

Optimización del proceso de extracción de fibroína a partir del capullo de gusano de seda *Bombyx Mori*

Carlos Augusto Murillo-Usuga^a; Diana Marcela Escobar-Sierra^b

Grupo de Investigación en Biomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia; UdeA.
Calle 70 n.º 52-21, Medellín, Colombia.

^acarlos.murillo@udea.edu.co

^bmarcela.escobar@udea.edu.co

Fecha recepción: abril 12 de 2021

Fecha aceptación: septiembre 14 de 2021

Resumen

En el presente trabajo se realizó un estudio estadístico para optimizar el rendimiento del proceso de extracción de fibroína del capullo del gusano de seda *Bombyx Mori*, también conocido como desgomado, en el cual la fibroína y la sericina, componentes que conforman la estructura del capullo, son separadas utilizando soluciones acuosas de carbonato de sodio (Na_2CO_3); el estudio en cuestión se hizo mediante un diseño experimental 2^3 con dos puntos centrales, para ello, los factores seleccionados fueron la temperatura, la relación Na_2CO_3 /Capullos y el tiempo de extracción. La significativa estadística de estos factores fue estudiada mediante análisis de varianza (ANOVA). De acuerdo con los resultados, el proceso de extracción depende principalmente del tiempo de extracción ($p = 0,009$) y la temperatura de trabajo ($p = 0,0112$), obteniéndose bajo las condiciones óptimas de extracción un promedio de 74,76% de fibroína del capullo. Finalmente, la muestra obtenida bajo las mejores condiciones se caracterizó por medio de análisis Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y por análisis termogravimétrico (TGA) con el fin de tener la base del material obtenido para posibles aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: Fibroína; Desgomado; Optimización.

Optimization of the fibroin extraction process from the Bombyx Mori silkworm cocoon

Abstract

In the present work, a statistical study was carried out to optimize the performance of the fibroin extraction process from the cocoon of the silkworm Bombyx Mori, also known as degumming, in which fibroin and sericin, components that make up the cocoon structure, are separated using aqueous solutions of sodium carbonate (Na_2CO_3); the study was done through an experimental design 2^3 with two central points. For this purpose, the selected parameters were temperature, the Na_2CO_3 /Cocoons ratio and extraction time. The statistical significance of these factors was studied by analysis of variance (ANOVA). According to the results, the extraction process depends mainly on the extraction time ($p = 0.009$) and the working temperature ($p = 0.0112$), obtaining an average of 74.76% fibroin from the cocoon under optimal extraction conditions. Finally, the sample obtained under the best conditions was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and by Thermo Gravimetric Analysis (TGA) in order to have the basis of the material obtained for possible biomedical applications.

Keywords: *Fibroin; Degumming; Optimization.*

Otimização do processo de extração de fibroína do casulo do bicho-da-seda Bombyx Mori

Resumo

No presente trabalho, foi realizado um estudo estatístico para otimizar o desempenho do processo de extração da fibroína do casulo do bicho-da-seda Bombyx Mori, também conhecido como degomagem, em que a fibroína e a sericina, componentes que compõem a estrutura do casulo, são separadas, utilizando soluções aquosas de carbonato de sódio (Na_2CO_3); o estudo em questão foi feito através de um delineamento experimental 2^3 com dois pontos centrais, para isso, os fatores selecionados foram a temperatura, a relação Na_2CO_3 /Cocoons e o tempo de extração. A significância estatística destes. Fatores foi estudado por análise de variância (ANOVA). De acordo com os resultados, o processo de extração depende principalmente do tempo de extração ($p = 0,009$) e da temperatura de trabalho ($p = 0,0112$), obtendo-se uma média de 74,76% de fibroína do casulo em condições ideais de extração. Finalmente, a amostra obtida nas melhores condições foi caracterizada por meio de análise por Transformada de Fourier no infravermelho (FTIR) e por análise termogravimétrica (TGA) a fim de se ter como base o material obtido para possíveis aplicações biomédicas.

Palavras-chave: *Fibroína; Degomado; Otimização.*

Introducción

La fibroína es una proteína secretada por varias especies de gusanos de seda de la familia *Bombyx Mori* para fabricar sus capullos, en este proceso, el gusano de seda produce dicha proteína desde su glándula posterior, luego, para mantener el capullo unido, el gusano de seda produce sericina desde su glándulas media y anterior [1]. En el capullo, la fibroína es el principal constituyente, y equivale a un porcentaje entre 70-80% de la masa del mismo, el resto de la masa del capullo corresponde a la sericina, la cual funciona como adhesivo en el capullo y mantiene unida toda su estructura [1,2].

