fibroína, uma fibra filamentosa; e a sericina, com a função de unir os filamentos de fibroína uns aos outros. Com esses dois componentes principais forma-se um casulo rígido e protetor. Dentro deste ocorrerá a metamorfose da larva (MAUERSBERGER, 1954).

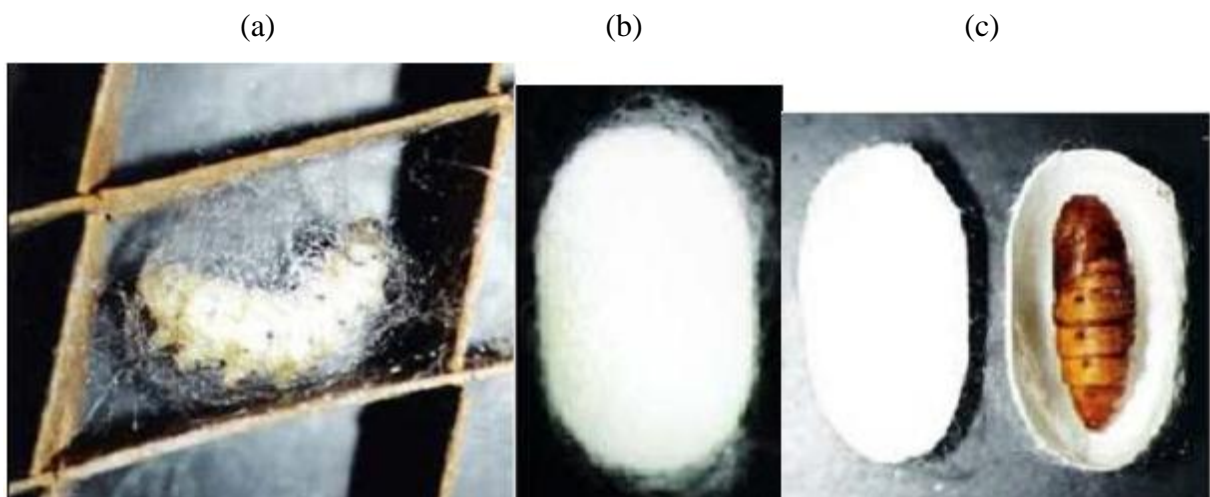


Figura 3.1. (a) Lagarta construindo casulo (b) Casulo (c) Pupa no interior do casulo.

(Marcelino, 2008).

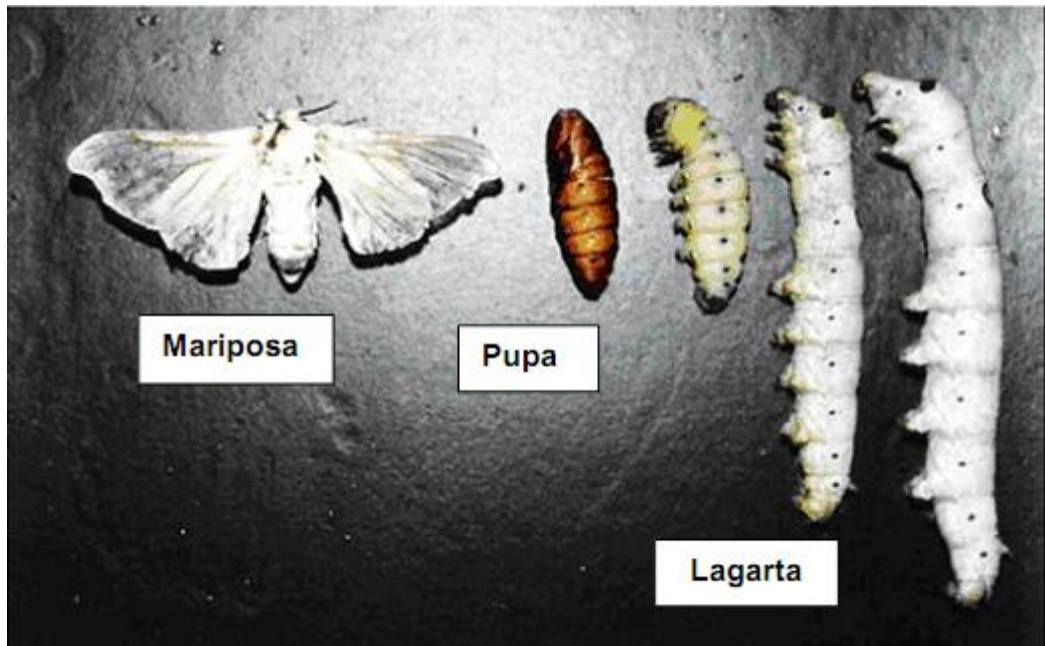


Figura 3.2. Metamorfose do inseto (Marcelino, 2008).

3.1.1 Composição do Casulo

A seda é um material altamente apreciado em produtos farmacêuticos, biomédicos, cosméticos e indústrias têxteis. Constituída principalmente, de dois componentes protéicos: a fibroína uma proteína fibrosa e insolúvel em água, e a sericina uma proteína globular que é solúvel em água. Ambas as proteínas possuem propriedades úteis que os tornam valiosos polímeros naturais para uma variedade de aplicações, incluindo as relacionadas com biomateriais (CAPAR et al., 2008). Com 70 a 80% da massa seca, a fibroína vem a ser o principal componente do fio de seda, e a sericina, compreendendo os 20-30% restantes, é uma proteína com propriedades adesivas, fundamental na manutenção das fibras de fibroína unidas, que tem por finalidade a resistência e proteção do casulo (PADAMWAR et al., 2005). Há também uma pequena quantidade de lipídios e polissacarídeos nas fibras de seda (KI et al., 2009), gordura e cera (0,5 a 1%), carboidratos (1 a 1,5%), corantes e outros (1 a 1,5%) (PADAMWAR et al., 2005).

A fibroína é uma fibra valiosa, com brilho e agradável ao tato (PADAMWAR et al., 2005). Classificada como uma glicoproteína fibrosa, altamente insolúvel em água (hidrofóbica), no entanto, pode ser solubilizada em soluções alcalinas. Sua massa molar varia entre 25 e 350 kDa (KUNDU et al., 2008; PADAMWAR e PAWAR, 2004; DASH et al. 2006 *in* TOMADON, 2011). Análise de aminoácidos mostra que a fibroína é composta principalmente de glicina (G), alanina (A) e serina (S). Com a exceção de serina, estes

aminoácidos hidrofóbicos representam quase 75% (mol%) e são sequenciados e repetidos com bastante regularidade, (GAGAGS) $_n$. Além disso, essa estrutura tem alta cristalinidade com as cadeias de fibroína orientada ao longo do eixo da fibra (KI et al., 2009). Estas características da estrutura dão a fibroína excelentes propriedades mecânicas (resistência à tração: 0,5 GPa), adicionalmente, tornam a fibroína insolúvel em água (SHAO et al., 2002).

Em contraste, a sericina contém uma quantidade relativamente grande de aminoácidos hidrofílicos e uma estrutura amorfa. Conseqüentemente tem pobres propriedades mecânicas e é solúvel em soluções aquosas. Sericina é ainda solúvel em água morna, e sua solubilidade aumenta com o aumento da temperatura. A solução aquosa de sericina com uma concentração alta o suficiente é bastante viscosa, comportando-se como um adesivo, no entanto, não contribui para a resistência à tração da fibra de seda devido a sua fragilidade (KI et al., 2009).

A sericina possui uma ampla faixa de massa molecular, variando de 10 a mais de 300 kDa (ZHANG et al, 2004). Assim como a fibroína, a sericina se compõe de vários aminoácidos, principalmente serina, glicina, e ácido aspártico que, juntamente, representam dois terços do total de aminoácidos (MAUERSBERGER, 1954). Dependendo do método utilizado na extração, há pequenas variações no percentual de aminoácidos na solução de sericina extraída, no entanto, o componente principal de aminoácidos na solução de sericina continua o mesmo. O teor de aminoácidos na solução de sericina extraída por vários métodos é mostrado na Tabela 3.1 (ARAMWIT, 2010).

Tabela 3.1. Composição de aminoácidos na solução de sericina (% mol).

