UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

SUZANNA BIZARRO BADRA

**Estudo do Equilíbrio de Fases em Sistemas contendo
Polímeros Naturais: Fibroína de Seda e Alginato de Sódio**

São Paulo

2019

SUZANNA BIZARRO BADRA

**Estudo do Equilíbrio de Fases em Sistemas contendo
Polímeros Naturais: Fibroína de Seda e Alginato de Sódio**

Versão Revisada

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Badra, Suzanna

Estudo do Equilíbrio de Fases em Sistemas contendo Polímeros Naturais: Fibroína de Seda e Alginato de Sódio / S. Badra -- versão corr. -- São Paulo, 2019.

80 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Equilíbrio de Fases 2.Polímeros Naturais 3.Termodinâmica 4.Fibroína de Seda 5.Alginato de Sódio I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, pelos inúmeros aprendizados ao longo do processo, e também pela compreensão durante os momentos de dificuldades.

Às Prof^{as} Dr^{as} Mariana Agostini de Moraes (UNIFESP) e Marisa Masumi Beppu (UNICAMP) e à Laise Maia Lopes (UNICAMP) pelo apoio e pelo compartilhamento de conhecimentos para o trabalho. Aos alunos de Iniciação Científica que colaboram no desenvolvimento do trabalho Luísa Storelli dos Reis e Marcus Amaral Leite.

Aos meus colegas de trabalho pelas conversas, pelos aconselhamentos e pela companhia durante o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ivanise Guilherme Branco, do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Estadual Paulista, campus de Assis, que gentilmente me permitiu completar os testes experimentais em seu laboratório.

A toda minha família, que me incentivou, apoiou e mostrou interesse pelo meu trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

BADRA, Suzanna Bizarro. Estudo do Equilíbrio de Fases em Sistemas contendo Polímeros Naturais: Fibroína de Seda e Alginato de Sódio. 2018. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Blendas poliméricas de biopolímeros, além de apresentarem uma melhora das propriedades do material, ainda possuem as vantagens de serem biocompatíveis, biodegradáveis e apresentar baixa toxicidade, como no caso de blendas de alginato de sódio e fibroína de seda. Membranas confeccionadas a partir desta mistura apresentam grande potencial no desenvolvimento de curativos de alto desempenho, proporcionando condições ótimas de cicatrização. Entretanto, o processo de mistura destes biopolímeros é bastante complexo e resulta na separação de fases, processo que ainda não foi muito explorado. Este trabalho buscou explorar experimentalmente o comportamento do equilíbrio de fases dos sistemas aquosos contendo fibroína de seda e alginato de sódio em diversos valores de pH. Soluções aquosas de fibroína foram previamente preparadas por meio de processo de diálise, e soluções de alginato, por meio de dissolução direta em água. Ambas as soluções eram misturadas em concentrações em que se desejava avaliar o comportamento de fases. Após a separação de fases, a fase líquida sobrenadante era coletada, a fibroína quantificada via espectrofotometria e o alginato, via calcinação. Observou-se que a região monofásica do diagrama de fases é pequena, e a separação de uma segunda fase ocorre em concentrações baixas dos dois biopolímeros. A separação de fases pôde ser descrita como a precipitação da fibroína pela adição de alginato, e a solubilidade da fibroína pôde ser descrita por meio da equação de Cohn. As curvas de solubilidade obtidas não apresentaram diferenças significativas em função do pH. Medidas do potencial Zeta de soluções de alginato e fibroína em diversas faixas de pH não mostraram diferenças significativas quanto à carga superficial das moléculas, o que é compatível com a ausência de influência do pH no equilíbrio de fases.

Palavras-chave: Biopolímeros, Equilíbrio de fases, Fibroína de seda, Alginato de sódio, Termodinâmica.

ABSTRACT

BADRA, Suzanna Bizarro. Study of Phase Equilibrium in Systems containing Natural Polymers: Silk Fibroin and Sodium Alginate. 2018. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polymer blends formed by biopolymers may show an improvement of material properties (compared to the pure biopolymers), and present advantages such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. An interesting biopolymer blend is that formed by sodium alginate and silk fibroin. Membranes prepared with this mixture show great potential in the development of high-performance wound dressing, since it provides optimum healing conditions. However, the mixing process of these two biopolymers is complex and has not been extensively explored. In this work the phase equilibrium behavior of aqueous systems containing silk fibroin and sodium alginate was experimentally studied at different pH values. Fibroin aqueous solutions were previously prepared through dialysis, and alginate solutions were prepared by direct dissolution in water. Both solutions were mixed at the concentration range in which the phase behavior of the system was to be assessed. After phase separation, the supernatant liquid phase was separated, the fibroin was quantified through spectrophotometry, and the alginate was quantified through calcination. The single-phase region of the phase diagram is small, and the separation of a second phase occurs at low concentrations of both biopolymers. The phase separation could be described as the precipitation of fibroin due to the addition of alginate, and the solubility of fibroin was described by the Cohn equation. The solubility was not significantly affected by the pH. The Zeta potential of either alginate or fibroin, measured in solutions of different pH values, did not present any significant difference concerning the surface charges of these macromolecules. This finding agrees with the absence of pH influence upon the phase equilibrium.

Key-words: Biopolymers, Phase equilibrium, Silk-fibroin, Sodium alginate, Thermodynamics.

Lista de Figuras

Figura 1: Imagem ilustrativa da disposição das proteínas fibroína e sericina no fio de seda. (Adaptado de: www.puresericin.com).....	20
Figura 2: Principais aminoácidos constituintes da fibroína de seda. (Fonte: Voet et al., 2014).....	20
Figura 3: Estruturas secundárias da proteína fibroína de seda (a) estrutura secundária folha- β (b) estrutura secundária α -hélice. (Fonte: Loertscher, 2011).....	21
Figura 4: Exemplos de materiais produzidos a partir da fibroína de seda extraída de casulos de <i>B. mori</i> . (Adaptado de: Rockwood et al, 2011).....	23
Figura 5: Monômeros que constituem a molécula de alginato de sódio (a) ácido (1-4) β -D manurônico (b) ácido (1-4) α -L gulurônico. (Fonte: FMC Polymer).....	24
Figura 6: Estrutura <i>Egg box</i> formada por sequências de grupos GG nas moléculas de alginato na presença de cálcio. (Fonte: FMC Polymer).....	24
Figura 7: Representação esquemática das curvas binodal e spinodal. (Fonte: www.ebrary.net).....	32
Figura 8: Esquema dos mecanismos de separação de fases, na parte superior a separação por decomposição spinodal e na parte inferior a separação por nucleação e crescimento. (Fonte: Robeson, 2007).....	33
Figura 9: Exemplo de diagrama ternário entre óxido de polipropileno (PEO), óxido de polipropileno-b-dimetilsiloxano (P(EO-b-DMS)) (COP) e tolueno (TL), mostrando a influência da temperatura no diagrama de fases. (Fonte: Jiang et al, 2011).....	34
Figura 10: Exemplo de diagrama retangular para MIK, acetona e água. (Fonte: Sandler, 2006).....	34
Figura 11: Esquemática do potencial Zeta de partícula com carga negativa, solvatada com íons positivos e contra-íons negativos, mostrando a camada elétrica dupla e o potencial Zeta. (Adaptado de: www.malvern.com).....	39
Figura 12: Esquema dos métodos utilizados para quantificar os componentes do sistema ternário e realizar o balanço de massa.....	45

Figura 13: Amostras com solução de fibroína 5% (esquerda) e 10% (direita) após o processo de diálise para analisar qualitativamente a influência da concentração da proteína na precipitação durante a diálise.....	47
Figura 14: Óxido de cálcio formado após decomposição do alginato de sódio pelo processo de calcinação em mufla.....	50
Figura 15: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 7,0.....	51
Figura 16: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 8,0.....	51
Figura 17: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 9,0.....	52
Figura 18: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 10,0.....	52
Figura 19: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 7,0.....	53
Figura 20: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 8,0.....	53
Figura 19: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 7,0.....	54
Figura 20: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 8,0.....	54
Figura 23: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =7,5. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.....	59
Figura 24: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =8,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.....	60
Figura 25: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =8,5. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.....	60

Figura 26: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =9,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.....	61
Figura 27: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =10,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.....	61
Figura 28: Comparativo visual entre solução de fibroína pura (a) e na blenda com alginato.....	63
Figura 29: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 6,5. ◇ dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.....	65
Figura 30: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 7,5. Δ dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.....	65
Figura 31: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 8,5. x dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.....	66
Figura 32: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 9,5. + dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.....	66
Figura 33: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C na faixa de pH estudada. Δ pH 6,50; ◇ pH 7,50. x pH 8,50 e + pH 9,5. Ajuste em pH 6,50; - -- Ajuste em pH 7,50; - · - · - Ajuste em pH 8,5 e - - - Ajuste em pH 9,50....	67
Figura 34: Linearização dos dados para a obtenção dos parâmetros da Equação de Cohn. Δ pH 6,50; ◇ pH 7,50. x pH 8,50 e + pH 9,5. Ajuste em pH 6,50; --- Ajuste em pH 7,50; - · - · - Ajuste em pH 8,5 e - - - Ajuste em pH 9,50.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Medidas de potencial Zeta (mV) e desvio padrão das leituras efetuadas para as amostras individuais de fibroína de seda e alginato de sódio com pH variando entre 7,0 e 10,0.....	55
Tabela 2: Faixa de pH e concentração inicial dos componentes nas amostras trabalhadas na primeira fase do estudo.....	57
Tabela 3: Composição mássica das fases formadas no equilíbrio de fases do sistema fibroína-alginato-água na primeira etapa do projeto.....	58
Tabela 4: Constante β e constante de solubilidade (K_s) da equação de Cohn obtidos através do ajuste dos dados experimentais.....	68
Tabela 5: Coeficiente de determinação (R^2) obtidos no ajuste das curvas linearizadas do sistema nos pH estudados.....	69
Tabela 6: Porcentagem, em relação a massa inicial de cada componente na blenda, de cada um na fase líquida.....	69
Tabela 7: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 6,5.....	73
Tabela 8: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 7,5.	73
Tabela 9: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 8,5.	74
Tabela 10: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 9,5.	74

Nomenclatura

Abreviaturas

AU – Unidades Arbitrárias de absorbância

BSA – Bovine Serum Albumin

DSC – Differential Scanning Calorimetry

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

G – Ácido gulurônico

M – Ácido manurônico

NRTL – Non Random Two Liquid

PC – SAFT – Perturbed Chain Statistical Association Fluid Theory

PEG – Polietilenoglicol

PEO – Poli (óxido de etileno)

SA – Alginato de Sódio

SF – Fibroína de Seda

UNIQUAC – Universal Quasichemical

Letras latinas

C – Número de componentes em um sistema (Regra das Fases de Gibbs)

F – Número de graus de liberdade (Regra das Fases de Gibbs)

f – Fugacidade do componente puro

$\hat{f}_i$ – Fugacidade do componente na fase i

m_s – massa da fase sólida (g)

m_l – massa da fase líquida (g)

m_b – massa da blenda (g)

m_{IH} – massa de água na fase líquida (g)

m_{ISA} – massa de alginato na fase líquida (g)

m_{ISF} – massa de fibroína na fase líquida (g)

m_{sH} – massa de água na fase sólida (g)

m_{sSA} – massa de alginato na fase sólida (g)

m_{sSF} – massa de fibroína na fase sólida (g)

P – Número de fases (Regra das Fases de Gibbs)

r – Razão entre volumes molares de compostos diferentes

R – Constante Universal dos Gases (8,31 J / (mol.K))

T – Temperatura (K)

u – energia de interação entre moléculas

V – Volume molar (m³/mol)

x_i – Fração molar do componente i

w – Fração mássica

X – Parâmetro de Interação de Flory

Letras gregas

Θ_i – Fração superficial do componente i

Φ_i – Fração volumétrica do componente i

ΔG – Variação da Energia Livre de Gibbs (J/mol)