La fibroína está compuesta principalmente por la secuencia de aminoácidos glicina-alanina-glicina-alanina-glicina-serina (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser), siendo dichos aminoácidos aproximadamente el 85% del total de esta proteína [1]. Como material, la fibroína tiene diversas aplicaciones, las cuales pueden abarcar desde la industria textil [3], hasta las aplicaciones biomédicas [4-6], en las cuales se aprovechan las propiedades mecánicas y de biocompatibilidad para la construcción de plataformas de crecimiento celular [7-9], en la Ingeniería de Tejidos (IT) [10-12], como liberadores de medicamentos [13,14] y como materiales aptos para el contacto con sangre [15,16].

El proceso de extracción de fibroína, conocido como desgomado, utiliza soluciones básicas de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a altas temperaturas para separar la fibroína de la sericina en los capullos, sin embargo, es común encontrar estudios en los que se reportan diversos parámetros de extracción, y variables como: el tiempo, la concentración de Na_2CO_3 y las temperaturas de trabajo; los cuales no están acompañados de una caracterización exacta del rendimiento del proceso de extracción [17-20]. De este modo, teniendo en cuenta que recientemente se ha encontrado que los parámetros utilizados en el proceso de extracción de la fibroína afectan las propiedades fisicoquímicas de ésta [21], resulta importante entender dicho proceso, y la combinación óptima de factores que lleve al producto que se desea, para ello, Kumar *et al.* [22], han estudiado mediante un diseño experimental de superficie de respuesta como optimizar todo el proceso desde la extracción hasta la solubilización de la fibroína en soluciones iónicas de bromuro de litio (LiBr), sin embargo, en algunas aplicaciones, solubilizar la fibroína no será siempre de interés, y

aquellos estudios que se enfocan en el proceso de extracción, se concentran en las consecuencias de este sobre la sericina y su degradación a altas temperaturas [23], por lo tanto, considerando que existen aplicaciones en las que se utiliza la fibroína en forma de seda para la fabricación de dispositivos como conductos vasculares [3,16], o en forma de solución para la fabricación de películas en usos biomédicos [24,25], optimizar el proceso de extracción dependerá de la aplicación final que se le quiera dar a esta proteína, por tal motivo, si se desea utilizar la fibroína en forma de solución, algunas aplicaciones no se limitarán por el estado de la fibroína luego del proceso de extracción, ya que esta proteína puede ser aprovechada a través de sus grupos amino terminales con el fin de inmovilizar sobre ésta algunas sustancias bioactivas como: ácido fólico para fabricar nanopartículas, transportadores de medicamentos [26,27], o heparina en la fabricación de dispositivos para contacto con la sangre [28].

El propósito del presente estudio fue investigar como: la temperatura, la relación Na_2CO_3 /Capullos y el tiempo de extracción afectan el rendimiento del proceso de extracción de fibroína del capullo de gusano de seda *Bombyx Mori*, para ello, se cuantificó la cantidad de fibroína extraída del capullo a diferentes condiciones y se escogió la combinación de factores que arrojó el mayor rendimiento para caracterizarlas por medio de Análisis Termo Gravimétrico y espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier con el fin de determinar la temperatura de degradación y la estructura predominante del producto resultante a estas condiciones, con esto, el material obtenido servirá como base para la formulación de materiales en aplicaciones biomédicas que requieran de la inmovilización de moléculas bioactivas sobre la estructura de esta proteína [28,29].

Materiales y métodos

Extracción de fibroína

Para el proceso de extracción de fibroína desde los capullos del gusano de seda, se adquirieron capullos en la Corporación para el Desarrollo la Sericultura del Cauca (CORSEDA), y con ellos, se realizó la extracción de fibroína según el esquema mostrado en la **Figura 1**. Para lo cual, los capullos del gusano fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 5 mm², y tratados con una solución 0,01M de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , Carlo Erba, Anhidro), con el fin de

que se mantuviera la relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$ (g:g) entre 0,2 y 0,4, y la temperatura de extracción entre 60 y 80 °C, este proceso se realizó en lapsos de tiempo entre 3 y 6 horas, una vez terminado, la fibroína fue removida de la solución resultante de

sericina, lavada con abundante agua destilada y puesta a secar en estufa a 30 °C durante 24 horas, finalmente se pesó la masa de fibroína obtenida y se reportó como porcentaje en masa respecto a la masa inicial del capullo.

