

SEPARAÇÃO DE SERICINA UTILIZANDO ALCOÓIS E CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO

A.P.SONE¹ e M. L. GIMENES¹

¹ Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: anapaulasone@hotmail.com

RESUMO – A sericina é uma proteína presente em torno de 20 a 30% de massa nos casulos do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. É uma proteína que tem propriedades adesivas, hidrofílica, antioxidantes e antibacterianas. A sua extração pode ser feita por meio de água em ebulição e a sua separação pode ser obtida por precipitação. O uso dos solventes como o metanol, etanol e isopropanol e o processo de congelamento e descongelamento são investigados para a separação de sericina extraída. Nesse contexto o presente trabalho objetivou quantificar e avaliar a separação de sericina usando diferentes proporções de alcoóis e a técnica de congelamento e descongelamento e posterior secagem da sericina, de modo a obter sericina em pó. Os resultados mostram que a sericina obtida com extração com alcoóis tem características diferentes daquela obtida pela técnica de separação congelamento/descongelamento. Os melhores resultados de separação de sericina foram para o etanol a elevadas proporções.

1. INTRODUÇÃO

O casulo do *Bombyx mori* constitui-se, principalmente, de três componentes protéicos: a fibroína, a sericina e a P25. A fibroína, contém 70 a 80% da massa seca, vem a ser o principal componente do fio de seda, 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. A P25 é uma glicoproteína com importante papel na manutenção da integridade do fio de seda. No último ainda se encontra gordura e cera, carboidratos, corantes e outros (PADAMWAR et al., 2005).

A sericina contém uma quantidade relativamente grande de aminoácidos hidrofílicos e uma estrutura amorfa. Consequentemente tem pobres propriedades mecânicas e é solúvel em soluções aquosas, sendo que a sua solubilidade aumenta com o aumento da temperatura. A solução aquosa de sericina em alta concentração é bastante viscosa, comportando-se como um adesivo (KI et.al., 2009). Sericina, que até recentemente era considerada como um produto

residual da indústria de processamento da seda apresenta várias propriedades importantes, como a excelente absorção de umidade (GENÇ et al. de 2009), a resistência UV (PATEL E MODASIYA, 2011) anticoagulante, antioxidantes (SAROVART et al., 2003). Dado o elevado valor comercial desse produto, existe uma necessidade de desenvolver métodos de degomagem que não degradam a sericina e que também permitem a recuperação máxima do banho de desengomagem (KI et al. de 2009). Recuperando a sericina de águas residuais reduz o impacto ambiental do processamento de seda e, ao mesmo tempo produz um ingrediente valioso para alimentos (PADAMWAR et al, 2005), a indústria farmacêutica e cosmética.

O tratamento da sericina especialmente na presença de solventes orgânicos ou água afeta as mudanças estruturais da sericina de randômica para β -folhas. A sericina transforma-se em um estado agregado pela água e solvente orgânico. Os agregados contêm fortes ligações de hidrogênio. A forte interação intermolecular pode resultar da abundância de cadeias laterais polares, tais como grupos hidroxila e carboxila, que podem formar ligações de hidrogênio intermoleculares com outras cadeias laterais polares ou grupos amida no peptídeo. Teramoto e Miyazawa (2005) relatam que o uso de etanol para a formação de estrutura folha- β na proteínas da seda é mais efetivo que o uso do metanol. Além disso, o etanol é menos tóxico do que o metanol, o que é uma vantagem para aplicação da sericina como um biomaterial.

Deste modo, o objetivo deste trabalho é quantificar e avaliar a separação de sericina usando diferentes proporções de alcoóis e a técnica de congelamento e descongelamento, de modo a obter a sericina em forma pó.