Aminoácidos	Métodos de Extração da Sericina			
	Calor	Uréia	Ácido	Alcalino
Ácido aspártico	15,64	18,31	15,93	19,88
Serina	33,63	31,27	31,86	30,01
Ácido glutâmico	4,61	5,27	5,75	5,93
Glicina	15,03	11,23	10,49	11,01
Histidina	1,06	3,26	2,47	1,72
Arginina	2,87	5,41	4,92	4,92
Treonina	8,16	8,36	8,51	6,49
Alanina	4,10	4,33	3,72	4,21
Prolina	0,54	1,46	0,78	1,24
Cisteína	0,54	0,39	0,53	0,23

Tirosina	3,45	0,36	5,56	5,24
Valina	2,88	2,96	2,95	2,94
Metionina	3,39	0,12	0,06	0,15
Lisina	2,35	3,14	3,48	2,89
Isoleucina	0,56	0,96	0,87	0,75
Leucina	1,00	1,58	1,43	1,56
Fenilalanina	0,28	0,60	0,71	0,81

A quantidade de aminoácidos hidrofílicos, superior a 70% dos aminoácidos, pode explicar a boa solubilidade e a tendência de absorver água pela sericina (ZHANG, 2002).

3.1.2. Processo de Fiação

O processamento dos casulos para utilização na indústria de fiação inicia-se com o processo de secagem dos casulos. A secagem tem por objetivos: a) interromper o processo da metamorfose da crisálida, induzindo a sua morte evitando assim a sua saída dos casulos, como mariposa, o que provoca a perda do casulo pelo rompimento do fio; b) eliminar a umidade excessiva dos casulos, que prejudica a fiação. Nessas condições, o comprimento dos fios de seda nos casulos varia normalmente de 800 a 1500 metros, com espessura de 0,002 mm (HOLANDA et al., 2004).

De acordo com Zhang (2002), estima-se que a produção anual de casulos no mundo é cerca de um milhão de toneladas (massa fresca), o que é equivalente a quatrocentos mil toneladas de casulos secos. O processamento da seda bruta gera cerca de cinquenta toneladas de sericina anualmente, cuja recuperação e aproveitamento poderia representar uma economia significativa, além de um benefício social e ambiental (ZHANG, 2002).

3.2. SERICINA

3.2.1. Extração e Separação

A extração ou remoção da sericina dos casulos, também conhecida como degomagem, é feita por via física ou química. No primeiro caso, os processos são bem

conhecidos e baseiam-se principalmente na solubilidade dessa proteína em água (MARCELINO, 2008).

Os métodos de degomagem que utilizam enzimas como agentes são mais eficazes e envolvem economia em termos de água, energia, produtos químicos, e do tratamento de efluentes. Entretanto, o alto custo das enzimas tem limitado a sua aplicação industrial (LAMOOLPHAK et al., 2008).

Dependendo da forma de extração a massa molecular da sericina obtida pode ter uma ampla distribuição, onde as proteínas com massas moleculares maiores que 20 kDa são usadas principalmente na confecção de biomateriais (ZHANG, 2002).

Na indústria da seda a sericina é removida por um processo chamado degomagem e a água residual é descartada do processamento da seda. Sericina é uma proteína solúvel em água, ao contrário da fibroína da seda que é uma proteína de fibras orientadas. Durante a produção de seda crua, na fábrica de enrolamento, a maioria da sericina deve ser removida (TURBIANI, 2011).

Os peptídeos pequenos de sericina são solúveis em água fria e podem ser recuperados em estágios iniciais de produção de seda crua. Os peptídeos maiores de sericina são solúveis em água quente e podem ser obtidos na última fase do processamento da seda ou de processos para degomagem da seda (ZHANG, 2002)

Há vários métodos físicos descritos na literatura para a remoção da sericina do casulo, sendo os mais estudados: a extração em água com alta pressão e a extração com soluções aquosas alcalinas (TURBIANI, 2011).

Os primeiros métodos de extração da sericina utilizavam água em ebulição e foram realizados por Cramer em 1895 e por Bondi em 1902, como descritos no trabalho de Kodama (1926). Cramer extraiu a sericina em água fervente, promoveu a sua precipitação com ácido acético e em seguida decompôs esse precipitado com sulfeto de hidrogênio, separando a proteína com etanol. Bondi também estudou a extração com água em ebulição e a recuperação da proteína foi realizada através de dois métodos. Primeiro o extrato foi evaporado, o material obtido lavado com água, dissolvido em uma solução alcalina e precipitado com etanol. No segundo método a proteína foi precipitada com ácido acético e o precipitado obtido foi tratado com álcool.

Modificando a metodologia de separação da sericina usada por Bondi, Kodama (1926), após extrair a sericina de cerca de 100 g de casulos em água em ebulição, estudou a precipitação da proteína em solução pela adição de ácido acético (até pH 3,8). O precipitado foi separado por decantação, lavado com água e aquecido com 25% de álcool até que esse

ficasse incolor. Cerca de 27 g de pó foram obtidas pelo tratamento desse precipitado com álcool e éter.

Kodama (1926) estudou também a extração da sericina em água sob pressão, a partir de 20 g de casulos e 500 mL de água destilada, a 100 e a 105 °C, durante uma hora. Esse procedimento foi repetido três vezes e a água renovada a cada extração. A recuperação da proteína foi realizada pela adição de ácido acético (até pH 3,8) ou álcool. Foi demonstrado que a extração a 105 °C é mais efetiva do que a 100 °C, onde os rendimentos, em porcentagem de Nitrogênio no extrato, foram de 0,165% e 0,150%, respectivamente, somando-se as três extrações. Quanto maior a temperatura utilizada na extração, menor foi a quantidade de proteína precipitada pelo acetato e maior a concentração de álcool necessária para a precipitação da proteína no extrato. Concluiu-se, portanto, que o aquecimento a altas temperaturas causa alguma mudança na proteína ou na sua decomposição.

Kurioka et al. (2004 apud TURBIANI, 2011) compararam a extração em água sob pressão, com a extração alcalina e ácida. A degomagem alcalina foi feita com solução de carbonato de sódio 0,5% (m/v), a extração em água sob pressão foi feita a 110, 115 e 121 °C e a extração ácida foi feita com solução aquosa de ácido cítrico 1,25% em ebulição. O rendimento da sericina em pó obtido pela degomagem ácida foi comparável ao obtido pela degomagem alcalina e em água quente. A média de perda de massa dos casulos na extração ácida foi de 27,8% e nas extrações alcalina e em água foram de 25,7% e 21%, respectivamente.

Hong et al. (2006 apud MARCELINO, 2008), também estudaram a extração de sericina em água sob pressão. Neste estudo, a concentração da solução obtida realizou-se com a vaporização da água a 40 °C, em seguida, secada com spray-dryer. O pó resultante foi solubilizado em água destilada (razão 1:10) e refrigerado a 4 °C. Para realizar a precipitação da sericina Hong utilizou diferentes proporções de etanol a -18 °C e utilizou a centrifugação para fazer a separação da proteína (3500 rpm por 20 minutos). Para retirar o etanol residual realizou a evaporação a 40 °C e o precipitado foi então liofilizado. Para determinar o rendimento do processo, o autor determinou o teor de nitrogênio do pó obtido por atomização. Em seguida, solubilizou este pó em água e, novamente, determinou o teor de nitrogênio do sobrenadante. Dessa maneira, o rendimento em termos de nitrogênio solúvel, correspondente à sericina, foi de 95%. O autor percebeu também que o rendimento da precipitação da sericina com etanol se eleva com o aumento da concentração do álcool.

Com o objetivo de tentar melhorar a eficiência de extração de sericina, Lamoolphak et al. (2008) como citado no trabalho de Tomadon (2011) propuseram a extração de sericina

com água subcrítica, isto é, água pressurizada a temperaturas acima da temperatura de ebulição da água, porém abaixo da temperatura crítica. Os autores analisaram o efeito da temperatura, variando de 120 até 160 °C; da razão entre seda:água (1:20, 1:50 e 1:100) e do tempo de reação (10 – 60 min), no rendimento dos produtos. Os produtos obtidos a baixas temperaturas (120 e 130°C) apresentaram viscosidade maior do que aqueles obtidos a temperaturas maiores e observou-se a gelificação deles após o resfriamento. De acordo com os autores, a massa de resíduo não se alterou significativamente com o aumento da temperatura de 120 para 160 °C. Tal fato indica que a maior parte da fibroína não foi hidrolisada nessa temperatura. Após 30 minutos de extração a baixas temperaturas, a massa molar da sericina variou de 10 a 225 kDa. Com somente 10 minutos de reação a massa molar da sericina variou entre 100 e 225 kDa. Em relação à razão mássica entre seda:água os autores observaram que, para razões menores (1:100), a taxa de decomposição da sericina em peptídeos e aminoácidos foi menor, comparado a razões maiores (1:50 e 1:20). Segundo os autores, isso pode ter acontecido porque, em razões maiores, a viscosidade da proteína pode aumentar a resistência à transferência de massa, limitando a taxa de reação.