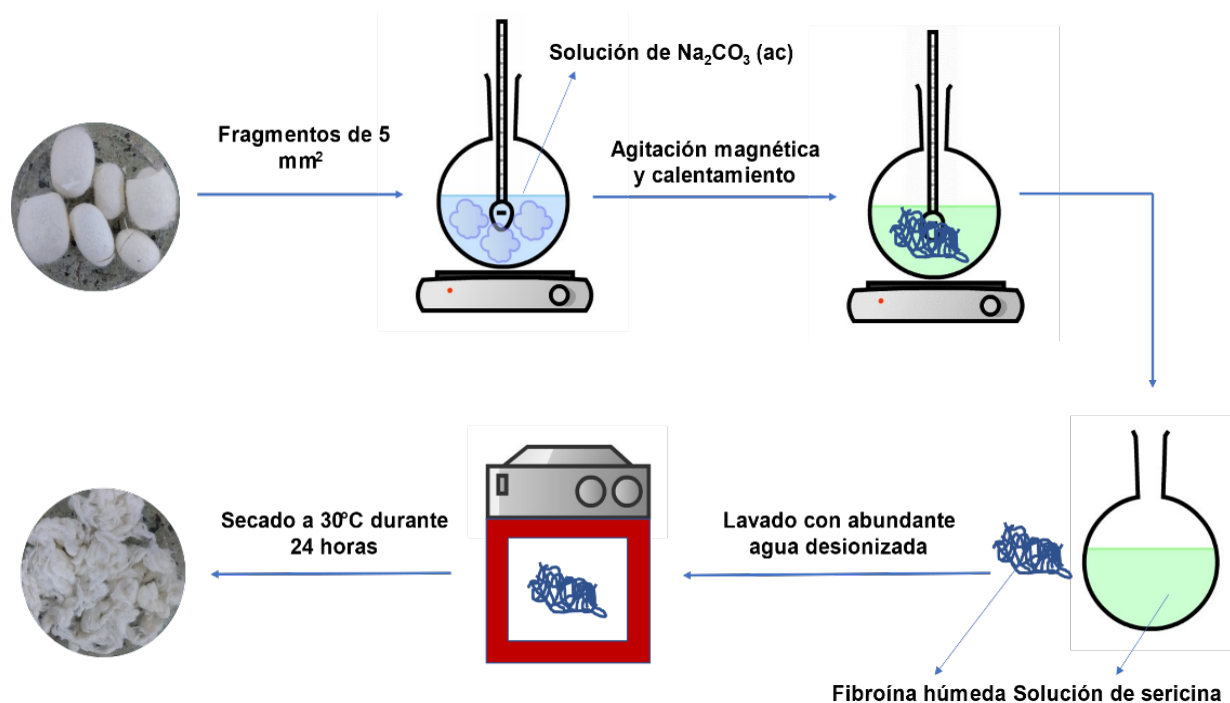


Figura 1. Esquema del proceso de obtención de fibroína a partir del capullo del gusano de seda Bombyx Mori.

Diseño experimental

El estudio del proceso de extracción consistió en el diseño 2^3 con 2 puntos centrales mostrado en la **Tabla 1**, con el cual se buscó estudiar la curvatura sobre la variable de respuesta entre los puntos extremos de cada uno de los factores del diseño. Todos los cálculos estadísticos y el esquema del diseño experimental fueron realizados en el software *Statgraphics Centurion 17* ®. Cada

combinación de factores y niveles fue realizada 3 veces, como resultado completo tuvo un total de 30 corridos, finalmente, el diseño experimental fue aleatorizado para evitar sesgo estadístico [30]. La significancia de los factores fue estudiada mediante análisis de varianza (ANOVA), de este modo, los parámetros con un valor p menor a 0,05 tuvieron significancia estadística con un 95% de confianza [31].

Tabla 1. Factores y niveles trabajados en el diseño experimental.

