

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MORFOLOGIA, PROPRIEDADES TÉRMICAS E MECÂNICAS DE
FILMES DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA / DODECILSULFATO
DE SÓDIO / POLICAPROLACTONA-TRIOL.**

Vanessa Schmidt Giacomelli

Florianópolis

2005

Vanessa Schmidt Giacomelli

**MORFOLOGIA, PROPRIEDADES TÉRMICAS E MECÂNICAS DE
FILMES DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA / DODECILSULFATO
DE SÓDIO / POLICAPROLACTONA-TRIOL.**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de *Mestre em Química*, área de concentração *Físico-Química*.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2005

**MORFOLOGIA, PROPRIEDADES TÉRMICAS E MECÂNICAS DE FILMES DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA / DODECILSULFATO DE SÓDIO /
POLICAPROLACTONA-TRIOL.**

VANESSA SCHMIDT GIACOMELLI

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da Banca Examinadora para a obtenção do título de *Mestre em Química*, área de concentração *Físico-Química*.

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do curso de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edson Minatti
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Valfredo T. De Fávère
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Valdir Soldi
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedicatória

“Este trabalho é dedicado aos meus pais, Edoardo e Assunta, ao meu irmão (Charles) e, especialmente, ao meu esposo Cristiano. Pelo apoio, incentivo e compreensão irrestritos e fundamentais ao longo de todos esses anos. A todos vocês o meu imenso e sincero Muito Obrigada!”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, pela orientação, amizade e dedicação.

À Marly pelo constante auxílio, pelas sugestões e pela amizade.

Aos colegas do POLIMAT pela amizade e companheirismo.

À Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos pela cessão das amostras de Proteína Isolada de Soja, material essencial para a realização desse trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS _____	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS _____	vi
LISTA DE FIGURAS _____	vii
LISTA DE TABELAS _____	x
RESUMO _____	xi
ABSTRACT _____	xiii
INTRODUÇÃO _____	1
CAPÍTULO I _____	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONCEITOS BÁSICOS _____	4
I.1. A proteína isolada de soja (SPI) _____	4
I. 2. Formação do Filme _____	8
I.3. Propriedades Térmicas _____	10
I.3.1 Termogravimetria (TG) _____	10
I.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) _____	14
I.4. Propriedades Mecânicas _____	15
CAPÍTULO II _____	18
OBJETIVOS _____	18
II.1. Objetivo geral _____	18
II.2. Objetivos específicos _____	18
CAPÍTULO III _____	19
PARTE EXPERIMENTAL _____	19
III.1. Reagentes _____	19
III.2. Preparação dos filmes _____	19
III.3. Medidas de Fluorescência _____	20
III.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) _____	20
III.5. Termogravimetria (TG) _____	21

III.6. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR) _____	21
III.7. Ensaio Mecânicos _____	22
III.8. Determinação da quantidade de umidade presente nos filmes _____	22
III.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) _____	23
CAPÍTULO IV _____	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	24
IV.1. Medidas de Fluorescência _____	24
IV.2. Propriedades Térmicas _____	26
IV.2.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) _____	26
IV.2.2. Degradação Térmica _____	28
IV.3. Propriedades Mecânicas _____	40
IV.4. Determinação da quantidade de umidade presente nos filmes _____	49
IV.5. Morfologia _____	50
CAPÍTULO IV _____	55
CONCLUSÃO _____	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	57

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

[X]	Concentração da espécie X em mol.L ⁻¹
A	Fator pré-exponencial
a	Taxa de aquecimento
CMC	Concentração Micelar Crítica
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG	Termogravimetria Derivativa
<i>E</i>	Energia de ativação
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
L	Alongamento na ruptura
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
n	Ordem da reação
PCL-T	Policaprolactona-triol
pH	Potencial Hidrogeniônico
R	Constante dos gases
S	Svedberg
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SPI	Proteína Isolada de Soja
T	Tensão na ruptura
T _d	Temperatura inicial de degradação
T _g	Temperatura de transição vítrea
TG	Termogravimetria
T _{max}	Temperatura de máxima velocidade de degradação
UR	Umidade Relativa
W	Fração de massa residual da amostra
α	Fração de perda de massa
λ _{ex}	Comprimento de onda de excitação
λ _{max}	Comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Carro com o corpo plástico a base de proteína de soja [6]. _____	2
Figura 2. Ilustração gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas. _____	5
Figura 3. Fluxograma do processo utilizado para obtenção da SPI SUPRO 500E. _____	6
Figura 4. Diagrama de solubilidade para a SPI em função do pH da solução. _____	6
Figura 5. Estrutura química da PCL-T, proposta pelo fornecedor, onde n, m e p representam diferentes unidades de repetição. _____	9
Figura 6. Curva de decomposição térmica de um material polimérico que possui três estágios de degradação térmica. _____	11
Figura 7. Gráfico de Ozawa obtido a partir de termogramas registrados com diferentes taxas de aquecimento (10, 20 e 40 °C/min) para um dado processo de degradação. _	13
Figura 8. Ilustração dos processos térmicos obtidos por DSC. _____	14
Figura 9. Curvas de tensão vs. deformação típicas para um plástico rígido, uma fibra, um plástico flexível e um elastômero. _____	16
Figura 10. Estrutura do triptofano em pH 7,0. _____	17
Figura 11. Fluorescência do triptofano nas soluções formadoras de filme : (A) λ_{\max} e (B) variação da intensidade em função da composição da solução. A Figura inserida na Figura 11A mostra um espectro de fluorescência típico para o resíduo de aminoácido triptofano; $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. _____	25
Figura 12. Termograma de DSC tipicamente observado para filmes de SPI preparados a partir da metodologia descrita neste estudo. _____	27
Figura 13. Influência da composição dos filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T na temperatura de transição vítrea (T_g), determinada por medidas de DSC. _____	28
Figura 14. Curva de decomposição térmica (TG e DTG) típica para filmes de SPI medida com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio. _____	29
Figura 15. Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI. _____	30
Figura 16. Curvas de decomposição térmica (TG e DTG) para filmes de SPI/SDS (A) 87/13, (B) 72/28 e (C) 67/37 medidas com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio. _____	31

- Figura 17.** Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI/SDS com diferentes composições. _____ 32
- Figura 18.** Curva de decomposição térmica (TG e DTG) para o polímero PCL-T medida com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio. _____ 33
- Figura 19.** Curvas de decomposição térmica (TG e DTG) para filmes de SPI/SDS/PCL-T (A) 85/06/09, (B) 72/10/18, (C) 49/19/32 medidas com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio _____ 34
- Figura 20.** Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes composições. _____ 36
- Figura 21.** Espectros FTIR para os resíduos sólidos de filmes de SPI (—), SPI/SDS 63/37 (----) e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 (—) durante a degradação térmica em diferentes temperaturas. _____ 37
- Figura 22.** Espectros FTIR para os produtos gasosos formados a partir filmes de SPI (—), SPI/SDS 63/37 (—) e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 (—) durante a degradação térmica na temperatura de máxima velocidade de degradação. _____ 40
- Figura 23.** Curvas representativas de tensão vs. deformação para filmes de SPI/SDS em 75 % de UR e SPI/SDS/PCL-T em 75 e 40 % de UR. _____ 41
- Figura 24.** Variação do módulo de Young em função da composição para filmes de SPI/SDS (A) e de SPI/SDS/PCL-T (B), acondicionados em diferentes umidades relativas (UR). _____ 43
- Figura 25.** Variação do alongamento na ruptura medido em função da composição dos filmes de SPI/SDS/PCL-T para diferentes umidades relativas. _____ 46
- Figura 26.** Dependência do módulo de Young e da tensão na ruptura com o tempo decorrido após a preparação dos filmes a base de SPI (SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39). _____ 48
- Figura 27.** Variação da quantidade de umidade restante em função da composição para filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T acondicionados em dessecador a vácuo durante 4 dias _____ 49
- Figura 28.** Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (A) e da seção transversal (B) dos biofilmes de SPI. _____ 51

Figura 29. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície (à direita) e da seção transversal (à esquerda) para filmes de SPI/SDS com diferentes composições: 94/06 (A,B); 87/13 (C,D); 80/20 (E,F); 72/28 (G,H). _____ 53

Figura 30. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície (à direita) e da seção transversal (à esquerda) para filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes composições: 85/06/09 (A,B); 72/10/18 (C,D); 60/14/26 (E,F); 39/22/39 (G,H). ____ 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais aminoácidos presentes na SPI [7]. _____ 7
- Tabela 2.** Parâmetros termogravimétricos para a degradação térmica de filmes a base de SPI. _____ 35
- Tabela 3.** Módulo de Young, tensão na ruptura (T) e alongamento na ruptura (L) medidos em função da composição dos filmes acondicionados em diferentes umidades relativas. _____ 44
- Tabela 4.** Variação da Tensão na Ruptura (T) e do Módulo de Young em função do tempo decorrido após a preparação dos filmes de SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39. _____ 48

RESUMO

Neste trabalho, filmes de proteína isolada de soja (SPI)–dodecilsulfato de sódio (SDS)–policaprolactona-triol (PCL-T) foram preparados por evaporação em solvente comum a partir de soluções contendo diferentes concentrações de SDS e PCL-T. As propriedades físico-químicas dos filmes resultantes foram estudadas por métodos térmicos de análise (temperatura de transição vítrea – T_g – e degradação térmica) e ensaios mecânicos (Módulo de Young, Alongamento (L) e Tensão (T) na ruptura), também foi avaliada a quantidade de umidade e a morfologia. Os resultados foram interpretados com base nas interações intermoleculares (eletrostáticas, dipolo-dipolo e hidrofóbicas) entre os componentes do filme, considerando-se também as mudanças na estrutura da SPI conforme sugeriram as medidas de fluorescência.

De acordo com os resultados obtidos, a degradação térmica dos filmes de SPI ocorre em uma única etapa que tem início em 292 °C e atinge a máxima velocidade de degradação em 331 °C. Quando SDS ou SDS/PCL-T são adicionados ao sistema, a estabilidade térmica do mesmo decresce, sendo que a temperatura inicial de degradação é 29 °C menor para os filmes de SPI/SDS – 67/37, e 42 °C menor para os filmes de SPI/SDS/PCL-T – 39/22/39 em comparação ao valor tipicamente observado para filmes de SPI. A variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α), assim como dos valores médios de E comportam-se de maneira similar. A energia de ativação decresce de 160 kJ mol⁻¹ (filmes de SPI) para 128 kJ mol⁻¹ (filmes de SPI/SDS; 67/37) (32 kJ mol⁻¹ inferior) e para 123 kJ mol⁻¹ (filmes de SPI/SDS/PCL-T ; 39/22/39) (37 kJ mol⁻¹ inferior).

Os espectros FTIR dos produtos gasosos liberados durante a degradação térmica de filmes submetidos à temperatura correspondente de máxima velocidade de degradação (T_{MAX}) revelaram bandas de absorção características de CO_{2(g)}, CO_(g), NH_{3(g)}, C=O, C–H, C=C e CH₂, sugerindo que o mecanismo da reação de degradação compreende primeiramente a quebra de ligações mais fracas como C–N, C(O)–NH, C(O)–NH₂ e –NH₂, as quais estão presentes em diversas funções químicas encontradas na SPI.

O efeito da presença de SDS e SDS/PCL-T sobre as propriedades mecânicas e morfológicas dos filmes mostrou-se estritamente dependente da umidade presente nos mesmos. As modificações mais importantes foram observadas para filmes de SPI/SDS/PCL-T acondicionados em umidade relativa de 75% cuja concentração de PCL-T

é superior ou igual a 18%. Nestes casos, um decréscimo significativo no módulo de Young de 1424 MPa (filmes de SPI) para aproximadamente 50 MPa foi observado, em paralelo à diminuição na T_g (de 150°C para to 135°C) e ao aumento de L (de 2% para 90%). O efeito plastificante da PCL-T pôde também ser evidenciado quando as amostras foram expostas à umidade relativa de 54% ou inferior. Neste caso, porém, as modificações foram menos acentuadas ($T_g \sim 150^\circ\text{C}$, módulo de Young ~ 650 MPa, L ~ 5 %). As micrografias referentes à seção transversal dos filmes revelaram a formação de uma matriz porosa.

ABSTRACT

This work reports the study of soy protein isolate (SPI)–sodium dodecyl sulfate (SDS)–polycaprolactone-triol (PCL-T) films prepared by solvent casting from solutions containing variable amounts of SDS or SDS/PCL-T. The resulting films were evaluated in terms of thermal properties (glass transition temperature - T_g - and thermal degradation), mechanical tests (Young's modulus, Elongation at break (L) and Tensile at break (T)), moisture content and morphology, and the results were interpreted on the basis of intermolecular interactions (electrostatic, dipole-dipole and hydrophobic) between the film components, also considering the protein structure as accessed by fluorescence experiments.

According to the results, the thermal degradation of SPI films occurred in a single process that began at 292 °C and reached the maximum degradation rate at 331 °C. When SDS or SDS/PCL-T were added to the system, the thermal stability decreased, so that the initial temperature of degradation was 29 °C lower in the case of SPI/SDS – 67/37 films, and 42 °C lower in the case of SPI/SDS/PCL-T – 39/22/39. The activation energy (E) profile as a function of the weight-loss fraction behaved similarly, as did the average E -values which shifted from 160 kJ mol⁻¹ (SPI films) to 128 kJ mol⁻¹ (SPI/SDS ; 67/37 films) (32 kJ mol⁻¹ lower) and 123 kJ mol⁻¹ (SPI/SDS/PCL-T ; 39/22/39 films) (37 kJ mol⁻¹ lower).

The FTIR spectra of gas products evolved during the thermal degradation indicated the formation of CO₂, CO, NH₃, C=O, C-H, C=C and CH₂, suggesting that the reaction mechanism included at the same time scission of the C–N, C(O)–NH, C(O)–NH₂, –NH₂ and C(O)–OH bonds of the protein. The suggested reaction mechanism was supported by the high values of the activation energy ($E > 100$ kJ mol⁻¹) which were probably associated with a process that occurred by random scission of the chain.

It was also shown that the extend of SDS and PCL-T effects on the selected properties is strictly dependent on the moisture content. The utmost changes were observed for SPI/SDS/PCL-T films conditioned at 75% relative humidity whose PCL-T content was no less than 18%. In these cases, a significant decrease in the Young's modulus from 1424 MPa (pure SPI films) down to 50 MPa was found, followed by parallel downwards shift in the T_g (from 150°C down to 135°C) and an increase in E (from ca. 2% to 90%). Specimens exposed to 54% (or lower) relative humidity also put forward the plasticizer effect of PCL-

T, but in a lesser extent ($T_g \sim 150^\circ\text{C}$, Young' modulus ~ 650 MPa, $L \sim 5\%$). Micrographs taken at the cross-section of these films revealed the occurrence of a complete porous matrix. On the other side, films containing SPI/SDS or less than 18% PCL-T were in general more brittle, although some improvement was noticed.

INTRODUÇÃO

Até o momento, o mercado mundial de materiais poliméricos tem sido dominado pelos derivados do petróleo, principalmente devido às suas excelentes propriedades mecânicas, baixo peso, baixo custo, fácil processabilidade e excelente barreira à água. Entretanto, grande parte dos polímeros sintéticos não é biodegradável e, como os custos para recuperação dos mesmos são elevados, a cada ano milhares de toneladas de plásticos são descartadas no meio ambiente.

Uma alternativa largamente estudada para reduzir os impactos da poluição ambiental causados pelos plásticos derivados de petróleo é a substituição dos mesmos por materiais poliméricos derivados de produtos agrícolas. Esses materiais, também conhecidos como biopolímeros ou ainda agropolímeros, compreendem uma diversidade de polissacarídeos, proteínas e poliésteres, entre outros. Os benefícios da aplicação de polímeros de ocorrência natural como novos materiais incluem biodegradabilidade, uso de recursos renováveis e, também, a possibilidade do controle genético da produção visando à manipulação e modificação na estrutura e funcionalidade dos mesmos [1].

Dentre os biopolímeros, a proteína isolada de soja (SPI – do inglês “Soy Protein Isolate”) tem sido estudada extensivamente devido, principalmente, a sua competitividade econômica [2]. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (em primeiro lugar aparecem os EUA) com uma safra de 52 milhões de toneladas e uma área plantada de 18,4 milhões de hectares na temporada 2002/2003, segundo dados do Ministério da Agricultura [3].

Os materiais construídos a partir da proteína de soja encontram aplicação em diversos setores de atividade, tais como: adesivos, plásticos, filmes, revestimentos, emulsificantes na química de alimentos, terapêuticos, equipamentos para agricultura, automóveis, infra-estrutura marinha e engenharia civil [4,5]. Um dos exemplos mais impressionantes do potencial uso da soja deve-se a Henry Ford. Também conhecido como “o gigante do automóvel”, Henry Ford foi pioneiro no uso de proteína de soja como plásticos e fibras têxteis [6], chegando até mesmo a construir o corpo completo de um automóvel (Figura 1) com plásticos derivados de soja para demonstrar a sua durabilidade e promover o uso de algumas peças de automóveis também fabricadas com plásticos derivados de proteína de soja.

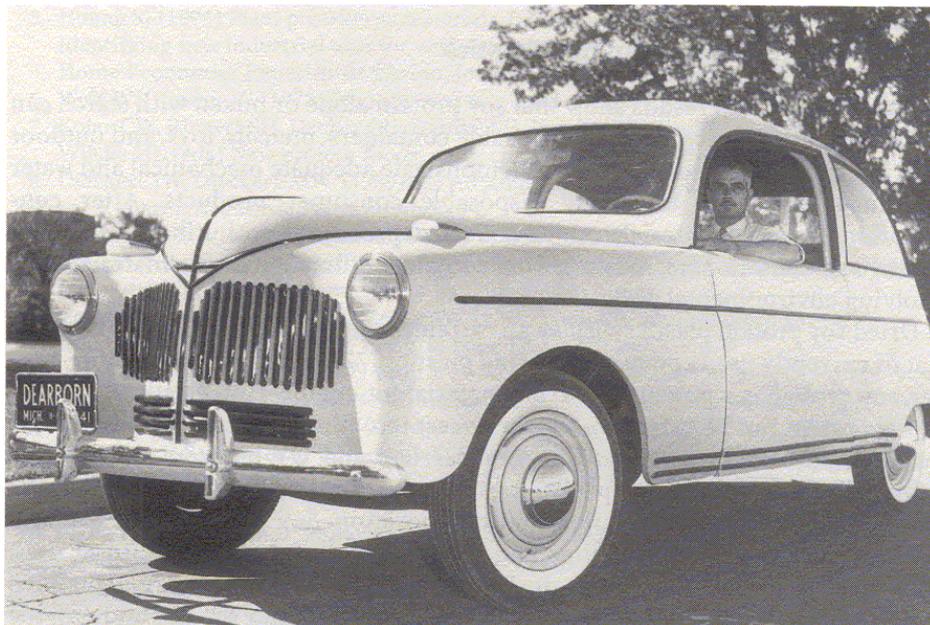


Figura 1. Carro com o corpo plástico a base de proteína de soja [6].