Ellis (1932 apud MARCELINO, 2008), em sua patente sobre tratamento de tecidos, descreve a degomagem da seda utilizando soluções de sais alcalinos orgânicos e inorgânicos (como silicatos, boratos, carbonatos) e banhos contendo sabões, em pH 10-10,5 e temperatura de 80 °C.

Li et al. (2002 apud TOMADON, 2011) utilizaram uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,5% (m/v) a 95 °C, por 1 hora, para a completa remoção da sericina. O experimento objetivou o estudo da formação de géis de fibroína e álcool polivinílico com potencial para utilização como substrato em cultura de células

Yeo et al. (2002 apud MARCELINO, 2008), com o objetivo de preparar microesferas de fibroína, isolaram a sericina pela extração com solução de Na_2CO_3 0,3% (m/v) e sabão de Marselha 0,5%, a 100 °C por 1 hora, duas vezes. Li, (2003) *in* Turbiani (2011) isolou a sericina pela extração alcalina com uma solução aquosa (Na_2CO_3 0,5% e sabão de Marselha 0,3% (m/v)) em ebulição, por 1 hora.

Ki et al. (2007 apud MARCELINO, 2008) em seu trabalho sobre o efeito da sericina residual na estrutura e na propriedade mecânica do filamento de seda extraíram a sericina dos casulos, previamente secos, com água e com misturas em diferentes concentrações de sabão de Marselha e carbonato de sódio, a 100 °C, durante 1h. Os resultados obtidos pelos autores mostraram o aumento na taxa de degomagem com o aumento da concentração de sabão e de carbonato de sódio.

3.2.2. Aplicações

Os peptídeos de sericina possuem aplicações importantes em toda a faixa de massa molecular. Os peptídeos de baixa massa molecular ou hidrolisados, inferior a 60 kDa, são solúveis em água fria e podem ser recuperados nos estágios iniciais de produção da seda crua. Esta sericina é caracterizada pelo excelente conteúdo de umidade e atividades biológicas, além de possuírem propriedades antioxidante, anticoagulante e prevenir o câncer de pele. Esta fração da sericina é utilizada em cosméticos. Já os peptídeos com alta massa molecular, de 60 a 300 kDa, são pouco solúveis em água fria, mas solúvel em água quente e podem ser obtidos nos estágios posteriores do processamento da seda e estão sendo investigados para utilização como materiais médicos, materiais biodegradáveis, polímeros compostos, biomembranas funcionais, hidrogéis e fibras funcionais (TURBIANI, 2011).

Kato et al. (1998 apud TURBIANI, 2011) demonstraram a primeira evidência da ação antioxidante da sericina pelo estudo da inibição da atividade da tirosinase (polifenol oxidase), enzima responsável pelas reações de escurecimento de vários alimentos e biossíntese da melanina, sugerindo que este biomaterial é uma valiosa matéria-prima para a indústria de alimentos e de cosméticos.

Zhang et al. (2004) prepararam micropartículas de sericina da ordem de 1-30 μm , as quais foram reticuladas quimicamente com a enzima L-asparaginase e utilizadas para tratamento de leucemia linfoblástica.

Aramwit et al. (2007) estudaram os efeitos da sericina na cicatrização e diminuição do tamanho de feridas em ratos. Um creme contendo 8% de sericina não mostrou nenhum efeito tóxico nos ratos, mostrando-se seguro e biocompatível, sendo que as reações inflamatórias da pele, nas feridas tratadas com sericina, mostraram-se menores do que aquelas tratadas com o controle. A cicatrização das feridas tratadas com o creme contendo sericina foi mais rápida do que a cicatrização das feridas tratadas com o controle (11 vs. 15 dias).

O uso de sericina na formulação de um cosmético para as unhas foi patenteado por Yamada et al. (2007 apud MARCELINO, 2008). Segundo os autores, a sericina na concentração de 0,2 a 20%, é capaz de diminuir a secura das unhas, tornando-as brilhantes e mantendo ou melhorando a sua saúde.

Fox et al. (2006 apud MARCELINO, 2008), descreveram os estudos realizados por Yao (2004), que mostram a relação entre a massa molecular de peptídeos de sericina e os seus efeitos nos cuidados com os cabelos. Neste trabalho foram estudadas a influência da adsorção desses peptídeos na superfície e nas propriedades mecânicas dos cabelos humanos. Os

peptídeos que tiveram maior afinidade ao cabelo humano formaram um filme transparente na superfície, protegendo-os dos danos causados por fatores externos, conferindo brilho e elasticidade, e facilitando a penetração para a reparação do cabelo danificado.

3.3. BIOFILMES

Muitas embalagens flexíveis são feitas com plásticos, isto é, materiais sintéticos, que apesar de possuírem excelentes propriedades funcionais, são considerados não-biodegradáveis e estão envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos sólidos municipais. A biodegradação do polietileno, por exemplo, é estimada em duzentos anos. Uma das soluções para amenizar esse problema é a utilização de biopolímeros na produção de materiais biodegradáveis (SOBRAL, 2000).

Para a formação do filme é necessário que a macromolécula possua a capacidade de formar uma matriz contínua e coesa. Dentre as macromoléculas que apresentam estas características os polissacarídeos e as proteínas têm chamado a atenção devido à sua disponibilidade e às características dos filmes formados com estes materiais (TURBIANI, 2011). De modo geral, os biofilmes produzidos a partir de proteínas apresentam propriedades mecânicas melhores que as dos filmes à base de polissacarídeos (CHEN, 1995).

O uso desses materiais na confecção de biofilmes vai depender, além de parâmetros como custo e disponibilidade de suas propriedades funcionais: propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), solubilidade em água e propriedades sensoriais (SOBRAL, 2000).

Os filmes podem ser classificados em comestíveis ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para a sua produção e da quantidade das substâncias empregadas. Podem ser utilizados como filmes ou coberturas. A diferença básica é que os filmes são pré-formados separadamente do produto e, as coberturas são formadas sobre a própria superfície do alimento, que pode ser por imersão ou aspersão (MAIA et al., 2000).

Biofilmes obtidos a partir de proteínas apresentam geralmente baixa elasticidade e são quebradiços, sendo que a introdução de plastificantes tem sido uma ótima alternativa para resolver este problema. Os plastificantes são substâncias de alto ponto de fusão e baixa volatilidade, que devem ser compatíveis com o biopolímero para garantir sua eficiência. Interação com a interface do polímero, enfraquecendo as forças intermoleculares, dando

maior mobilidade às cadeias formadoras da matriz polimérica e conseqüentemente, aumentando a flexibilidade dos filmes (MARTINS, 2010). Entre os plastificantes mais empregados na produção de filmes a base de proteínas estão os polióis, como o glicerol e o sorbitol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A sericina utilizada no presente trabalho foi obtida a partir da extração de casulos do bicho-da-seda de 2º classe utilizando água destilada. Os casulos foram cedidos pela empresa BRATAC S/A – Londrina – PR.

Na confecção dos filmes de sericina foi utilizado dimetiloluréia (DMU) (Sigma-Aldrich) como agente reticulante e glicerol (Synth P.A., Brasil) como agente plastificante. Nos dessecadores utilizados para o armazenamento dos filmes a 52% UR e para os ensaios de permeabilidade ao vapor de água a 75% UR foram adicionadas soluções saturadas de nitrato de magnésio e cloreto de sódio (Fmaia P.A., Brasil), respectivamente.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Extração da Sericina

Os casulos previamente cortados em três partes, foram imersos em água destilada na proporção 3:100 (m/v), em erlenmeyers de 500 mL. A extração foi realizada a 120°C na pressão manométrica correspondente a 1 kgf./cm² durante 60 min em autoclave. Após a extração, a solução de sericina foi filtrada para a remoção do material insolúvel. A solução de sericina filtrada foi armazenada, em recipientes identificados, sob refrigeração, com temperatura média de 4°C.

4.2.2. Recuperação da Sericina

4.2.2.1. Precipitação por Congelamento

A solução de sericina após o processo de extração em autoclave foi armazenada em garrafas PET e levadas a um congelador convencional onde foram mantidas a -20 °C durante 24 horas para alcançar precipitação. Após este período a solução foi retirada do congelador e deixada à temperatura ambiente (25 °C) até descongelar. O mesmo procedimento foi feito para precipitar a sericina dissolvida no efluente de degomagem.

A separação da proteína precipitada procedeu-se mediante filtração a vácuo. O precipitado foi acondicionado em embalagens identificadas e armazenado sob refrigeração. O filtrado, da mesma maneira, foi armazenado sob refrigeração. A concentração da proteína na solução foi determinada em estufa a 105 °C por 24 horas e ajustada para 2% antes do uso.