Factores	Niveles		
	-1	1	0
Temperatura (°C)	60	80	70
$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$ (g/g)	0,2	0,3	0,4
Tiempo de separación (h)	3	6	4,5

Análisis estructural por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis estructural, presencia de grupos funcionales y configuración de la fibroína extraída se realizó mediante espectroscopia infrarroja utilizando un equipo SHIMATZU IR-TRACER 100, para este propósito, se barrió el rango espectral entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} durante 24 ciclos.

Análisis termo gravimétrico

La pérdida de masa de la fibroína extraída en función de la temperatura fue medida en un equipo TGA Q500 de TA Instruments, utilizando atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El barrido se realizó entre 25 y 900 $^{\circ}\text{C}$.

Resultados y discusión

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este diseño experimental no se ajustan a una distribución normal, lo que impide realizar algunos análisis estadísticos que requieren dicha condición, por lo tanto, para realizar de forma correcta los análisis posteriores, los datos del porcentaje de fibroína extraída de los capullos del gusano de seda fueron transformados a una distribución normal [30], verificados por la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,15811$), de este modo, los valores correspondientes al porcentaje de fibroína extraída y su transformación se encuentran en las 2 últimas columnas de la **Tabla 2**.

Tabla 2. Porcentaje de fibroína extraída según el diseño experimental y datos transformados a una distribución normal.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Na_2CO_3 /capullo (g/g)	Tiempo de extracción (h)	Fibroína extraída (%)	Datos transformados
60	0,2	3	35,233 \pm 6,571	2,074 \pm 0,831
60	0,2	6	72,286 \pm 3,732	27,344 \pm 6,238
60	0,4	3	31,479 \pm 8,222	1,717 \pm 0,708
60	0,4	6	75,540 \pm 5,568	33,670 \pm 10,944
80	0,2	3	73,796 \pm 0,791	29,682 \pm 1,422
80	0,2	6	73,852 \pm 3,671	30,068 \pm 6,631
80	0,4	3	72,990 \pm 0,376	28,251 \pm 0,650
80	0,4	6	73,668 \pm 4,511	29,887 \pm 8,084
70	0,3	4,5	74,320 \pm 2,382	30,818 \pm 4,539

La separación, y posterior extracción de fibroína trabajada en este diseño experimental, aprovecha la composición de las proteínas que forman el capullo del gusano de seda (fibroína y sericina). La sericina, debido a su composición de aminoácidos altamente polares (serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina) [32], es una proteína que permite su disolución en medios acuosos a temperaturas moderadamente altas. Por otra parte, la fibroína está compuesta principalmente por glicina y alanina [33], los cuales son aminoácidos poco polares, lo que hace a esta fibra altamente hidrofóbica, y por lo tanto,

fácilmente separable de la sericina una vez esta última haya sido separada del capullo a través de su disolución en soluciones calientes de Na_2CO_3 . De acuerdo con los resultados del análisis de varianza mostrado en la **Tabla 3**, los factores que tienen significancia estadística sobre la variable de respuesta en los rangos trabajados a lo largo del diseño experimental son la temperatura ($p = 0,0112$), el tiempo de extracción ($p = 0,009$) y la interacción entre estos dos factores ($p = 0,0103$), por lo tanto, solo estos influyen en el porcentaje de fibroína extraída del capullo, particularmente, el efecto de estos factores se observa en el gráfico

de contorno mostrado en la **Figura 2**, donde se representa el modelo ajustado a los resultados experimentales de porcentaje de fibroína extraída contra el tiempo de extracción y la temperatura, según dicho modelo, se pueden obtener porcentajes de extracción de fibroína superiores a un 70% independiente de la relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$ que se trabaje, siempre y cuando, los valores de temperatura y tiempo de extracción seleccionados se encuentren en la zona blanca mostrada en la **Figura 2**, estos resultados muestran ser óptimos en

términos de la eficiencia de la extracción teniendo en cuenta que el capullo de gusano de seda tiene aproximadamente un 75% en masa de fibroína como se ha reportado previamente por Khan *et al.* [1], además de esto, el modelo ajustado predice valores similares a los reportado por Kumar *et al.* [34], quienes encontraron rendimientos similares a temperaturas superiores a los 70 °C, sin embargo, en su estudio, los autores no hacen estudio alguno de los tiempos de extracción, por lo que el presente estudio complementa estos resultados.

Tabla 3. Análisis de varianza para los valores normalizados del porcentaje de proteína extraída del capullo.