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. Revisão Bibliográfica	18
3.1 Fibroína de seda	19
3.2 Alginato de sódio	23
3.3 Blendas poliméricas	25
3.4 Blendas fibroína de seda e alginato de sódio	26
3.5 Equilíbrio termodinâmico	29
3.7 Diagramas de Fases	33
3.8 Modelagem Termodinâmica	35
3.8.1 Equilíbrio sólido líquido	37
3.9. Potencial Zeta	38
4. Materiais e Métodos	41
4.1 Reagentes e Equipamentos	41
4.2 Purificação da fibroína	41
4.3 Dissolução da fibroína em solvente ternário	42
4.4 Diálise da fibroína	42
4.5 Determinação da concentração da solução aquosa de fibroína	42
4.5.1 Concentração da solução de fibroína	42
4.6 Preparo da solução de alginato	43
4.7 Preparo das blendas – Equilíbrio líquido-líquido	43
4.8 Preparo das blendas – Equilíbrio sólido-líquido	43
4.9 Equilíbrio Termodinâmico	43
4.10 Separação das fases	44
4.11 Quantificação dos componentes	44
4.12 Potencial Zeta	45
5. Resultados e Discussão	46
5.1 Purificação da fibroína	46
5.2 Dissolução da fibroína em solvente ternário	46
5.3 Diálise da fibroína	46
5.4 Concentração da solução de fibroína	47
5.5 Preparo da solução de alginato	48

5.6 Preparo das blendas.....	48
5.7 Quantificação dos componentes	48
5.8 Potencial Zeta.....	50
5.9 Equilíbrio de fases – abordagem líquido-líquido	56
5.10 Equilíbrio de fases – abordagem sólido-líquido	64
6. Conclusões	71
7. Sugestões de Continuidade do Trabalho.....	72
8. Anexos.....	73
A.1. Resultados da quantificação dos componentes no equilíbrio sólido-líquido na fase líquida	73
9. Referências Bibliográficas.....	75

1. Introdução

O conhecimento sobre a interação e o comportamento de compostos químicos em uma mistura é parte importante no estudo de processos e no desenvolvimento de novos materiais e tecnologias. O estudo desse comportamento é realizado, entre outros, por meio da determinação do equilíbrio de fases, importante ramo da termodinâmica. Entre as substâncias que apresentam potencial para materiais inovadores nas áreas alimentícia, médica e farmacêutica, e que ainda não foram muito estudadas em conjunto, estão o alginato de sódio e a fibroína de seda, objetos deste trabalho.

A fibroína de seda é uma proteína secretada por artrópodes e insetos. Ela é encontrada no fio da seda, principalmente do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Trata-se de uma proteína com alta biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e baixa toxicidade (Nogueira et al, 2010). Já o alginato de sódio é um carboidrato encontrado em algas marrons, constituído por ácidos urônicos, e amplamente utilizado com espessante na indústria de alimentos. A combinação dos dois polímeros busca intensificar as propriedades mecânicas individuais de cada um e ampliar seu campo de aplicação. Moraes et al (2014) e Lee et al (2004) estudaram a aplicação desta blenda no campo da biomedicina, como curativos de alto desempenho.

Blendas envolvendo a fibroína de seda e o alginato de sódio são bastante complexas, pois envolvem macromoléculas. Além disso, seu comportamento em solução pode se alterar devido às condições do sistema, como por exemplo, temperatura, pH ou presença de sais. A determinação de propriedades termodinâmicas de misturas desses compostos é de grande importância para a indústria, pois, para esta blenda, a tendência é que ocorra a separação de fases. O entendimento desse equilíbrio, bem como das características das fases formadas, fornece a janela de processamento para esta blenda.

Existem trabalhos publicados que mostram que em sistemas contendo fibroína e alginato ocorre a formação de duas fases distintas. Porém, ainda não foi explorada a influência do pH neste processo, fator de grande importância, uma vez que ambos biopolímeros possuem grupos ionizáveis. Moraes (2010) apresentou resultados que comprovaram a melhora das propriedades mecânicas da blenda polimérica em

relação aos polímeros quando analisados separadamente, além da verificação da viabilidade celular na presença dos compostos. Lopes (2016) estudou a separação de fases neste sistema, determinando o tempo necessário para que a blenda formada por fibroína de seda e alginato de sódio atinja o equilíbrio termodinâmico e investigou o mecanismo de separação de fases envolvido.

Para que se possa prever o comportamento de fases de determinado sistema, a termodinâmica fornece modelos cujos parâmetros ajustáveis permitem essa previsão. Para o sistema em questão, ainda são poucas as publicações que apresentam a modelagem do sistema por meio de modelos termodinâmicos. Existem na literatura diversos modelos termodinâmicos que preveem o comportamento das misturas, sendo que as características do sistema e compostos químicos em questão devem ser levadas em consideração na escolha do modelo apropriado.

Tanto o conhecimento a respeito do comportamento do sistema em diversas condições de pH e concentração dos biopolímeros, quanto os parâmetros obtidos pela modelagem do equilíbrio termodinâmico do sistema são de fundamental importância para que se possa ter um material com as características e propriedades desejadas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o equilíbrio termodinâmico em sistemas ternários contendo fibroína de seda, alginato de sódio e água em função da variação do pH e concentração dos biopolímeros, para avaliar as condições de separação de fases e processamento da blenda.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar individualmente o comportamento da solução aquosa de fibroína e de alginato, em função do pH;
- Estudar o equilíbrio utilizando-se as abordagens de equilíbrio líquido-líquido e sólido-líquido;
- Avaliar a interferência da presença de fibroína no processo de quantificação do alginato por calcinação e da presença de alginato na quantificação da fibroína por espectroscopia;
- Construir curvas de solubilidade para o sistema ternário;
- Modelar as curvas de solubilidade por meio do ajuste dos dados experimentais obtidos.

3. Revisão Bibliográfica

Uma blenda polimérica é a mistura de dois ou mais polímeros visando à criação de um novo material que possua propriedades de interesse, sejam elas resistência mecânica, química, elétrica ou térmica. A alteração das propriedades do material ocorre devido a interação entre os polímeros na blenda, que depende de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas (Parameswaranpilai, 2015).

Polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de unidades menores, chamadas monômeros. O grau de organização entre as cadeias poliméricas de um mesmo polímero é conhecido como cristalinidade: quanto maior a cristalinidade de um polímero, maior o alinhamento entre suas cadeias. Polímeros em geral são semicristalinos, possuindo regiões com alinhamento de cadeias, cristalinas, e regiões amorfas. O grau de cristalinidade de um polímero está diretamente ligado a suas propriedades, como por exemplo, sua resistência mecânica e sua densidade (Mark, 2007).

Materiais que estão em destaque no campo de elaboração de novas blendas poliméricas são os biopolímeros, pois apresentam propriedades interessantes, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, e podem ser obtidos, em sua grande maioria, a baixo custo. Nesse contexto, encontram-se também os biopolímeros investigados neste trabalho, a fibroína de seda, obtida dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e o alginato de sódio, encontrado em algas marinhas marrons. Zhang (2015) apresentou resultados sobre produção, a partir destes biopolímeros, de materiais que imitam o tecido extracelular, através da separação induzida de fases de blendas preparadas.

Para a elaboração de uma blenda polimérica levam-se em consideração fatores que vão desde o método de mistura dos polímeros até o equilíbrio de fases do sistema em questão, visando a avaliar desde custos do processo de mistura até as condições físico-químicas de estabilidade da blenda. Os polímeros estudados neste trabalho possuem aplicações em diversas áreas, como farmacêutica, médica e alimentícia. Porém, suas propriedades em uma blenda ainda não foram completamente elucidadas, sendo ainda objeto de estudos (Zhang, 2015; Song, 2011). Moraes e Beppu (2013) analisaram a formação de membranas compostas por fibroína de seda

e alginato de sódio, e os resultados obtidos mostraram que a incorporação da fibroína na matriz de alginato altera algumas propriedades mecânicas da membrana. Dentre as propriedades observadas, destacam-se o aumento da resistência a tração e da resistência a ruptura da membrana, ambas propriedades importantes na confecção de curativos. Liang e coautores (1992) apresentaram resultados da influência da adição de alginato de sódio na matriz de fibroína no que diz respeito a presença de estruturas do tipo folha- β (seda II) e cristalinas, sendo que, no geral, a presença do alginato favorece a formação destas estruturas.

3.1 Fibroína de seda

A seda é um material conhecido e cobiçado há muito tempo, sendo que os artefatos mais antigos a utilizá-la datam da idade da pedra. Na cultura chinesa existem registros de roupas confeccionadas em seda de seis mil anos atrás. O material também foi utilizado como moeda de troca e, em determinadas culturas, seu uso representava a classe social a qual a pessoa pertencia, sendo as sedas mais nobres reservadas a nobreza, realeza e corte (Schoeser, 2007).

O fio da seda é obtido a partir de casulos do *Bombyx mori*, mais conhecido como bicho-da-seda, criados em cativeiro e sendo seu cultivo de baixo custo. Outros artrópodes, como as aranhas, também são capazes de produzir seda. Porém, enquanto se obtém cerca de 12 m de seda de uma teia de aranha, um único casulo do bicho-da-seda é capaz de fornecer até 900 m de fio de seda (Liu e Zhang, 2014). A seda propriamente dita é composta por duas proteínas, a fibroína da seda, proteína de cadeia longa responsável pela resistência mecânica do fio, e a sericina, uma proteína que age como uma cola unindo os fios de fibroína. O processo de separação dessas duas proteínas é conhecido como degomagem, e é descrito por Ribeiro et al (2014) e Rockwood et al (2011). Estudos mostram que, para uso como biomaterial, a sericina deve ser removida para assegurar a biocompatibilidade, pois ela pode causar reações imunológicas (Rockwood et al, 2011). Existem diversos processos para a remoção de sericina dos casulos do bicho-da-seda. Um dos mais aplicados é o apresentado por Ajisawa (1997), em que a solubilização da sericina ocorre por meio da adição de uma solução de carbonato de cálcio. Yamada (2001) apresenta um estudo sobre a conservação da cadeia da proteína após o processo de degomagem,

indicando que o método proposto por Ajisawa acaba por causar a ruptura desta cadeia, e propõe um processo de dissolução em tiocianato de lítio em temperatura ambiente para preservar a massa molecular da fibroína.

Figura 1: Imagem ilustrativa da disposição das proteínas fibroína e sericina no fio de seda. (Adaptado de: www.puresericin.com)

A fibroína de seda é composta pela proteína P25 e por duas cadeias polipeptídicas, uma leve e outra pesada, ligadas por ponte de dissulfeto, (Inoue et al, 2000). A cadeia leve possui cerca de 16 kDa enquanto a cadeia pesada possui cerca de 391 kDa e possui a seguinte composição: 45,9% glicina, 30,3% alanina, 12,1% serina, 5,3% tirosina, 1,8% valina e 4,7% dos demais aminoácidos. Como a maior parte dos aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica possuem resíduos apolares, as moléculas interagem principalmente por interações hidrofóbicas (Zhou et al, 2001).

Figura 2: Principais aminoácidos constituintes da fibroína de seda.
(Fonte: Voet et al., 2014)

A molécula de fibroína pode apresentar duas configurações, conhecidas por seda I e seda II. A seda II é a configuração termodinamicamente mais estável da proteína, insolúvel em água, neste caso as cadeias se encontram no formato de folha- β e ligam-se entre si por meio de ligações de hidrogênio. Devido a orientação entre as cadeias poliméricas, a configuração seda II confere à fibroína características de polímeros cristalinos. Essa é a forma encontrada nos fios produzidos pelo *Bombyx mori*. A conformação do tipo seda I, correspondente a uma predominância do formato de α -hélice, solúvel em água, corresponde à forma metaestável da proteína. Devido à falta de alinhamento entre as cadeias, essa configuração confere à fibroína características de polímeros amorfo (Kundu et al., 2013). Soluções aquosas de fibroína apresentam inicialmente a proteína em sua forma solúvel (seda I), porém por se tratar de uma solução instável, ocorre a transição de fases com a formação de gel (seda II), configuração estável da proteína.