Entretanto, materiais à base de SPI sem componentes secundários não apresentam, na maioria dos casos, propriedades físico-químicas e mecânicas satisfatórias para uso cotidiano em escala industrial. Em decorrência da necessidade de melhorar tais características, metodologias como a combinação com outros polímeros biodegradáveis [7-10] e modificações químicas [2,7,11,12] ou enzimáticas [7,13,14] têm sido desenvolvidas. Por exemplo, as estruturas secundária, terciária e quaternária destas macromoléculas podem ser modificadas por desnaturação, aumentando a interação entre as cadeias de aminoácidos sem que haja a quebra das ligações peptídicas, melhorando,conseqüentemente a qualidade dos géis e filmes formados, assim como as propriedades mecânicas [7].

Neste sentido, outra alternativa extensivamente utilizada na produção de materiais poliméricos que visa o aprimoramento das propriedades mecânicas é a adição de agentes plastificantes. Tais compostos, de baixo peso molecular em comparação às macromoléculas, têm, em geral, a capacidade de formar ligações intermoleculares, diminuindo muitas vezes a rigidez organizacional das cadeias poliméricas (micro-estrutura). Um agente plastificante possível, cujos efeitos ainda não foram descritos na literatura, é a policaprolactona-triol (PCL-T), um polímero biodegradável semelhante a poli(ϵ -caprolactona), entretanto com massa molar inferior, e com grupos hidroxilas terminais que a conferem um caráter menos hidrofóbico.

Considerando os fatos acima mencionados, o presente estudo visa o desenvolvimento de uma metodologia para preparação por dissolução e evaporação em

solvente comum (i.e. bom solvente para todos os componentes) de filmes à base de SPI, SDS e PCL-T totalmente biodegradáveis e com propriedades físico-químicas e mecânicas satisfatórias.

Esta dissertação está dividida em três capítulos principais, além desta seção introdutória, objetivos, conclusão e referências bibliográficas. No capítulo I serão apresentados alguns conceitos básicos e uma revisão detalhada da literatura sobre a proteína isolada de soja, a formação de filmes e os métodos mais utilizados para avaliar as propriedades dos materiais à base de SPI. O capítulo II descreve os procedimentos experimentais adotados para o desenvolvimento deste trabalho. O capítulo III reúne os resultados obtidos neste estudo, bem como a discussão dos mesmos. Este último será dividido em quatro partes principais que dizem respeito aos estudos das propriedades da solução formadora do filme, das propriedades térmicas e mecânicas, e da morfologia dos filmes obtidos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONCEITOS BÁSICOS

I.1. A proteína isolada de soja (SPI)

As proteínas podem ser consideradas polímeros de alta massa molar (acima de 10000 g/mol) formados por cadeias de aminoácidos unidas entre si por ligações peptídicas. O modo como esses aminoácidos estão ordenados é que determinará as propriedades físico-químicas destas (bio)macromoléculas.

Uma classificação em termos de níveis de organização descreve as proteínas como possuindo estrutura primária, secundária, terciária e quaternária [15]. A estrutura primária de uma proteína consiste na seqüência de aminoácidos da sua cadeia polipeptídica ou das suas cadeias polipeptídicas, no caso de esta ser constituída de mais de uma cadeia. A análise de um grande número de proteínas mostrou que estas são compostas de 20 resíduos de aminoácidos, que estão nas proteínas. A estrutura secundária, por sua vez, compreende o arranjo espacial dos átomos de um esqueleto polipeptídico, sem levar em consideração a conformação de suas cadeias laterais. Inclui os padrões regulares de dobramento de polipeptídeos, como as hélices, as folhas pregueadas e as voltas [16]. As proteínas podem ainda apresentar estruturas secundárias não repetitivas ou aleatórias (“*coil*”), sendo simplesmente irregulares e, portanto, mais difíceis de serem descritas [15]. A estrutura terciária de uma proteína descreve o dobramento dos elementos estruturais secundários e especifica as posições de cada átomo na proteína, incluindo as das cadeias laterais.

A maioria das proteínas é constituída por mais de uma cadeia polipeptídica. Essas subunidades associam-se em geral com uma geometria específica, cujo arranjo espacial é conhecido como estrutura quaternária da proteína. A Figura 2 apresenta uma ilustração gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.

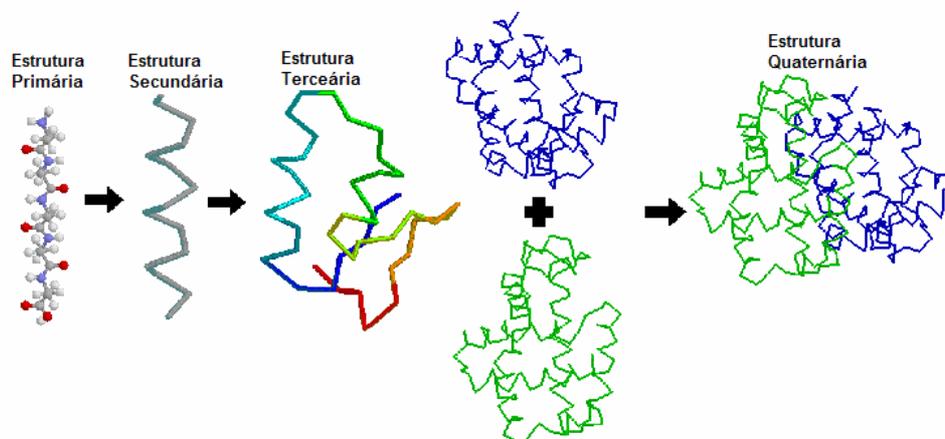
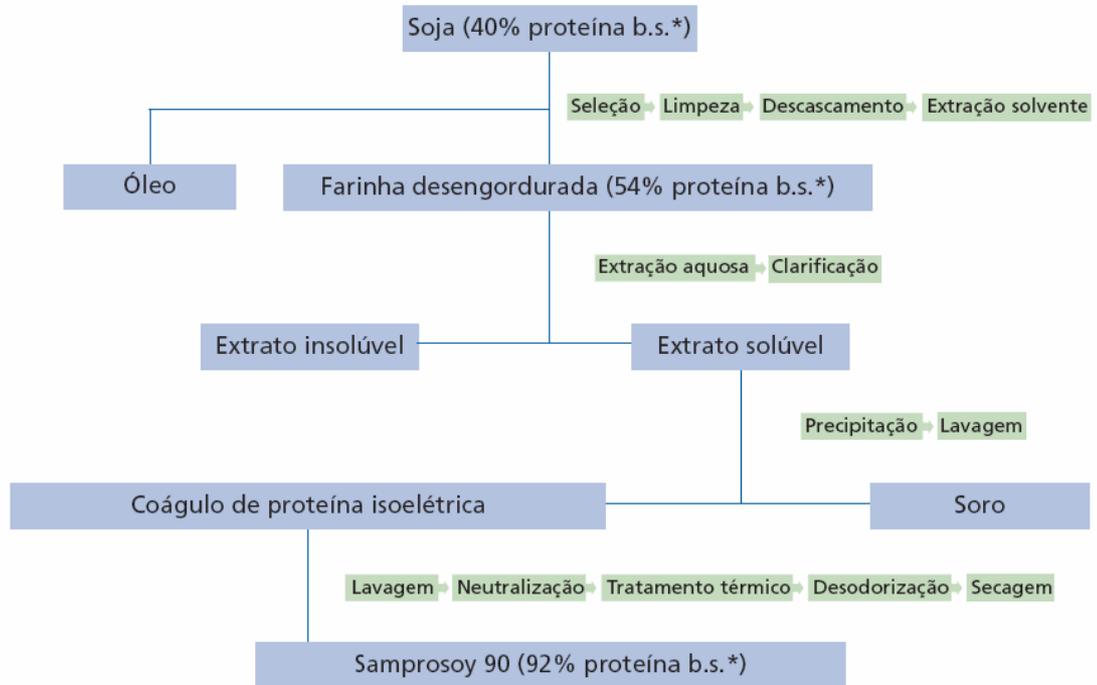


Figura 2. Ilustração gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.

As forças que estabilizam a estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas são regidas principalmente por efeitos hidrofóbicos e, em menor grau, por interações entre os resíduos polares e outros tipos de interações, como as pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína. O efeito hidrofóbico, que faz com que substâncias apolares minimizem seus contatos com a água, é o principal fator determinante da estrutura de proteínas nativas. A agregação de cadeias laterais apolares no interior de uma proteína é favorecida pelo aumento na entropia das moléculas de água que, de outra forma, iriam formar “gaiolas” ordenadas em torno dos grupos hidrofóbicos [16].

A Proteína Isolada de Soja é a forma mais refinada entre os derivados protéicos mais comuns da soja (entre eles a farinha de soja, a proteína texturizada e a proteína concentrada). Com mais de 90% de proteína, a SPI é um pó de coloração creme, preparado a partir da fração protéica dos grãos de soja, e separada dos demais componentes não-protéicos através de um processo de purificação em etapas baseado na sua reatividade química e solubilidade [2,7]. A Figura 3 ilustra o processo empregado para a obtenção da SPI utilizada no presente estudo. De maneira geral, após a remoção da casca e do óleo dos grãos de soja, prepara-se uma farinha desengordurada, a partir da qual se obtém a SPI através de um processo típico de extração em fase aquosa baseado em dissolução ($\text{pH} < 4,0$ ou $\text{pH} > 6,5$) –precipitação ($4,0 < \text{pH} < 6,5$), que explora a variação da solubilidade da SPI em função do pH (Figura 4).

Fluxograma de Processo



* base seca

Figura 3. Fluxograma do processo utilizado para obtenção da SPI SUPRO 500E.

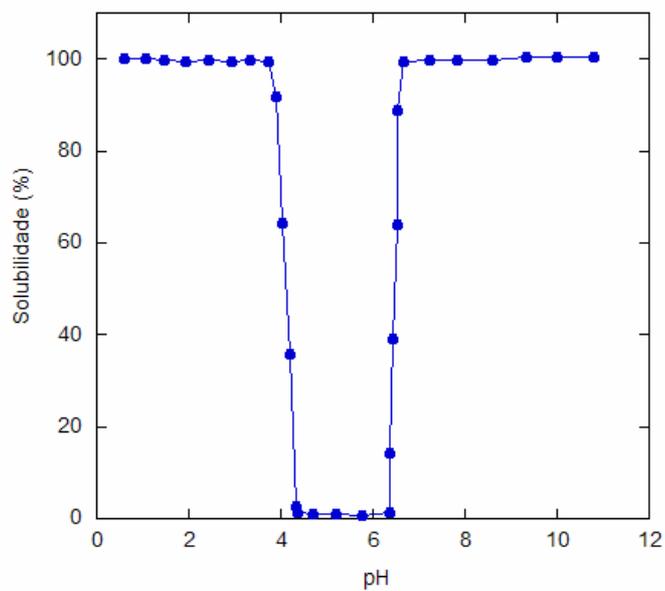


Figura 4. Diagrama de solubilidade para a SPI em função do pH da solução [17].

A SPI é constituída pelas proteínas de armazenamento da soja, e compreende um conjunto de macromoléculas de tamanhos (de 8 a 600.000 g/mol) [5,6,18] e estruturas variadas formadas a partir de 18 resíduos de aminoácidos diferentes (Tabela 1). As soluções aquosas de SPI submetidas à ultra-centrifugação revelam, de um modo geral, aproximadamente 15 frações distintas. Existem, porém, quatro frações dominantes identificadas como 2S (20-22%), 7S (37%), 11S (31-40%) e 15S (10-11%), às quais são atribuídas as características da SPI.

Tabela 1. Principais aminoácidos presentes na SPI [7].

Aminoácidos	Composição (g / 16g de nitrogênio)
Isoleucina	4,54
Leucina	7,78
Lisina	6,38
Metionina	1,26
Cisteína	1,33
Fenilalanina	4,94
Tirosina	3,14
Treonina	3,86
Triptofano	1,28
Valina	4,80
Arginina	7,23
Histidina	2,53
Alanina	4,26
Ácido Aspártico	11,70
Ácido Glutâmico	18,70
Glicina	4,18
Prolina	5,49
Serina	5,12

Algumas propriedades funcionais das proteínas podem ser melhoradas pela alteração da estrutura espacial das mesmas, ou seja, pela desnaturação, através de agentes físicos, químicos ou enzimáticos. Por exemplo, o aquecimento da proteína nativa provoca o rompimento de ligações não-covalentes. De modo similar, valores de pH muito baixos ou muito altos afetam a ionização de grupamentos da proteína e conferem à molécula uma elevada carga positiva ou negativa ocasionando repulsão intramolecular, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares (e.g. álcoois) e de compostos com grande capacidade de formar ligações de hidrogênio (e.g. uréia) desnaturam as proteínas, pois estabelecem ligações de hidrogênio com a mesma, substituindo ligações que mantinham a

estrutura nativa da proteína. A desnaturação também pode ser ocasionada por surfactantes através de interações hidrofóbicas e hidrofílicas com a estrutura protéica, induzindo o rompimento das interações internas nativas.

No caso da proteína de soja, as modificações estruturais têm sido promovidas principalmente pelo uso de bases, enzimas e agentes tenso-ativos como dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) [7]. Em princípio, esse tipo de tratamento favorece a exposição de grupos funcionais polares para possíveis interações com outras moléculas. Por exemplo, Huang e Sun [19] avaliaram as propriedades de adesão e de resistência à água da SPI tratada com diferentes concentrações de SDS e SDBS, e constataram que a SPI modificada com 0,5 e 1,0% de SDS ou SDBS apresenta valores maiores de deformação na ruptura, ou seja, maior resistência mecânica do que a SPI não tratada. Além disso, diversos estudos demonstram que a modificação alcalina de adesivos e filmes à base de proteína de soja aumenta a resistência mecânica e melhora a aparência dos mesmos, sem alterar, no entanto, propriedades como permeabilidade aos vapores de água e ao oxigênio.

Outra alternativa para melhorar as propriedades de materiais à base de proteína de soja é a formação de ligações cruzadas através da adição de agentes reticulantes como, por exemplo, compostos sulfurados, cobre, cromo, sais de zinco e epóxidos [7].

I. 2. Formação do Filme

Um filme pode ser formado considerando-se três componentes principais: polímero, plastificante e solvente. Uma condição fundamental é a miscibilidade entre o plastificante e o polímero e, além disso, ambos devem possuir solubilidade semelhante no solvente.

Um plastificante é caracterizado por ser uma molécula pequena e com baixa volatilidade que, quando adicionado a materiais poliméricos, modifica a organização tridimensional, diminui as forças atrativas intermoleculares e aumenta o volume livre e a mobilidade da cadeia polimérica [5]. Na fabricação de filmes à base de proteína de soja, os plastificantes mais empregados são os polióis, pois os mesmos apresentam polaridade semelhante à da proteína garantindo, dessa forma, o sucesso no processamento da mesma [7]. Dentre os principais polióis testados estão: propileno glicol, trietileno glicol, etileno glicol, butano diol e glicerol.

Entretanto, no caso específico do presente estudo, fez-se necessária a adição de um quarto componente para a formação do filme, pois o plastificante empregado (PCL-T – Figura 5) é pouco solúvel em água, solvente utilizado para a solubilização da proteína. A baixa solubilidade da policaprolactona-triol se deve principalmente ao fato de que, de acordo com estudos anteriores [20], a mesma é composta por uma mistura de oligômeros que compreende aproximadamente oito frações de massas molares distintas na faixa de 200 a 950 g/mol, na qual as cadeias de massa molar mais elevada tem sua solubilidade reduzida em água.

Tendo em vista o caráter anfifílico da PCL-T, a sua solubilidade em meio aquoso pode ser favorecida, em princípio, pela a adição de um surfactante (dodecilsulfato de sódio - SDS). A presença deste na solução formadora do filme, entretanto, tem um duplo efeito, pois além de promover a solubilização do plastificante, contribui para a desnaturação da proteína aumentando também a solubilidade e estabilidade da mesma no meio.

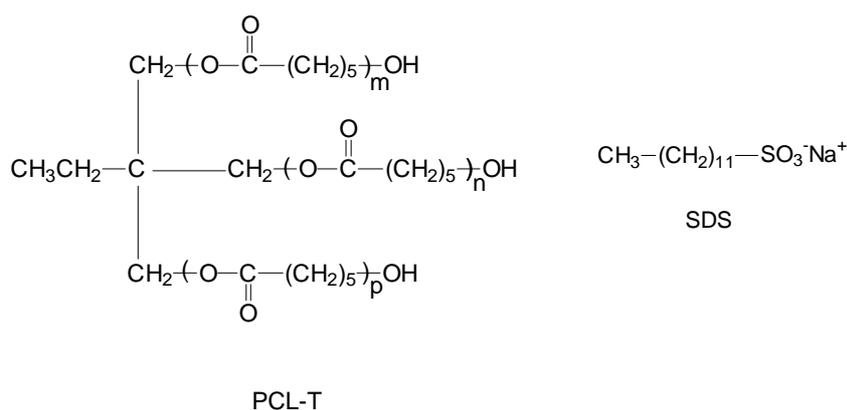


Figura 5. Estrutura química da PCL-T, proposta pelo fornecedor, onde n, m e p representam diferentes unidades de repetição e do surfactante SDS, ambos utilizados neste trabalho.

Assim como em outras estruturas protéicas, a solubilidade da SPI em meio aquoso depende do resultado do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, as quais são influenciadas também por fatores como temperatura, pH e força iônica. Conforme proposto por Mohamed e Xu [8] que estudaram a influência do pH nas propriedades térmicas e reológicas de blendas à base de SPI e amilopectina, a estabilidade/solubilidade da proteína em pHs alcalinos é significativamente maior do que em pH ácido.

I.3. Propriedades Térmicas

Os métodos térmicos compreendem a avaliação de um determinado parâmetro em função temperatura. Dentre as técnicas mais empregadas pode-se citar a termogravimetria (TG) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC), as quais são discutidas separadamente na seqüência.

I.3.1 Termogravimetria (TG)

A compreensão da degradação térmica de filmes poliméricos constitui, juntamente com as propriedades mecânicas, um aspecto indispensável para o estabelecimento da aplicabilidade dos mesmos, notadamente nos setores primário e secundário. Isto se deve ao fato de que os (bio)polímeros são geralmente submetidos a temperaturas relativamente elevadas durante seu processamento. Neste sentido, além da potencial degradação térmica propriamente dita do material em transformação – fato que tem implicações claras na qualidade final do mesmo –, outro aspecto importante concerne aos produtos gerados durante a decomposição, pois em inúmeros casos gases tóxicos podem ser formados.

Na análise termogravimétrica, o parâmetro medido é a massa, isto é, o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função da temperatura ou do tempo, no último caso se a temperatura for mantida constante [21]. O resultado da análise, em geral, é mostrado sob a forma de um gráfico de TG, cuja abscissa contém os registros de temperatura (ou tempo) e a ordenada o percentual em massa perdido ou ganho. Através do cálculo da derivada da curva de TG obtém-se a curva de DTG, que pode ser útil para se determinar a temperatura onde a velocidade de degradação é máxima, a qual corresponde aos picos na curva de DTG. A Figura 6 ilustra os resultados obtidos para um material polimérico na análise por termogravimetria.