Variable	Suma de Cuadrados	Df	Estadístico F	P
A: Temperatura	704,442	1	88,1	0,0112
B: $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$	4,74566	1	0,59	0,5216
C: Tiempo	877,518	1	109,74	0,009
AB	14,3634	1	1,8	0,3121
AC	761,775	1	95,27	0,0103
BC	15,7291	1	1,97	0,2958
Prueba: Falta de ajuste	375,336	10	4,69	0,1883
Error	15,9921	2		
Total	2923,25	19		

R²= 86,6132%
R² ajustado= 78,8043%

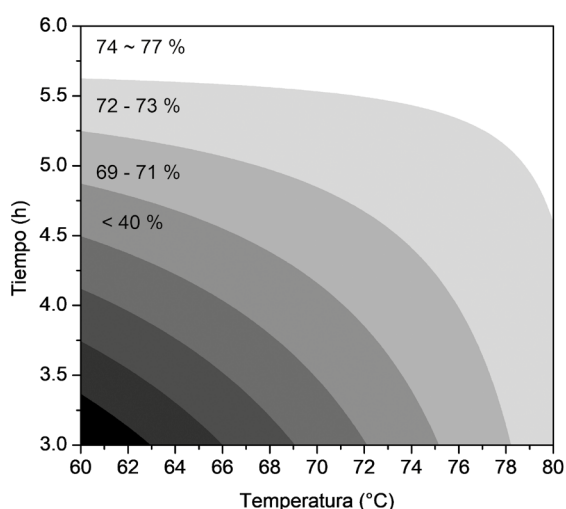


Figura 2. Contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el porcentaje de fibroína extraída a un valor constante de relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{capullos} = 0,4$.

Finalmente, de acuerdo con el modelo ajustado, los valores óptimos en los que se podrán obtener los máximos rendimientos de extracción se muestran en la **Tabla 4**, dicho resultado se verificó realizando una nueva extracción bajo estas condiciones, obteniéndose un porcentaje de fibroína extraída

de $74,76 \pm 4,16\%$, estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura, donde se documenta que el capullo de gusano de seda tiene aproximadamente 75% de masa de fibroína [1], por lo tanto, se puede concluir que el proceso de optimización del proceso de extracción fue exitoso.

Tabla 4. Relación de factores óptima para maximizar la extracción de fibroína desde el capullo de gusano de seda.

Factor	Nivel		
	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura (°C)	60	80	60
Na ₂ CO ₃ /Capullos (g/g)	0,2	0,4	0,4
Tiempo (h)	3	6	6

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

En la **Figura 3** se presenta el espectro IR de una muestra fibroína extraída a 60 °C durante 6 horas, dicho espectro fue analizado en el rango

de 1800 cm⁻¹ hasta 500 cm⁻¹ debido a que en esta región se puede observar la presencia de las cuatro bandas principales que identifican la configuración estructural de esta cadena proteica [35].

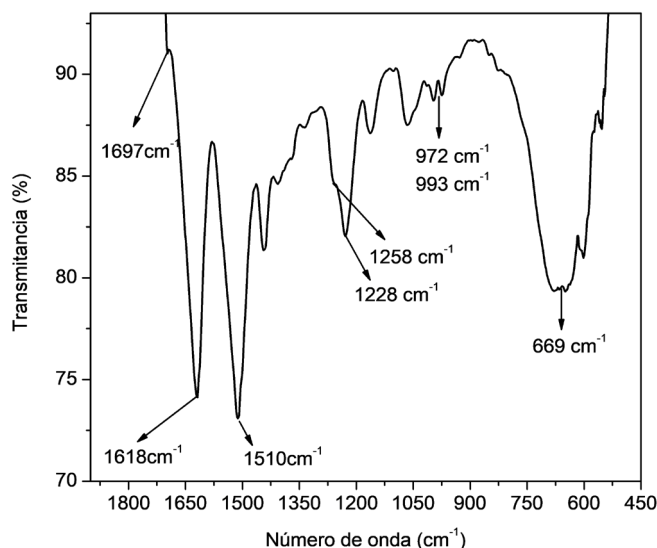


Figura 3. Espectro infrarrojo de la fibroína extraída bajo las mejores condiciones.