(a)

(b)

Figura 3: Estruturas secundárias da proteína fibroína de seda (a) estrutura secundária folha- β (b) estrutura secundária α -hélice. (Fonte: Loertscher, 2011)

Na conformação de α -hélice, a cadeia de aminoácidos se dobra em torno de um eixo imaginário, deixando os grupos laterais expostos. A estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio do grupo amina e átomo de oxigênio presente no grupo carboxila de diferentes aminoácidos. Na conformação de folha- β , a cadeia se dispõe na forma de ziguezague, e as ligações de hidrogênio são formadas em segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica (Loertscher, 2011).

Alguns métodos são propostos para que ocorra uma transição configuracional de seda I para seda II, como a aplicação de cisalhamento, o uso de solventes orgânicos e a elevação de temperatura. Porém, a estrutura em seda II resultante desses métodos se apresenta quebradiça (Jim et al, 2003; Kawahara et al., 2006; Nogueira et al., 2010). O ponto isoelétrico da cadeia pesada ocorre, corresponde ao pH 4,2 (Lammel et al., 2010). Estudos de DSC (Differential Scanning Calorimetry) realizados por Ho e Lau (2012) sobre o comportamento térmico da proteína mostraram que em aproximadamente 100°C as fibras perdem umidade e em 365°C ocorre a degradação térmica das moléculas orientadas em folha- β cristalinas.

Lammel et al (2010) estudou o uso da fibroína de seda no desenvolvimento de partículas para liberação de medicamentos. Nogueira et al (2010) apresentou um estudo sobre membranas de fibroína, no qual são apresentadas características das membranas como citotoxicidade, resistência térmica e morfologia. Rockwood et al. (2011) apresentaram um protocolo sobre processos de extração da fibroína do casulo para a produção de diversos materiais.

Figura 4: Exemplos de materiais produzidos a partir da fibroína de seda extraída de casulos de *B. mori*. (Adaptado de: Rockwood et al, 2011)

3.2 Alginato de sódio

Alginatos são polissacarídeos solúveis em água encontrados em algas marrons na forma de gel. Eles possuem funções estruturais, conferindo resistência ao corpo da alga, e geralmente ocorrem na forma de sais, associando o ácido algínico com íons de cálcio, sódio e magnésio, por exemplo (FMC Biopolymer, 2003).

Este polissacarídeo é amplamente utilizado na indústria alimentícia como espessante de alimentos, na área odontológica como material para a produção de moldes para impressão dental, e em medicamentos como anti-refluxo (FMC Biopolymer, 2003).

As algas são coletadas em seu ambiente natural, processo que fornece o material a baixo custo, uma vez que o cultivo de algas em cativeiro resultaria em um custo elevado.

A cadeia polimérica pode variar de tamanho, podendo ter entre 50 e 180 kDa e é composta por dois isômeros, o ácido (1-4) β -D manurônico (M) e o (1-4) α -L gulurônico (G), apresentados na Figura 5. Esses dois monômeros formam blocos do

tipo MM, MG e GG que conferem características diferenciadas dependendo da proporção entre eles. A proporção entre os blocos MM, MG e GG do alginato depende de vários fatores, entre os quais pode-se citar a espécie da alga, a localização geográfica e o período do ano (FMC Biopolymer, 2003). Os blocos constituídos por MM e MG são responsáveis pela flexibilidade do material, enquanto os blocos GG formam uma estrutura chamada *egg box*, apresentada na Figura 6, e são responsáveis pela capacidade de formação de gel do material na presença de cátions divalentes. (Johnson et al, 1997)

Figura 5: Monômeros que constituem a molécula de alginato de sódio (a) ácido (1-4) β -D manurônico (b) ácido (1-4) α -L gulurônico. (Fonte: FMC Polymer)

Figura 6: Estrutura *Egg box* formada por sequências de grupos GG nas moléculas de alginato na presença de cálcio. (Fonte: FMC Polymer)

Dentre suas características, a capacidade de formação de gel se apresenta como uma das mais interessantes, uma vez que permite ampliar seu campo de utilização. O pKa dos ácidos gulurônico e manurônico se encontra entre 3,2 e 4,0. Em pH muito superior a esses valores, os grupos -COOH estão totalmente desprotonados, conferindo carga negativa às moléculas, o que gera repulsão

eletrostática entre elas. A formação de gel ocorre em pH ácido, geralmente abaixo de 5, no qual os grupos -COOH estão protonados e as moléculas não possuem carga, estando livres para interagir entre si (Li et al. 2009).

Estudos relacionados a estabilidade térmica do alginato de sódio mostram que o composto começa a sofrer decomposição térmica em torno de 250°C (Soares et al, 2004).

3.3 Blendas poliméricas

Blendas poliméricas são misturas de dois ou mais polímeros, visando ao melhoramento de alguma propriedade de um dos compostos sem que haja a necessidade de desenvolver um novo polímero. Ao se misturarem dois ou mais polímeros duas situações distintas podem ser observadas: a formação de uma mistura homogênea, ou seja, uma mistura em que apenas uma fase é formada, em que não é possível a distinção entre os componentes da mistura, e as propriedades da mistura são uniformes, ou a formação de uma mistura heterogênea, em que mais de uma fase é formada, cada qual com características e propriedades distintas. O conceito de miscibilidade é de extrema importância quando se trata de estudo de blendas poliméricas, pois o comportamento da blenda está diretamente relacionado com a miscibilidade da mesma. Olabisi (1981) define como blenda miscível uma mistura homogênea e estável que apresenta características macroscópicas esperadas em um material monofásico homogêneo. Utracki (2002) complementa o conceito dizendo que a homogeneidade deve se estender ao nível molecular. As blendas que não se classificam como miscíveis podem ser totalmente imiscíveis (ou seja, apresentam mais de uma fase, cada qual com características distintas, não sendo observada miscibilidade em nenhuma situação) ou podem ser parcialmente miscíveis (apresentando comportamento distinto em relação a composição, possuindo uma região de miscibilidade e uma de separação em fases distintas em um diagrama de fases).

A miscibilidade de uma blenda é determinada por dois tipos de contribuições, a entrópica e a entálpica. A contribuição entrópica reflete a organização das moléculas, ou seja, a forma pela qual as moléculas do polímero podem se encaixar no meio das

demais moléculas presentes levando em consideração seu tamanho e volume. Já a contribuição entálpica está relacionada a energia de interação entre moléculas distintas, ou seja, solvente-solvente, solvente-soluto, soluto-soluto, no caso de uma solução binária (Coleman, 1991). Em geral, a separação de fases pode ser prevista pela energia livre de Gibbs (Equação 1):

$$G = H - TS \quad (1)$$

No sistema estudado, mantidas constantes a pressão e a temperatura, a situação de equilíbrio é dada pela situação de mínima energia livre de Gibbs (Equação 1). As contribuições entálpica e entrópica são, muitas vezes, conflitantes, e justamente o balanço entre as duas tendências opostas leva à separação, ou não, de fases.

Na prática, entre os métodos mais utilizados para determinar a miscibilidade de polímeros pode-se citar a temperatura de transição vítrea (T_g). Blendas miscíveis apresentam apenas um valor de T_g , enquanto blendas imiscíveis apresentam dois ou mais valores de T_g , um para cada fase formada (Lopes, 2016). Outro indicativo da imiscibilidade de uma blenda é a formação de uma solução opaca, sendo este o princípio da técnica de ponto de névoa para a determinação da curva de solubilidade.

Ao se preparar uma blenda, nem sempre se busca uma blenda miscível, podendo ser a blenda imiscível a que apresenta as características desejadas. Utracki (1989) define como uma blenda compatível aquela que apresenta características comercialmente atrativas, como resistência mecânica, permeação a água, etc. Este autor apresenta uma revisão sobre métodos de realizar a compatibilização de blendas poliméricas, sendo o processo de compatibilização definido por ele como o processo de modificação das propriedades interfaciais em uma blenda imiscível, resultando na redução do coeficiente de tensão superficial, formando e estabilizando a morfologia desejada (Utracki, 2002).

3.4 Blendas fibroína de seda e alginato de sódio

Na literatura é possível encontrar diversos estudos a respeito de propriedades e aplicações para blendas poliméricas que contenham pelo menos um dos dois polímeros em questão.

Dentre estudos sobre blendas contendo fibroína de seda, algumas análises sobre comportamentos e propriedades são especificamente interessantes. Zhu et al. (2012) estudaram a formação de filmes de fibroína e poli(ácido láctico), e verificaram a melhora de propriedades mecânicas quando comparadas as propriedades de filmes dos materiais isolados. Por outro lado, esses autores verificaram que a hidrofiliabilidade da superfície e a capacidade de absorver água diminuíram. Este efeito foi associado ao fato de a fibroína sofrer a transição de sua estrutura de seda I para seda II na presença do poli(ácido láctico). Outro estudo envolvendo a fibroína de seda foi desenvolvido por Park (2006). Este autor avaliou a utilização de nanofibras de fibroína e quitina como suporte para cultivo de células, devido a seu baixo custo. Conforme esse trabalho, nanofibras compostas apenas por fibroína perdem sua forma quando imersas em água, enquanto as de quitina não. Como a quitina apresenta uma maior condutividade, as nanofibras de quitina pura são muito finas, efeito que pode ser controlado com a adição de fibroína, gerando fibras com maior diâmetro. Ao estudar a interação entre os polímeros, Park (2006) verificou, pela análise da viscosidade, que existe interação entre os polímeros, e classificou a blenda como imiscível. Filmes contendo fibroína e celulose foram estudados por Freddi et al. (1995) como suporte para a imobilização de enzimas. O estudo revelou melhoras das propriedades mecânicas de acordo com a proporção de fibroína/celulose no filme. Além disso, quando a densidade do material foi analisada, observa-se um volume em excesso positivo, ou seja, um aumento de volume, indicativo da interação entre os polímeros. Como um último estudo referente a blendas envolvendo fibroína, podem-se citar filmes de fibroína e poli(vinil álcool) de Tsukada (1994). Também nesse caso, a maior parte das propriedades analisadas se apresentaram como intermediárias entre as propriedades de cada polímero puro, podendo-se inferir a existência de forte interação entre os polímeros.

Ao explorar a aplicação do alginato de sódio como componente em blendas poliméricas para fins biológicos, foram encontrados alguns estudos sobre o comportamento deste polímero. Çaykara et al. (2005) apresentaram um estudo sobre blendas de alginato de sódio e poli(óxido de etileno) (PEO) por meio de FTIR (abreviação de *Fourier-transform infrared spectroscopy*, ou espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier). Os dados indicam que os dois polímeros interagem por meio de ligações de hidrogênio, e que esta ligação apresenta alguma

influência sobre comportamento térmico da blenda. Ainda referente à blenda de alginato com PEO, um estudo realizado por Mary e Swaniappan (2016) avaliou o uso de blendas de alginato com PEG, ou poli(etilenoglicol), e de alginato com PEO para liberação controlada de medicamentos ao longo do trato intestinal. Mais uma vez, os estudos mostraram que a interação entre o alginato e os demais polímeros ocorre por meio de ligações de hidrogênio. Verificou-se a possibilidade de produzir cápsulas com diferentes tamanhos de poros, o que influenciou diretamente na liberação do medicamento. Os resultados apresentados mostram que as blendas apresentam a resistência ao ambiente gástrico. Além disso, vale ressaltar que as blendas de alginato e PEG apresentaram maior estabilidade que as blendas de alginato com PEG, sendo que continham PEO não se apresentaram estáveis em algumas composições.

De forma geral, nos estudos encontrados referentes a blendas contendo fibroína, é recorrente a informação de que, ao se realizar a purificação da proteína, ocorre a quebra da cadeia de sua molécula, ficando ela mais frágil do que a fibroína obtida diretamente da glândula dos insetos antes da adição da sericina. Freddi (1995) pondera que a adição de hidróxido de sódio pode causar essa degradação da cadeia da fibroína.

Blendas envolvendo ambos os polímeros naturais fibroína de seda e alginato de sódio vêm sendo estudadas devido a propriedades promissoras do seu uso como biomaterial. Dentre essas características pode-se citar a biocompatibilidade, o custo de obtenção das matérias primas, a não toxicidade do material e suas propriedades mecânicas.