2. MATERIAIS

Para a obtenção da sericina, foram utilizados casulos do bicho- da-seda, *Bombyx mori*, cedidos pela empresa Fiação de Seda BRATAC S. A. Além da utilização de álcool metílico, álcool etílico e álcool isopropílico.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Extração de sericina

Para extração da sericina, foram cortados e limpos os casulos do bicho seda em vários pedaços e colocou-se aproximadamente 18 g de casulos em erlenmeyer de 1000 mL adicionando 300 mL de água ultra pura, utilizando uma proporção de seis gramas de casulos secos para cada cem mililitros de água (6:100)(m/v).

Para realização da extração em autoclave utilizou-se o equipamento da marca LS – Logen Scientific, Autoclave Vertical, em pressão nanométrica de 1 kgf.cm (correspondente a 120°C), por 60 minutos. Após esfriar a solução a mesma foi filtrada em peneira simples para

separação da solução de sericina da fibroína. Após determinou-se por gravimetria e secagem a concentração (g/L) da solução de sericina.

3.2 Precipitação da sericina

Na separação da sericina dissolvida em água, promoveu-se a precipitação da mesma através de duas metodologias, a) utilizando solventes orgânicos: metanol, etanol, e isopropanol em diferentes proporções e b) através do método congelamento/descongelamento.

Precipitação da sericina por Solventes Orgânicos: Para o estudo do processo de precipitação utilizou-se metanol, etanol e isopropanol como solventes orgânicos nas proporções de álcool: solução de sericina (v/v): 1:1; 2:1 e; 3:1. Esta escolha de diferentes quantidades de álcool objetivou verificar qual a melhor quantidade de álcool provoca uma maior precipitação em massa da proteína sericina. A precipitação foi realizada em tubos de centrifugação de 50 mL, previamente secos e pesados.

Inicialmente foram adicionados nos tubos de centrifugação os alcoóis na sua devida proporção e posteriormente a solução de sericina (10 mL), o tubo de centrifugação não foi agitado em nenhum momento da precipitação. Os tubos contendo a solução de sericina e o álcool foram armazenados em refrigerador por 24 horas com temperatura de 5°C para acelerar o processo de precipitação.

Para separar o precipitado do solvente, após retirar os tubos de centrifugação da geladeira utilizou-se uma centrífuga da marca Jouan GR2022, programada para 15 minutos de centrifugação, rotação de 7000 rpm na temperatura de 20°C. A centrifugação auxiliou-se na separação da massa de sericina e o solvente (álcool contendo água). Após centrifugação obteve-se um sobrenadante (solvente) e um precipitado (sericina). Retirou-se todo o sobrenadante do tubo com auxílio de uma pipeta e deixou-se secar toda a massa de sericina em estufa da marca Orion 515 na temperatura de 60°C por 48 horas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

Precipitação da sericina por congelamento/descongelamento: Este método de precipitação de sericina compreendeu o acondicionamento de uma quantidade pré-determinada (10 mL) de solução de sericina em congelador convencional. Esta solução ficou congelada por 24 horas.

Para determinar a massa de sericina precipitada, após retirar os tubos da geladeira, deixou os mesmos descongelarem naturalmente (temperatura ambiente de 25°C) e quando a solução estava totalmente líquida centrifugou-se a mesma obtendo-se um sobrenadante (água) e um precipitado (sericina). Retirou-se todo o sobrenadante do tubo com auxílio de uma pipeta e deixou-se secar toda a massa de sericina em estufa da marca Orion 515 a 60°C por 72 horas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas

Determinação do melhor método de precipitação da sericina: Após a evaporação de todo o solvente pesou-se os tubos de centrifugação, obtendo assim, a massa de sericina precipitada por meio de cada método de precipitação utilizando a equação 1.

$$MS = m_f - m_i \quad (1)$$

Onde a m_f é a massa final da amostra em [g], m_i é a massa inicial da amostra em [g]. Determinando assim qual o melhor método de precipitação.

3.3 Obtenção da sericina em pó

Muitas vezes é de interesse obter materiais que se encontrem no estado sólido e sem nenhum tipo de solvente, por isso verificou-se a possibilidade de obter sericina em pó através de 2 metodologias: secagem "Spray Drier" e Liofilização.