En términos generales, la secuencia de aminoácidos presentes en la fibroína puede organizarse en tres estructuras principales conocidas como: seda I, seda II y seda III. La seda I corresponde a la fibroína en su estado natural, la seda II corresponde a la fibroína en seda hilada, y la seda III corresponde a la estructura que adquiere la fibroína en solución [19], además de éstas, la

fibroína puede organizarse en tres estructuras secundarias: aleatoria, estructura α y estructura β [36], de este modo, con el fin de determinar la configuración correspondiente del extracto producido, se analizaron las bandas vibracionales de las amidas presentes en la cadena proteica, las cuales se utilizan normalmente en la identificación de dichas configuraciones moleculares [37].

Basado en los resultados del espectro, la estructura molecular de la fibroína extraída corresponde mayoritariamente a la configuración de láminas- β , lo cual se puede evidenciar por la presencia de las bandas presentes en 1697 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} y 1228 cm^{-1} , las cuales pertenecen a las amidas I, II y III de su cadena proteica [38], y que son la clave para identificar la configuración de láminas- β que da a la fibroína su resistencia mecánica.

De estas bandas, las dos primeras corresponden a los balanceos en fase y desfase de las amidas de la configuración de láminas- β , y las dos siguientes corresponden al estiramiento C-C de los residuos de tirosina de la cadena molecular, además de esto, se observan un conjunto de bandas presentes en 1228 cm^{-1} , 1258 cm^{-1} , 972 cm^{-1} y 993 cm^{-1} , las

cuales corresponden a la presencia tanto de la configuración de láminas- β como de láminas- α , finalmente, la banda presente en 669 cm^{-1} , corresponde a la torsión del grupo OCN que se da en la configuración conocida como *random coil*, la cual se presenta de forma natural en la fibroína hilada y puede ser transformada a configuración de láminas- β con tratamientos químicos o físicos según sea la necesidad de la aplicación [19].

Análisis termogravimétrico

La Figura 4 muestra el termograma de la fibroína extraída a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas, en ésta, se pueden apreciar tres regiones de interés en las que se observan pérdidas de masa a medida que la temperatura del sistema aumenta.

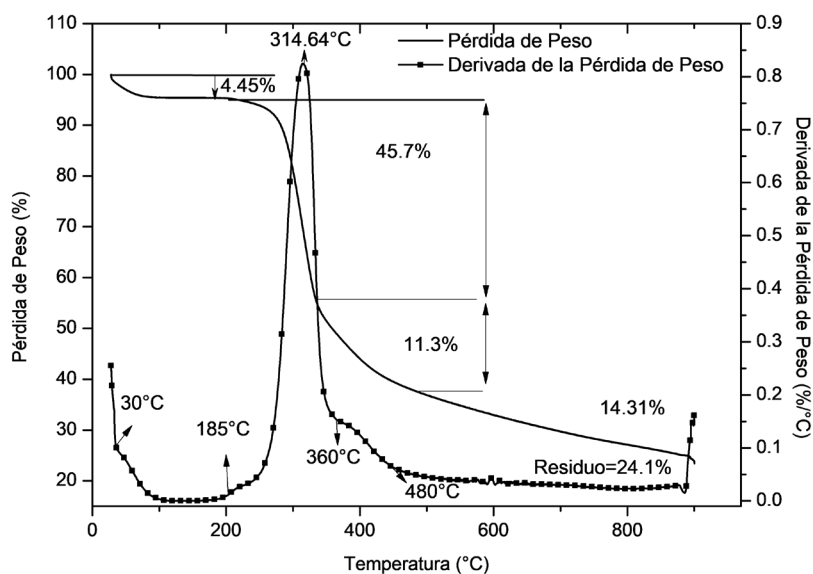


Figura 4. Termograma para la muestra de fibroína extraída: (—) Pérdida de peso (%), (---) Derivada de la pérdida de peso (%/°C).

La primera región corresponde al rango de temperatura entre 30 y $185\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el cual se pierde el $4,45\%$ del peso de la muestra, y que se explica debido a la evaporación de agua que queda en la muestra debido a la humedad del ambiente. Las regiones dos y tres corresponden a los rangos de temperatura que van desde 200 hasta $360\text{ }^{\circ}\text{C}$ y desde 360 hasta $480\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

A diferencia de la primera, la región dos se caracteriza por un cambio abrupto de peso, el cual encuentra su punto de inflexión a $314,64\text{ }^{\circ}\text{C}$, en esta etapa, la cadena proteica de la fibroína comienza a romperse para formar los aminoácidos

que componen su estructura principal [39], posterior a esto, dichos aminoácidos comienzan a descomponerse en la tercera etapa de degradación, dejando un residuo de aproximadamente $24,1\%$ después de $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ como se ha encontrado en estudios previos [39].