4.2.3. Preparação dos filmes de sericina

Os filmes de sericina foram obtidos pelo processo de moldagem convencional aplicado a polímeros termoplásticos e termorrígidos, denominado evaporação, vazamento, ou “*casting process*”. Este processo consiste basicamente na preparação da solução filmogênica e aplicação ou espalhamento da mesma em um suporte (TURBIANI, 2011).

Uma solução polimérica com fração mássica de sericina (2 % m/v) foi preparada em água destilada já contendo glicerol à temperatura ambiente. A solução foi mecanicamente agitada para obter uma solução homogênea. Em seguida, a temperatura do sistema foi aumentada para 70 °C e uma solução diluída de dimetiloluréia (Tabela 4.1) foi lentamente adicionada à solução biopolimérica. Essa solução foi mantida sob agitação por mais 1 hora. Alíquotas de 70 g desta solução foram transferidas para placas de polipropileno (diâmetro = 15 cm), e levadas a uma estufa de circulação de ar, a 40 °C por 16 horas, para gelificação incipiente e formação de um filme por evaporação (TURBIANI, 2011).

Antes de sua caracterização, os filmes foram armazenados por 72 horas em dessecadores a uma umidade relativa de 52% (solução saturada de nitrato de magnésio) e temperatura de 25 °C para uniformizar seu conteúdo de umidade (TURBIANI, 2011).

4.2.4. Caracterização dos filmes

Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, teor de umidade, solubilidade em água, propriedades mecânicas (tensão na ruptura, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade) e coeficiente de permeabilidade ao vapor de água.

4.2.4.1. Espessura

O controle da espessura dos filmes foi obtido vertendo um volume adequado de solução filmogênica (em torno de 70 g) de modo a manter constante a massa seca nas placas. A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (Starret® – 3206 (resolução de $\pm 0.001\text{mm}$)). A espessura final foi calculada pela média aritmética de cinco medidas aleatórias sobre uma área de $9,6\text{ cm}^2$ (diâmetro igual a 3,5 cm) nos ensaios de permeabilidade ao vapor de água, e a média de dez medidas aleatórias sobre uma área de $26,7\text{ cm}^2$ ($10,5 \times 2,54\text{ cm}$) nos ensaios mecânicos (TURBIANI, 2011).

4.2.4.2. Conteúdo de umidade

A umidade (ω) foi determinada em triplicata para cada formulação de filme. A massa inicial de discos cortados dos filmes, de 2,5 cm de diâmetro, foi quantificada e as amostras submetidas à secagem a 105°C por 24 h em estufa (Brasdonto, modelo 1, Brasil) e a massa seca quantificada novamente. O conteúdo de umidade (ω) foi expresso como fração da massa inicial do filme pela Eq. (4.1), como descrito por Turbiani (2011).

$$\omega = \frac{(m_i - m_{sf})}{m_i} * 100 \quad (4.1)$$

onde: ω é a umidade do filme (%);

m_i é a massa seca inicial da amostra (g);

m_{sf} é a massa seca final da amostra (g).

4.2.4.3. Massa solubilizada em água

A massa solubilizada em água foi determinada em triplicata. A massa total de amostras do filme foi quantificada (m_o) e o material imerso em excesso de água destilada sob agitação branda (125 rpm) a 25°C por 24 h, utilizando-se uma incubadora refrigerada com agitação (Shaker, modelo CE-320) como mostrado na Figura 4.1. A massa seca final (m_f) foi determinada submetendo-se esta amostra à secagem ($105^\circ\text{C}/24\text{ h}$). A massa solubilizada foi expressa em função da massa seca inicial, conforme Eq. (4.2), como citado no trabalho de Turbiani (2011).

$$S_w = \frac{m_o(1 - \omega) - m_f}{m_o(1 - \omega)} * 100 \quad (4.2)$$

onde: S_w é a quantidade de matéria solúvel (%);

m_o é a massa seca inicial da amostra (g);

m_f é a massa seca final da amostra (g).



Figura 4.1. Incubadora utilizada nos ensaios de solubilidade.

4.2.4.4. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (K_{vap}) foi determinada, utilizando pequenas células de teflon e alumínio a 25°C. Amostras circulares de filmes, 5 cm de diâmetro, foram fixadas nas células com auxílio de parafuso, como mostrado na Figura. 4.2, e a célula permaneceu no interior de um dessecador com circulação de ar (Arsec, modelo DCV040) com umidade relativa constante de 75%, obtida com uma solução saturada de cloreto de sódio. A área da superfície livre exposta dos filmes para permeação de vapor foi 9,6 cm². Cloreto de cálcio granulado preencheu o fundo da célula, mantendo um micro-ambiente a 2% de UR. As células foram pesadas diariamente com uma balança analítica durante sete dias. O valor da K_{vap} foi calculado pela Eq. (4.3), como metodologia descrita por Turbiani (2011). Todas as determinações foram feitas em triplicata

$$K_{vap} = \frac{\dot{G} * \delta}{A_e * \Delta P_{H_2O}} \quad (4.3)$$

onde: K_{vap} é a permeabilidade ao vapor de água [(g.mm)/(m²dia.kPa)];

δ é a espessura inicial do filme (mm);

\dot{G} é a taxa constante de ganho de massa (g/dia);

A_e é a área exposta do filme;

$\Delta P_{\text{H}_2\text{O}}$ é a diferença de pressão parcial do vapor de água no ambiente próximo às duas faces do filme na temperatura do ensaio (kPa).



Figura 4.2. Célula de teflon utilizada nos testes de permeabilidade ao vapor de água.

4.2.4.5. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram obtidas, utilizando um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems, Inglaterra) pertencente a Universidade Estadual de Londrina-UEL – PR.

Amostras de dimensões de 25,4 mm por 100 mm foram ajustadas às garras do equipamento texturômetro. A separação inicial foi de 60 mm e a velocidade de tração foi de 50 mm/min. A tração na ruptura (força máxima no momento da ruptura/área de seção transversal inicial do filme) e o alongamento na ruptura (porcentagem em relação ao comprimento inicial) foram determinados diretamente usando o software Texture Expert V.1.15 da Stable Microsystems.

As propriedades de tração determinadas foram: tração na ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de Young (MPa). A tração na ruptura foi calculada pela Equação (4.4) e o alongamento na ruptura de acordo com a Equação (4.5).

$$T = \frac{F_m}{A} \quad (4.4)$$

onde: T é a tração na ruptura (Pa);

F_m é a força máxima no momento da ruptura (N);

A é a área da seção transversal do filme (m²).

$$\varepsilon = \frac{(d_r - d_i)}{d_i} * 100 \quad (4.5)$$

onde: ε é o alongamento (%);

d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura (cm);

d_i é a separação inicial entre as garras (cm)

4.2.4.6. Análise estatística dos resultados

A avaliação estatística dos resultados obtidos foi realizada por meio do programa STATISTICS, versão 7, empregando-se Teste de Tukey para comparação das médias das propriedades a um nível de 95% de confiança.

O efeito das variáveis independentes nas respostas foram avaliadas usando a análise de variância (ANOVA), sendo os resultados considerados sempre significativos quando $p < 0,05$.

4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizada metodologia de superfície de resposta para estudar o efeito da concentração de glicerol e da concentração de agente reticulante (DMU) nas propriedades finais dos filmes. Os níveis das variáveis independentes (glicerol e DMU) foram definidos de acordo com um fatorial 2^2 conforme apresentado na Tabela 4.1. O sistema estudado pode ser descrito de acordo com um modelo linear (Eq. 4.6):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} .x_i x_j \quad (4.6)$$

onde: Y é a resposta, β_0 é o coeficiente de intersecção, β_i são os termos lineares, β_{ij} são os termos de interação, e x_i e x_j são os níveis codificados das variáveis independentes.

A análise estatística (análise de variância, análise de regressão e otimização gráfica) foi feita usando o software Design - Expert (Versão 6.0.5).

Tabela 4.1. Planejamento fatorial 2^2 para produção de filmes de sericina reticulados com dimetiloluréia.

R	x_1 (C_{DMU})	x_2 ($C_{glicerol}$)
1	-1 (0,1)	-1 (0,2)
2	+1 (0,4)	-1 (0,2)
3	-1 (0,1)	+1 (0,6)
4	+1 (0,4)	+1 (0,6)

R = corridas; x_1 e x_2 = variáveis independentes; $C_{glicerol}$ = % glicerol na solução filmogênica; C_{DMU} = % DMU na solução filmogênica; -1, +1 = valores codificados do planejamento experimental; () = valores reais do planejamento experimental.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes de sericina reticulados com DMU apresentaram uma espessura média de $0,135 \pm 0,025$ mm. Os filmes foram facilmente removidos do suporte, apresentaram coloração levemente amarela, transparentes, homogêneos e visualmente atrativos.