Entre as principais aplicações da blenda destaca-se o seu uso em curativos de alto desempenho. Alguns estudos mostram que o material apresenta boa resistência mecânica, estabilidade térmica e mecânica, capacidade de reter água e baixa toxicidade, criando um ambiente favorável à cicatrização devido à absorção do exsudado e manutenção de umidade em níveis ótimos para a cicatrização e recuperação do epitélio (Roh et al, 2006; Moares et al, 2013; Liang et al, 1992).

Apesar de promissora, a blenda formada por alginato de sódio e fibroína de seda ainda não foi estudada em profundidade quanto ao seu comportamento de fases em relação a composição, pH, temperatura, força iônica, etc. Existem, porém, alguns estudos envolvendo alginato de sódio e outros polímeros naturais.

Mession et al. (2012) estudaram o equilíbrio de um sistema ternário envolvendo alginato de sódio, proteína de ervilha e água. Foi observada a predominância de repulsão eletrostática entre os polímeros, pois ambos apresentarem cargas negativas no pH estudado. Além disso, os autores observaram que para sistemas preparados com soluções mais concentradas de alginato, as linhas de amarração não coincidiram com a curva binodal. Devido à alta viscosidade da solução inicial de alginato, parte da fase rica em proteína ficou retida na fase rica em alginato (Mession et al., 2012). Outro estudo, apresentado por Simeone, a respeito do diagrama de fases do sistema formado por alginato de sódio, caseinato de sódio e água, apresentou problemas no processo de separação das fases em misturas com maior fração mássica dos polímeros (Simeone et al, 2004). Dentre os trabalhos publicados referentes a blendas dos polímeros alginato de sódio e fibroína de seda, encontram-se os de Moraes (2010) e Lopes (2016). Moraes (2010) iniciou o processo de caracterização da morfologia das blendas e compósitos formados pelos polímeros, além de apresentar estudos de citotoxicidade de ambos. Lopes (2016), por sua vez, determinou o tempo para que a blenda atingisse o equilíbrio termodinâmico, e verificou o mecanismo de separação de fases e a miscibilidade das blendas através da medição da temperatura de transição vítrea (T_g) das mesmas.

3.5 Equilíbrio termodinâmico

Um sistema em equilíbrio termodinâmico é aquele no qual suas propriedades termodinâmicas não se alteram ao longo do tempo. Os sistemas em equilíbrio podem ser classificados como homogêneos ou heterogêneos, sendo a homogeneidade dada por propriedades intensivas constantes ao longo de todo o sistema. No caso de não homogeneidade, o sistema é dito heterogêneo e possui, portanto, mais de uma fase quando em estado de equilíbrio.

Para se determinar o estado de equilíbrio de um sistema, é necessário o conhecimento de algumas de suas propriedades. Para um sistema não reativo, a Regra das Fases de Gibbs, Equação 2, fornece o número de variáveis intensivas cujo conhecimento é necessário para que se defina o estado de equilíbrio do sistema (Sandler, 2006):

$$F = C - P + 2 \quad (2)$$

- F – Número de graus de liberdade do sistema;
- C – Número de componentes do sistema;
- P – Número de fases do sistema.

Em um sistema multifásico tem-se que as fases em equilíbrio devem estar em:

- Equilíbrio mecânico: igualdade de pressões;
- Equilíbrio térmico: igualdade de temperatura;
- Equilíbrio químico: igualdade dos potenciais químicos de cada componente em cada fase.

O sistema abordado neste trabalho é mantido em condições constantes de temperatura e pressão. Sistemas sob essas condições apresentam, na situação de equilíbrio termodinâmico, a condição de mínima energia livre de Gibbs (Sandler, 2006).

O estudo realizado por Lopes (2016) mostrou que o sistema ternário em questão apresenta a formação de duas fases nas condições de equilíbrio, o que resulta em 3 graus de liberdade. Ou seja, pela Regra das Fases de Gibbs:

- C = 3 componentes (água, fibroína e alginato);
- P = 2 fases (conforme estudo apresentado por Lopes, 2016)
- $F = C - P + 2 = 3$ graus de liberdade

Nesses estudos de equilíbrio, o sistema é mantido em temperatura e pressão constantes, de modo que resta apenas um grau de liberdade – ou seja, uma única fração de um composto em uma fase. Embora em termos fundamentais essa relação esteja apropriadamente determinada, experimentalmente o processo é conduzido criando-se um sistema com composição determinada em temperatura e pressão constantes. Nesse caso, o sistema tende a um único estado de equilíbrio, cuja definição envolve também o balanço de massa do sistema.

Quando se fala em sistemas heterogêneos contendo N componentes e M fases, o sistema é dito em equilíbrio quando respeita as seguintes condições, sendo T a temperatura, P a pressão e μ o potencial químico (Smith, 2007):

$$\begin{aligned} T^1 &= T^2 = \dots = T^M \\ P^1 &= P^2 = \dots = P^M \\ \mu_1^1 &= \mu_1^2 = \dots = \mu_1^M \\ \mu_2^1 &= \mu_2^2 = \dots = \mu_2^M \\ \mu_N^1 &= \mu_N^2 = \dots = \mu_N^M \end{aligned} \quad (3)$$

Como não se pode medir o potencial químico de um componente de forma direta, este é indiretamente quantificado por meio da fugacidade através da seguinte correlação:

$$\mu_i = \mu_i^0(T) + RT \ln \left(\frac{f_i}{f_{i0}} \right) \quad (4)$$

em que $\mu_i^0(T)$ é o potencial químico do composto i em um estado padrão, de tal forma que f_{i0} esteja definida no mesmo estado e à mesma temperatura. Assim, pode-se correlacionar o estado de equilíbrio da seguinte forma:

$$f_i^\alpha = f_i^\beta \quad (5)$$

De tal forma que α e β representam fases distintas. Essa correlação pode ser expressa pela Equação 6 em termos das frações molares e do coeficiente de atividade das espécies em cada fase:

$$x_1^\alpha \gamma_1^\alpha f_{10}^\alpha = x_1^\beta \gamma_1^\beta f_{10}^\beta \quad (6)$$

3.6 Mecanismos de separação de fases

Um sistema que apresenta separação de fases, pode ser representado por um diagrama de fases, no qual encontra-se a curva binodal, que separa a região monofásica da multifásica, e a curva spinodal, que separa, dentro da região multifásica, as regiões metaestável e instável, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7: Representação esquemática das curvas binodal e spinodal.

(Fonte: www.ebrary.net)

Partindo-se de um sistema inicialmente monofásico, a separação de fases pode ocorrer devido a vários fatores, como a variação de temperatura, pressão, concentração, remoção de solvente, etc. O processo de separação de fases pode se dar por dois mecanismos distintos: decomposição spinodal ou nucleação, esquematicamente apresentados na Figura 8.

- Nucleação: ocorre apenas na região metaestável do diagrama de fases, sendo caracterizada pela formação de uma segunda fase com composição constante, cujo tamanho varia com o tempo.
- Decomposição spinodal: ocorre na região de instabilidade do diagrama de fases, podendo ser gerada por uma pequena variação de temperatura através do ponto crítico do sistema, ou se a região metaestável for cruzada rapidamente. É caracterizada pela formação de uma fase que possui tamanho constante, na qual a concentração dos componentes varia com o tempo.

Figura 8: Esquema dos mecanismos de separação de fases, na parte superior a separação por decomposição spinodal e na parte inferior a separação por nucleação e crescimento. (Fonte: Robeson, 2007)

Lopes (2016) realizou um estudo cinético via espalhamento de luz a baixo ângulo para determinar por qual mecanismo ocorre a separação de fases no sistema ternário fibroína de seda, alginato de sódio e água, sendo encontrados os dois tipos de mecanismos. Além disso, esse estudo cinético permitiu determinar oito dias como o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio termodinâmico após a mistura.

3.7 Diagramas de Fases

Sistemas multicomponentes que possuem mais de uma fase, podem ser estudados através de seus diagramas de fases. A dependência do equilíbrio de fases de variáveis, tais como temperatura e pressão, altera o diagrama de fases da mistura, como exemplificado na Figura 9.

Figura 9: Exemplo de diagrama ternário entre óxido de polipropileno (PEO), óxido de polipropileno-b-dimetilsiloxano (P(EO-b-DMS)) (COP) e tolueno (TL), mostrando a influência da temperatura no diagrama de fases. (Fonte: Jiang et al, 2011)

Para sistemas ternários, como o estudado, diagramas comumente utilizados são o ternário e o retangular. O diagrama ternário apresenta diretamente informações sobre a região de miscibilidade da blenda em função de sua composição, bem como a composição de cada fase do sistema. Já o diagrama retangular, Figura 10, apresenta a fração de dois componentes, sendo a fração do terceiro componente calculada considerando-se que a soma das três frações deve ser igual à unidade.

Figura 10: Exemplo de diagrama retangular para MIK, acetona e água.
(Fonte: Sandler, 2006)

Como já mencionado, a curva binodal separa as regiões monofásica e bifásica do sistema, enquanto as linhas de amarração (*tie lines*) relacionam a composição em equilíbrio de cada fase. Ainda é possível identificar o ponto crítico da mistura através dos diagramas, sendo que este ocorre quando a linha de amarração se torna um único ponto, e ambas as fases apresentam a mesma composição.

3.8 Modelagem Termodinâmica

A modelagem e a simulação de processos são de extrema importância na indústria, pois permitem a concepção de novos processos, o dimensionamento de equipamentos e eventualmente o aumento da eficiência do equipamento ou da planta. Porém, para que se possa realizar a simulação de um processo, conhecimento das propriedades termodinâmicas dos compostos é de fundamental importância.

Modelos termodinâmicos, que representam o comportamento dos compostos quando em mistura, têm evoluído ao longo do tempo, passando a apresentar resultados cada vez mais acurados quando aplicados a misturas mais complexas, como aquelas contendo polímeros, eletrólitos e biomoléculas. Porém, ainda existe a necessidade de estudar mais profundamente alguns tipos de sistemas e desenvolver modelos mais precisos para que seu comportamento termodinâmico seja melhor descrito. Por meio de simulação é possível prever, via extrapolação de resultados em condições conhecidas, o comportamento de compostos em condições nas quais seria difícil obter dados experimentais (Chen et al, 2002).

A solução formada através da mistura de duas ou mais substâncias pode ser classificada como uma mistura ideal ou uma mistura não ideal. Uma mistura ideal é uma mistura homogênea que apresenta propriedades físicas (como volume, energia interna e entalpia) proporcionais às propriedades dos componentes puros que a constituem na mesma temperatura e pressão. Essa condição é observada para misturas em que interações intermoleculares entre o soluto e o solvente são similares as interações entre as moléculas do mesmo grupo, solvente-solvente e soluto-soluto. Na prática, verifica-se a não idealidade de uma solução pela observação de variação de volume e/ou temperatura no processo de mistura, variação ausente em misturas ideais (Sandler, 2006).

Bates (1991) coloca quatro fatores como sendo determinantes no equilíbrio de fase formado por polímeros: a estrutura molecular do polímero (isto é, se os polímeros possuem cadeia linear ou ramificado), a composição da mistura (em se tratando de polímeros geralmente é usada a fração volumétrica de cada componente na mistura), o grau de polimerização e a estrutura dos monômeros que constituem os polímeros, uma vez que monômeros diferentes possuem energia de interação diferentes entre si.

Em geral misturas poliméricas apresentam desvios da solução ideal, que são facilmente observáveis em termos de variação de volume, ao se realizar a mistura. Essa variação é causada pelas interações diferentes entre cada monômero presente, que não ocorrem de maneira aleatória. Essas divergências da idealidade podem ser computadas na interação entre os polímeros via equações de estado e equações que avaliem a entropia em excesso da mistura.