Conclusiones

El proceso de obtención de fibroína a partir del capullo de gusano de seda *Bombyx Mori*, se realizó de forma exitosa siguiendo un diseño experimental 2^3 con dos puntos centrales en

cual se estudiaron como factores del proceso de extracción las variables: temperatura, relación Na_2CO_3 /Capullos y tiempo de extracción en los niveles mostrados en la Tabla 1. De acuerdo con los resultados estadísticos, los únicos factores que afectan el rendimiento de la extracción de fibroína en los niveles trabajados son la temperatura ($p = 0,0112$), el tiempo de extracción ($p = 0,009$) y la interacción entre estos dos factores ($p = 0,0103$), razón por la cual, cualquier valor para la relación Na_2CO_3 /Capullos podrá ser trabajado sin alterar el rendimiento de la extracción.

El análisis por espectroscopía IR muestra que el extracto de fibroína posee mayoritariamente configuración de láminas- β , sin embargo, parte de dicha proteína se encuentra en una configuración de *Random coil* y láminas- α , estos resultados, junto con los resultados mostrados en el análisis termogravimétrico pueden ser usados como base para otros estudios en los que se requiera inmovilizar moléculas bioactivas sobre la estructura de la fibroína para funcionalizarla, ya que el éxito de dichas reacciones se suele confirmar comparando estas caracterizaciones con las de los compuestos funcionalizados.

Los resultados mostrados en el presente estudio prueban que el proceso de extracción de fibroína a partir del capullo de gusano de seda se puede optimizar a través de un diseño experimental factorial con puntos centrales, lo que ahorraría el número de corridos experimentales comparado con un diseño de superficie de respuesta y por lo tanto permitiría la optimización de los recursos disponibles para posteriores trabajos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Biomateriales (BIOMAT) de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto que dio lugar a esta publicación.

Referencias bibliográficas

- [1] Khan MMR, Tsukada M. Electrospun silk sericin nanofibers for biomedical applications. *Silk biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine*. Woodhead Publishing. 2014; 125-156. doi: 10.1533/9780857097064.1.125.
- [2] Dumitriu S. *Polymers as Biomaterials 1*. 2002. doi:10.15713/ins.mmj.3.
- [3] Enis IY, Sezgin H, Sadikoglu TG. Full factorial experimental design for mechanical properties of electrospun vascular grafts. *Journal of Industrial Textiles*. 2018;47(6):1378-1391. doi:10.1177/1528083717690614.
- [4] Koh LD, Cheng Y, Teng CP, Khin YW, Loh XJ, Tee SY, Han MY (2015). Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*. 2015;46: 86-110.
- [5] Zhang J, Huang H, Ju R, Chen K, Li S, Wang W, Yan Y. In vivo biocompatibility and hemocompatibility of a polytetrafluoroethylene small diameter vascular graft modified with sulfonated silk fibroin. *The American Journal of Surgery*. 2017;213(1): 87-93.
- [6] Wang D, Liu H, Fan Y. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microsc. Res. Tech*. 2017;80(3):280-290.
- [7] Wang Q, Tu F, Liu Y, Zhang Y, Li H, Kang Z, et al. The effect of hirudin modification of silk fibroin on cell growth and antithrombogenicity. *Mater Sci Eng C*. 2017;75:237-46.
- [8] Sagnella A, Pistone A, Bonetti S, Donnadio A, Saracino E, Nocchetti M, et al. Effect of different fabrication methods on the chemophysical properties of silk fibroin films and on their interaction with neural cells. *RSC Adv*. 2016;6(11):9304-14.
- [9] Du X, Wang Y, Yuan L, Weng Y, Chen G, Hu Z. Guiding the behaviors of human umbilical vein endothelial cells with patterned silk fibroin films. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;122:79-84.
- [10] Du J, Zhu T, Yu H, Zhu J, Sun C, Wang J, et al. Potential applications of three-dimensional structure of silk fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering. *Appl Surf Sci*. 2018;447:269-78.
- [11] Li Z-H, Ji S-C, Wang Y-Z, Shen X-C, Liang H. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Front Mater Sci*. 2013;7(3):237-47.
- [12] Seib FP, Herklotz M, Burke KA, Maitz MF, Werner C, Kaplan DL. Multifunctional silk e heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2014;35:83-91.
- [13] Sun N, Lei R, Xu J, Kundu SC, Cai Y, Yao J, et al. Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells. *J Mater Sci*. 2019;54(4):3319-30.
- [14] Chen J, Venkatesan H, Hu J. Chemically modified silk proteins. *Adv Eng Mater*. 2018;20(7):1700961.