5.1. Conteúdo de umidade e solubilidade em água

Depois de armazenados por um período de três dias, os filmes foram caracterizados, obtendo os resultados descritos na Tabela 5.1, de acordo com o planejamento experimental previamente descrito (Tabela 4.1).

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados referentes aos testes de solubilidade e teor de umidade, para as diferentes formulações de filmes estudadas. O teor de umidade, para as quatro formulações de filmes empregados no estudo, variou de 14,36 a 32,25%.

O glicerol é um plastificante hidrofílico bastante empregado, que interage com as cadeias do polímero, aumentando a mobilidade molecular e, conseqüentemente, a hidrofiliçidade e a flexibilidade dos filmes plastificados (MALI et al., 2004). Neste trabalho, os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo, na solubilidade com o aumento do teor de plastificantes.

Tabela 5.1. Efeito de diferentes formulações, no teor de umidade (ω) e solubilidade em água (S_w) de filmes de sericina.

Formulação	C_{DMU} (g/g sericina)	$C_{glicerol}$ (g/g sericina)	ω (g/100g _{filme})	S_w (%)
1	0,1	0,2	$14,76 \pm 2,72^a$	$21,78 \pm 1,28^a$
2	0,4	0,2	$17,59 \pm 1,62^a$	$18,87 \pm 1,25^a$
3	0,1	0,6	$29,38 \pm 1,65^b$	$40,52 \pm 2,01^c$
4	0,4	0,6	$32,25 \pm 2,11^b$	$33,64 \pm 0,86^b$

Média \pm desvio padrão (3 repetições). Nota: letras diferentes, na mesma coluna, representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do Teste de Tukey.

Os resultados obtidos para cada parâmetro (Tabela 5.1) foram submetidos à análise de variância a 95% de confiança. Somente os parâmetros estatisticamente significativos foram utilizados para analisar o modelo e os gráficos das superfícies de respostas apresentadas.

De acordo com os resultados da análise de variância, o modelo calculado para o conteúdo de umidade do filme (W), representado na Eq. (5.1), foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$ e $R^2 = 0,9635$). Na Figura 5.1 está apresentada a superfície de resposta.

$$W = +23,50 + 1,43. C_{DMU} + 7,32. C_{glicerol} \quad (5.1)$$

De acordo com a Eq. (5.1), todos os fatores de primeira ordem afetam o conteúdo de umidade do filme, sendo este conteúdo mais afetado pela concentração de glicerol na solução filmogênica. O modelo não sofreu influência de nenhuma interação entre os fatores.

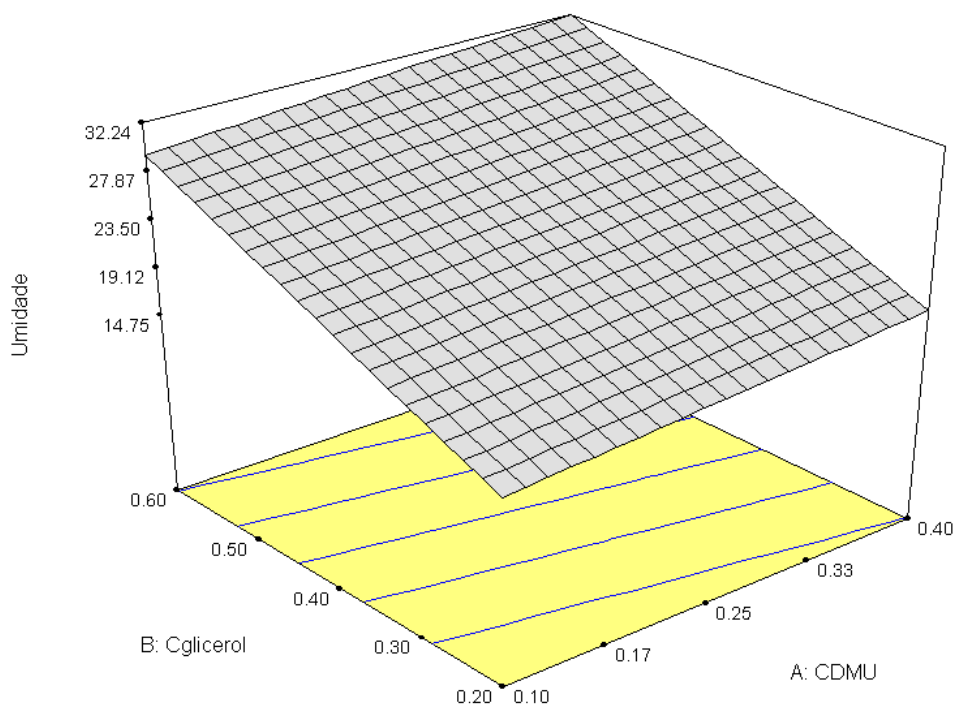


Figura 5.1. Superfície de resposta para o conteúdo de umidade (W): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

A respeito da solubilidade em água, pode ser observado que os parâmetros do modelo linear (Eq. (5.2)) em termos de C_{DMU} e $C_{glicerol}$ foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$ e $R^2 = 0,9872$).

$$S_w = +28,70 - 2,45 \cdot C_{DMU} + 8,38 \cdot C_{glicerol} \quad (5.2)$$

Desta maneira, a Eq. (5.2) pode ser usada para gerar a superfície de resposta (Fig. 5.2).

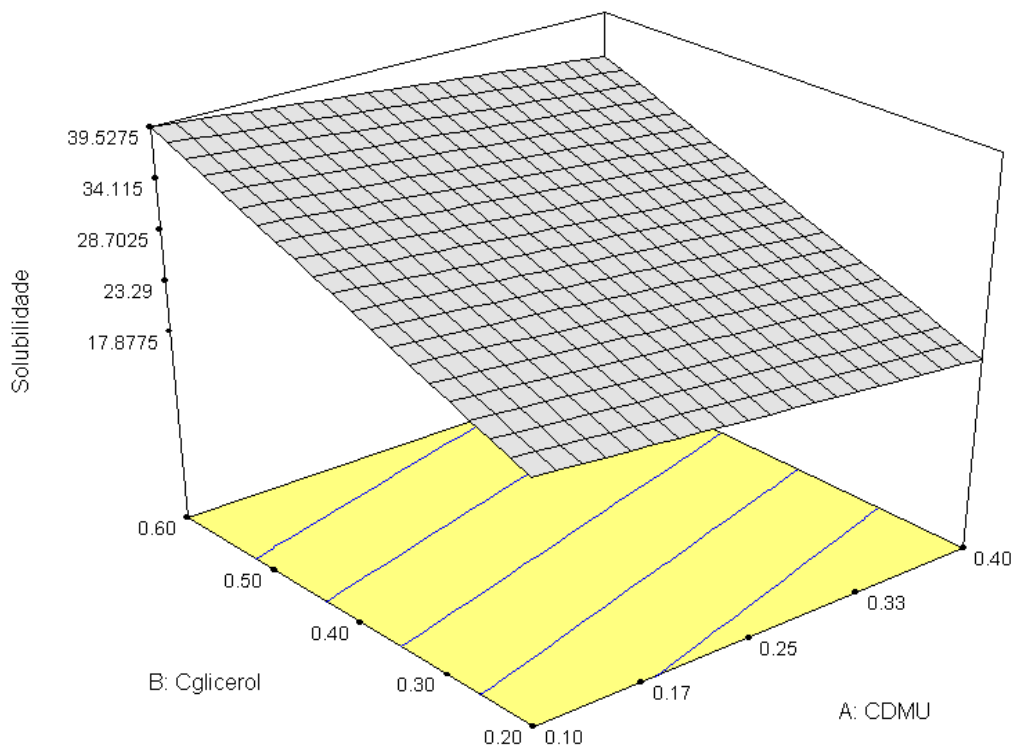


Figura 5.2. Superfície de resposta para a solubilidade em água (S_w): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

A concentração de agente plastificante na solução filmogênica afetou fortemente a solubilidade em água dos filmes (Fig 5.2). Filmes com maior concentração de agente reticulante apresentaram-se menos solúveis. O aumento na concentração de glicerol diminuiu a resistência à água, sugerindo que o aumento da concentração de plastificante poderia aumentar a higroscopicidade e hidrofiliabilidade dos materiais.

Observa-se na Tabela 5.1 que a concentração do agente reticulante influenciou significativamente ($p > 0,05$) a solubilidade em água nas formulações 3 e 4, sendo seus

valores 40,52% e 33,64%, respectivamente. Turbiani (2011), avaliando a influência do grau de reticulação na caracterização de biofilmes de sericina, concluiu que solubilidade em água dos filmes tende a diminuir com o aumento da concentração de DMU.