A avaliação de miscibilidade entre polímeros está relacionada com a interação entre eles. Embora, em princípio, modelos para a não idealidade de misturas possam ser estendidos para sistemas poliméricos, existem modelos específicos que buscam quantificar essa interação para que se possa entender o fenômeno de separação de fases para sistemas poliméricos. Esses sistemas não são de fácil modelagem, uma vez que são compostos por macromoléculas, podem ter grupos laterais que influenciam a movimentação da cadeia principal da molécula alterando as probabilidades de interação. Além disso, verifica-se a presença de diversas formas de interação intermoleculares como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Estudos da literatura relacionados a blendas poliméricas muitas vezes apresentam resultados experimentais contraditórios, como no caso apresentado por Jawalkar (2007), que apresenta resultados de simulação de dinâmica molecular entre moléculas de poli(vinilálcool) e quitosana, sendo para isso considerados todos os fatores previamente mencionados na elaboração da simulação.

O sistema estudado, contendo fibroína e alginato em solução aquosa, classifica-se como uma solução fortemente não ideal, pois observa-se a formação de duas fases. Os componentes poliméricos são macromoléculas dotadas de cargas pontuais dispersas (polieletrólitos), cuja estrutura molecular difere de forma significativa, e podem sofrer alterações significativas de estrutura (como a transição

de seda I para seda II no caso da fibroína) e carga elétrica, relacionada à protonação e desprotonação conforme as condições do meio.

Para sistemas multifásicos contendo polímeros que, ao atingir o equilíbrio termodinâmico, apresentam duas ou mais fases líquidas, existem diversos modelos na literatura que descrevem o comportamento termodinâmico de tais sistemas com precisão satisfatória sem envolver uma grande complexidade de cálculos matemáticos, dentre os modelos menos complexos pode-se citar o de Flory-Huggins, NRTL (Non Random Two Liquid Model) e UNIQUAC (Universal Quasichemical). O modelo PC-SAFT (Perturbed Chain Statistical Association Fluid Theory) também pode ser utilizado para sistemas poliméricos, porém já se trata de um modelo mais complexo, envolvendo um esforço matemático e computacional maior.

Soluções proteicas podem, alternativamente ao equilíbrio líquido-líquido, apresentar a formação de um precipitado sólido, dando origem a um sistema em equilíbrio sólido-líquido. Em termos de modelagem, uma equação simples que ajusta bem dados de equilíbrio de soluções proteicas contendo eletrólitos e não eletrólitos é a chamada equação de Cohn, uma equação empírica que correlaciona a solubilidade da proteína com a constante de *salting out* (K_s). A Equação de Cohn é apresentada na Equação 7:

$$\ln(S) = \beta - K_s m \quad (7)$$

em que S é a solubilidade da proteína, K_s a constante de solubilidade, m a concentração do agente precipitante e β uma constante relacionada à carga líquida da proteína, portanto dependente do pH. Para não eletrólitos, o valor de β é relacionado à solubilidade da proteína na ausência de agentes precipitantes. (Green, 1931; Myerson, 1952; Franco, 2012).

3.8.1 Equilíbrio sólido líquido

Ao se tratar de equilíbrio sólido-líquido, a Equação 6, quando analisada do ponto de vista como a relação à fugacidade na fase líquida e na fase sólida, pode ser calculada como proposto por Prausnitz (1999), considerando o sólido como componente puro:

$$\ln\left(\frac{f_i^{l,0}}{f_i^{s,0}}\right) = \frac{\Delta h_f}{RT_t}\left(\frac{T_t}{T} - 1\right) - \frac{\Delta C_p}{R}\left(\frac{T_t}{T} - 1\right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \ln\left(\frac{T_t}{T}\right) \quad (8)$$

A Equação 8 coloca a relação entre as fugacidades do componente em fases distintas em função de propriedades termodinâmicas mensuráveis, sendo:

- Δh_f a entalpia de fusão do composto
- T a temperatura
- R a constante universal dos gases
- T_t a temperatura do composto no ponto triplo
- ΔC_p a diferença entre a capacidade calorífica do composto na fase sólida e na fase líquida

Em geral, duas simplificações são feitas na Equação 8. Primeiramente, utiliza-se a temperatura de fusão no lugar da temperatura do ponto triplo. Em segundo lugar, devido os termos contendo a variação da capacidade calorífica podem ser desprezados quando comparados ao termo que envolve a entalpia. (Rocha, 2011). Para sistemas poliméricos, entretanto, muitas vezes essa forma de equação não é utilizada, pois as propriedades de fusão não são conhecidas para polímeros. Desse modo, equações como a equação de Cohn acabam sendo preferidas.

3.9. Potencial Zeta

Um sistema coloidal é constituído de uma fase finamente dispersa em outra, ou seja, quando se tem partículas ou moléculas de 1 a 100 nm de uma fase dispersas em outra fase (IUPAC, 2002). Existem exemplos de sistemas coloidais de diversos tipos, como dispersões de líquido em líquido e de sólido em líquido.

Quando em solução, as moléculas dispersas na fase contínua podem adquirir cargas superficiais, que por sua vez atraem contra íons presentes na solução, formando uma camada de contra íons na superfície da molécula para neutralizar a carga superficial. Este fenômeno é conhecido como camada elétrica dupla. A região da camada de contra íons pode ser dividida em duas. A primeira região, mais próxima à superfície da molécula, é conhecida como camada de Stern, onde os contra íons podem até ser adsorvidos na superfície; a segunda é uma camada difusa, que permite

a difusão dos íons (Hunter, 1988). A existência dessa camada elétrica dupla faz com que o potencial elétrico próximo à molécula seja diferente do seio da solução, sendo a tendência a redução deste potencial com o aumento da distância da superfície da molécula, conforme pode-se observar na Figura 11:

Figura 11: Esquemática do potencial Zeta de partícula com carga negativa, solvatada com íons positivos e contra-íons negativos, mostrando a camada elétrica dupla e o potencial Zeta. (Adaptado de: www.malvern.com)

Como na camada de Stern os contra íons estão ligados à superfície da molécula, estes se movimentam como uma unidade. Para efeitos práticos, é importante saber a carga líquida da molécula com os contra íons aderidos na camada de Stern. Para isso, é medido o potencial elétrico na divisão entre a camada de Stern e a camada difusa, que é conhecido como potencial Zeta (Glawdel, 2008).

Para sistemas coloidais observam-se duas situações distintas: o sistema pode ser instável ou ser estável. Quando se tem um sistema instável, a carga líquida das moléculas não é grande o suficiente, o que limita a repulsão eletrostática entre elas e

pode ocasionar a aglomeração dessas moléculas. No caso de um sistema estável, a carga superficial das moléculas é grande o suficiente para que elas não se aproximem, permanecendo, desta forma, em suspensão. De acordo com a literatura, suspensões que apresentam potencial Zeta entre -30 mV e +30 mV são consideradas instáveis e para valores menores que -30 mV e maiores que +30 mV, tem-se uma suspensão estável (Larsson, 2012).

As macromoléculas estudadas neste trabalho, quando em solução, podem apresentar variações de suas cargas líquidas em função do pH da solução em que se encontram. O alginato de sódio possui um pKa de aproximadamente 3,50, o que quer dizer que em valores de pH inferiores a 3,50 a molécula começa a sofrer desprotonação e, portanto, a ganhar carga negativa, até que esteja completamente desprotonada em valores mais elevados; em pH igual a 3,50, metade das moléculas estará protonada. A fibroína de seda possui um pI (ponto isoelétrico) na faixa de 4, apresentando, portanto, carga líquida negativa para valores acima deste pH. Para soluções contendo estes dois polímeros, espera-se que em pH acima dos valores de pKa e pI ambos os polímeros possuam carga negativa, indicando uma tendência a repulsão entre as moléculas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Reagentes e Equipamentos

Os reagentes utilizados nos experimentos realizados foram os seguintes:

- Fibroína de seda (casulos de bicho-da-seda *Bombyx mori*), cedidos pela empresa Bratac S.A.
- Alginato de sódio Sigma Aldrich
- Carbonato de cálcio P.A. Labsynth ®
- Cloreto de cálcio P.A. Labsynth ®
- Etanol 98%
- Hidróxido de sódio P.A. Labsynth ®
- Polietilenoglicol 10.000 g/mol Sigma Aldrich

Na realização dos experimentos e análises foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica Shimadzu AUX 229
- Banho termostático Láctea F25 MC
- Centrífuga Hermle modelo Z326 K
- Espectrofotômetro DeNovix modelo DS11
- Zetasizer Nano ZS90
- Estufa Quimis Q317B12
- Mufla Quimis Q318M

4.2 Purificação da fibroína

A fibroína de seda foi removida dos casulos e submetida ao processo de degomagem para a retirada da sericina. Primeiramente os casulos foram lavados com água. Em seguida foram imersos em solução de NaCO_3 1 g/L pelo período de 30 min a 85 °C, para cada 50 g de casulos foi utilizado 600 mL de solução de NaCO_3 (Ribeiro, 2014). Este processo foi repetido por três vezes. Uma vez lavados, estes foram mantidos em estufa a 30 °C (Lopes, 2016). Após secos, os fios foram cortados utilizando uma tesoura.

4.3 Dissolução da fibroína em solvente ternário

A fibroína purificada foi dissolvida em solvente ternário de CaCl_2 , etanol e água (proporção molar 1:2:8). Uma vez preparado o solvente ternário, este foi aquecido em banho termostático até 85 °C, em seguida a fibroína foi adicionada e a solução mantida no banho até sua total dissolução pelo período máximo de 1h 30 (Ribeiro, 2014). O volume de solvente e massa de fibroína utilizados foram calculados de forma que a solução final obtida tivesse 5 % em massa de fibroína (Ajisawa, 1997). A solução preparada foi mantida sob refrigeração a 10 °C para uso posterior.

4.4 Diálise da fibroína

A solução de fibroína em solvente ternário foi submetida ao processo de diálise para a obtenção de uma solução aquosa. No processo, 10 mL de solução de fibroína em solvente ternário foram colocados em uma membrana de diálise Viscosan 22 EU – 20 USA com corte de massa molecular de 3,5 kDa, e esta foi colocada em um bquer com água ultrapura na proporção volumétrica entre a solução de fibroína e água de 1:15 (Ribeiro, 2014). A água de diálise foi trocada a cada 24h pelo período de 3 dias. A solução aquosa obtida foi centrifugada por 15 min.

4.5 Determinação da concentração da solução aquosa de fibroína

Após a diálise, a solução aquosa obtida teve sua concentração calculada por gravimetria por evaporação de solvente em estufa a 100 °C (Lopes, 2016).

4.5.1 Concentração da solução de fibroína

Quando necessário, a solução aquosa de fibroína foi submetida ao processo de diálise com poli(etilenoglicol) (PEG). Foi preparada uma solução de PEG 25 % (m/m). O período de diálise variou de 2 a 8 h, dependendo da necessidade de concentração da solução de fibroína (Kaplan et al, 2013). O critério de parada foi

visual. Após a diálise a solução aquosa de fibroína teve sua concentração novamente determinada por gravimetria por evaporação de solvente.

4.6 Preparo da solução de alginato

O alginato de sódio foi dissolvido diretamente em água ultrapura na concentração desejada com agitação magnética.

4.7 Preparo das blendas – Equilíbrio líquido-líquido

Com base nas concentrações das soluções de fibroína de seda e alginato de sódio, foram calculadas as quantidades de cada solução que deveriam ser utilizadas para que se atingisse a concentração mássica desejada de cada componente em uma blenda de 10 g. Primeiramente foi adicionada a solução de fibroína, seguida pela de alginato e, por fim, caso houvesse necessidade, a massa total era completada com água ultrapura. A mistura foi realizada sob agitação magnética baixa e o pH foi ajustado pela adição de hidróxido de sódio.

4.8 Preparo das blendas – Equilíbrio sólido-líquido

Foram preparadas amostras de 5 mL, sendo 4,5 mL de solução de alginato e 0,5 mL da solução de fibroína. As concentrações de alginato nas blendas variaram de 0,4% (m/m) a 2% (m/m) em intervalos de 0,2%. Foram preparadas amostras em duplicata, e o pH foi ajustado pela adição de hidróxido de sódio.