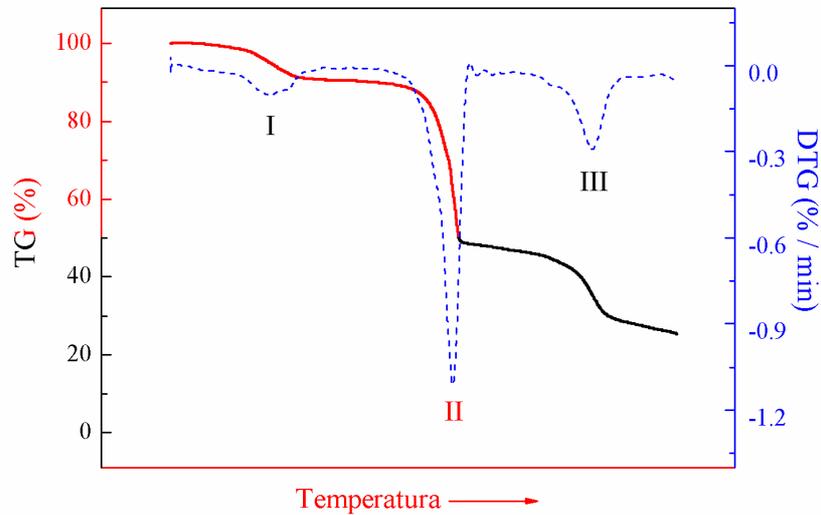


Figura 6. Curva de decomposição térmica (TG (—) e DTG (---)) de um material polimérico que possui três estágios de degradação térmica.

Além fornecer informações sobre a estabilidade térmica e a composição da amostra, a análise termogravimétrica pode ser utilizada para obtenção de informações a respeito da cinética de decomposição e do tempo de vida útil do material em estudo. Atualmente, a introdução de aparelhos de TG de alta resolução permite a determinação de parâmetros cinéticos, como a energia e a ordem de reação para cada estágio de degradação de materiais formados por múltiplos componentes. Dentre os vários métodos já propostos para a determinação destes parâmetros, um dos mais aceitos e utilizados é o método de Ozawa [22].

Ozawa propôs uma metodologia de aproximação integral na qual, assim como nos demais métodos, a taxa de decomposição está fundamentada na equação de Arrhenius, e é dada por:

$$-\frac{dW}{dt} = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) W^n \quad (1)$$

onde:

W	=	fração de massa residual da amostra (adimensional)
T	=	temperatura absoluta (K)

R	=	constante dos gases (8,314 J/mol K)
t	=	tempo (s)
A	=	fator pré-exponencial (1/s)
$?E$	=	energia de ativação (J/mol)
n	=	ordem da reação (adimensional)

Geralmente, a fração de massa, W , do material em degradação é expressa como uma função da fração da quantidade estrutural, como um grupo, um constituinte, uma ligação quebrada, etc., a qual é representada por x :

$$W = f(x) \quad (2)$$

onde, x varia de acordo com a equação:

$$-\frac{dx}{dt} = A \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) g(x) \quad (3)$$

Por integração:

$$-\int_{x_0}^x \frac{dx}{g(x)} = A \int_{t_0}^t \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) dt \quad (4)$$

onde x_0 é o valor de x em $t = t_0$. Na maioria dos casos, a cinética de variação de massa pode ser expressa pela Eq. 1, onde x é igual a W . Porém no caso da degradação randômica de polímeros, x é a fração numérica das ligações quebradas.

Quando a temperatura da amostra é aumentada com uma taxa constante, a , a variação de x é dada pela Eq. 5:

$$-\int_{x_0}^x \frac{dx}{g(x)} = \frac{A}{a} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) dT \quad (5)$$

onde T_0 é o valor de T em $t = t_0$. Geralmente, a taxa de degradação é menor em temperaturas menores e, portanto, a seguinte aproximação é válida:

$$\int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) dT = \int_0^T \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) dT \quad (6)$$

O valor de lado direito da Eq. 6 é expresso e tabelado por Doyle [23] como a função p a seguir:

$$\frac{?E}{R} p\left(\frac{?E}{RT}\right) = \int_0^T \exp\left(-\frac{?E}{RT}\right) dT \quad (7)$$

Se $?E/RT$ é maior que 20, $p(?E/RT)$ pode ser aproximado pela seguinte equação:

$$\log p\left(\frac{? E}{RT}\right) = -2,315 - 0,4567 \frac{? E}{RT} \quad (8)$$

Para um determinado valor de W , uma função simples de x , o lado esquerdo da Eq. 5 é uma constante que não depende da taxa de aquecimento. Portanto, se a massa diminui para uma dada fração em uma determinada temperatura, T_1 , com uma taxa de aquecimento a_1 e diminui em T_2 com a_2 , e assim por diante, a seguinte equação pode ser obtida:

$$\frac{A ? E}{a_1 R} p\left(\frac{? E}{RT_1}\right) = \frac{A ? E}{a_2 R} p\left(\frac{? E}{RT_2}\right) = \dots \quad (9)$$

Utilizando a Eq. 8, a seguinte relação linear pode ser facilmente obtida:

$$\begin{aligned} -\log a_1 - 0,4567 \frac{? E}{RT_1} &= \\ -\log a_2 - 0,4567 \frac{? E}{RT_2} &= \dots \end{aligned} \quad (10)$$

Portanto, os gráficos de $\log a$ versus o recíproco da temperatura absoluta para um dado valor de W originam obrigatoriamente uma linha reta, cuja inclinação fornece a energia de ativação (E), como ilustra a Figura 7.

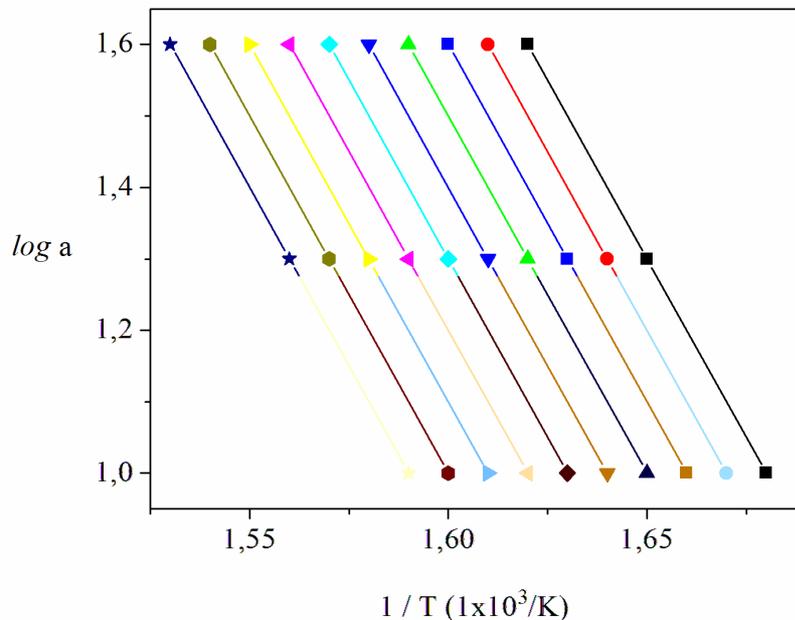


Figura 7. Gráfico de Ozawa obtido a partir de termogramas registrados com diferentes taxas de aquecimento (10, 20 e 40 °C/min) para um dado processo de degradação.

Enquanto o estudo da estabilidade térmica de polímeros e blends poliméricos através da metodologia acima descrita é largamente disseminado, sua aplicação na análise de filmes à base de proteínas ainda é limitada [24]. No caso específico de filmes de SPI, as primeiras investigações acerca do seu processo de degradação térmica foram publicadas recentemente [25], e constituem parte do presente estudo sendo, portanto, discutidas na seqüência.

1.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Esta técnica é utilizada na observação de mudanças físicas e químicas de substâncias através da análise da variação de entalpia [21], podendo ser aplicada na determinação das temperaturas de transições em polímeros, como a transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de fusão (T_m), e em medidas quantitativas de calor específico (C_p) e calor de fusão (ΔH_f). A Figura 8 ilustra as principais transições térmicas observadas em um termograma de DSC.

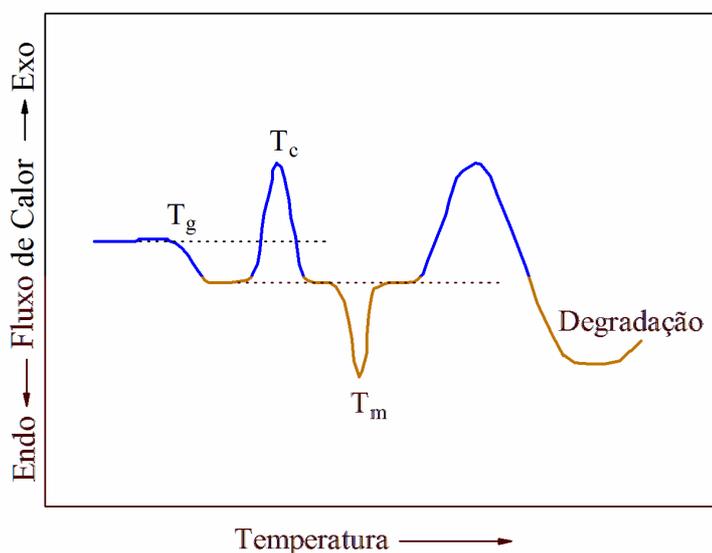


Figura 8. Ilustração dos processos térmicos obtidos por DSC.

No que concerne aos estudos dedicados à proteína de soja, a calorimetria diferencial de varredura tem sido largamente empregada na elucidação das mudanças estruturais que a mesma apresenta em função, por exemplo, da força iônica e do pH do meio [8,13,26,27]. Mohamed e Xu [8] estudaram o efeito da força iônica e do pH nas propriedades térmicas de blendas de proteína de soja e amilopectina, e observaram que os valores de T_g e de temperatura de desnaturação mudam significativamente quando o pH e a força iônica do meio variam. Com base nos valores de temperatura de transição vítrea, Zhong e Sun [11] demonstraram que a adição de MDI (difenilmetileno de diisocianato) promove a compatibilização entre os componentes em blendas formadas por SPI e PCL. Os estudos de DSC são ainda descritos na avaliação da adição de plastificantes (e.g. propileno glicol, trietileno glicol, etileno glicol, butano diol e glicerol) [2,28].

A modificação da proteína isolada de soja através da adição de dodecilsulfato de sódio (SDS), foi estudada por métodos térmicos de análise por Mo e Sun [29]. Esses autores verificaram que a adição de pequenas quantidades de SDS (1%) altera a temperatura de desnaturação da proteína, e que com a adição de quantidades maiores (5 - 10%) os picos de desnaturação não são observados, indicando que a mesma já está completamente desnaturada.

I.4. Propriedades Mecânicas

O estudo das propriedades mecânicas constitui uma etapa imprescindível no desenvolvimento de novos materiais, pois permitem avaliar seu comportamento frente às influências mecânicas externas e, portanto, inferir sobre suas possíveis aplicações. Estas propriedades estão associadas à capacidade de desenvolver deformações (reversíveis ou irreversíveis), e de apresentar resistência à ruptura e/ou fratura em consequência da composição da matriz polimérica e de sua estrutura nos níveis molecular e supramolecular.

Quanto ao comportamento mecânico, os polímeros podem ser classificados como plásticos, fibras ou elastômeros. O comportamento mecânico notadamente distinto dessas três categorias é ilustrado na Figura 9 [20].

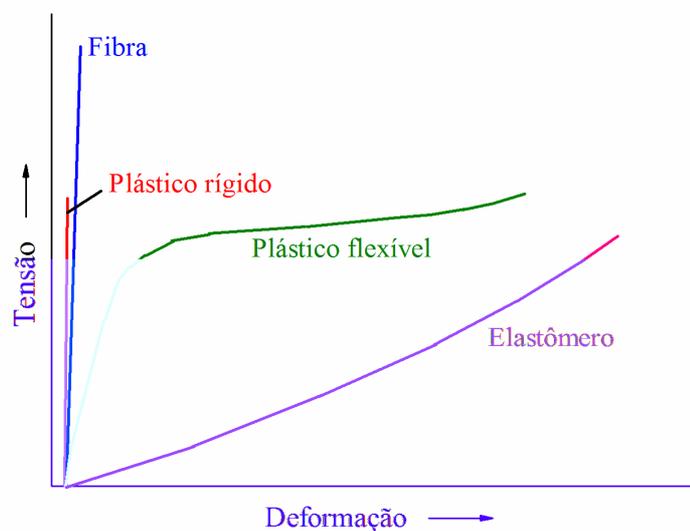


Figura 9. Curvas de tensão vs. deformação típicas para um plástico rígido, uma fibra, um plástico flexível e um elastômero.

Uma propriedade importante dos filmes poliméricos é sua resposta à aplicação de força, indicada por dois tipos principais de comportamentos: elástico e plástico. Materiais elásticos retornam à sua forma original desde que a força seja removida. Materiais plásticos, ao contrário, não retomam sua forma inicial. A maioria dos filmes poliméricos sintéticos demonstra uma combinação dos comportamentos elástico e plástico, em geral exibindo comportamento plástico após o limite elástico ter sido excedido. Neste caso, a principal propriedade mecânica avaliada é a deformação elástica, representada quantitativamente pelo módulo de elasticidade (ou módulo de Young), o qual corresponde ao regime onde a deformação do material é uma função linear da tensão aplicada. Logo, o módulo de Young é obtido diretamente a partir da inclinação da curva de tensão vs. deformação na região elástica. Outra propriedade mecânica importante exibida por filmes poliméricos é a capacidade de deformação sem sofrer ruptura.

Devido às propriedades mecânicas pobres dos materiais formados somente a base de SPI, inúmeros estudos tem sido dedicados à avaliação dessas propriedades após a adição de um componente secundário. Rhim *et al.* [30] observaram que a adição de 5 ou 10% de amido modificado em filmes de SPI promove melhoria nas propriedades mecânicas através da

formação de ligações cruzadas (reticulação) no filme. Cho e Rhee [31] estudaram o efeito de três diferentes tipos de plastificantes (glicerol, sorbitol e glicerol/sorbitol 1/1) em filmes de SPI, e concluíram que a hidrofobicidade e a concentração do plastificante presente no filme exerce um efeito pronunciado nos valores de tensão na ruptura. Estudo semelhante foi realizado por Orliac *et al.* [9], no qual as propriedades mecânicas foram modificadas pelo uso de diferentes poliálcoois como plastificantes.

Outros autores demonstraram que as propriedades mecânicas também podem ser alteradas pela formação de blendas com outros polímeros e pela modificação da SPI através do uso de agentes desnaturantes, como por exemplo, ácidos e surfactantes [2,11,29,32].

I.5. Medidas de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método bastante utilizado para estudar proteínas e os complexos formados. O espectro de emissão das proteínas é sensível à ligações com substratos, reações de associação, modificações da estrutura nativa e desnaturação. Medidas de fluorescência foram usadas para estudar as mudanças estruturais e conformacionais da proteína, monitorando-se os resíduos de triptofano (Figura 10), o qual está presente em grande parte das estruturas protéicas encontradas na SPI, principalmente na fração denominada glicinina (11S).

O comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência (λ_{\max}) depende da polaridade do micro-ambiente no qual o resíduo triptofano se encontra. Em meio hidrofóbico, o λ_{\max} situa-se tipicamente em torno de 330 nm, ao passo que quando exposto a um meio polar tal como em água, este valor aproxima-se de 350 nm. Desta maneira, o pico de emissão de fluorescência revela a polaridade do meio que circunda os resíduos de triptofano [33].

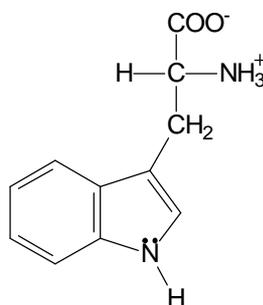


Figura 10. Estrutura do triptofano em pH 7,0.

OBJETIVOS

II.1. Objetivo geral

Preparar filmes de proteína isolada de soja com dodecilsulfato de sódio e policaprolactona-triol e avaliar a morfologia e as propriedades térmicas e mecânicas dos mesmos.

II.2. Objetivos específicos

- Preparar filmes de proteína isolada de soja com dodecilsulfato de sódio e policaprolactona-triol por dissolução e evaporação em solvente comum;
- Avaliar o efeito da adição de surfactante (dodecilsulfato de sódio) e do polioliol (policaprolactona-triol) na estrutura da proteína na solução formadora dos filmes;
- Estudar a estabilidade térmica em atmosfera inerte dos materiais puros, dos filmes de proteína de soja contendo dodecilsulfato de sódio e dos filmes contendo, além de dodecilsulfato de sódio, policaprolactona-triol através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Estudar os parâmetros cinéticos associados à degradação térmica dos filmes através do método de Ozawa [22];
- Analisar as características morfológicas dos filmes formados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar os resíduos sólidos e gasosos formados durante o processo de degradação térmica dos filmes através da análise por FTIR e inferir a cerca do mecanismo associado ao mesmo;
- Determinar a quantidade de água presente nos filmes, estabelecendo uma correlação com a composição e propriedades medidas;
- Determinar o módulo de Young (módulo de elasticidade), tensão e deformação na ruptura dos filmes através de ensaios mecânicos de tração em diferentes umidades relativas.

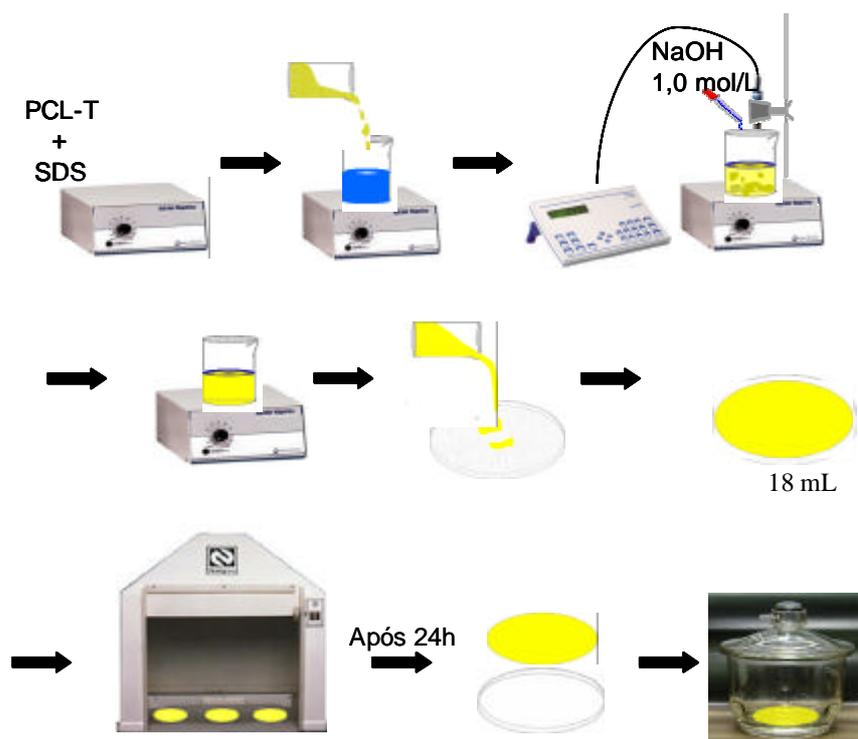
PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados durante o desenvolvimento do presente trabalho: proteína isolada de soja (SPI - Supro 500E, Solae), policaprolactona-triol (PCL-T - Aldrich), dodecilsulfato de sódio (SDS- Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH - Vetec) e brometo de sódio (NaBr - Vetec).