A solubilidade em água para formulações 1 e 2, com mesma concentração de glicerol e diferentes concentrações de agente reticulante, não diferiram significativamente para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Apesar da maior solubilidade apresentada para filmes com menor concentração de agente reticulante.

A solubilidade em água de filmes formados por polímeros de origem natural pode ser uma desvantagem, dependendo da aplicação do material. A afinidade pela água aumenta a velocidade de degradação; contudo, esta sensibilidade à umidade pode limitar a sua aplicação. Uma forma de contornar este problema é a inserção de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Estas ligações podem ser formadas através de um processo de reticulação (PORTO, 2007).

5.2. Permeabilidade ao vapor de água

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água juntamente com a espessura dos filmes, submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de DMU e glicerol.

Tabela 5.2. Espessura e permeabilidade ao vapor de água de filmes de sericina com diferentes concentrações de DMU e glicerol.

Formulação	C_{DMU} (g/g sericina)	$C_{glicerol}$ (g/g sericina)	Espessura (mm)	K_{vap} (g.mm)/(m ² .dia.kPa)
1	0,1	0,2	0,110 ± 0,004 ^a	11,55 ± 1,70 ^b
2	0,4	0,2	0,132 ± 0,012 ^a	3,41 ± 0,05 ^a
3	0,1	0,6	0,154 ± 0,014 ^a	15,79 ± 0,83 ^c
4	0,4	0,6	0,160 ± 0,016 ^a	15,77 ± 0,81 ^c

Média ± desvio padrão (3 repetições). Nota: letras diferentes, na mesma coluna, representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do Teste de Tukey.

Baseado no resultado da análise de variância para o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, o modelo linear foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$ e $R^2 = 0,9306$). A superfície de resposta para a Eq. (5.3) pode ser observada na Figura 5.3.

$$K_{\text{vap}} = +11,63 - 2,04 \cdot C_{\text{DMU}} + 4,15 \cdot C_{\text{glicerol}} + 2,03 \cdot C_{\text{DMU}} \cdot C_{\text{glicerol}} \quad (5.3)$$

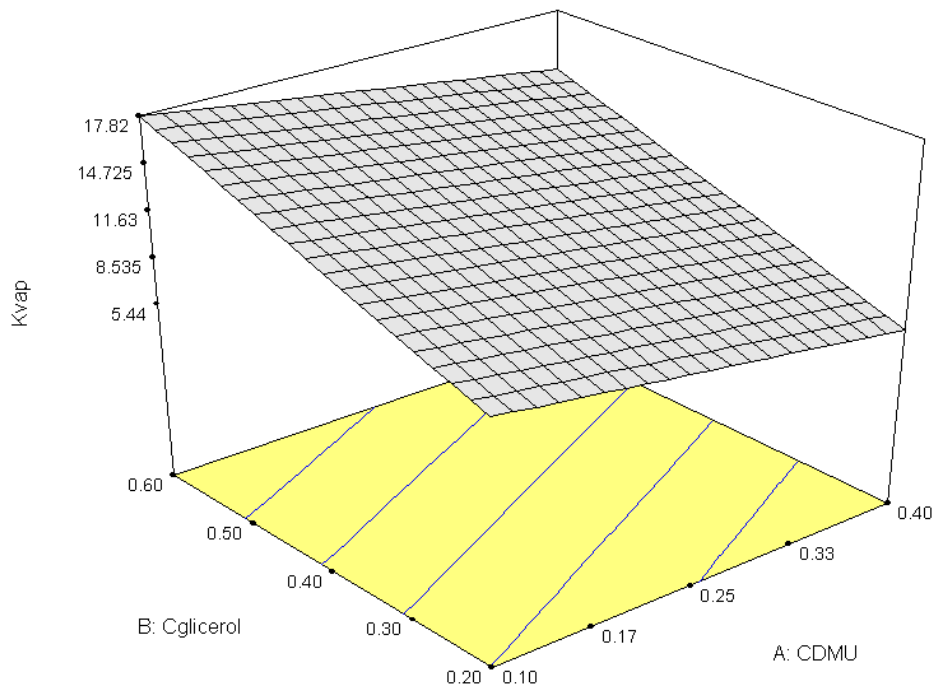


Figura 5.3. Superfície de resposta para o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (K_{vap}): efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

A performance do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água foi similar a observada na solubilidade em água dos filmes, só que neste caso houve interferência da interação entre os fatores C_{DMU} e C_{glicerol} sobre o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água dos filmes. O fator que mais intensificou este coeficiente foi a concentração de glicerol na solução filmogênica. O aumento da concentração de DMU causou um importante decréscimo no coeficiente de permeabilidade ao vapor de água dos filmes, e a interação entre C_{DMU} e C_{glicerol} também contribuiu para o aumento do coeficiente de permeabilidade.

O aumento da concentração de glicerol na solução filmogênica, afetou de forma significativa aumentando a K_{vap} , isso ocorre porque o glicerol é formado por moléculas

pequenas que se acoplam entre as cadeias dos polímeros e por possuírem caráter hidrofílico permitem uma maior permeação ao vapor de água.

Os resultados obtidos demonstram que os valores do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), quando a concentração de agente reticulante foi aumentada de 0,1 para 0,4 (g DMU/ g sericina), em concentração de glicerol de 0,2 (g glicerol/ g sericina), correspondentes as formulações 1 e 2. O mesmo não ocorreu para concentrações de glicerol na ordem de 0,6 (g glicerol/ g sericina), correspondentes as formulações 3 e 4, onde não houve influência da concentração de DMU nos valores do K_{vap} .

Estes resultados demonstram a alta capacidade de reticulação e diminuição da hidrofiliabilidade do agente reticulante, quando em concentrações maiores em relação ao plastificante. Neste caso, houve uma redução no K_{vap} de aproximadamente 71% quando utilizado concentrações de reticulante superior a do plastificante. Turbiani (2011) investigando a influência do grau de reticulação em filmes de sericina observou uma redução de 86% no K_{vap} , quando a relação DMU/glicerol foi de 0,8/0,6 (g/ g sericina) e de 60 % na relação DMU/glicerol de 0,4/0,2 (g/ g sericina).

5.3. Propriedades mecânicas

Os resultados da espessura e dos ensaios mecânicos em termos de tensão na ruptura (T), alongamento na ruptura (ϵ) e módulo de Young (Y) dos filmes de sericina para as quatro formulações estudadas, estão representados na Tabela 5.3.

O aumento no teor de plastificante promoveu uma diminuição da tensão na ruptura em aproximadamente 79% entre as formulações 1 e 3, e 81% nas formulações 2 e 4. Esta diminuição da tensão na ruptura pode ser explicada pelo fato do glicerol apresentar caráter hidrofílico, e de ser facilmente acoplado entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade de reduzir a formação de ligações de hidrogênio entre elas, diminuindo as forças de atração intermoleculares, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero Bodmeier e Paeratakul, (1997 apud TURBIANI, 2011).

Efeito contrário é observado quanto a concentração de agente reticulante, que tende a aumentar a tensão na ruptura, com o aumento de sua concentração, devido ao seu efeito de promover ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas e conseqüentemente alterar as propriedades mecânicas do composto.

Tabela 5.3. Espessura e propriedades mecânicas para diferentes formulações de filmes de sericina.

Formulação	Espessura (mm)	T (MPa)	ϵ (%)	Y (MPa)
1	0,120 ± 0,009 ^a	16,63 ± 4,22 ^b	5,36 ± 2,02 ^a	427,5 ± 106,4 ^b
2	0,114 ± 0,015 ^a	20,24 ± 2,28 ^b	3,58 ± 0,88 ^a	492,6 ± 52,4 ^b
3	0,158 ± 0,016 ^b	3,45 ± 0,14 ^a	38,60 ± 4,47 ^c	54,2 ± 2,52 ^a
4	0,155 ± 0,025 ^b	3,87 ± 0,09 ^a	27,98 ± 5,28 ^b	62,0 ± 3,07 ^a

Média ± desvio padrão (8 repetições). Nota: letras diferentes, na mesma coluna, representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do Teste de Tukey.