Secagem por spray drier: A secagem foi realizada utilizando-se 300 mL da solução de sericina obtida: a) na precipitação por congelamento/descongelamento; b) precipitação com metanol 3:1 sericina; c) precipitação etanol 3:1 sericina; e d) precipitação com isopropanol 3:1 sericina. Foram utilizadas somente as maiores proporções de alcoóis, pois foram aquelas que apresentaram maior massa de sericina precipitada. A secagem foi realizada em um mini Spray Dryer BÜCHI, B-191, com a temperatura de 171°C, na câmara de secagem

Secagem por Liofilização: A secagem das amostras foram realizadas com o liofilizador de bancada CHRIST, Alpha 1-4 LD, equipado com bomba a vácuo PFEIFFER, D-35614, com temperatura de -55°C e vácuo de 119 bar. As amostras de sericina submetidas a este processo de secagem foram obtidas após precipitação de 30 mL de sericina através dos métodos: a) congelamento/descongelamento; b) com metanol na proporção 3:1 sericina; c) com etanol na proporção 3:1 sericina; e d) com isopropanol na proporção 3:1 sericina. Foram utilizadas as maiores proporções de alcoóis, pois foram aquelas que apresentaram maior massa de sericina precipitada.

4.RESULTADOS

Na extração da sericina, determinou-se que 23,94% de sericina foram extraídos em relação à massa do casulo, mostrando que este resultado está dentro dos descritos em outras metodologias. A concentração da solução de sericina foi determinada antes da realização da precipitação que foi de 15,85 g.L⁻¹. Mostrando uma grande quantidade de sericina na solução, e que essa sericina pode ser precipitada obtendo um valor significativo de massa de sólidos.

4.1 Precipitação da sericina

Precipitação da sericina por Solventes Orgânicos: A sequência de utilização dos alcoóis foi conforme o aumento de cadeia carbônica, assim o metanol apresenta menor cadeia carbônica, seguido do etanol e por ultimo o isopropanol. A tabela 1 mostra que conforme aumenta a proporção de álcool, aumenta a massa de sericina precipitada.

Tabela 1: Massa de sericina obtida na precipitação com diferentes alcoóis

Proporção de sericina: álcool	Massa de Sericina obtida na precipitação com metanol (g)	Massa de Sericina obtida na precipitação com etanol (g)	Massa de Sericina obtida na precipitação com isopropanol (g)
1:1	0,128	0,1384	0,1377
1:2	0,1318	0,1430	0,1455
1:3	0,1353	0,1520	0,1498

Conforme a Tabela 1, na precipitação com solventes orgânicos utilizando alcoóis (metanol, etanol e isopropanol) o que apresentou a maior massa de sericina foi o álcool etanol. Isso ocorre, pois aumentando a cadeia carbônica ocorre maior interação com a proteína. Entretanto, o álcool que apresenta a maior cadeia carbônica é o isopropanol, o qual possui maior impedimento estérico, dificultando assim a interação com a proteína. Contudo o etanol não apresenta esse impedimento e por apresentar maior cadeia carbônica que o metanol promove uma maior interação com a proteína sericina.

Em relação à proporção, conforme aumentamos a proporção de álcool maior a massa de sericina precipitada, isso se deve a maior interação intermolecular entre a proteína e o solvente. É evidente na tabela acima, que a precipitação com todos os alcoóis na proporção 3:1 sericina foi o que se obteve maior massa, seguido pela proporção álcool 2:1 sericina. A proporção álcool 1:1 sericina foi a que obteve-se a menor massa.

Precipitação da sericina por Congelamento/descongeloamento: A precipitação da sericina utilizando o método de congelamento/descongeloamento foi feita a partir de uma solução de sericina, congelada num freezer a -10°C por 24 horas e descongelada naturalmente a temperatura ambiente (25°C). Partindo-se de um mesmo volume de solução de sericina na mesma concentração (mesma solução mãe), obteve-se um valor médio de 0,1309 g de sericina seca, quando esta foi separada pelo método de congelamento/descongeloamento.