- [15] Adali T, Uncu M. Silk fibroin as a non-thrombogenic biomaterial. *Int J Biol Macromol*. 2016;90:11-9.
- [16] Mi H-Y, Jiang Y, Jing X, Enriquez E, Li H, Li Q, *et al*. Fabrication of triple-layered vascular grafts composed of silk fibers, polyacrylamide hydrogel, and polyurethane nanofibers with biomimetic mechanical properties. *Mater Sci Eng C*. 2019;98:241-9.
- [17] Zhou J, Zhang B, Shi L, Zhong J, Zhu J, Yan J, *et al*. Regenerated silk fibroin films with controllable nanostructure size and secondary structure for drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(24):21813-21.
- [18] 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.
- [19] Kamalha E, Zheng Y, Zeng Y. Analysis of the secondary crystalline structure of regenerated *Bombyx mori* fibroin. *Res Rev Biosci*. 2013;7:76-83.
- [20] Nakazawa Y, Sato M, Takahashi R, Aytemiz D, Takabayashi C, Tamura T, *et al*. Development of small-diameter vascular grafts based on silk fibroin fibers from *Bombyx mori* for vascular regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011;22(1-3):195-206.
- [21] DeBari MK, Abbott RD. Microscopic considerations for optimizing silk biomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2019;11(2):e1534.
- [22] Sah MK, Kumar A, K P. The extraction of fibroin protein from *Bombyx Mori* silk cocoon: Optimization of process parameters. *Int j bioinform res*. 2010;2(2):33-41.
- [23] Yun H, Oh H, Kim MK, Kwak HW, Lee JY, Um IC, *et al*. Extraction conditions of *Antheraea mylitta* sericin with high yields and minimum molecular weight degradation. *Int J Biol Macromol*. 2013;52:59-65.
- [24] Allardyce BJ, Rajkhowa R, Dilley RJ, Redmond SL, Marcus D, Atlas, Wang X. Glycerol-plasticised silk membranes made using formic acid are ductile, transparent and degradation-resistant. *Mater Sci Eng C*. 2017;80:165-73.
- [25] 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.
- [26] Subia B, Chandra S, Talukdar S, Kundu SC. Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery. *Integr Biol (Camb)*. 2014;6(2):203-14.
- [27] Zhao Z, Li Y, Xie M-B. Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):4880-903.
- [28] Seib FP, Herklotz M, Burke KA, Maitz MF, Werner C, Kaplan DL. Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2014;35(1):83-91.
- [29] Kara F, Aksoy EA, Calamak S, Hasirci N, Aksoy S. Immobilization of heparin on chitosan-grafted polyurethane films to enhance anti-adhesive and antibacterial properties. *J Bioact Compat Polym*. 2016;31(1):72-90.
- [30] Kuehl R. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2 ed. Thomson Learning; 2000.
- [31] Leivisk K. Introduction to Experiment Design. University of Oulu; 2013.
- [32] Takasu Y, Yamada H, Tsubouchi K. Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66(12):2715-18.
- [33] Murphy A, Kaplan D. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater Chem*. 2009;19(36):6443-50.
- [34] Yeo I-S, Oh J-E, Jeong L, Lee TS, Lee SJ, Park WH, *et al*. Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures. *Biomacromolecules*. 2008;9(4):1106-16.
- [35] Jin H-J, Kaplan DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. 2003;424(6952):1057-61.
- [36] Bandekar J, Krimm S. Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: Characteristic amide bands of beta-turns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(2):774-7.
- [37] Boulet-Audet M, Vollrath F, Holland C. Identification and classification of silks using infrared spectroscopy. *J Exp Biol*. 2015;218(Pt 19):3138-49.
- [38] Kweon HY, Um IC, Park YH. Thermal behavior of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin film treated with aqueous methanol. *Polymer (Guildf)*. 2000;41(20):7361-67.
- [39] Antonella M, Luca F, Claudio M. Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromol Chem Phys*. 2002;203(10-11):1658-1665.