A seguir estão apresentados os resultados da análise de variância para a espessura ($R^2 = 0,9986$), tensão na ruptura ($R^2 = 0,9887$), alongamento na ruptura ($R^2 = 0,9780$) e módulo de elasticidade ($R^2 = 0,9950$) para os filmes de sericina reticulados com dimetiloluréia. Estas análises também foram obtidas a 95% de confiança e as superfícies de resposta para as Eqs. abaixo apresentadas (5.4, 5.5, 5.6 e 5.7) podem ser observadas nas Figuras 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente.

$$\text{Espessura} = +0,14 + 0,020 \cdot C_{\text{glicerol}} \quad (5.4)$$

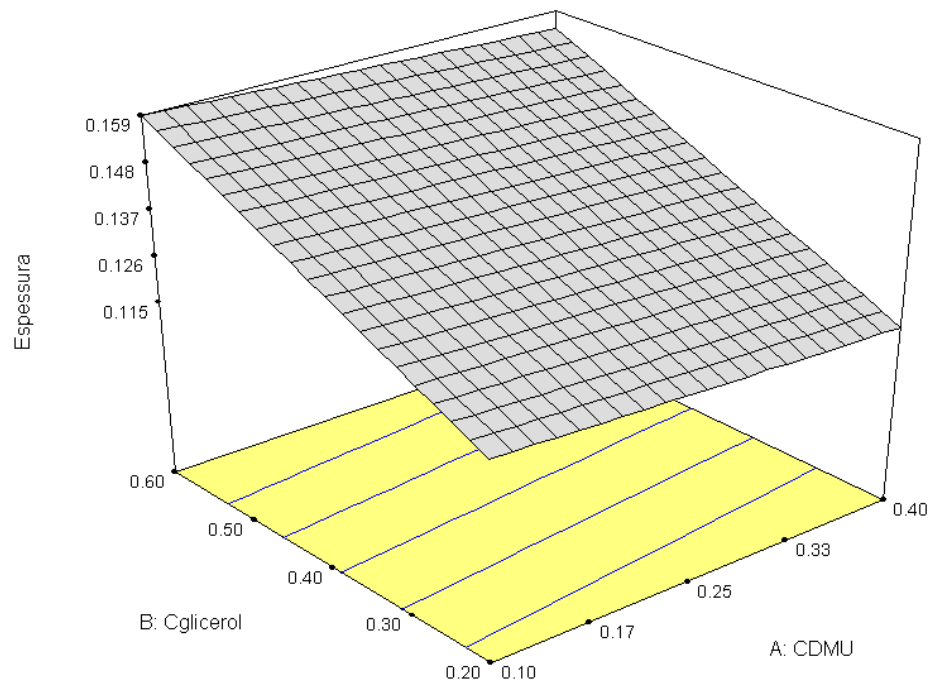


Figura 5.4. Superfície de resposta para a espessura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

$$\text{Tensão na ruptura} = +11,05 + 1,01 \cdot C_{DMU} - 7,39 \cdot C_{glicerol} \quad (5.5)$$

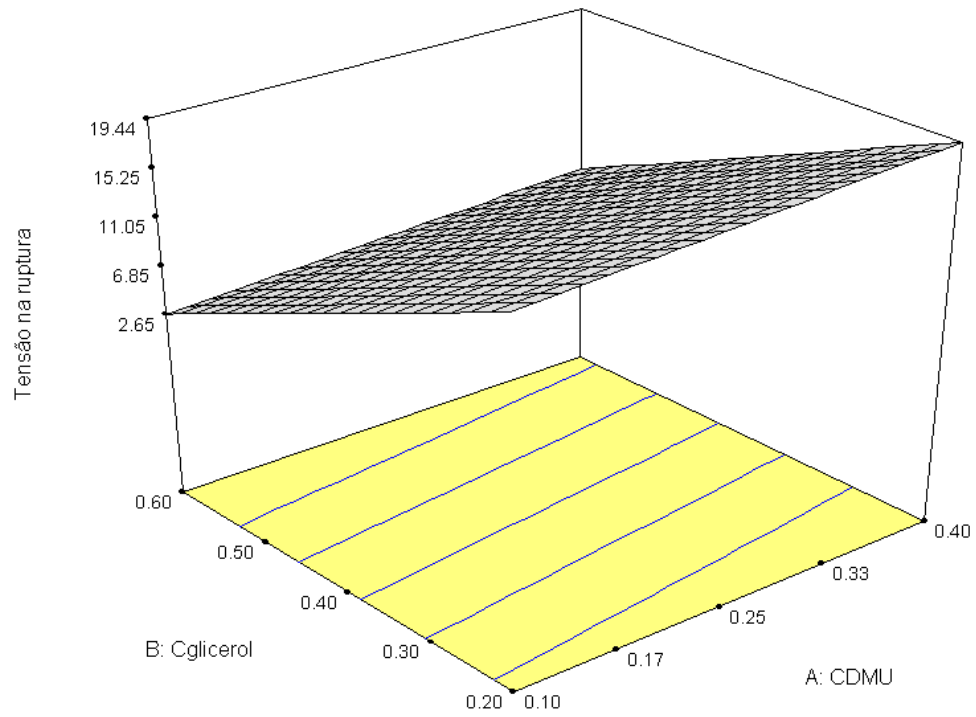


Figura 5.5. Superfície de resposta para a tensão na ruptura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

$$\text{Alongamento na ruptura} = +18,88 - 3,10 \cdot C_{DMU} + 14,41 \cdot C_{glicerol} \quad (5.6)$$

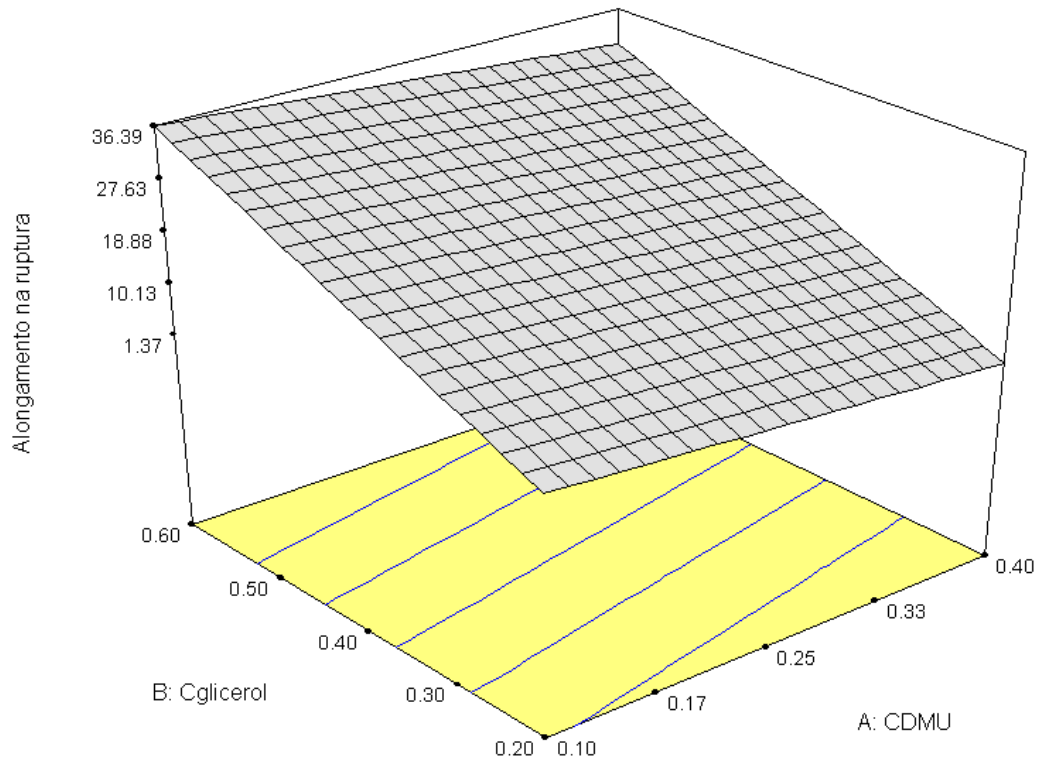


Figura 5.6. Superfície de resposta para o alongamento na ruptura dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

$$\text{Elasticidade} = +259,07 + 18,23 \cdot C_{DMU} - 200,97 \cdot C_{glicerol} - 14,33 \cdot C_{DMU} \cdot C_{glicerol} \quad (5.7)$$