4.9 Equilíbrio Termodinâmico

Após o preparo das blendas, estas foram colocadas em banho termostático a 25 °C pelo período de 8 dias.

4.10 Separação das fases

Uma vez atingido o equilíbrio termodinâmico cada blenda foi centrifugada pelo período de 20 minutos a 5000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, e o restante foi novamente centrifugado por mais 10 minutos, sendo o sobrenadante novamente coletado e a massa final do sobrenadante coletado anotada.

4.11 Quantificação dos componentes

A fibroína de seda foi quantificada nas amostras pelo método de Bradford. A curva de calibração foi construída com a própria fibroína, com amostras preparadas em concentrações variando de 0 – 100 µg/mL. As amostras foram diluídas, adicionou-se o reagente de Bradford e foi realizada a leitura no espectrofotômetro. Para cada amostra foi realizada a leitura em triplicata.

O alginato de sódio foi quantificado utilizando-se o método de calcinação. Primeiramente foi realizada a validação do método, com a construção de uma curva de calibração com amostras de concentração variando entre 0,5 – 3,0% em massa de alginato. Na quantificação de cada amostra, 3 mL foram adicionados a um cadinho de cerâmica previamente pesado, a massa da amostra também foi pesada e o cadinho com a amostra foi colocado em estufa a 100 °C pelo período de 24h. Após este período, as amostras foram colocadas em uma mufla a 600 °C pelo período de 6 horas. Ao serem retiradas da mufla, as amostras calcinadas foram mantidas em um dissecador até esfriarem para serem pesadas. As Equações 9 e 10 mostram a reação de decomposição do alginato de sódio:

Uma vez conhecidas as massas da fibroína e de alginato na fase líquida e a massa total da fase líquida, o restante das composições pode ser obtido por balanço de massa, como ilustrado na Figura 13 e nas Equações de 11 a 15.

$$m_s = m_b - m_l \quad (11)$$

$$m_{\text{SSF}} = m_{\text{SF}} - m_{\text{ISF}} \quad (12)$$

$$m_{sSA} = m_{SA} - m_{ISA} \quad (13)$$

$$m_{IH} = m_I - m_{ISF} - m_{ISA} \quad (14)$$

$$m_{sH} = m_s - m_{sSF} - m_{sSA} \quad (15)$$

As Equações 10 a 14 mostram o balanço de massa realizado para a quantificação dos componentes nas fases no estudo do equilíbrio líquido – líquido. Nessas equações, o subscrito b é referente à blenda, g, à fase gel formada, l, à fase líquida formada, SF, à fibroína de seda, e AS, ao alginato de sódio.

Figura 12: Esquema dos métodos utilizados para quantificar os componentes do sistema ternário e realizar o balanço de massa.

4.12 Potencial Zeta

Soluções de fibroína e alginato foram preparadas individualmente, sendo a de fibroína em concentração 1,40% em massa (após o processo de diálise) e a de alginato, em concentração de 2,5% em massa. Foram separadas quatro amostras de 5 mL de cada um dos polímeros. O ajuste de pH foi feito por meio da adição de hidróxido de sódio até que se tivesse uma amostra de cada polímero nos pHs 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

Cada amostra foi diluída 100 vezes antes da leitura do potencial Zeta. O *software* foi configurado para realizar três grupos de leitura, com até 100 leituras cada, para a geração de um pico com o valor do potencial Zeta aparente das moléculas em solução de cada amostra.

5. Resultados e Discussão

5.1 Purificação da fibroína

Para a obtenção da fibroína de seda pura, foi necessário realizar a purificação da proteína presente nos casulos do bicho-da-seda. A purificação é conhecida pelo processo de degomagem e consiste na solubilização da sericina presente no fio da seda.

5.2 Dissolução da fibroína em solvente ternário

A fibroína de seda é uma proteína com características hidrofóbicas e não é possível dissolvê-la diretamente em água, para a obtenção da solução aquosa de fibroína, um método proposto é a dissolução em um solvente ternário contendo água, etanol e cloreto de cálcio. Esse sistema proporciona a solvatação e consequente estabilização das moléculas de fibroína permitindo sua dissolução.

Neste processo de preparo da solução de fibroína em solvente ternário, foi testada a dissolução de fibroína em duas concentrações diferentes 5% e 10% (m/m). Não foram observadas diferenças significativas no preparo da solução, porém após a diálise foi observada uma maior perda de proteína precipitada para os sistemas com concentração de 10% (m/m).

5.3 Diálise da fibroína

Após o processo de diálise, a solução aquosa de fibroína apresentava a concentração variando de 1,40 a 1,80% (m/m). Estes valores foram obtidos tanto para soluções aquosas preparadas a partir da solução em solvente ternário contendo 5% (m/m) de fibroína, quanto para soluções preparadas a partir da solução em solvente ternário contendo 10% (m/m) de fibroína. Como as concentrações finais da solução aquosa eram similares, independente da solução em solvente ternário que a originou, optou-se por trabalhar com a solução 5% em massa para reduzir perdas de fibroína, uma vez que o material precipitado no processo de diálise não pode ser reaproveitado.

A Figura 13 mostra o resultado da diálise para solução preparada a partir da solução de 5% (m/m) e 10% (m/m).

Figura 13: Amostras com solução de fibroína 5% (esquerda) e 10% (direita) após o processo de diálise para analisar qualitativamente a influência da concentração da proteína na precipitação durante a diálise.

Em alguns casos, após o processo de diálise foi observado que a membrana não estava túrgida, o que indica que a vedação não foi eficaz e parte da fibroína foi perdida. De fato, ao realizar a gravimetria destas soluções, foi verificado que a concentração de fibroína estava mais baixa do que para as soluções cuja membrana se apresentou túrgida após os 3 dias de diálise. As soluções que apresentaram essa situação de não turgidez após a diálise não foram utilizadas.

5.4 Concentração da solução de fibroína

Em algumas soluções dialisadas, apesar da membrana se apresentar túrgida, a concentração de fibroína se apresentou menor do que o desejado. Nestes casos, foi realizada uma segunda diálise com PEG conforme descrito na metodologia. O PEG é um polímero hidrofílico que acaba por retirar água da solução de fibroína do interior da membrana, resultando no aumento da concentração de fibroína na solução aquosa. O critério de parada para esta diálise foi visual, uma vez que quanto mais concentrada, mais opaca se apresenta a solução aquosa de fibroína.

5.5 Preparo da solução de alginato

Para o estudo do equilíbrio líquido-líquido foram testadas inicialmente diversas concentrações da solução de alginato de sódio para o preparo das blendas, desde 3% até 10% em massa. Decidiu-se utilizar a solução com 5% em massa de alginato, pois ela permitia que as blendas fossem feitas nas composições desejadas sem que houvesse problemas de manipulação da solução de alginato relacionados à viscosidade elevada de soluções mais concentradas. Messian et al (2012) apresentaram um estudo de separação de fases entre o alginato de sódio e proteínas presentes em ervilhas, em que soluções iniciais de alginato com concentrações superiores a 1% em massa interferiram no processo de separação de fases, devido à retenção de um polímero no outro. Apesar disso, optou-se aqui por usar a solução 5%, pois em concentrações menores não seria possível a obtenção de uma blenda com as composições desejadas.

Nas blendas preparadas para testar a metodologia proposta e avaliar preliminarmente o comportamento das mesmas no processo de separação, observou-se que concentrações mais elevadas dos polímeros (acima de 1,0% de fibroína e 2,0% de alginato) apresentavam dificuldades no processo de separação das fases formadas. Desse modo, optou-se por trabalhar com concentrações inferiores ou próximas a essas no estudo do equilíbrio líquido - líquido.

5.6 Preparo das blendas

A mistura das soluções para o preparo das blendas foi realizada com agitação magnética baixa para evitar a fibrilogênese da fibroína que quando submetida a cisalhamento sofre a transição de fase de seda I para seda II, tornando-se insolúvel e tornando a amostra inviável para análise, pois a concentração dos polímeros em solução não é mais a desejada.

5.7 Quantificação dos componentes

Goodwin e Morton (1946) apresentaram resultados que mostram a absorção dos aminoácidos tirosina e triptofano na faixa entre 250 – 290 nm do espectro UV-VIS,

o que tornaria o método de espectroscopia adequado para a quantificação da fibroína, uma vez que esta possui triptofano em sua composição. Porém, verificou-se experimentalmente que o alginato também absorve no comprimento de onda de 290 nm, o que tornou necessário a utilização do método de Bradford para a quantificação da proteína, uma vez que foi verificado que o alginato não absorve na faixa de 595 nm do espectro.

Para a construção da curva de calibração do método de Bradford, optou-se por utilizar a própria fibroína ao invés da BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumina de soro bovino), proteína utilizada normalmente como padrão em análises desse método.

No processo de preparo das amostras para a leitura da concentração de fibroína pelo método de Bradford, foi necessária a diluição das amostras, pois em alguns casos observava-se a formação de um aglomerado que causava espalhamento de luz, fornecendo uma leitura equivocada. Duas hipóteses foram levantadas para a formação deste aglomerado: a transição de fases seda I para seda II da fibroína e a formação de gel de alginato. A transição de fases da proteína pode ocorrer devida à agitação aplicada para homogeneizar a amostra após a adição do reagente de Bradford. Já a formação de gel de alginato pode ter sido causada pela redução do pH com a adição do reagente de Bradford, que possui pH ácido. Para avaliar o efeito do pH do reagente de Bradford na gelificação do alginato presente na amostra, foram preparadas amostras com uma concentração de 0,02% em massa de BSA e variando a concentração de alginato de 0,1% a 0,8% em massa. Ao adicionar o reagente de Bradford, verificou-se que em concentrações de 0,6% e 0,8% de alginato ocorreu a formação de gel. Com isso, pode-se dizer que a dificuldade nas leituras não está associada unicamente ao pH da solução, mas também à concentração de alginato. Desse modo, em cada caso era realizada a diluição das amostras de modo a que não ocorresse a formação de aglomerados sólidos.

A quantificação do alginato de sódio na fase líquida foi feita pela calcinação das amostras. Este processo é utilizado para a remoção de compostos voláteis, decomposição térmica, ou para se obter transição de fases. No caso da análise do alginato de sódio, o propósito foi a decomposição térmica do material, que forma óxido de sódio, permitindo a quantificação do alginato presente na amostra por meio da estequiometria da reação de decomposição. No processo de calcinação ocorre a

evaporação da água presente nas amostras, a fibroína é completamente decomposta, e o alginato se decompõe gerando óxido de sódio, o resíduo verificado nos cadinhos, conforme a Figura 14. Para isso foram preparadas amostras padrão de alginato e adicionados volumes diferentes de solução de fibroína para avaliar a possível influência da presença de fibroína no método. Essa influência foi descartada pelos resultados experimentais.

Figura 14: Óxido de cálcio formado após decomposição do alginato de sódio pelo processo de calcinação em mufla.

No processo de calcinação do alginato de sódio observou-se, ao retirar as amostras da mufla, que na parte de fora dos cadinhos havia óxido de sódio. Isso foi atribuído ao arraste de amostra para fora do cadinho durante o aquecimento. Para solucionar tal problema passou-se a evaporar a água das amostras em estufa antes de estas serem levadas à mufla.

5.8 Potencial Zeta

Como exposto na metodologia, soluções contendo um dos polímeros (alginato de sódio ou fibroína de seda) foram preparadas nos pHs 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 para que fosse possível avaliar a carga superficial de cada componente em solução aquosa de forma individual. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 15 a 22:

Figura 15: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 7,0

Figura 16: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 8,0.

Figura 17: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 9,0

Figura 18: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de fibroína preparadas em concentração 1,4% em massa diluída 100x em pH = 10,0

Figura 19: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 7,0

Figura 20: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 8,0

Figura 21: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 9,0

Figura 22: Resultado das leituras de potencial Zeta para amostras de alginato preparadas em concentração 1,0% em massa diluída 100x em pH = 10,0

Cada gráfico foi construído a partir de três leituras da amostra pelo equipamento. Após a realização das leituras o próprio equipamento categoriza a qualidade dos dados obtidos. Para todas as amostras analisadas, os dados obtidos

pelo equipamento foram classificados como de boa qualidade, e isso se reflete nos gráficos obtidos, pois os três picos obtidos para cada amostra são próximos e se apresentam na mesma faixa de potencial Zeta. Para melhor explorar os dados obtidos, a Tabela 1 apresenta os valores médios dos picos e os desvios para cada amostra analisada.