Observa-se que o método de congelamento/descongeloamento apresentou massa de sericina inferior a aquelas obtidas com precipitação com solventes orgânicos, em todas as proporções. Entretanto é interessante mencionar que nesse método (congelamento/descongeloamento) não se utiliza solvente algum, o que torna este método mais desejável economicamente, sem o efeito do solvente orgânico na estrutura da proteína.

Da Figura 1, obtém-se uma comparação entre todos os métodos de precipitação utilizados para precipitar sericina.

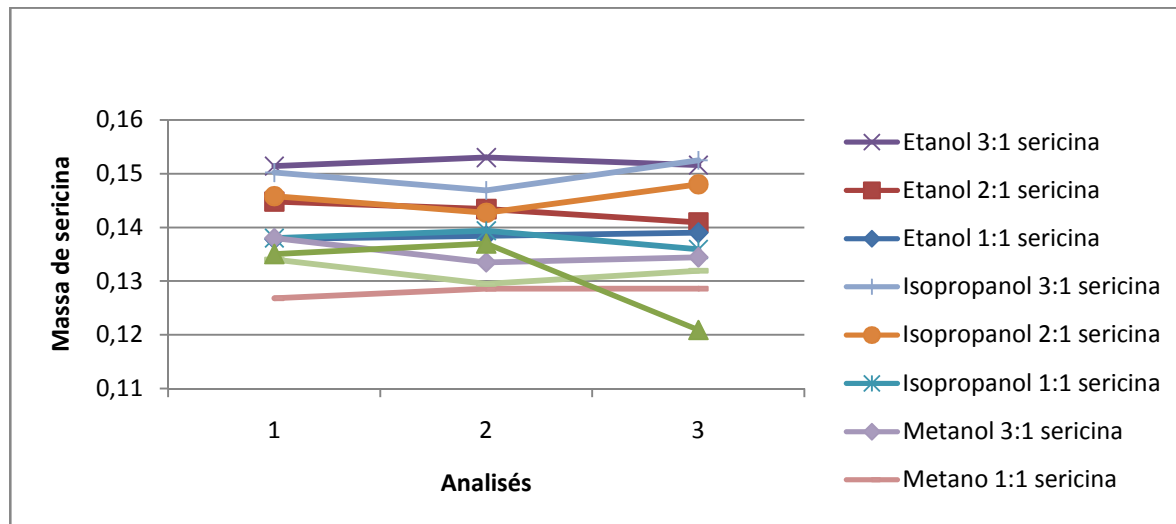


Figura 1: Variação das 3 replicas de cada amostras utilizando todos os métodos de precipitação em todas as proporções.

É interessante ressaltar a interação que o solvente pode ter com a proteína. Segundo Teramoto e Miyazawa (2005) o uso de alcoóis altera a estrutura da sericina. Essa mudança de estrutura não será observada quando se utiliza o método de congelamento/descongelamento. Assim conclui-se que a precipitação com solventes orgânicos, obtém-se maior quantidade de massa seca, contudo estruturas alteradas. Quando se utiliza somente água estas estruturas não serão alteradas mais a massa seca obtida é menor em quantidade.

4.2 Obtenção de sericina em pó

Para obtenção de sericina em pó, foram utilizados amostras de sericina precipitada com os solventes orgânicos (metanol, etanol, isopropanol) nas proporções 3:1 (álcool/sericina), e também amostras de solução de sericina obtida com o método de precipitação por congelamento/descongelamento.