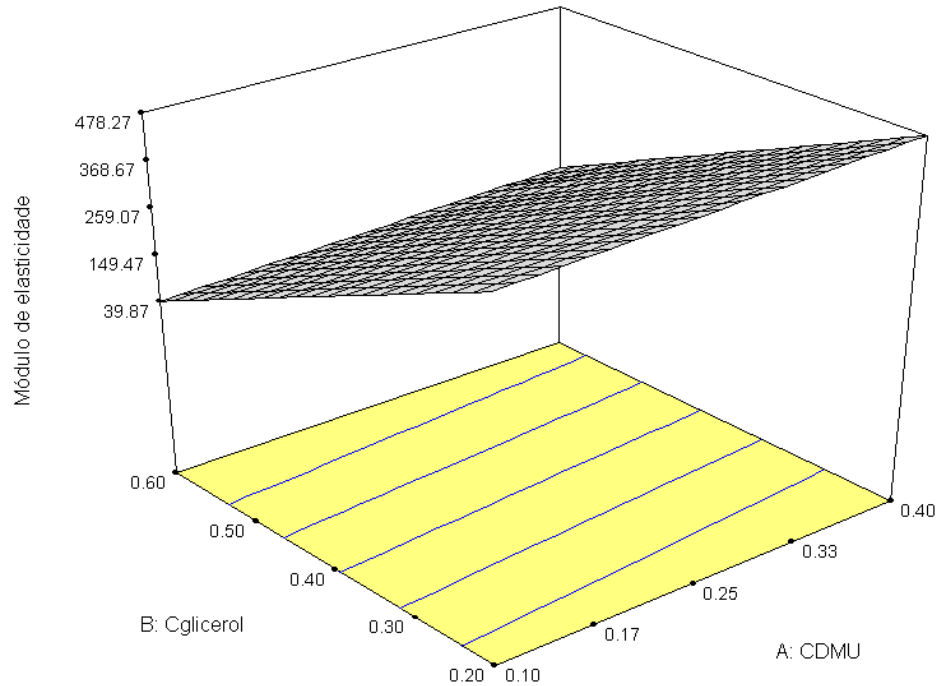


Figura 5.7. Superfície de resposta para o módulo de elasticidade dos filmes: efeito da concentração de glicerol e da concentração de DMU.

O alongamento dos filmes foi influenciado significativamente com o aumento do teor de plastificante, onde o maior alongamento foi observado na formulação 3 (38,60%), com menor teor de agente reticulante, e o menor alongamento na formulação 2 (3,58%) com menor teor de plastificantes e maior teor de reticulante. A incorporação de plastificantes reduz as forças intermoleculares do polímero, aumentando a mobilidade das cadeias dos polímeros, permitindo que os filmes melhorem suas características mecânicas, tornando-os menos quebradiços, mais flexíveis e aumentando sua manuseabilidade.

Vanin et al., (2005) estudando o efeito de plastificantes sobre filmes com base em gelatina, observaram que a presença de agente plastificante influenciou nas propriedades mecânicas, aumentando a porcentagem de alongação dos filmes.

Arvanitoyannis et al., (1997) avaliaram as propriedades térmicas e mecânicas de filmes comestíveis baseados em blendas de gelatina com amido solúvel, plastificadas com glicerol, observaram que a presença deste causou uma diminuição na tensão na ruptura, e aumentou a alongação dos filmes.

O módulo de Young não foi influenciado significativamente com o aumento do teor de agente reticulante, para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Entretanto, os diferentes teores de plastificante promoveram uma diminuição significativa nos resultados obtidos para o módulo de Young, reduzindo seu valor em aproximadamente 87%, para as formulações (1;3) e (2;4), onde se mantiveram constante a concentração de agente reticulante.

6. CONCLUSÃO

A sericina é uma matéria-prima natural, abundante e útil em diversas aplicações, sendo a adição de plastificante e/ou reticulação de suas cadeias poliméricas uma maneira de alterar algumas de suas propriedades. Neste estudo, foram analisados os efeitos da adição de dimetiloluréia e glicerol na confecção dos filmes de sericina.

A adição de glicerol promoveu um aumento significativo no teor de umidade em filmes de sericina com mesmo grau de reticulação, ao mesmo tempo, uma diminuição na resistência à tração e no módulo de elasticidade foi observada. Esse comportamento sugere que moléculas de glicerol enfraquecem as forças intermoleculares entre as cadeias, aumentando o volume livre do sistema, facilitando, em consequência, a absorção de água.

A incorporação de plastificantes reduziu as forças intermoleculares do polímero, aumentando a mobilidade das cadeias dos polímeros, permitindo aos filmes de sericina um maior alongamento, sendo observado um efeito contrário, quanto à incorporação de DMU, que diminuiu a capacidade de alongamento dos filmes, ao mesmo tempo, promoveu um aumento na resistência a tração e no módulo de elasticidade, resultante de ligações cruzadas dentro e entre as cadeias de sericina.

As modificações químicas mediante adição de dimetiloluréia foram eficientes na diminuição do coeficiente de permeabilidade a vapor de água, efeito provocado através da introdução de ligações covalentes estáveis entre os grupos reativos presentes nas cadeias de sericina.

REFERÊNCIAS

ARAMWIT, P.; SANGCAKUL, A. The effects of sericin cream on wound healing in rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.71, n. 10, p. 2473-2477, 2007.

ARAMWIT, P.; KANOKPANONT, S.; NAKPHENG, T.; SRICHANA, T. The Effect of Sericin from Various Extraction Methods on Cell Viability and Collagen Production. **International Journal of Molecular Science**, p. 2200-2211, 2010.

ARVANITTOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n.4, p. 593-604, 1997.

AYGUN, S.S. **Recovery of sericin protein from silk processing wastewaters by membrane technology**. 2008. 202 p. Master of Science's Thesis, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2008.

BNDS - Banco Nacional do Desenvolvimento. **Seda um Tecido Nobre**. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhececi/setorial/is11seda.pdf> Acesso em: 22 de Maio de 2011.

CAPAR, G.; AYGUN, S. S.; GECIT, M. R. Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters. **Journal of Membrane Science**, v. 342, p. 179-189, 2009.

CAPAR, G.; AYGUN, S. S.; GECIT, M. R. Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery. **Journal of Membrane Science**, v. 325, p. 920-931, 2008.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, n.11, p.2563-2583, 1995.

FREDERICO, G. **An Economic History of the Silk Industry - 1830-1930**, United Kingdom, Cambridge University Press, p. 1-7, 1997.

HOLANDA, P. R. H.; MATA S. F.; LIMA, A. G. B. Propriedades físicas e secagem de casulos do bicho-da-seda em leito fixo: uma investigação teórica e experimental. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n. 2, p.101-114, 2004.

KI, C. S.; PARK, Y. H. Silk Protein as a Fascinating Biomedical Polymer: Structural Fundamentals and Applications. **Macromolecular Research**, v. 17, N°. 12, p. 935-942, 2009.

KODAMA, K. The Preparation and physico-chemical properties of sericin. **Biochemical Journal**, v.20, p.1208-1222, 1926.

LAMOOLPHAK, W.; DE-EKNAMKUL, W.; SHOTIPRUK, A. Hydrothermal production and characterization of protein and amino acids from silk waste. **Bioresearch Technology**, v. 99, p.7678–7685, 2008.

MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **B. CEPPA**, v.18, n.1, p. 105-128, 2000.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A., MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Barrier. Mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.129-135, 2004.

MARCELINO, A. G. **Desenvolvimento tecnológico da extração da sericina e preparação de nanopartículas para aplicação em cosméticos**. 2008. 146 p. Dissertação de Mestrado Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MARTINS, A. P. C. **Preparação e Caracterização de Biofilmes com Aplicação em Embalagens de Alimentos**. 2010. 15 p. Relatório. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

MAUERSBERGER, H. R. **Matthews`Textile Fibers Their Physical, Microscopic, and Chemical Properties**. 6° ed. Chapman & Hall, Londres, 1954.

PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P.; DAITHANKAR, A.V.; MAHADIK, K.R. Silk Sericin as a moisturizer: an in vivo study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.4, p. 250-257, 2005.

PORTO, L. C. **Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico) : efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água**. 2007. 95 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2007.

SHAO, Z.; VOLLRATH, F. Surprising strength of silkworm silk. **Nature Publishing Group**, v. 418, p. 741, 2002.

SOBRAL, P. J. A. Influência Da Espessura De Biofilmes Feitos À Base De Proteínas Miofibrilares Sobre Suas Propriedades Funcionais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.35, n.6, p.1251-1259, 2000.

SOTHORNVIT, R.; CHOLLAKUP, R.; P. SUWANRUJI. Extracted sericin from silk waste for film formation. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2010.

TOMADON, J. J. **Obtenção da proteína sericina, com alta massa molecular, a partir de casulos Bombyx mori**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2011.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Sericina E PVA Reticulados com Dimetiloluréia**. Tese de doutorado. 2011. 147 p. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2011.

VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal properties and functional properties gelatin based films. **Food Hydrocolloids**, v.19, p. 899-907, 2005.

ZHANG, Y. Q. Application of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 91-100, 2002.

ZHANG, Y. Q.; TAO, M. L.; SHEN, W. D.; ZHOU, Y. Z.; DING, Y.; ZHOU, W. L. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, p. 3751-3759, 2004.