III.2. Preparação dos filmes

As soluções para formação de filmes foram preparadas pela dissolução de 1 g de SPI (contendo 92 % de proteína em base seca) em 20 mL de solução aquosa com diferentes concentrações de SDS e de policaprolactona-triol sob agitação. O pH da solução foi ajustado para 10,0 com NaOH 1,0 mol L⁻¹. Condições alcalinas favorecem a formação do filme de SPI por ajudar na dispersão da proteína na solução formadora do filme [32]. As soluções foram, posteriormente, depositadas em placas de poliestireno para evaporação do solvente. A espessura dos filmes foi controlada pela deposição do mesmo volume (18 mL) de solução formadora de filme por placa. A evaporação do solvente ocorreu a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h, e, em seguida, os filmes secos foram removidos das placas. Foram preparados filmes contendo 100/0, 97/03, 94/06, 87/13, 80/20, 72/28 e 63/37 (% em massa) SPI/SDS e 93/04/03, 85/06/09, 72/10/18, 60/14/26, 49/19/32 e 39/22/39 (% em massa) SPI/SDS/PCL-T. Antes dos experimentos, os filmes à base de SPI ficaram armazenados em dessecador a vácuo por, no mínimo, 24 h.



Esquema 1. Ilustração do procedimento de preparação dos filmes.

III.3. Medidas de Fluorescência

As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas empregando-se um espectrofotômetro da HITACHI F-4500, equipado com uma cubeta de quartzo de 10 mm. As medidas de fluorescência foram obtidas ajustando-se o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) em 280 nm.

III.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas por calorimetria exploratória diferencial num aparelho Shimadzu DSC-50. Aproximadamente 6 - 10 mg das amostras sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de $N_2 = 50 \text{ cm}^3/\text{min}$) foram aquecidas a $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, as mesmas foram resfriadas a temperatura ambiente e novamente aquecidas a 10

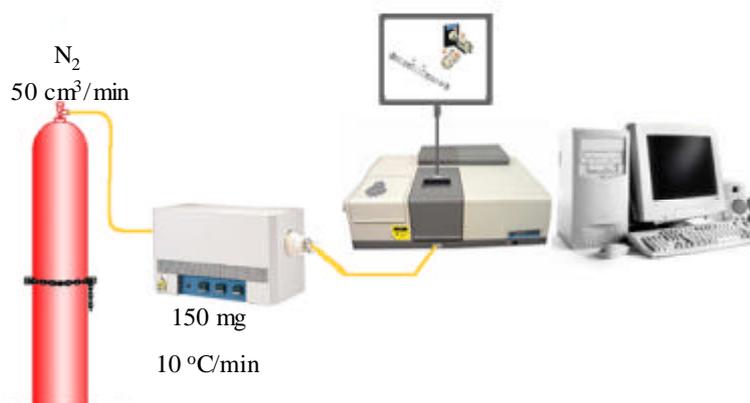
°C/min até 200 °C. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi obtida a partir do ponto médio entre as linhas-base antes e após a transição.

III.5. Termogravimetria (TG)

A degradação térmica dos filmes sob atmosfera de nitrogênio foi estudada através de um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA 50. Experimentos não-isotérmicos foram realizados na faixa de temperatura de 25 – 600 °C com diferentes taxas de aquecimento (10 – 40 °C/min) para cada amostra. O fluxo de nitrogênio foi mantido a 50 cm³/min. Os dados termogravimétricos foram analisados pelo método de Ozawa [22], conforme fora descrito acima, e os parâmetros cinéticos determinados usando o software associado TGA-50. A energia de ativação (E) foi determinada pela inclinação do gráfico de $\log a$ (taxa de aquecimento) contra $-1/T$.

III.6. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho (FTIR) foram registrados utilizando-se um espectrômetro 16 PC Perkin Elmer com resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹. Através deste, os resíduos sólidos e os produtos gasosos formados a partir de filmes a base de SPI submetidos a degradação em um forno tubular em temperaturas definidas foram analisados. Amostras contendo ca. 150 mg (para os resíduos sólidos e os produtos gasosos) foram aquecidas sob atmosfera de nitrogênio (50 cm³/min) com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os resíduos sólidos foram resfriados a temperatura ambiente, e os espectros obtidos usando suporte de KBr. Os produtos gasosos foram coletados em uma célula durante o processo de degradação em um forno tubular para análises de FTIR.



Esquema 2. Ilustração do procedimento utilizado na obtenção dos espectros de FTIR dos produtos gasosos de decomposição térmica.

III.7. Ensaios Mecânicos

Os ensaios de tensão-deformação foram conduzidos em um equipamento EMIC DL2000 operando com uma velocidade de tração de 1 a 10 mm/min a temperatura ambiente para se determinar a tensão e a deformação na ruptura, assim como o módulo de Young (módulo de elasticidade). As amostras com dimensões de 50x20 mm e espessura de até 0,2 mm foram previamente armazenadas em um dessecador com umidades relativas de 40, 54 e 75% para avaliar o efeito da umidade sobre as mesmas. Os valores reportados correspondem a uma média de, no mínimo, 10 medidas para cada filme.

III.8. Determinação da quantidade de umidade presente nos filmes

Para esta análise os filmes foram armazenados em dessecador por 24h e, em seguida, a massa das amostras foi determinada. Após, os mesmos foram levados para uma estufa a vácuo (Napco modelo 5381) onde permaneceram por 4h a 100°C , e posteriormente sua massa foi novamente determinada. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

III.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As superfícies dos filmes e suas respectivas seções transversais foram fixadas em suporte metálico e recobertas com uma fina camada de ouro. Posteriormente, os filmes foram observados em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips XL30.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Medidas de Fluorescência

A Figura 11 mostra a variação do λ_{\max} (Figura 11A) e da intensidade (Figura 11B) de fluorescência do triptofano em função da composição da solução, utilizando um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 280 nm. O quadro inserido na Figura 11A ilustra um espectro de fluorescência típico para o resíduo de aminoácido triptofano.

Nesta etapa do trabalho, soluções diluídas em comparação às utilizadas para obtenção dos biofilmes (conforme indicado na Figura 11) foram igualmente investigadas com intuito de enfatizar o efeito da presença do SDS e da PCL-T sobre a polaridade do micro-ambiente onde se situa o triptofano e, por fim, na estrutura da proteína.

Na Figura 11A, foi observado um deslocamento batocrômico de 3 nm no λ_{\max} para [SDS] (os colchetes se referem a concentração) acima da Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual é ca. 8 mmol/L para SDS em água pura. Em paralelo, a intensidade de fluorescência do triptofano (Figura 11B) também exibiu um decréscimo evidente. Em ambos os casos, Figuras 11A e 11B, os resultados demonstraram que o micro-ambiente em que o triptofano está inserido tem sua polaridade diminuída quando a [SDS] está acima da CMC, de acordo com os resultados publicados anteriormente por Lakemond *et al.* [17].

Portanto, a principal mudança na estrutura da proteína, conforme sugerem os resultados de fluorescência, está relacionada à presença de micelas de SDS na solução, as quais interagem eletrostaticamente (através dos grupos $-\text{SO}_3^-$) e hidrofobicamente (através das cadeias de alifáticas) com a proteína. Provavelmente, tais interações promovem a ruptura das ligações inter- e intramoleculares de baixa energia que mantêm a conformação da proteína e interrompem a continuidade da matriz [5,29,32] originando estruturas estendidas. Conforme sugere na Figura 11, em todas as soluções utilizadas para formação dos filmes, a SPI apresenta estruturas desnaturadas (estendidas). Conseqüentemente, as mudanças nas propriedades dos filmes (mostradas na seqüência) estão mais provavelmente associadas às interações entre os componentes do filme do que à estrutura da proteína em si.

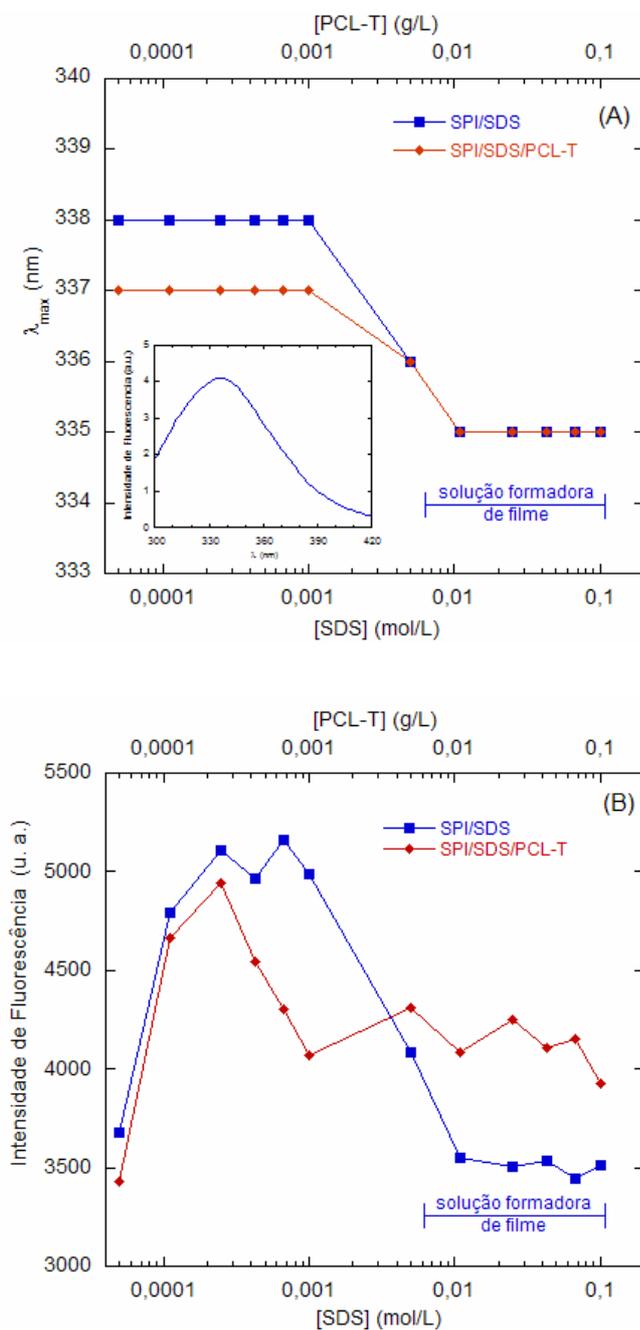


Figura 11. Fluorescência do triptofano nas soluções formadoras de filme : (A) λ_{max} e (B) variação da intensidade em função da composição da solução. A Figura inserida na Figura 11A mostra um espectro de fluorescência típico para o resíduo de aminoácido triptofano; $\lambda_{ex} = 280$ nm. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

IV.2. Propriedades Térmicas

IV.2.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Considerando que as propriedades das soluções formadoras de filme (estrutura e interação entre os componentes) devem ser refletidas no comportamento dos filmes sólidos, a temperatura de transição vítrea (T_g), a qual pode ser interpretada como a faixa de temperatura em que o movimento das macromoléculas torna-se termicamente ativado, foi analisada. Geralmente, a T_g de proteínas aumenta com a rigidez das cadeias e com a intensidade das interações inter- e intramoleculares, inclusive pelo impedimento da rotação interna ao longo das cadeias macromoleculares. Na presença de um plastificante eficaz, tais interações inter- e intramolecular são minimizadas, facilitando a mobilidade molecular e diminuindo o atrito interno no biopolímero.

A Figura 12 mostra um termograma de DSC típico de um biofilme de SPI, o qual apresenta uma temperatura de transição vítrea (T_g) em 143 °C. No caso de SPI não submetida a modificações externas (pH, força iônica, temperatura, etc.) este processo termo-ativado é observado em uma temperatura um pouco superior (150 °C) [34,35]. A diminuição de 7 °C observada no presente trabalho para a SPI é, aparentemente, devida às mudanças na estrutura da proteína promovidas durante a preparação do filme. De fato, a ausência de transições endotérmicas entre 70 e 90 °C indica que a proteína está completamente desnaturada, conforme já conhecido, devido ao ajuste do pH em 10 durante a preparação das soluções formadoras dos filmes. Na realidade, tal afirmação é confirmada pela primeira varredura de DSC (não apresentada), a qual também não apresenta transições correspondentes às temperaturas de desnaturação.

A influência da composição do filme na temperatura de transição vítrea é apresentada na Figura 13. Conforme pode ser observado, os filmes formados por SPI/SDS apresentam valores de T_g praticamente constantes em torno de 151 °C, enquanto que os filmes de SPI/SDS/PCL-T apresentam um considerável decréscimo no valor da T_g para [PCL-T] > 9%, refletindo o efeito plastificante da PCL-T. No caso dos filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T que contêm até 9% de PCL-T, os resultados sugerem que a rigidez das cadeias e a extensão das interações inter- e intramoleculares mantêm-se praticamente invariáveis.

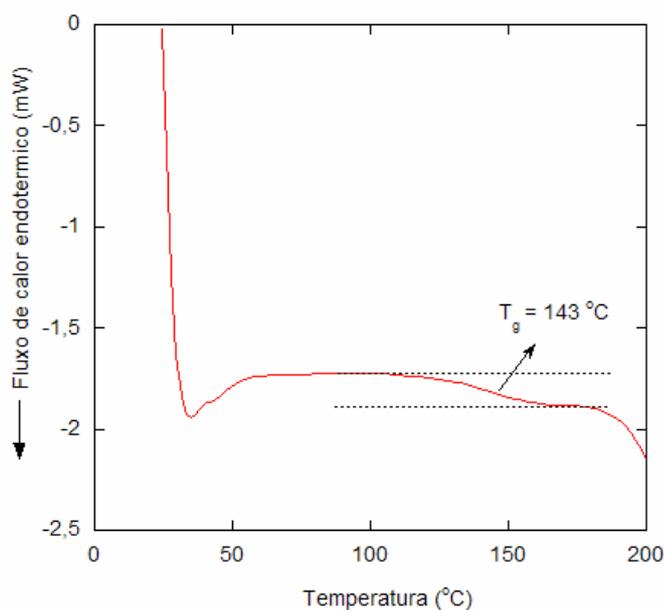


Figura 12. Termograma de DSC tipicamente observado para filmes de SPI preparados a partir da metodologia descrita neste estudo.

Conforme exposto na seção anterior, a interação entre o SDS e o biopolímero SPI se estende aos domínios hidrofílicos e hidrofóbicos com conseqüente redução na interação entre as cadeias peptídicas da matriz polimérica, resultando em um material menos rígido (isto é, com menor T_g). Com base nos testes mecânicos (discutidos posteriormente), observou-se que os filmes de SPI/SDS são de fato menos rígidos que os filmes formados apenas por SPI, porém este comportamento é extremamente dependente da umidade presente. As moléculas de água são conhecidas por reduzir as ligações de hidrogênio intramoleculares e as interações eletrostáticas e de dipolo-dipolo na estrutura da proteína, e acabam por aumentar a mobilidade das cadeias (i.e., menor T_g). Portanto, os valores de T_g constantes em 151 °C podem ser atribuídos a baixa quantidade de umidade presente nos filmes de SPI/SDS devido a evaporação da mesma durante o aquecimento.

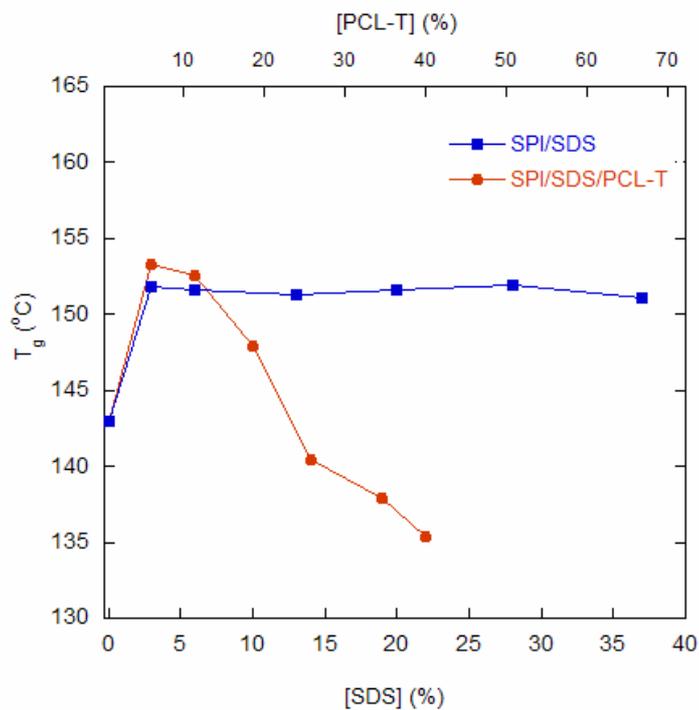


Figura 13. Influência da composição dos filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T na temperatura de transição vítrea (T_g), determinada por medidas de DSC. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

IV.2.2. Degradação Térmica

A estabilidade térmica de filmes de SPI, SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T foi, portanto, investigada por termogravimetria (TG) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

IV.2.2.1. Termogravimetria (TG) e parâmetros cinéticos

A Figura 14 mostra uma curva de decomposição térmica (TG e DTG) obtida com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio típica para filmes de SPI. Nesta Figura, duas etapas principais (I e II) de degradação térmica são observadas. O primeiro decréscimo apreciável da massa da amostra (etapa I) ocorre em aproximadamente

100 – 130 °C, e está relacionada à evaporação da água (ca. 10%) presente no biofilme e não será, portanto, discutida na sequência. A degradação térmica dos filmes de SPI acontece em um processo único de perda de massa (etapa II), o qual se inicia em 292 °C e atinge a máxima velocidade de degradação em 331 °C. O resíduo final em 600 °C corresponde a cerca de 30 % da massa inicial da amostra.

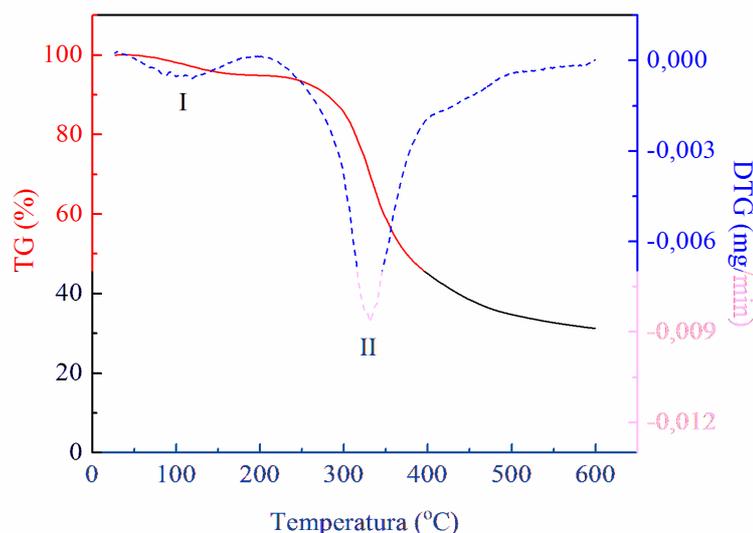


Figura 14. Curva de decomposição térmica (TG (—) e DTG (---)) típica para filmes de SPI medida com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

A variação da energia de ativação (E), determinada pelo Método de Osawa [22] conforme descrito anteriormente (pg. 11), em função da fração de perda de massa (α) para a degradação de filmes de SPI é mostrada na Figura 15. Nesta figura observa-se que os valores de E permanecem praticamente constantes para $\alpha < 0,4$, aumentando rapidamente em função do avanço da degradação térmica. Aparentemente, as estruturas mais termo-estáveis formadas acima de $\alpha \cong 0,4$ são devidas à ocorrência de reações de reticulação ativadas pelo aumento da temperatura, as quais podem envolver funções químicas reativas presentes na estrutura protéica, tais como aminas, hidroxilas, carbonilas e sulfidrilas [29]. O mesmo comportamento foi também descrito para filmes a base de proteína de trigo e gelatina [24].

A variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para processos de degradação térmica está relacionada a mudanças no mecanismo de degradação e, usualmente, tais mudanças refletem a existência de etapas reacionais múltiplas e competitivas

[36]. No caso dos filmes de SPI, os valores de E situam-se na faixa de 150 – 190 kJ/mol, sugerindo ainda que o processo observado envolve o cisão randômica de ligações fortes na SPI, uma vez que interações/ligações químicas fracas apresentam valores de E tipicamente inferiores a 100 kJ/mol [36].

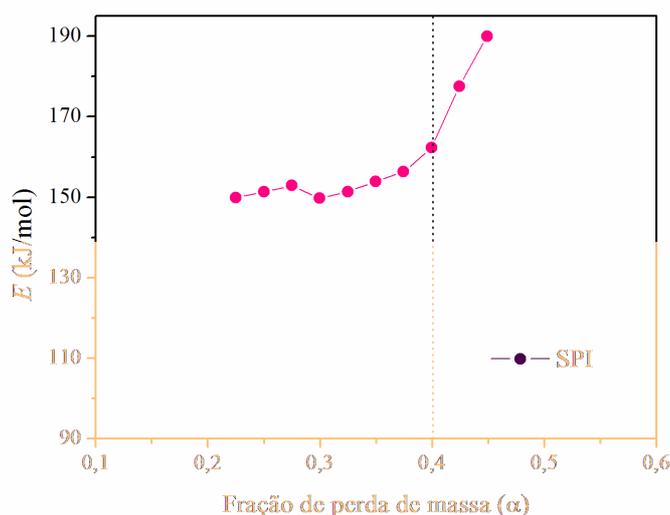


Figura 15. Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI.

A Figura 16 mostra curvas de decomposição térmica (TG e DTG) para filmes de SPI/SDS com composições distintas. Os resultados obtidos a partir da análise detalhada das curvas de TG e DTG registradas para os filmes de SPI e SPI/SDS, assim como para filmes formados por SPI/SDS/PCL-T discutidos a seguir, estão sumarizados na Tabela 2. Em presença de SDS, pode-se observar na Tabela 2 que a temperatura inicial de degradação térmica (T_d) diminui progressivamente de 294 °C para 263 °C conforme a [SDS] aumenta de 3 para 37 %, enquanto que o resíduo final permanece praticamente invariável em comparação aos filmes de SPI. Entretanto, os espécimes formados por SPI/SDS exibiram um pico acentuado nas curvas de DTG em ca. 275 °C (Figuras 16B – 16C), cuja intensidade aumenta em função da [SDS]. Este processo térmico pode ser atribuído não somente à decomposição do SDS, mas também à degradação da SPI, conforme sugerem os resultados referentes à análise dos produtos gasosos gerados.

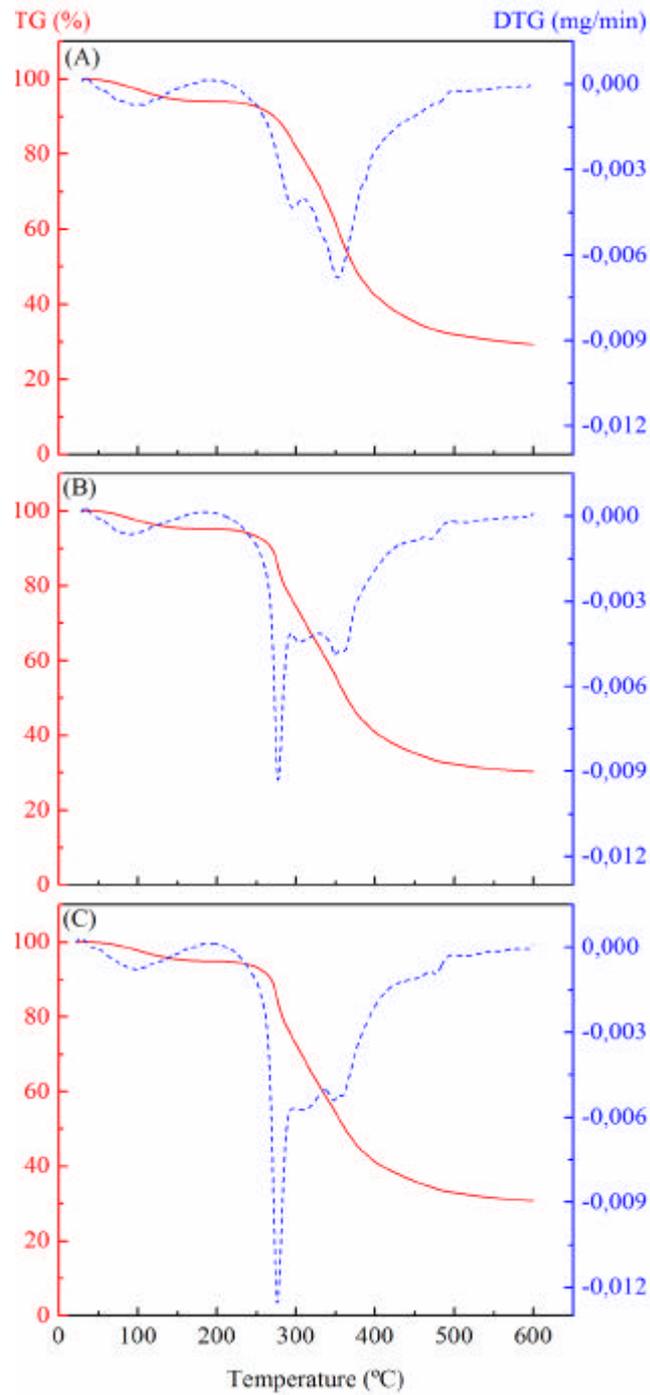


Figura 16. Curvas de decomposição térmica (TG (—) e DTG (---)) para filmes de SPI/SDS (A) 87/13, (B) 72/28 e (C) 67/37 medidas com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

O perfil da energia de ativação aparente (E) para a degradação térmica dos filmes de SPI/SDS em função da fração de perda de massa (α) (Figura 17) revela que a estabilidade térmica dos filmes decresce (i.e., menor E) à medida que a [SDS] aumenta. Os valores médios da E calculados com base nos dados mostrados da Figura 17 são sumarizados na Tabela 2. Em paralelo ao comportamento acima mencionado, constata-se que ao passo que filmes de SPI apresentam um valor médio de E em torno de 160 kJ/mol, em presença de SDS este valor diminui gradualmente para 128 kJ/mol (20% menor) no caso de filmes de SPI/SDS – 67/37. Resultados similares foram anteriormente reportados para outros polímeros naturais, como por exemplo, xantana, metilcelulose e hialuronato de sódio [37], e celulose, proteína do leite, trigo e gelatina [24].

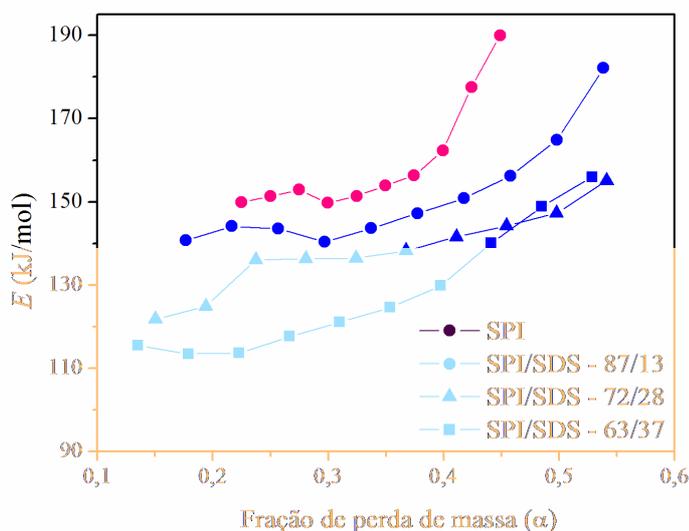


Figura 17. Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI/SDS com diferentes composições. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

O decréscimo na estabilidade térmica para o sistema SPI/SDS tem sido atribuído a mudanças promovidas pelo SDS na estrutura da proteína [25]. Este tensoativo aniônico pode interagir eletrostaticamente (através dos grupos $-\text{SO}_3^-$) e hidrofobicamente (através das cadeias alifáticas) com as macromoléculas presentes na SPI. Estas interações induzem a

ruptura de ligações/interações intermoleculares que mantêm a conformação da proteína, modificando a continuidade da matriz polimérica [5,29].

A PCL-T degrada-se praticamente na mesma faixa de temperatura que os demais componentes do filme, conforme se verifica na Figura 18, a qual mostra as curvas de TG e DTG para a PCL-T empregada neste estudo. Dessa forma, os sistemas ternários formados por SPI/SDS/PCL-T exibiram basicamente o mesmo perfil de degradação térmica (TG e DTG) em comparação aos sistemas binários SPI/SDS, como mostrado na Figura 19 para diferentes composições. A degradação térmica da PCL-T acontece em ca. 200 °C, estendendo-se até ca. 400 °C.

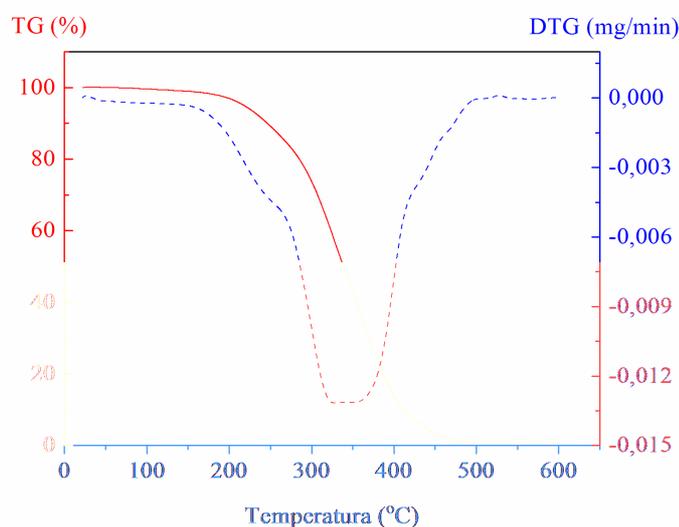


Figura 18. Curva de decomposição térmica (TG (—) e DTG (---)) para o polímero PCL-T medida com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

Todavia, a análise detalhada das curvas de DTG representadas na Figura 18 revelou deslocamentos importantes da temperatura inicial de degradação (T_d) e da temperatura de máxima velocidade de degradação (T_{MAX}). Nitidamente, a baixa estabilidade térmica da PCL-T ($T_d = 200^\circ\text{C}$, Figura 18) tem implicações diretas na diminuição da estabilidade térmica do material resultante. Os valores de T_d para filmes a base de SPI variam, portanto, desde 292 °C (filmes de SPI) até 252 °C (filmes SPI/SDS/PCL-T - 39//22/39), passando por valores intermediários no caso de filmes de SPI/SDS.

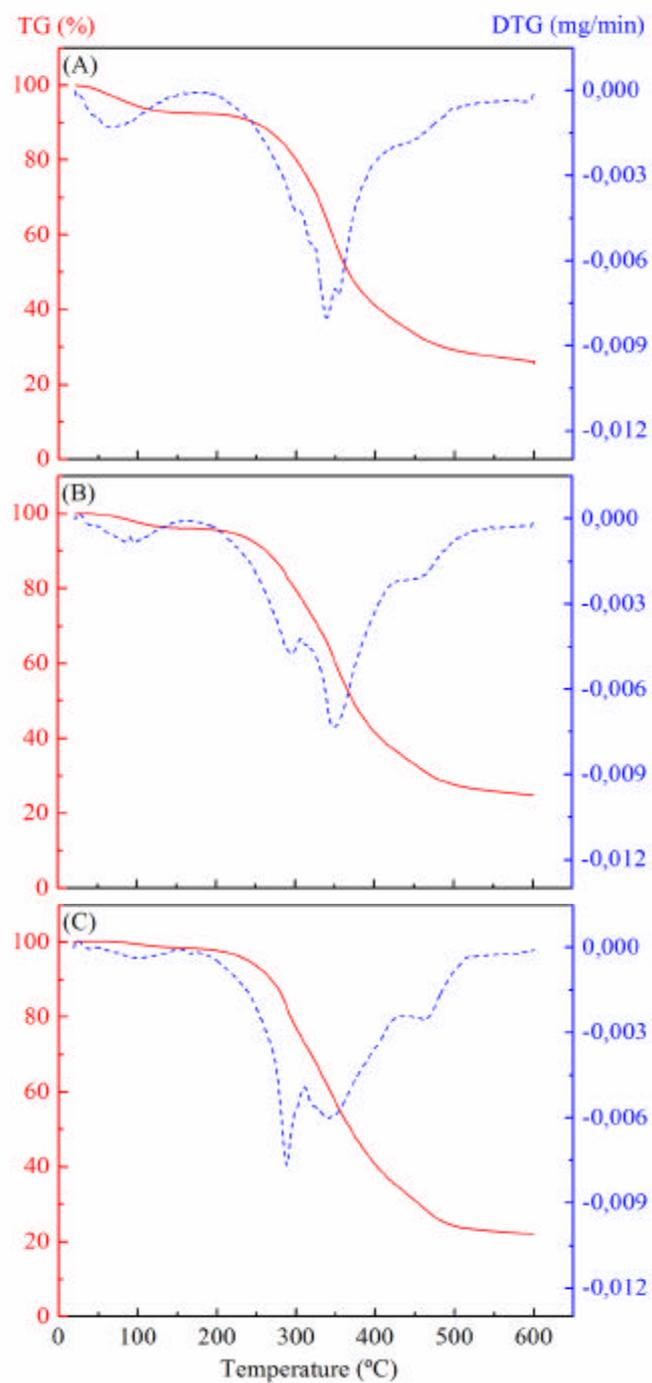


Figura 19. Curvas de decomposição térmica (TG (—) e DTG (---)) para filmes de SPI/SDS/PCL-T (A) 85/06/09, (B) 72/10/18, (C) 49/19/32 medidas com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

A Figura 20 mostra a variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes composições. Pode-se observar nesta figura que a estabilidade térmica dos filmes decresce (i.e., menor E) à medida que a [PCL-T] e [SDS] aumentam, corroborando a tendência mencionada no parágrafo anterior. Os perfis das curvas exibidas são similares àqueles já discutidos anteriormente (Figuras 15 e 17) e, portanto, os mesmos comentários podem ser aplicados neste caso. Além disto, os valores médios da E (Tabela 2) confirmam que a barreira energética necessária para ocorrer a degradação dos filmes de SPI/SDS/PCL-T é, em geral, inferior àquela observada para os demais casos.

Tabela 2. Parâmetros termogravimétricos para a degradação térmica de filmes a base de SPI.

Filme	T_d^a (°C)	T_{MAX}^b (°C)	E^c (kJ/mol)	Resíduo ^d (%)
SPI	292	331	160	32
SPI/SDS - 97/03	294	331	142	30
SPI/SDS - 94/06	291	349	138	30
SPI/SDS - 87/13	289	353	151	29
SPI/SDS - 80/20	281	354	138	30
SPI/SDS - 72/28	264	277	133	30
SPI/SDS - 63/37	263	276	128	31
SPI/SDS/PCL-T - 93/03/04	288	346	129	30
SPI/SDS/PCL-T - 85/06/09	290	338	117	26
SPI/SDS/PCL-T - 72/10/18	280	349	124	25
SPI/SDS/PCL-T - 60/14/26	268	340	118	23
SPI/SDS/PCL-T - 49/19/32	260	288	133	22
SPI/SDS/PCL-T - 39/22/39	252	281	123	21

^a Temperatura inicial de degradação

^b Temperatura de máxima velocidade de degradação.

^c Determinada a partir da media dos valores mostrados nas Figuras 15, 17 e 20.

^d Valores medidos a 600 °C a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

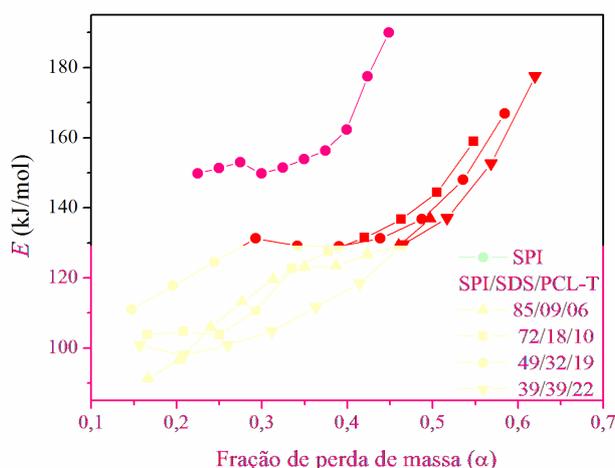


Figura 20. Variação da energia de ativação (E) em função da fração de perda de massa (α) para o processo de degradação térmica de filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes composições. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

IV.2.2.2. Análise dos produtos de degradação por FTIR

Os espectros de FTIR dos produtos gasosos e dos resíduos sólidos formados pelas amostras quando submetidas a diferentes temperaturas foram analisados com o intuito de melhor compreender o mecanismo de degradação térmica, correlacionando os produtos identificados com os resultados registrados nas análises térmicas.

A Figura 21 mostra os espectros na região do infravermelho dos resíduos sólidos dos filmes de SPI, SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 durante a degradação térmica em diferentes temperaturas, as quais foram definidas com base nas curvas de DTG para o principal estágio de decomposição de cada sistema estudado.

Para os filmes de SPI a temperatura ambiente, observa-se claramente as bandas de absorção referentes ao $\nu(\text{C}=\text{O})$ em 1630 cm^{-1} (amida I), $\delta(\text{N}-\text{H})$ em 1530 cm^{-1} (amida II) e $\delta(\text{C}-\text{H})$ em ca. 1450 cm^{-1} . A banda de deformação em 1230 cm^{-1} pode ser atribuída aos grupos $\nu(\text{C}-\text{N})$ e a $\delta(\text{N}-\text{H})$ (amida III) [38]. A banda em ca. 1100 cm^{-1} , por sua vez, é aparentemente formada pela contribuição de diferentes funções químicas, tais como $\delta(\text{C}-\text{H})$ (de estruturas aromáticas), $\nu(\text{PO}_2)$ ou $\nu(\text{P}-\text{OH})$ de ésteres de fosfato [38], os quais estão presentes em

quantidades significativas na SPI e em outras proteínas, especialmente nos resíduos do aminoácido serina (aproximadamente 5% na SPI [7]). Na faixa de $3600 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ são observadas bandas referentes aos grupos O–H e N–H, enquanto que as deformações axiais C–H típicas dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ aparecem na faixa de $2980 - 2850 \text{ cm}^{-1}$. No que diz respeito ao espectro referente aos filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T (não mostrados a 25°C), basicamente os mesmos comentários podem ser aplicados. Entretanto, os filmes de SPI/SDS exibiram menor transmitância (maior absorbância) na região associada a $\nu(\text{C-H})$ ($2980 - 2850 \text{ cm}^{-1}$) devido às cadeias alifáticas do SDS. A característica mais importante neste espectro é o aparecimento de uma banda referente a um $\nu(\text{C=O})$ em 1730 cm^{-1} , sugerindo modificações estruturais da proteína promovidas pelo SDS.