Tabela 1: Medidas de potencial Zeta (mV) e desvio padrão das leituras efetuadas para as amostras individuais de fibroína de seda e alginato de sódio com pH variando entre 7,0 e 10,0.

pH	7	8	9	10
SF	-7,3 ± 4,8	-8,5 ± 3,9	-8,8 ± 4,0	-8,3 ± 4,3
SA	-58,9 ± 3,6	-60,8 ± 4,1	-61,0 ± 4,3	61,0 ± 3,3

Por meio dos dados apresentados, observa-se que as soluções de ambos os polímeros apresentam potencial Zeta aparente negativo, ou seja, as moléculas apresentam carga superficial negativa na faixa de pH estudada. Este fato indica que ao realizar a mistura de soluções dos dois polímeros, a interação predominante será a repulsão eletrostática entre as moléculas dos dois polímeros. O que diferencia as soluções de fibroína das de alginato é que a solução de fibroína apresenta valores de potencial Zeta entre os limites de -30,0 mV e +30,0 mV, faixa de valores adotada como referência para classificar soluções instáveis. Desse modo, as soluções de fibroína, em todos os valores de pH estudados, pode ser classificada como uma solução instável (Larsson, 2012). Essa classificação da solução de fibroína em água está de acordo com o verificado experimentalmente. Alguns dias após o preparo da solução aquosa pelo processo de diálise, as soluções de fibroína gelificavam. Como o potencial Zeta da solução se encontra na faixa de instabilidade, as moléculas de fibroína na solução preparada não possuem carga superficial suficiente para que sejam fortemente repelidas entre si formando uma solução estável. Com o tempo, as moléculas de fibroína se aglomeram, formando um gel, devido possivelmente às interações hidrofóbicas e às ligações de hidrogênio intermoleculares, que acabam por estabilizar as estruturas beta formadas no processo de gelificação (Ayub, 1993). Além disso, a solubilização da proteína foi realizada com água ultrapura, e no processo de

diálise foram retirados os íons em solução, que por sua vez garantiam a estabilidade da solução devido a solvatação das moléculas de fibroína.

Já a solução de alginato, por apresentar um valor de potencial Zeta aparente em torno de $-60,00$ mV, é classificada como solução estável, ou seja, as moléculas possuem carga superficial com intensidade suficiente para evitar que elas interajam entre si. Experimentalmente esta estabilidade também foi observada, uma vez que, após preparadas, as soluções de alginato permaneciam estáveis indefinidamente, sem que sofressem processos de gelificação ou precipitação.

Para os dois polímeros esperava-se que a leitura do potencial Zeta apresentasse valores negativos, pois na faixa de pH trabalhada, a fibroína está acima do seu ponto isoelétrico e o alginato está acima do pKa dos ácidos que o compõem. Por outro lado, esperava-se que as soluções apresentassem valores diferentes para o potencial Zeta com o aumento do pH, pois ao se afastar do ponto isoelétrico e do pKa da fibroína e alginato, respectivamente, mais grupos ionizáveis deveriam sofrer desprotonação alterando a carga superficial das moléculas. A hipótese que justifica a invariância do potencial Zeta é a de que, mesmo em pH de 7,0 (o valor mais baixo estudado experimentalmente), as moléculas já se encontram completamente desprotonadas.

5.9 Equilíbrio de fases – abordagem líquido-líquido

Na primeira etapa do projeto, as blendas foram preparadas variando a concentração de fibroína e de alginato para a determinação das composições das fases formadas quando fosse atingido o equilíbrio termodinâmico. Nesse caso, a concentração da solução inicial de fibroína, como mencionado na metodologia, foi determinada por gravimetria de evaporação de solvente (a quantidade de água foi determinada considerando-se também a fração de alginato, determinada por calcinação e gravimetria). Nesse caso, a massa indicada na balança analítica está sujeita à incerteza inerente ao equipamento ($\pm 0,0005$ g). Além disso, apesar de ter sido utilizado o vidro de relógio mais leve disponível, com massa da ordem de 9,0 g, a massa de amostra seca não se encontrava na mesma ordem de grandeza da massa

do vidro de relógio, o que altera a precisão da balança em termos de algarismos significativos, e influencia os valores de concentração calculados pelo método.

As concentrações e pH trabalhados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Faixa de pH e concentração inicial dos componentes nas amostras trabalhadas na primeira fase do estudo.

pH	wt% SF	wt% SA	wt% H ₂ O
7,5	0,5%	0,5%	99,0%
7,5	0,5%	1,5%	98,0%
7,5	1,0%	2,0%	97,0%
8,0	0,5%	0,5%	99,0%
8,0	0,5%	1,5%	98,0%
8,0	1,0%	2,0%	97,0%
8,5	0,5%	0,5%	99,0%
8,5	0,5%	1,5%	98,0%
8,5	1,0%	2,0%	97,0%
9,0	0,5%	0,5%	99,0%
9,0	0,5%	1,5%	98,0%
9,0	1,0%	2,0%	97,0%
10,0	0,5%	0,5%	99,0%
10,0	0,5%	1,5%	98,0%
10,0	1,0%	2,0%	97,0%

Uma vez atingido o equilíbrio termodinâmico, foi verificada a formação de duas fases distintas, uma líquida e uma fase gel, os componentes alginato e fibroína foram quantificados na fase líquida, pelos métodos já descritos na metodologia apresentada: a fibroína através do método de Bradford e o alginato através da calcinação das amostras. O método de Bradford foi utilizado, pois ele não sofre influência do alginato e é capaz de quantificar a proteína quando esta se encontra em baixas concentrações, o que não seria possível fazer por gravimetria devido a capacidade/sensibilidade da balança. De posse das concentrações de fibroína e alginato na fase líquida, foi realizado o cálculo da composição das fases em equilíbrio através do balanço de massa do sistema. Os resultados são apresentados na Tabela 3, em que cada amostra é identificada por dois números separados por uma barra (XX/YY), designando respectivamente as frações mássicas (em porcentagem) de fibroína e alginato na amostra preparada (wSF/wSA). Com esses dados foram construídos os

diagramas de fases do sistema. Após a construção dos diagramas, verificou-se que as composições determinadas para as fases em equilíbrio apresentaram características incompatíveis com uma curva de equilíbrio de fases. Os diagramas obtidos são apresentados nas Figuras 23 a 27.

Tabela 3: Composição mássica das fases formadas no equilíbrio de fases do sistema fibroína-alginato-água na primeira etapa do projeto.

Amostra	pH	wH ₂ O (m/m) fase líquida	wSF (m/m) fase líquida	wSA (m/m) fase líquida	wH ₂ O (m/m) fase gel	wSF (m/m) fase gel	wSA (m/m) fase gel
0,5/0,5	7,5	0,9947	0,0006	0,0047	0,9953	0,0044	0,0003
0,5/1,5	7,5	0,9856	0,0005	0,0139	0,9944	0,0045	0,0011
1,0/2,0	7,5	0,9775	0,0009	0,0216	0,9886	0,0091	0,0023
0,5/0,5	8	0,9944	0,0009	0,0047	0,9956	0,0041	0,0003
0,5/1,5	8	0,9865	0,0009	0,0126	0,9935	0,0041	0,0024
1,0/2,0	8	0,982	0,0004	0,0176	0,988	0,0096	0,0024
0,5/0,5	8,5	0,9939	0,0014	0,0046	0,9961	0,0035	0,0004
0,5/1,5	8,5	0,9895	0,0005	0,0100	0,9905	0,0045	0,0005
0,5/0,5	9	0,9955	0,0005	0,004	0,9945	0,0045	0,0001
0,5/1,5	9	0,9865	0,0007	0,0128	0,9935	0,0043	0,0022
1,0/2,0	9	0,9762	0,0016	0,0222	0,9898	0,0084	0,0018
0,5/0,5	10	0,9944	0,0007	0,0049	0,9957	0,0042	0,0001
0,5/1,5	10	0,9852	0,0008	0,014	0,9947	0,0042	0,0011
1,0/2,0	10	0,9778	0,0008	0,0214	0,9882	0,0092	0,0025

Figura 23: Curva de equilíbrio para o sistema em pH = 7,5. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. ● dados experimentais. + ponto de mistura inicial.

Figura 24: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =8,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. • dados experimentais. + ponto de mistura inicial.

Figura 25: Curva de equilíbrio para o sistema em pH =8,5. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. • dados experimentais. + ponto de mistura inicial.

Figura 26: Curva de equilíbrio para o sistema em pH = 9,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. • dados experimentais. + ponto de mistura inicial.

Figura 27: Curva de equilíbrio para o sistema em pH = 10,0. Linhas pontilhadas: linhas de amarração. • dados experimentais. + ponto de mistura inicial.

Nas Figuras apresentadas observa-se uma acentuada variação da inclinação das linhas de amarração, o que em alguns casos leva ao cruzamento destas. Esse comportamento não é compatível com um estudo de equilíbrio de fases, pois viola o princípio de que o estado de equilíbrio, em um sistema de composição constante

mantido em pressão e temperatura constantes, seja único. Apesar de ter sido observado o cruzamento das linhas de amarração, verifica-se, através dos dados apresentados na Tabela 3, a formação de uma fase rica em alginato e uma segunda fase rica em fibroína. Nota-se que, em todas as blendas, a porcentagem de alginato na fase líquida é substancialmente maior do que a de fibroína. O contrário ocorre na fase mais densa, que se parece com um sólido. Esse fato pode ser devido à solubilidade do alginato em água, ou seja, devido a sua hidrofiliidade – o alginato permanece em solução, enquanto a fibroína se aglomera, resultando em consequente formação de uma fase densa semelhante a um sólido ou a um gel. Segundo Ayub (1993) a fibroína ao gelificar sofre a transição de fase de α -hélice (seda I) para folhas- β (seda II), que são insolúveis em água, o que está de acordo com o verificado experimentalmente, uma vez que a maior parte da fibroína se encontra na fase mais densa. Com base nos resultados de potencial Zeta obtidos, pode-se dizer que a formação da segunda fase ocorre devido à instabilidade da solução de fibroína, levando a formação de estrutura que pode ser classificada como gel. Deve-se lembrar que a fibroína possui a cadeia principal hidrofóbica, que em presença de água tende a se aglomerar com outras moléculas de fibroína. Como o alginato é um polímero altamente hidrofílico e com carga negativa nas condições de pH trabalhadas, ele se encontra solvatado por moléculas de água e, portanto, interage de forma limitada com as moléculas de fibroína; por outro lado, sua presença diminui a disponibilidade de moléculas de água para a estabilização da fibroína em solução.

Ao realizar uma análise mais criteriosa do cruzamento das linhas de amarração, observa-se que, por se tratar de um sistema diluído, em que as concentrações de polímero representam uma baixa fração do total do sistema, as concentrações finais obtidas são muito baixas, e qualquer desvio nas leituras realizadas pode gerar um desvio significativo nos resultados obtidos. Outro ponto importante, também de cunho matemático, é o fato de que o ponto que representa a fase líquida e o ponto de mistura inicial se encontram muito próximos, o que faz com que um pequeno desvio de leitura cause uma grande variação na concentração calculada para a fase sólida, o que pode vir a causar a alteração da inclinação da linha de amarração, gerando resultados distorcidos. Um fator importante que pode ter causado essa variação na inclinação das linhas de amarração é o efeito cumulativo dos desvios experimentais. Primeiramente, tem-se a determinação da concentração exata de fibroína, que é

somada aos erros envolvidos na leitura das amostras após a separação de fases. As medidas feitas no espectrofotômetro possuem uma incerteza inerente de $\pm 0,5\%$, o que, por se tratar de amostras diluídas, pode gerar desvios entre o valor real e o valor determinado que podem chegar a $0,14 \mu\text{g/mL}$ de fibroína. Analisando as amostras de alginato, o erro envolvido na quantificação das amostras é o mesmo observado em medidas gravimétricas, ou seja, o erro da balança. Entretanto, mais uma vez a massa de amostra final não se encontra na mesma ordem de grandeza da massa do cadinho, principalmente para amostras cuja fração total de alginato seja menor. Na finalização do trabalho, foi proposta a quantificação de alginato nas amostras via fotometria de chama, porém não foi possível a instalação do equipamento em tempo hábil para a leitura das amostras. Esse método, por envolver menor manipulação da amostra, possivelmente minimizaria os desvios experimentais.