Secagem por spray drier:

Amostras de sericina em pó obtida pelo método de secagem em spray drier através do a) processo de precipitação por congelamento/descongelamento; b) processo de precipitação com metanol na proporção metanol 3:1 sericina; c) processo de precipitação com etanol na proporção 3:1 sericina; e d) processo de precipitação com isopropanol na proporção 3:1 sericina, estão apresentadas na Figura 2,



Figura 3: Sericina em pó obtida pela secagem em spray drier.

Observa-se visualmente que a sericina em pó obtida pelo método de precipitação em alcoóis apresenta coloração mais clara, diferente da obtida pelo método de congelamento/descongelamento. Isso devido as mudanças estruturais que o álcool causa na proteína.

Secagem por Liofilização: As amostras de sericina em pó obtidas por este método de secagem pode ser observadas na Figura 3.

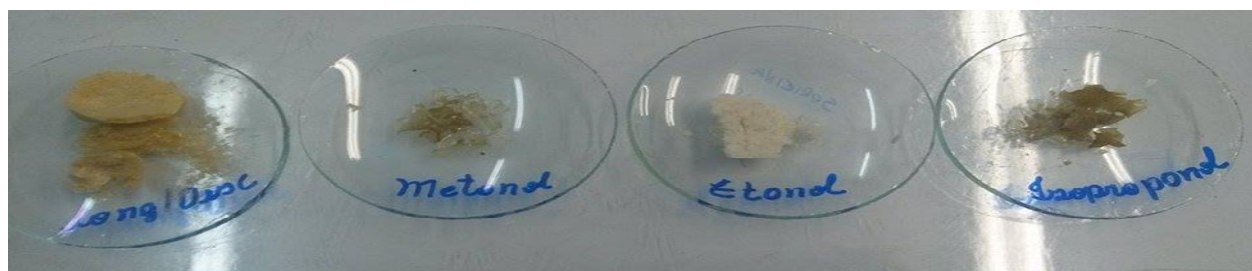


Figura 3: Sericina em pó obtida pela secagem em liofilizador.

As amostras obtidas por liofilização não apresentam todas a mesma coloração, demonstrando um material de aparência irregular, principalmente para as amostras em que foram usadas metanol e isopropanol na precipitação. De uma maneira geral, o aspecto visual das sericinas em pó obtidas na secagem spray drier é muito melhor que aquelas obtidas por liofilização.

O método de precipitação com solvente altera a estrutura da sericina, pois a coloração da sericina é visualmente diferente. Posteriormente, em trabalho futuro, serão investigadas as mudanças estruturais causada por cada método de precipitação e também pela secagem.

5. CONCLUSÃO

Dentre os métodos de separação da sericina por precipitação com alcoóis, verificou-se que o solvente orgânico etanol é o mais eficiente entres os alcoóis analisados (metanol, etanol e isopropanol), e que a proporção 3:1 de etanol/sericina foi qual obteve uma maior massa seca de sericina. Alternativamente, pode-se obter sericina separada por processo físico sem uso de solvente – processo de congelamento/descongelamento. Esse processo em

comparação com os processos que utiliza álcool como solvente, apresenta um menor rendimento de sericina, mas a vantagem da inexistência do solvente que tem ação em modificar a estrutura da proteína.

O método de secagem para obter sericina em pó influencia as características do material, afetando o aspecto visual e a coloração. A secagem spray é a que apresenta melhor características para obter sericina em pó.

6. REFERENCIAS

GENÇ, G., BAYRAKTAR, O., BASAL, G., 2009. A research on the production of silk sericin powders by using spray drying method. *Tekstilve Konfeksiyon* 19 (4), 273e 279.

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.

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.

PATEL, R.J., MODASIYA, M.K., 2011. Sericin-pharmaceutical applications. *Int. J. Res. Pharm. Biomed.Sci.* 2, 913e917.

SAROVART, S., SUDATIS, B., MEESILPA, P., GRADY, B.P., MAGARAPHAN, R., 2003. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 5, 193e198.

TERAMOTO, J., MIYAZAWA, M. Molecular orientation behaviour of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 2049-2057, 2005

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