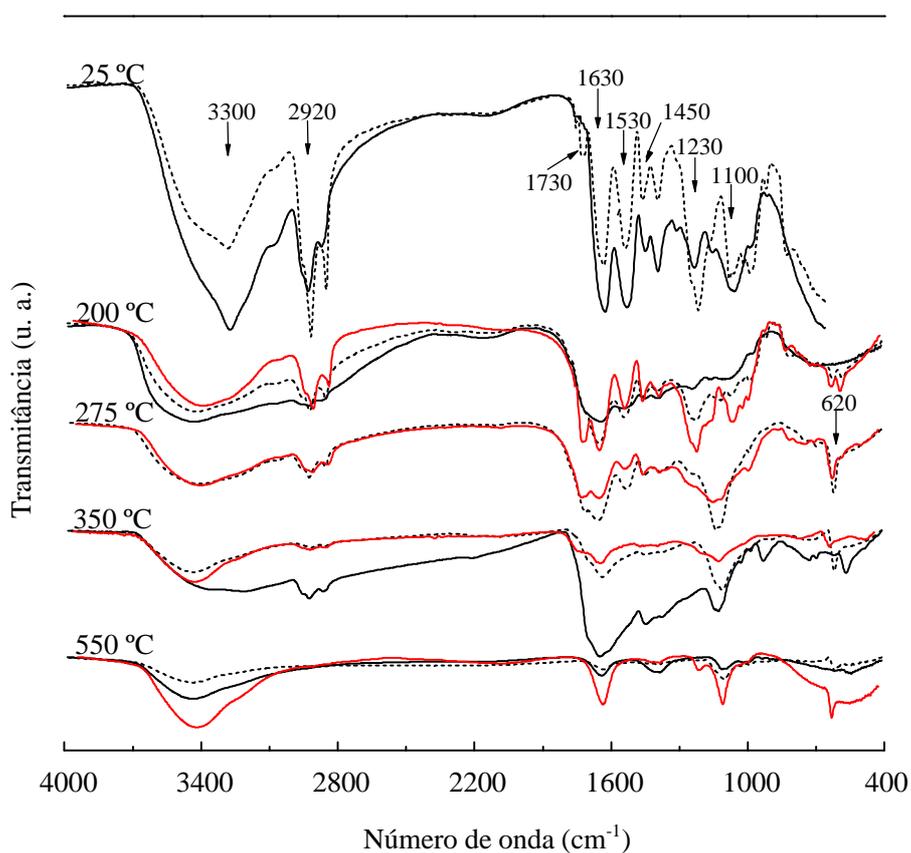


Figura 21. Espectros FTIR para os resíduos sólidos de filmes de SPI ($\frac{3}{4}$), SPI/SDS 63/37 (----) e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 ($\frac{3}{4}$) durante a degradação térmica em diferentes temperaturas.

As absorbâncias verificadas para as amostras aquecidas até 200 °C diminuíram consideravelmente em todos os casos, e a banda relativa ao estiramento amida I aparece como uma combinação de bandas entre um ombro em ca. 1680 cm⁻¹ e um máximo em ca. 1630 cm⁻¹. Resultados semelhantes foram anteriormente encontrados por Moharram *et al.* [39] para amostras de proteína de soja aquecidas a 240 °C. Segundo os autores, a presença de uma banda intensa entre 1630 – 1637 cm⁻¹ e uma banda moderada/fraca entre 1680 – 1685 cm⁻¹ é devida a estrutura do tipo pregueada, enquanto que a vibração amida I de estruturas desordenadas localizar-se-ia em 1660 cm⁻¹ [39].

Embora se constata com clareza que a estrutura da macromolécula em estudo se altera quando aquecida a 200 °C, esta mudança não é acompanhada por processos de perda massa. No entanto, aumentando-se a temperatura para 275 °C, a qual corresponde a temperatura de máxima velocidade de degradação dos filmes de SPI/SDS 67/37 (Figura 16C) e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 (Figura 18C) (filmes de SPI não exibem perda de massa nesta temperatura; Figura 14), as bandas associadas ao $\nu(\text{C-H})$ (2980 – 2850 cm⁻¹) e ao $\delta(\text{N-H})$ (amida II em ca. 1530 cm⁻¹) tiveram sua intensidade comparativamente diminuída. O decréscimo na absorção referente ao $\delta(\text{N-H})$ dos resíduos sólidos está de acordo com a liberação de NH_{3(g)} observada em 275 °C (discussão abaixo). Ao mesmo tempo, o fato de que a banda correspondente a vibração amida I deslocou-se para números de onda superiores confirma a existência de rearranjos estruturais envolvendo ligações peptídicas, tal como a dissociação em subunidades. Portanto, para os filmes formados por SPI/SDS submetidos ao aquecimento em 275 °C há a degradação térmica de ambos os componentes: SDS, visto que quanto maior a [SDS] mais intenso é o pico na curva de DTG (Figura 16), e SPI, uma vez que há liberação de NH_{3(g)}. Os mesmos comentários são válidos também para o sistema ternário SPI/SDS/PCL-T em 275 – 280 °C. Neste caso, entretanto, e de acordo com os dados mostrados na Figura 19, a decomposição do polímero PCL-T deve ocorrer em paralelo. Persenaire *et al.* [40] propuseram recentemente que a PCL degrada-se termicamente gerando CO_{2(g)}, H₂O_(g), ácido hexanóico_(g), e seu monômero ϵ -caprolactona_(g). As características dos espectros de FTIR apresentados por estes autores coincidem com as observadas neste trabalho. Naquele caso, entretanto, informações complementares extraídas de espectros de massa dos gases liberados permitiram à Persenaire *et al.* [40] inferir acerca a natureza química de outros produtos da reação não identificados neste trabalho (i.e., ácido hexanóico e ϵ -caprolactona).

Em 350 °C, as bandas de absorção referentes ao $\nu(\text{C-H})$ na faixa de 2980 – 2850 cm^{-1} , à $\delta(\text{C-H})$ em 1450 cm^{-1} e a banda em ca. 1100 cm^{-1} permaneceram no espectro dos resíduos sólidos de filmes de SPI, indicando que o mecanismo da reação de degradação compreende primeiramente a quebra de ligações mais fracas como C-N, C(O)-NH, C(O)-NH₂ e -NH₂ [24,25], as quais estão presentes em diversas funções químicas encontradas na SPI, de forma análoga à degradação de filmes à base de proteína de trigo [24]. Esta hipótese está de acordo com os espectros registrados para os produtos gasosos formados (Figura 22). Em adição, nesta faixa de temperatura os filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T demonstraram espectros correspondentes a resíduos sólidos mais degradados, confirmando a menor estabilidade térmica dos mesmos em comparação aos filmes de SPI.

Finalmente, os espectros registrados para os filmes submetidos à temperatura de 550 °C contêm poucas informações, caracterizando a quase completa degradação térmica da amostra.

A Figura 22 mostra os espectros FTIR dos produtos gasosos liberados durante a degradação térmica de filmes de SPI, SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 submetidos à temperatura correspondente a máxima velocidade de degradação (T_{MAX}). Os gases formados a partir da degradação dos filmes de SPI e SPI/SDS/PCL-T revelaram bandas de absorção características de CO_{2(g)} (2370, 2340 e 670 cm^{-1}), CO_(g) (2200 – 2000 cm^{-1}), C=O (1730 cm^{-1}), NH_{3(g)} (970, 930 e 3335 cm^{-1}), e $\nu(\text{C-H})$ (2950 – 2850 cm^{-1} ; hidrocarbonetos saturados). As bandas vibracionais em ca. 1625 cm^{-1} ($\nu(\text{C=C})$) e 670 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$) sugerem a liberação de hidrocarbonetos insaturados.

A degradação térmica dos filmes SPI/SDS 67/37 produz compostos gasosos cujas bandas são características de CO_{2(g)}, NH_{3(g)} e hidrocarbonetos saturados. Porém, neste caso as bandas associadas às vibrações dos grupos =CH₂ e C=O e de CO_(g) praticamente não aparecem. A banda em 1375 cm^{-1} é atribuída à deformação angular de grupos -CH₃ oriundos da degradação das cadeias alifáticas de SDS.

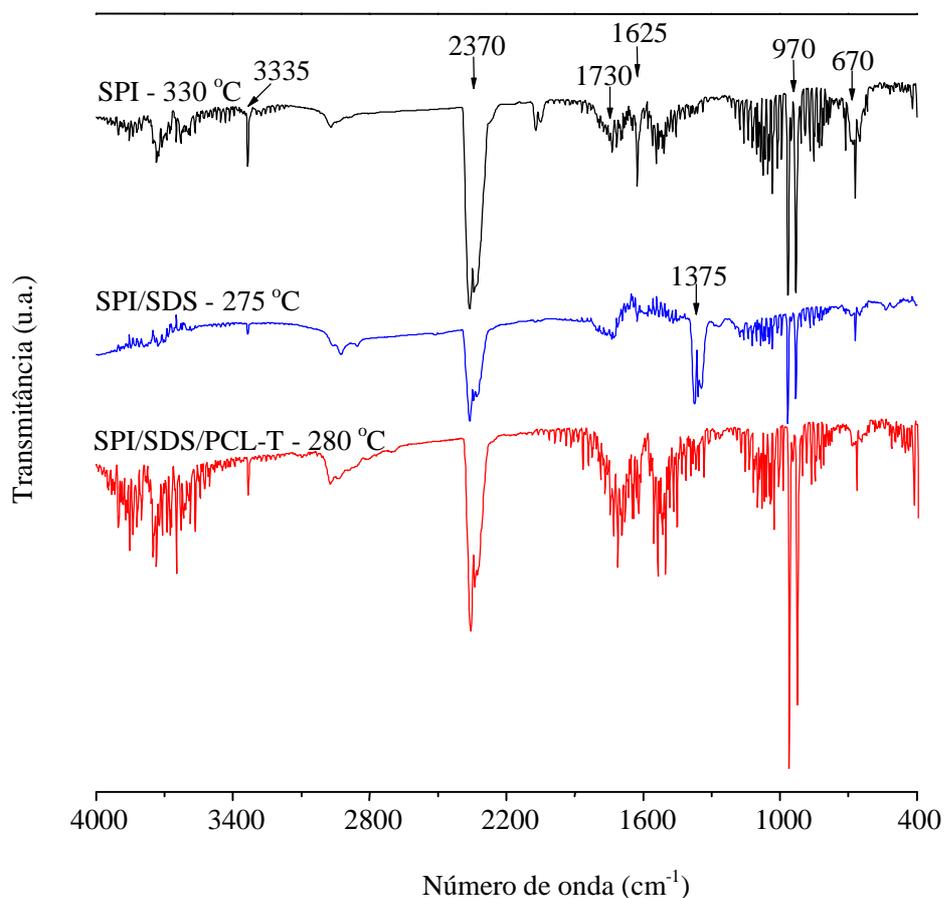


Figura 22. Espectros FTIR para os produtos gasosos formados a partir filmes de SPI ($\frac{3}{4}$), SPI/SDS 63/37 ($\frac{3}{4}$) e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39 ($\frac{3}{4}$) durante a degradação térmica na temperatura de máxima velocidade de degradação.

IV.3. Propriedades Mecânicas

Devido à complexidade da estrutura da proteína, as propriedades mecânicas dos (bio)filmes contendo SPI são sensíveis aos diferentes níveis de interações intra- e intermoleculares, e conseqüentemente, da concentração de cada componente (SPI, SDS, PCL-T e H₂O – umidade).

A Figura 23 mostra curvas representativas de tensão vs. deformação para filmes de SPI/SDS em 75 % UR e SPI/SDS/PCL-T em 40% e 75% UR. Comparando-se os resultados

registrados para filmes de SPI/SDS em 75 % UR (verde) e SPI/SDS/PCL-T em 75 (azul), observa-se um efeito proeminente da PCL-T sobre as propriedades mecânicas dos filmes, notadamente em termos de tensão (T) e alongamento na ruptura (L) e módulo de Young. Adicionalmente, as diferenças entre os perfis registrados para filmes de SPI/SDS/PCL-T em 40 % (vermelho) e 75% (azul) revelam com clareza que a umidade relativa à qual os filmes são expostos é um aspecto determinante das propriedades do material.

A Tabela 3 resume a dependência das propriedades mecânicas em função da composição e da umidade relativa dos filmes. É importante ressaltar que os parâmetros medidos para os filmes de SPI pura estão de acordo com aqueles publicadas por Mo e Sun [29]. Nesta etapa do trabalho, as medidas foram realizadas em três umidades relativas diferentes, salvo para os espécimes quebradiços.

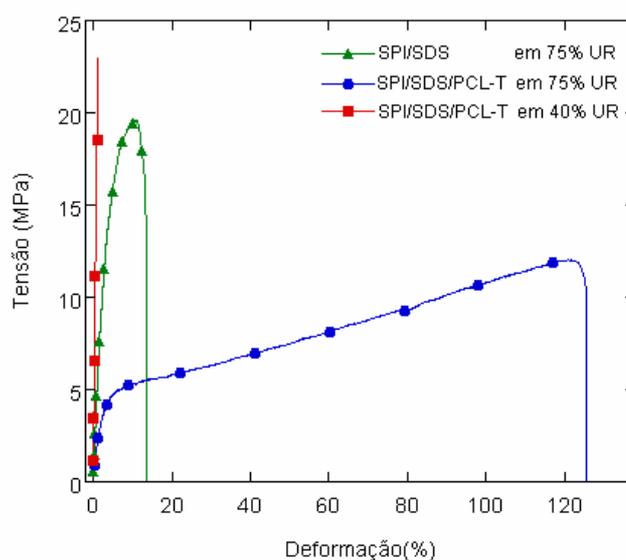


Figura 23. Curvas representativas de tensão vs. deformação para filmes de SPI/SDS em 75 % de UR e SPI/SDS/PCL-T em 75 e 40 % de UR.

A Figura 24 mostra a variação do módulo de Young (dados extraídos da Tabela 3) em função da composição para filmes de SPI/SDS (Figura 24A) e de SPI/SDS/PCL-T (Figura 24B), acondicionados em diferentes umidades relativas (UR). No primeiro caso (filmes de SPI/SDS - Figura 24A), os resultados obtidos para UR de 75% demonstram que os valores do

módulo de Young tendem a estabilizar-se em ca. 800 MPa para $[SDS] \geq 13\%$, após um decréscimo inicial a partir de 1424 MPa (filmes de SPI). Entretanto, o efeito da presença de SDS torna-se gradativamente menos significativo à medida que a UR decresce (i.e., $UR \leq 54\%$). Enquanto que para UR de 54% seu valor inicialmente diminui de 1720 MPa (filmes de SPI) até 985 MPa para filmes de SPI/SDS 80/20, o comportamento oposto pode ser verificado para $[SDS] > 20\%$. Quando acondicionados a uma UR de 40%, as propriedades mecânicas dos filmes praticamente não sofrem alteração mediante o aumento da $[SDS]$.

Como citado anteriormente, a interação entre o SDS e SPI ocorre simultaneamente nos domínios hidrofílicos e hidrofóbicos da macromolécula, rompendo a continuidade da respectiva matriz e reduzindo a interação entre as cadeias peptídicas. Em princípio, este cenário implicaria em materiais menos rígidos (menos quebradiços) [29]. Em contraste, os dados coletados neste trabalho mostram que tal efeito depende da presença de umidade no filme (Tabela 3 e Figura 24A), sendo observado somente para $UR = 75\%$. A natureza altamente higroscópica da SPI é favorecida pela presença de resíduos de aminoácidos polares, fazendo com que moléculas de água penetrem facilmente na estrutura interna do biopolímero, a qual, presumivelmente, já se encontra expandida. Neste sentido, as ligações de hidrogênio e as interações dipolo-dipolo entre cadeias macromoleculares são drasticamente reduzidas, caracterizando assim o efeito plastificante da água.

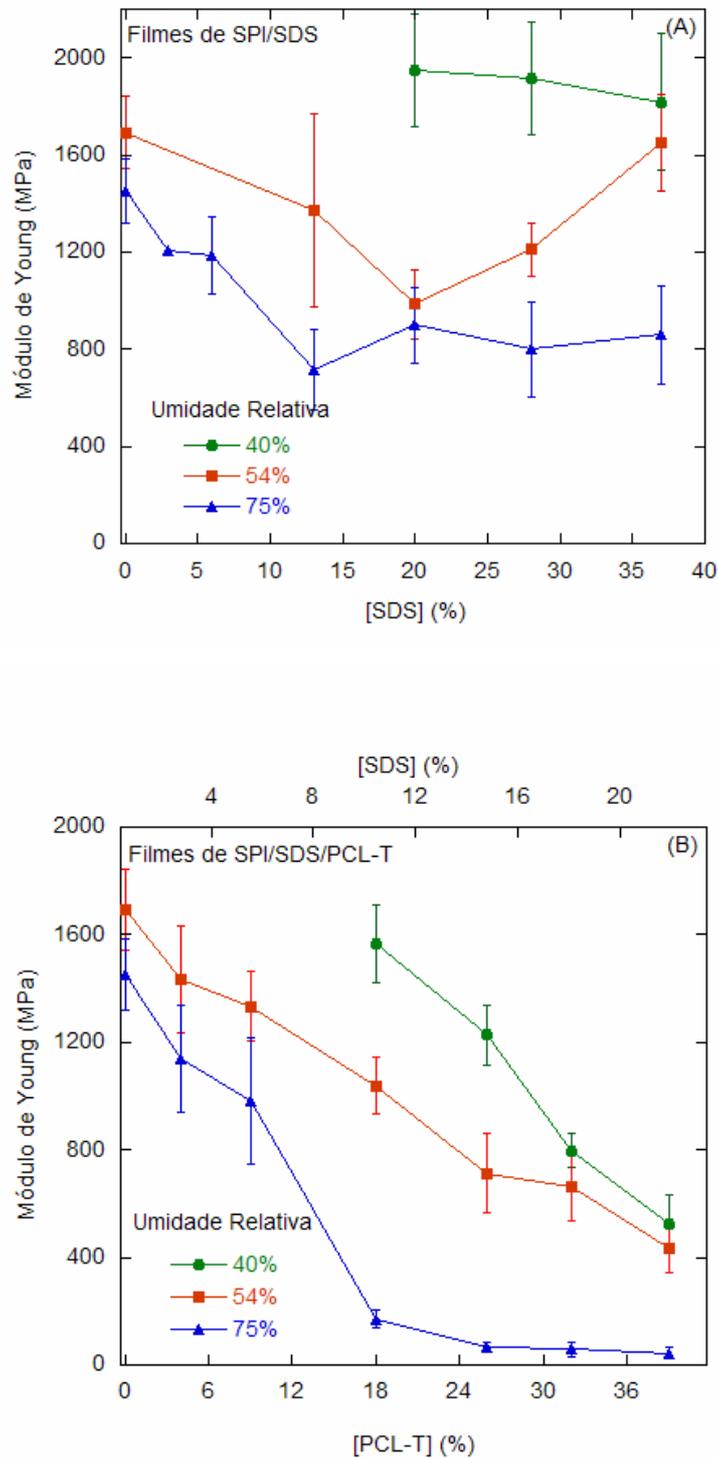


Figura 24. Variação do módulo de Young em função da composição para filmes de SPI/SDS (A) e de SPI/SDS/PCL-T (B), acondicionados em diferentes umidades relativas (UR). As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

Tabela 3. Módulo de Young, tensão na ruptura (T) e alongamento na ruptura (L) medidos em função da composição dos filmes acondicionados em diferentes umidades relativas.

Filme	Humidade Relativa (%)								
	40			54			75		
	T (MPa)	A (%)	Módulo de Young (MPa)	T (MPa)	A (%)	Módulo de Young (MPa)	T (MPa)	A (%)	Módulo de Young (MPa)
SPI	-	-	-	17±3	2.10±0.8	1726±152	14±5	1.5±0.8	1424±131
SPI*	-	-	-	-	-	-	15±3	1.8±0.5	1545±124
SPI/SDS									
94/06	-	-	-	-	-	-	19±3	2.6±0.9	1188±159
87/13	-	-	-	9±5	1.0±1.4	1409±396	11±2	11.3±6.6	717±167
80/20	21±5	2.2±0.8	1950±231	2±2	6.2±3.1	985±145	10±4	6.3±2.3	899±157
72/28	19±4	2.2±0.9	1914±233	7±2	3.8±2.1	1173±111	10±3	10.0±4.1	800±196
63/37	16±6	1.8±0.7	1819±282	23±4	2.5±1.2	1718±201	12±2	6.3±3.6	858±199
63/37*	-	-	-	-	-	-	12±3	8.8±5.5	900±117
SPI/SDS/PCL-T									
93/03/04	-	-	-	13±4	3.8±1.5	1433±200	15±3	4.5±1.6	1138±200
85/06/09	-	-	-	12±2	3.7±1.2	1333±129	11±3	10.4±8.7	982±235
72/10/18	13±2	1.4±0.6	1566±143	12±4	3.8±1.0	1038±107	6±2	121.4±32.1	171±41
60/14/26	10±2	1.2±0.3	1228±112	9±3	5.6±2.1	713±148	2±1	84.0±18.7	66±17
49/19/32	7±1	1.5±0.3	798±063	6±2	4.7±2.2	661±123	3±1	85.0±17.9	58±29
39/22/39	5±2	4.0±1.4	526±105	3±1	6.9±1.9	436±91	1±1	91.5±18.0	44±20
39/22/39*	-	-	-	-	-	-	4±2	135.4±32.1	48±15

* Filmes aquecidos a 70°C durante 01 hora após a evaporação do solvente.

Para baixas URs (principalmente 40%), entretanto, o efeito do SDS é menor, indicando que as cadeias protéicas expandidas (devido à presença de SDS) por si só não tem influência notória nas propriedades mecânicas dos filmes, se seu efeito for considerado separadamente do efeito da umidade relativa.

Os filmes contendo PCL-T exibiram propriedades mecânicas completamente distintas em comparação àquelas descritas até o presente momento. De acordo com dados registrados para UR = 75% na Figura 24B, o módulo de Young decresce abruptamente desde 1424 MPa (filmes de SPI) até apenas 171 MPa no caso dos espécimes SPI/SDS/PCL-T 72/10/18, e este valor diminui posteriormente para 44 MPa para [PCL-T] superiores. Em geral, os mesmos comentários também se aplicam aos valores de módulo de Young obtidos em 54% e 40%, exceto que nestes casos a diminuição ocorre gradativamente em função da [PCL-T].

A Figura 25 mostra a variação do alongamento na ruptura (L) em função da [PCL-T] para diferentes URs. Para filmes acondicionados em UR de 75%, os valores de A aumentam rapidamente até ca. 90% quando [PCL-T] \geq 18%, sendo que o comportamento oposto é verificado em termos da tensão na ruptura (T). No entanto, para RH \leq 54% os valores de A são comparáveis àqueles obtidos para filmes de SPI/SDS, enquanto que um pequeno incremento ocorre aparentemente nos valores de T em presença de PCL-T (Tabela 3).

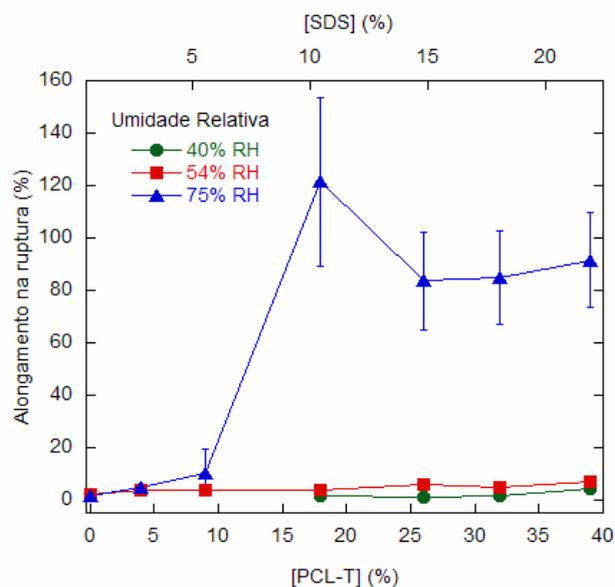


Figura 25. Variação do alongamento na ruptura medido em função da composição dos filmes de SPI/SDS/PCL-T para diferentes umidades relativas. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

Os resultados mostrados anteriormente para os filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T sugerem que as propriedades mecânicas desses materiais à base de SPI podem ser modificadas pelo ajuste das quantidades de SDS, PCL-T e umidade relativa. Características típicas de um material plástico em curvas de tensão vs deformação foram observadas para filmes nos quais a presença de PCL-T é de no mínimo 18% em umidade relativa de 75% (Figura 24). A PCL-T é um plastificante com grupamentos hidroxilas que lhe conferem caráter hidrofílico moderado com habilidade para participar nas ligações de hidrogênio intermoleculares, e portanto, reduz as interações polímero-polímero com conseqüente acréscimo na mobilidade da cadeia (isto é, menor módulo de Young e maior alongamento na ruptura). Além disto, a PCL-T pode ainda interagir com os domínios hidrofóbicos da SPI através das cadeias alifáticas. Contudo, a presença de moléculas de água parece ter papel fundamental na determinação da estrutura do filme e, conseqüentemente, nas propriedades dos mesmos, conforme evidenciado na Tabela 3 onde em 75% de umidade relativa o efeito plastificante da PCL-T e da água no comportamento mecânico dos filmes à base de SPI é marcadamente maior que a soma das contribuições individuais.

Já foi descrito na literatura que a formação de ligações cruzadas em materiais à base de proteínas pode ocorrer sob certas condições, basicamente devido à presença de grupos reativos de aminoácidos presentes na proteína, tais como aminas, hidroxilas, carbonilas e sulfidrilas [24]. Kim *et al.* [41] reportaram que os valores de tensão e alongamento na ruptura e a quantidade de água absorvida pelos filmes de SPI foram significativamente aumentados através de aquecimento a 60°C, devido à formação de ligações cruzadas inter- e intramoleculares.

Durante os experimentos do presente estudo, foi observado que os resultados dos testes mecânicos dependem do tempo decorrido após a preparação dos filmes, pois os mesmos mostram-se variáveis até uma semana após a preparação das amostras. Desta forma, os resultados mostrados anteriormente referem-se a filmes de SPI analisados após uma semana, no mínimo, de sua preparação. Neste período, entretanto, as propriedades mecânicas sofreram mudanças consideráveis.

A Figura 26 mostra a variação da tensão na ruptura (T) e do módulo de Young para filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T em função do tempo decorrido após a preparação dos mesmos. Para uma maior clareza dos resultados, os parâmetros apresentados foram normalizados em relação aos valores iniciais (dia 2), ou seja $T_{\text{normalizada}} = T/T_{\text{inicial}}$ e $\text{Módulo de Young}_{\text{normalizado}} = \text{Módulo de Young} / \text{Módulo de Young}_{\text{inicial}}$, os quais estão sumarizados na Tabela 4. Na Figura 26 fica evidente que os valores de tensão na ruptura (T) e de módulo de Young dos filmes formados por SPI/SDS permanecem constantes durante todo o período estudado (T ~ 11 MPa; módulo de Young ~ 840 MPa). Em contraste, os filmes formados por SPI/SDS/PCL-T apresentam um acréscimo óbvio em termos de T (de 0,6 para 3,0 MPa) e de módulo de Young (de 7,5 para 53 MPa) durante os primeiros 4-5 dias, permanecendo constante após esse período. Essa variação pode ser atribuída à formação de ligações cruzadas no filme, já que este processo foi acelerado pelo aquecimento a 70 °C durante uma hora do filme recém formado (veja resultados na tabela 3). Além disso, os filmes de SPI e SPI/SDS/PCL-T apresentaram-se insolúveis em água após o envelhecimento, confirmando a formação de ligações internas. Por outro lado, os filmes formados por SPI e SDS, sem adição de PCL-T, não exibiram rearranjos, permanecendo estáveis e solúveis em água mesmo uma semana após sua preparação.

Tabela 4. Variação da Tensão na Ruptura (T) e do Módulo de Young em função do tempo decorrido após a preparação dos filmes de SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39.

Filmes	Tempo (dias)	T (MPa)	T normalizada	Módulo de Young (MPa)	Módulo de Young normalizado
SPI/SDS	2	12	1.0	915	1.0
	3	10	0.8	836	0.9
	4	11	0.9	668	0.7
	5	8	0.7	827	0.9
	8	12	1.0	948	1.0
SPI/SDS/PCL-T	2	0.6	1.0	7.5	1.0
	3	2	3.3	5.8	0.8
	4	3	5.0	16.7	2.2
	5	3	5.0	52.6	7.0
	8	3	5.0	55.3	7.4

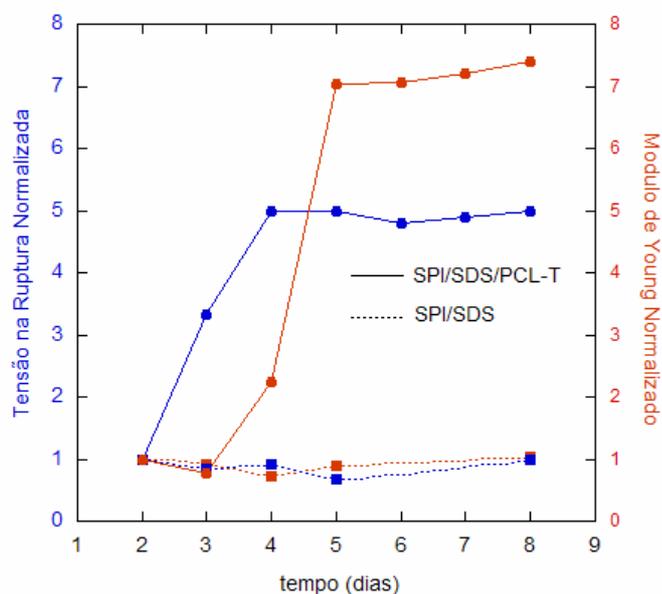


Figura 26. Dependência do módulo de Young e da tensão na ruptura com o tempo decorrido após a preparação dos filmes a base de SPI (SPI/SDS 63/37 e SPI/SDS/PCL-T 39/22/39). As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

IV.4. Determinação da quantidade de umidade presente nos filmes

Os resultados apresentados anteriormente evidenciam claramente o efeito da umidade nas propriedades dos filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T. Porém, a análise da capacidade dos filmes de absorver água pela simples variação da umidade relativa não se mostra muito evidente. Dessa forma, para examinar essa propriedade física, os filmes foram dispostos em um dessecador durante 4 dias (ao invés do controle de umidade relativa) antes da determinação da quantidade de umidade restante, a qual é mostrada na Figura 27 para os filmes de SPI, SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T.

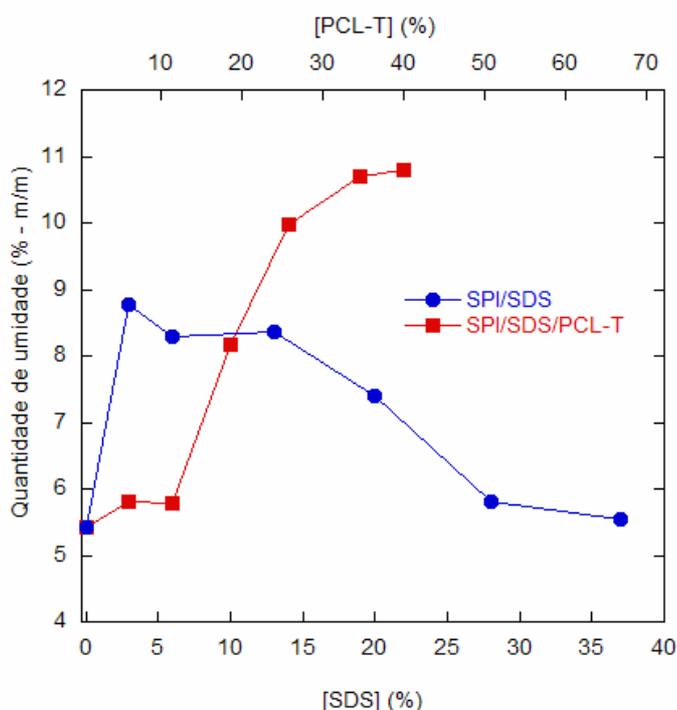


Figura 27. Variação da quantidade de umidade restante em função da composição para filmes de SPI/SDS e SPI/SDS/PCL-T acondicionados em dessecador a vácuo durante 4 dias. As linhas contínuas unem os pontos experimentais para melhor visualização.

Os experimentos revelaram que os filmes formados apenas por SPI apresentam cerca de 5,5 % de umidade em massa. Quando o SDS é adicionado esses valores inicialmente crescem até cerca de 8,8% para $[\text{SDS}] = 3\%$, aparentemente devido a exposição dos grupos polares hidrofílicos da estrutura protéica, os quais interagem com as moléculas de água. Acima desta concentração de SDS, a quantidade de umidade presente diminui até atingir o valor inicial. Provavelmente, isso ocorre por causa das partes hidrofóbicas das moléculas de SDS, que impedem a água de se acomodar na estrutura do filme [32]. Portanto, a presença de SDS possivelmente reduz a sensibilidade do filme protéico às mudanças de umidade. Essas observações estão de acordo com os resultados descritos para as propriedades mecânicas dos filmes de SPI/SDS (Figura 24A).

Por outro lado, os filmes formados por SPI/SDS/PCL-T apresentaram uma elevada capacidade de retenção de água para $[\text{PCL-T}] \geq 18\%$ ($[\text{SDS}] \geq 10\%$), enquanto que para baixas concentrações de plastificante a quantidade de umidade é similar àquela encontrada para filmes formados apenas por SPI. Esse comportamento pode ser explicado considerando que a PCL-T é uma molécula com grupamentos hidroxilas que lhe conferem caráter hidrofílico e portanto, em baixas concentrações, onde a estrutura da proteína já apresenta grupamentos hidrofílicos expostos, as moléculas de água não são retidas pelo fato de que a PCL-T substitui formando ligações de hidrogênio intermolecular com a proteína. Acima de certa concentração de PCL-T ($> 9\%$), a absorção é favorecida devido ao aumento de sítios hidrofílicos.

IV.5. Morfologia

A Figura 28 mostra micrografias obtidas por MEV da superfície (Figura 28A) e da seção transversal (Figura 28B) dos biofilmes formados por SPI. Esses espécimes são caracterizados pela presença de pequenas áreas heterogêneas em suas superfícies (Figura 28A), originadas no processo de evaporação do solvente, e pela presença de uma fase densa (Figura 28B), a qual é inicialmente bem compactada e se torna gradativamente menos organizada com a evaporação do solvente, conforme indicado pela seta na Figura 28B.

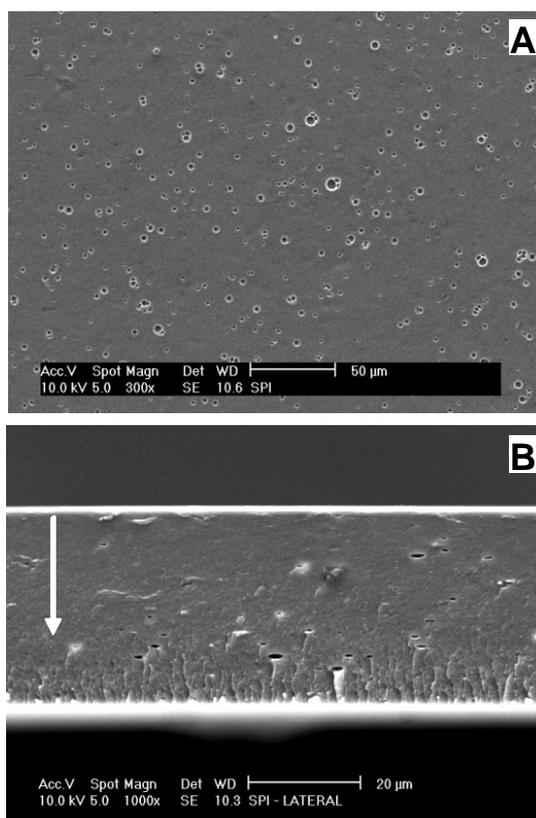


Figura 28. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície (A) e da seção transversal (B) dos biofilmes de SPI.

Com a adição de SDS, os filmes obtidos tornaram-se progressivamente mais porosos e com tendência a separação de fases em altas concentrações de SDS. A Figura 29 mostra as micrografias obtidas por MEV da superfície e da seção transversal dos filmes de SPI/SDS contendo diferentes quantidades de SDS. Com baixas concentrações de SDS (94/06 SPI/SDS – Figura 29A–B), as características morfológicas permanecem praticamente inalteradas se comparadas às observadas para os filmes de SPI. Em contraste, uma superfície homogênea (Figura 29C) e uma fase contínua (Figura 29D) são observadas para os filmes formados por SPI/SDS nas proporções 87/13. Acima de certa concentração de SDS (20%), a porosidade do filme aumenta (Figuras 29F e 29H) e as micrografias da superfície revelam a presença de regiões brancas como a indicada pela seta na Figura 29G. O ponto de fusão medido para o sólido branco coletado da superfície do filme foi característico do SDS (200 °C).

As micrografias dos filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes proporções entre os componentes são mostradas na Figura 30. Para baixas quantidades de PCL-T e SDS (SPI/SDS/PCL-T 85/06/09 – Figuras 30A-B), as morfologias das superfícies e das seções

transversais se apresentam muito similares às observadas nas Figuras 28A-B (SPI) e Figuras 29A-B (SPI/SDS). Para $[PCL-T] = 18\%$ (concentração na qual ocorre a maior mudança em termos de propriedades mecânicas) os filmes apresentam uma superfície rugosa (Figura 30C) e moderadamente porosos (Figura 30D). Uma transformação em uma matriz completamente porosa ocorre para $[PCL-T] > 18\%$ como mostra as Figuras 30F e 30H, onde duas fases são identificadas na superfície do filme, conforme mostrado na Figura 30E. Experimentalmente observou-se que uma das fases superficiais corresponde ao plastificante e, portanto, o aumento da porosidade dos filmes de SPI/SDS/PCL-T pode ser atribuída à migração do plastificante do filme para a superfície do filme. As forças que conduzem esse processo é o caráter relativamente hidrofóbico da PCL-T e seu tamanho relativamente grande, que aparentemente impedem as moléculas de se integrarem completamente a matriz quando grandes quantidades são utilizadas [9].

De fato, uma análise um pouco mais cuidadosa dos filmes com quantidade de PCL-T superior a 18% revela que na parte inferior do filmes estão presentes regiões ricas em PCL-T, enquanto que, na superfície existe um sólido branco que corresponde ao SDS. Apesar desta observação, a combinação SDS/PCL-T realmente tem aplicação como um plastificante, promovendo melhoria nas propriedades mecânicas sem separação de fases, desde que, a quantidade de PCL-T presente nos filmes seja superior a 18%.

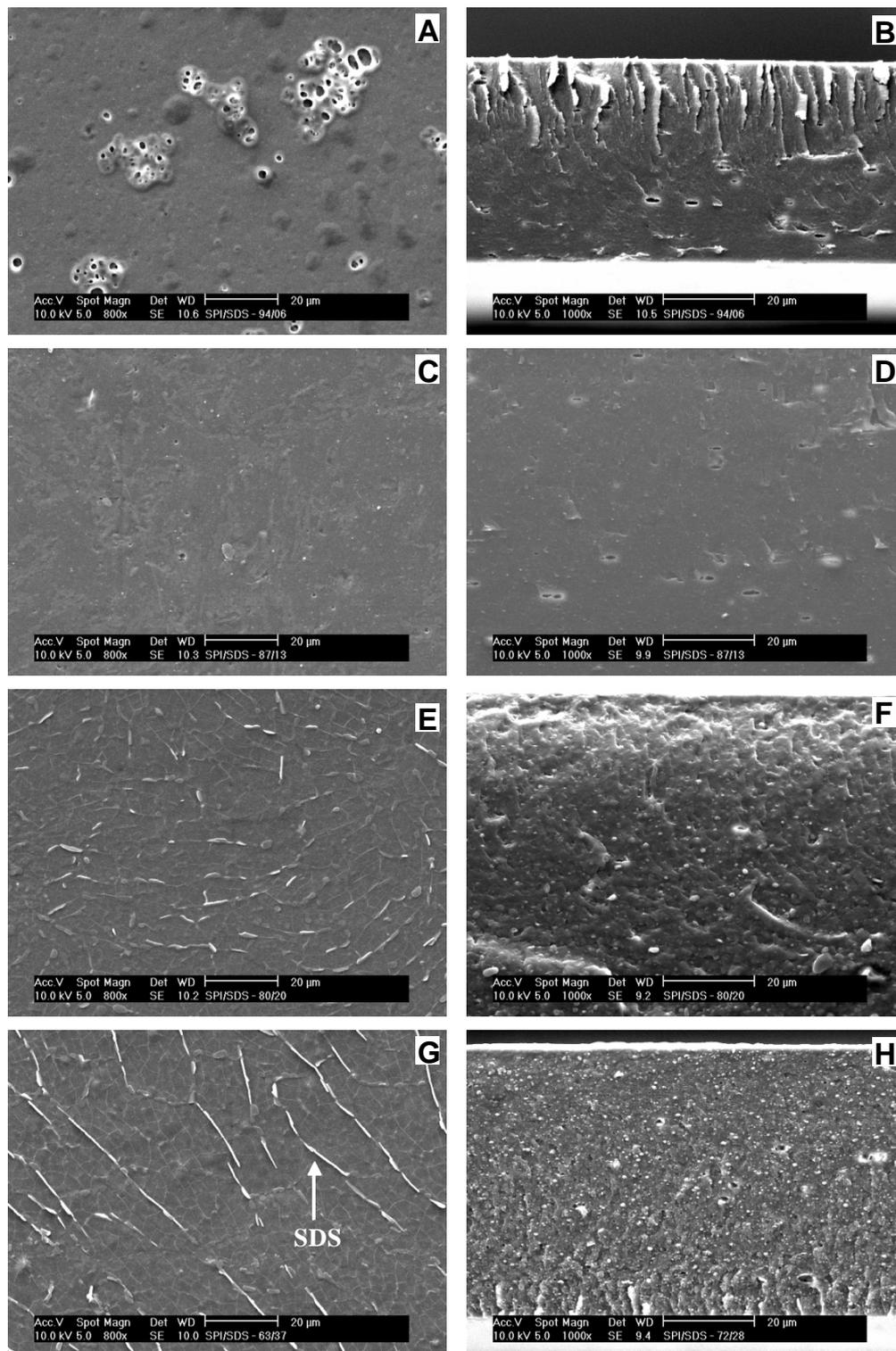


Figura 29. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície (à esquerda) e da seção transversal (à direita) para filmes de SPI/SDS com diferentes composições: 94/06 (A,B); 87/13 (C,D); 80/20 (E,F); 72/28 (G,H).

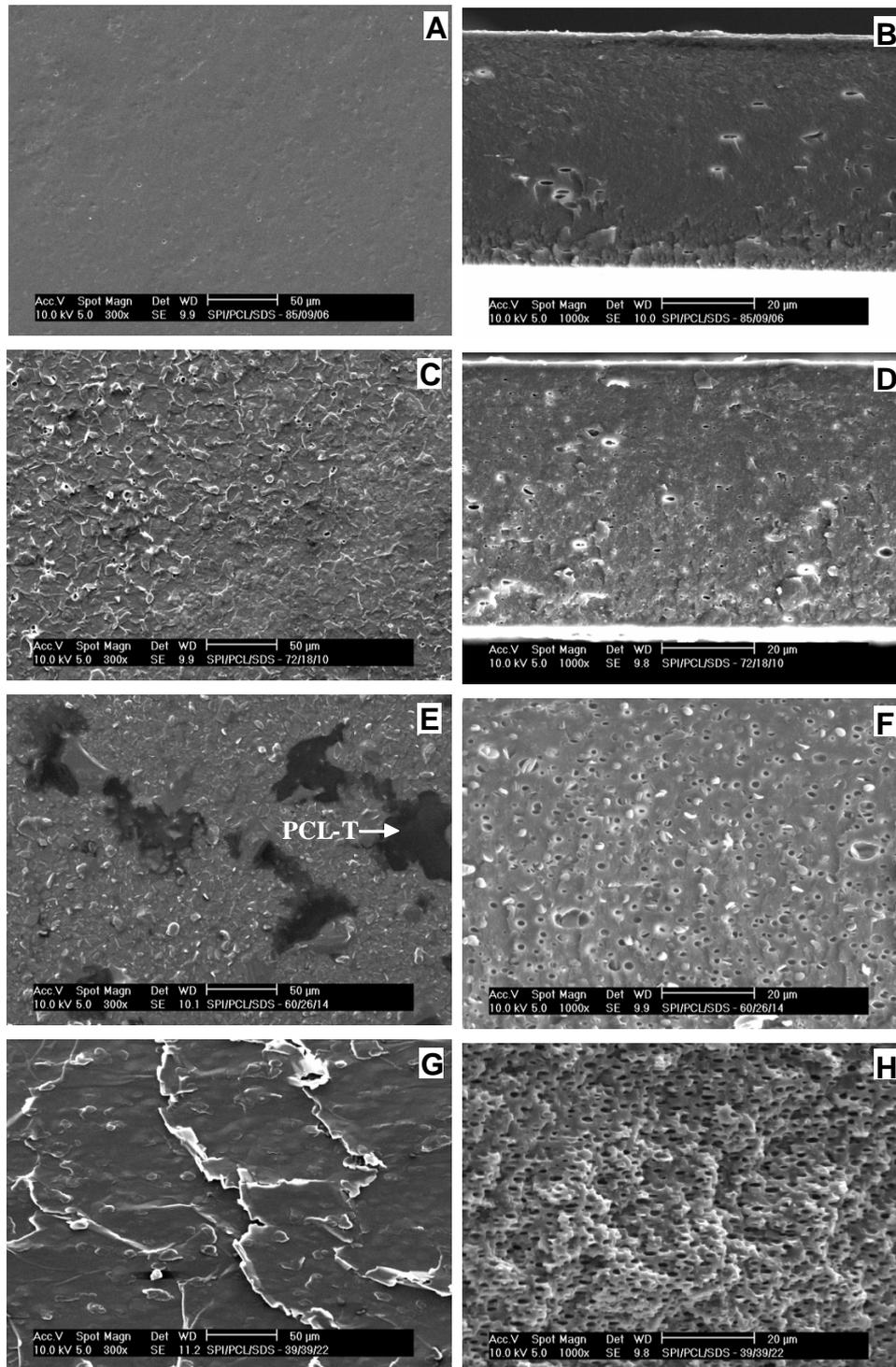


Figura 30. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície (à esquerda) e da seção transversal (à direita) para filmes de SPI/SDS/PCL-T com diferentes composições: 85/06/09 (A,B); 72/10/18 (C,D); 60/14/26 (E,F); 39/22/39 (G,H).

CONCLUSÃO

No presente estudo, as propriedades térmicas e mecânicas e a morfologia de filmes à base de SPI contendo diferentes quantidades de SDS e do plastificante PCL-T foram avaliadas. Conforme os resultados de fluorescência, utilizados no estudo das soluções formadoras dos filmes, as mudanças na estrutura da proteína estão relacionadas à presença de micelas de SDS na solução, as quais interagem eletrostaticamente e hidrofobicamente com a proteína. As análises de DSC mostraram que os filmes formados por SPI/SDS apresentam valores de T_g praticamente constantes ($T_g = 151\text{ }^\circ\text{C}$), enquanto que os filmes de SPI/SDS/PCL-T apresentam um considerável decréscimo nos mesmos ($T_g = 135\text{ }^\circ\text{C}$), refletindo o efeito plastificante da PCL-T.

A degradação térmica dos filmes formados por SPI ocorre em uma única etapa, com início em $292\text{ }^\circ\text{C}$. Quando o SDS é adicionado ao sistema, a estabilidade térmica decresce e a temperatura inicial de degradação tem um decréscimo de até $29\text{ }^\circ\text{C}$. O perfil da variação da energia de ativação (E) em função da perda de massa teve um comportamento similar, e seus valores variam de 160 kJ mol^{-1} nos filmes formados apenas por SPI para 128 kJ mol^{-1} nos filmes formados por SPI/SDS – 67/37. O decréscimo na estabilidade térmica para o sistema SPI/SDS tem sido atribuído a mudanças promovidas pelo SDS na estrutura da proteína formadora do filme. Os sistemas ternários formados por SPI/SDS/PCL-T exibiram basicamente o mesmo perfil de degradação térmica em comparação aos sistemas binários SPI/SDS. Todavia, foram observados deslocamentos importantes da temperatura inicial de degradação e da temperatura de máxima velocidade de degradação. Nitidamente, a baixa estabilidade térmica da PCL-T tem implicações diretas na diminuição da estabilidade térmica do material resultante. Pode-se observar ainda, que os valores de E decrescem à medida que a [PCL-T] e [SDS] aumentam, corroborando a tendência mencionada anteriormente.

Os espectros de FTIR dos produtos gasosos formados durante a degradação térmica apresentaram bandas típicas de CO_2 , CO , NH_3 e outros compostos insaturados, sugerindo que

o mecanismo da reação envolve, ao mesmo tempo, a ruptura das ligações C–N, C(O)–NH, C(O)–NH₂, –NH₂ e C(O)–OH presentes na proteína.

Os resultados dos ensaios mecânicos registrados evidenciaram o efeito proeminente da PCL-T e da umidade relativa sobre as propriedades mecânicas dos filmes de SPI/SDS/PCL-T. Estes resultados sugerem que as propriedades mecânicas desses materiais à base de SPI podem ser modificadas pelo ajuste das quantidades de SDS, PCL-T e da umidade relativa. Foi observado, ainda, que os resultados dos testes mecânicos dependem do tempo decorrido após a preparação dos filmes, pois os mesmos mostram-se variáveis até uma semana após a preparação das amostras. Essa variação pode ser atribuída à formação de ligações cruzadas no filme.

Nas análises por microscopia eletrônica de varredura observou-se que com a adição de SDS aos filmes de SPI, os mesmos tornaram-se progressivamente mais porosos e com tendência a separação de fases em altas concentrações de SDS. Com a adição de PCL-T, o filme torna-se mais poroso, apresentando em sua parte inferior regiões ricas em PCL-T, enquanto que, na superfície verifica-se a presença de um sólido branco que corresponde ao SDS. Apesar desta observação, a combinação SDS/PCL-T tem um efeito plastificante importante, promovendo melhoria nas propriedades mecânicas sem separação de fases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kaplan, D. L. Introduction to biopolymers from renewable resources. In *Biopolymers from renewable resources*; D. L. Kaplan, Ed.; Springer: Berlin, 1998; pp 1-29.
- [2] Lodha, P.; Netravali, A. N. Thermal and mechanical properties of environment-friendly 'green' plastics from stearic acid modified-soy protein isolate. *Ind Crops Prod* **2005**, *21*, 49-64.
- [3] Site do Ministério da Agricultura, www.agricultura.gov.br, acessado em 29/11/2004.
- [4] Koster, P.; De Graaf, L. A.; Vereijken, J. M. Application of cereal proteins in technical applications. In *Cereals: Novel Uses and Processes*; G. M. Cambell; C. Webb and S. L. Mc Knee, Eds.; Plenum Publishers: New York, 1997; pp 107-116.
- [5] Swain, S. N.; Biswal, S. M.; Nanda, P. K.; Nayak, P. L. Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. *J Polym Environ* **2004**, *12*, 35-42.
- [6] Ly, V. T.-P.; Johnson, L. A.; Jane, J. Soy protein as a biopolymer. In *Biopolymers from renewable resources*; D. L. Kaplan, Ed.; Springer: Berlin, 1998; pp 144-176.
- [7] Kumar, R.; Choudhary, V.; Mishra, S.; Varma, I. K.; Mattiason, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. *Ind Crops Prod* **2002**, *16*, 155-172.
- [8] Mohamed, A.; Xu, J. Effect of ionic strength and pH on the thermal and rheological properties of soy protein-amylopectin blend. *Food Chem* **2003**, *83*, 227-236.
- [9] Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Ind Crops Prod* **2003**, *18*, 91-100.
- [10] Tkaczyk, A. H.; Otaigbe, J. U.; Ho, K.-L. G. Bioabsorbable soy protein plastic composites: effect of polyphosphate fillers on biodegradability. *J Polym Environ* **2002**, *9*, 19-23.
- [11] Zhong, Z.; Sun, X. S. Properties of soy protein isolate/polycaprolactone blends compatibilized by methylene diphenyl diisocyanate. *Polymer* **2001**, *42*, 6961-6969.
- [12] Vaz, C. M.; De Graaf, L. A.; Reis, R. L.; Cunha, A. M. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polym Degrad Stab* **2003**, *81*, 65-74.
- [13] Mizuno, A.; Mitsuiki, M.; Motoki, M. Effect of transglutaminase on the glass transition of soy protein. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 3286-3291.

- [14] Yildirim, M.; Hettiarachchy, N. S. Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *J Food Sci* **1997**, *62*, 270-275.
- [15] Creighton, T. E. *Proteins, Structure and Molecular Properties*: New York, USA, 1996; 507 p.
- [16] Voet, D. V., J.; Pratt, C.W. *Fundamentos de Bioquímica*; Ed. Artmed: São Paulo, 2000; 931p.
- [17] Lakemond, C. M. M. D. J., H. H. J.; Hessing, M.; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J. Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 1991-1995.
- [18] Hermansson, A. M. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *J Texture Stud* **1997**, *9*, 33-58.
- [19] Huang, W.; Sun, X. Adhesive properties of soy proteins modified by sodium dodecyl sulfate and sodium dodecyl benzene sulfonate. *J Am Oil Chem Soc* **2000**, *77*, 705-708.
- [20] Meier, M. M. Filmes de acetato de celulose/poli(caprolactona-triol): diagramas de fases, propriedades térmicas, mecânicas e controle de permeação de um fármaco modelo, UFSC, 2004.
- [21] Lucas, E. F. S., B. G.; Monteiro, E. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*; e-papers: Rio de Janeiro, 2001; 366.
- [22] Ozawa, T. Critical investigation of methods for kinetic-analysis of thermoanalytical data. *J Therm Anal* **1975**, *4*, 601-617.
- [23] Doyle, C. D. *Journal of Applied Polymer Science* **1961**, *5*, 285.
- [24] Barreto, P. L. M.; Pires, A. T. N.; Soldi, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym Degrad Stab* **2003**, *79*, 147-152.
- [25] Schmidt, V.; Giacomelli, C.; Soldi, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. *Polym Degrad Stab* **2005**, *37*, 25-31.
- [26] Renkema, J. M. S.; Gruppen, H.; van Vliet, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 6064-6071.
- [27] Renkema, J. M. S.; Lakemond, C. M. M.; Jongh, H. H. J.; Gruppen, H.; van Vliet, T. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *J Biotechnol* **2000**, *79*, 223-230.

- [28] Zhang, J. M., P.; Jane, J. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer* **2001**, *42*, 2569-2578.
- [29] Mo, X.; Sun, X. Thermal and mechanical properties of plastics molded from sodium dodecyl sulfate-modified soy bean protein isolates. *J Polym Environ* **2000**, *8*, 161-166.
- [30] Rhim, J. W. G., A.; Weller, C. L.; Cezeirat, C.; Hanna, M. A. Soy protein isolate - dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products* **1998**, *8*, 195-203.
- [31] Cho, S. Y. R., C. Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **2002**, *35*, 151-157.
- [32] Rhim, J. W.; Gennadios, A.; Weller, C. L.; Hanna, M. A. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Ind Crops Prod* **2002**, *15*, 199-205.
- [33] Nilson, A. N.-P., M. T.; Johansson, H. O.; Jansson, J.; Schillén, K.; Tjerneld, F.; Peterson, S. B. Tryptophan-tagged cutinase studied by steady state fluorescence for understanding of tag interactions in aqueous two-phase system. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1646*, 57-66.
- [34] Ly, V. T.-P. J., L. A. Soy protein as a biopolymer. In *Biopolymers from renewable resources*; D. L. Kaplan, Ed.; Springer: Berlin, 1998; pp 144-176.
- [35] Wang, S.; Sue, H.-J.; Jane, J. *JMS Pure Appl. Chem* **1996**, *33*, 557.
- [36] Chan, J. H.; Balke, S. T. The thermal degradation kinetics of polypropylene: Part III. Thermogravimetric analyses. *Polym Degrad Stab* **1997**, *57*, 135-149.
- [37] Villetti, M. A.; Crespo, J. S.; Soldi, M. S.; Pires, A. T. N.; Borsali, R.; Soldi, V. Thermal degradation of natural polymers. *J Therm Anal Cal* **2002**, *67*, 295-303.
- [38] Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 141-173.
- [39] Moharram, M. A.; Abd-El-Nour, K. N.; Abd-El-Raof, G. Infrared spectra and dielectric properties of thermally treated soybean proteins. *Polym Degrad Stab* **1994**, *45*, 429-434.
- [40] Persenaire, O.; Alexandre, M.; Degée, P.; Dubois, P. Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Polycaprolactone. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 288-294.
- [41] Kim, K. M.; Weller, C. L.; Hanna, M. A.; Gennadios, A. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **2002**, *35*, 140-145.