Oliveira (2009) apresenta um procedimento experimental para a determinação do ponto de névoa para sistemas que formam duas fases líquidas, o que forneceria dados mais precisos para a determinação da curva binodal. Para o sistema estudado, o procedimento indicado seria adicionar a solução de alginato, de concentração conhecida, à solução de fibroína, pois com a manipulação poderia ocorrer a transição de fase da proteína. Contudo, não foi possível a aplicação deste método ao sistema, pois ao adicionar uma gota da solução de alginato e realizar a homogeneização da blenda, já se observava turbidez na solução de fibroína, fazendo com que esta perdesse sua característica transparente, não sendo possível assim, quantificar com precisão a quantidade exata adicionada. A Figura 28 apresenta a solução de fibroína pura e a blenda, onde pode ser observada a turbidez gerada após a mistura das soluções.

Figura 28:Comparativo visual entre solução de fibroína pura (a) e na blenda com alginato.

Essa turbidez é possivelmente resultante de um excesso local de alginato observado no momento da mistura. Ou seja, na própria adição de alginato, o fato de localmente se observar uma concentração relativamente alta de fibroína em contato com essa solução de alginato leva à formação da segunda fase. Mesmo que a composição final ainda devesse ser monofásica, pela instabilidade da solução de fibroína (observada nas medidas de potencial Zeta), a transição para uma única fase não é observada.

Diante das dificuldades apresentadas na abordagem do sistema como uma solução ternária que ao atingir o equilíbrio termodinâmico apresenta a formação de duas fases líquidas, e considerando-se o panorama geral resultante dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido, que mostravam uma concentração muito baixa de fibroína na fase líquida rica em alginato, pode-se considerar que a segunda fase formada nesse sistema constitui efetivamente uma fase sólida, ainda que amorfa, rica em fibroína. Novamente, ressalta-se que esse fato é compatível com análises resultantes das medidas de potencial Zeta (que mostram que mesmo uma fase líquida contendo somente fibroína é possivelmente instável). Desse modo, decidiu-se estudar o sistema sob a perspectiva da solubilidade da fibroína em solução de alginato, determinando-se a concentração de fibroína em solução em função da concentração de alginato, ou seja, analisando-se os dados como se o equilíbrio resultante fosse um equilíbrio sólido-líquido.

5.10 Equilíbrio de fases – abordagem sólido-líquido

Para esses experimentos, como descrito na metodologia, o volume de solução de fibroína adicionado foi mantido constante em todas as amostras e o de alginato variou de forma que a sua concentração final variasse de 0,2% a 2,0% em massa.

Após o período para que se estabelecesse o equilíbrio termodinâmico, o aspecto visual da blenda polimérica foi semelhante ao observado nas blendas preparadas na primeira etapa do trabalho, a formação de uma fase líquida incolor e de um precipitado com aspecto gelatinoso. Ao transferir a fase líquida de um tubo tipo Falcon para outro no momento de separação das fases formadas observou-se que esta era um pouco mais viscosa que a água, semelhante à solução de alginato pura, indicando que na fase líquida havia certa concentração de alginato. Já o precipitado obtido apresentou a mesma consistência verificada em soluções de fibroína que gelificaram dias após o processo de diálise.

Com base nas análises realizadas para quantificar cada um dos componentes na fase líquida obtida, foram construídos os gráficos de solubilidade apresentados nas Figuras 29 a 32. A concentração (g/mL) da fibroína na fase líquida foi calculada com a média obtida nas leituras do teste de Bradford e o coeficiente obtido a partir da curva de calibração de fibroína. O alginato por sua vez teve sua concentração calculada com base no peso de óxido de sódio formado no processo de calcinação convertido estequiometricamente para alginato de sódio e dividido pelo volume da amostra que foi calcinada, resultando em sua concentração em g/mL.

Figura 29: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 6,5. ◇ dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.

Figura 30: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 7,5. Δ dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.

Figura 31: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 8,5. x dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.

Figura 32: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C e pH 9,5. + dados experimentais. Linha pontilhada: Equação de Cohn.

Figura 33: Solubilidade da fibroína em soluções de alginato de sódio a 25°C na faixa de pH estudada. Δ pH 6,50; $\diamond$ pH 7,50. x pH 8,50 e + pH 9,5. Ajuste em pH 6,50; --- Ajuste em pH 7,50; - · - · - Ajuste em pH 8,5 e - - - Ajuste em pH 9,50.

Os dados experimentais retratados nas Figuras 29 a 32 foram linearizados para que os parâmetros da Equação de Cohn fossem obtidos. O gráfico linearizado é apresentado na Figura 34 e os parâmetros obtidos na Tabela 4:

Figura 34: Linearização dos dados para a obtenção dos parâmetros da Equação de Cohn. Δ pH 6,50; $\diamond$ pH 7,50. x pH 8,50 e + pH 9,5. Ajuste em pH 6,50; --- Ajuste em pH 7,50; - · - · - Ajuste em pH 8,5 e - - - Ajuste em pH 9,50.

Tabela 4: Constante β e constante de solubilidade (K_s) da equação de Cohn obtidos através do ajuste dos dados experimentais.

pH	β	K_s
6,50	0,7285	92,17
7,50	0,8033	94,20
8,50	0,8331	114,20
9,50	0,7159	89,04

Como pode-se verificar na Tabela 4, tanto o fator de proporcionalidade quanto a constante de solubilidade da fibroína do sistema não variaram de forma significativa em função do pH, sendo que K_s apresenta uma média de $97,4 \pm 11,4$. Especificamente o valor de K_s é usualmente considerado constante na equação de Cohn, e efetivamente os dados experimentais levam a resultados muito semelhantes.

Ainda no que diz respeito à modelagem, em todos os casos houve uma boa aderência do modelo aos dados experimentais, sendo que o R^2 foi próximo ou superior a 0,9000 em todas as curvas, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Coeficiente de determinação (R^2) obtidos no ajuste das curvas linearizadas do sistema nos pH estudados.

pH	R^2
6,5	0,8783
7,5	0,9229
8,5	0,9780
9,5	0,9767

Como pode ser visto na Figura 32, observa-se uma tendência de redução da solubilidade da fibroína com o aumento da concentração de alginato presente na blenda preparada em todos os valores de pH estudados. O fenômeno pode ser comparado ao *salting out*, em que substâncias solúveis em água são excluídas da fase aquosa devido à alta concentração de sais presentes na mesma (Timasheff, 1993), formando uma segunda fase, seja ela um precipitado amorfo ou um sólido cristalino. No caso, o alginato, um polieletrólito hidrofílico, tem ação semelhante à de um sal altamente solúvel em água, que fica solvatado pelas moléculas de água presentes na solução, causando a precipitação da fibroína.

Para que fosse possível avaliar a tendência de cada componente de se concentrar na fase líquida ou no precipitado, foi calculada, com base na massa de cada um presente na amostra preparada, a porcentagem desta massa inicial que se concentrou na fase líquida. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Porcentagem, em relação a massa inicial de cada componente na blenda, de cada um na fase líquida.

	pH = 6,5		pH = 7,5		pH = 8,5		pH = 9,5	
wt% SA	% SF fase líquida	% SA fase líquida	% SF fase líquida	% SA fase líquida	% SF fase líquida	% SA fase líquida	% SF fase líquida	% SA fase líquida
0,4%	24,21%	53,25%	22,20%	44,15%	21,06%	43,63%	20,13%	63,99%
0,6%	17,44%	51,67%	16,55%	32,40%	18,37%	37,59%	15,14%	56,09%
0,8%	15,87%	41,01%	14,07%	40,05%	15,80%	43,38%	15,57%	55,63%
1,0%	14,24%	39,88%	13,72%	43,73%	13,03%	35,51%	12,82%	40,63%
1,2%	9,47%	42,80%	10,66%	36,68%	10,36%	34,24%	10,21%	39,16%
1,4%	11,60%	39,56%	10,35%	36,78%	8,68%	42,90%	8,13%	41,04%
1,6%	5,83%	39,56%	8,05%	33,22%	5,42%	37,64%	6,94%	41,44%
1,8%	4,81%	38,80%	4,26%	46,08%	4,45%	37,84%	6,40%	45,24%
2,0%	6,85%	43,49%	5,07%	48,94%	3,89%	41,12%	4,46%	52,55%

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 6, verifica-se que a concentração de fibroína no sobrenadante, e consequentemente sua solubilidade, tende a diminuir com o aumento da concentração inicial de alginato na blenda de uma forma semelhante em toda a faixa de pH estudada.

Era esperado que o pH do sistema apresentasse influência significativa sobre a solubilidade da fibroína, pois proteínas são altamente sensíveis a variações de pH tanto em termos de conformação espacial quanto de protonação dos grupos residuais ionizáveis de alguns aminoácidos. Entretanto, a constância dos valores de potencial Zeta observada indica que, nesta faixa de valores de pH, os grupos residuais ácidos já se encontram completamente desprotonados. Como o pI da proteína se encontra na região ácida, em torno de 3,5, o número de grupos doadores de prótons deve ser maior que o de receptores de prótons. Considerando-se que o pK de grupos amina usualmente se encontra em valores muito altos (maiores que 10), na faixa investigada não deve haver variação da carga média das moléculas de fibroína (os grupos doadores já se encontram desprotonados, enquanto os grupos amina ainda se encontram protonados), o que responde pela invariância observada.

6. Conclusões

O sistema ternário composto por fibroína de seda, alginato de sódio e água foi estudado tanto como um equilíbrio líquido-líquido, como equilíbrio sólido-líquido.

Após a análise do sistema como um equilíbrio líquido-líquido, pode-se dizer que se trata de um sistema altamente complexo, pois a fibroína mostrou-se sensível tanto em seu preparo quanto nas análises realizadas para quantificação, sendo necessário muito cuidado em sua manipulação, uma vez que a solução aquosa da proteína sofre transição de fase, de sua condição instável (seda I) para a condição estável (seda II), insolúvel em água.

Os resultados obtidos analisando o sistema como equilíbrio líquido-líquido indicaram que talvez essa não fosse a abordagem mais adequada para o entendimento do sistema, pois para o cálculo da composição das duas fases havia uma propagação de erro significativa nas medidas o que comprometeu os resultados obtidos. Apesar das imprecisões nas medições, não foi observada uma influência do pH na separação das fases, esta ocorreu de forma similar em toda a faixa estudada. Como alternativa foi adotada a abordagem de um equilíbrio sólido-líquido.

Os resultados obtidos considerando-se um equilíbrio sólido-líquidos se apresentaram mais coerentes, não sendo observada nenhuma incongruência matemática ou termodinâmica como o cruzamento de linhas de amarração. A fibroína possui uma tendência a diminuir sua solubilidade conforme a concentração de alginato adicionada a blenda aumenta, uma vez que a presença de alginato favorece a interação fibroína-fibroína. A constante K_s não apresentou variações significativas na faixa de pH estudado, e os valores obtidos foram relativamente elevados ($97,4 \pm 11,4$), o que sugere a predominância do efeito de *salting out* no sistema proposto.

7. Sugestões de Continuidade do Trabalho

- Investigar mais detalhadamente modelos para a não-idealidade de fase líquida, que podem influenciar o entendimento do comportamento observado (Flory-Huggins, NRTL, etc).
- Testar a influência da força iônica do meio no equilíbrio de fases do sistema.
- Avaliar a influência da força iônica do meio nas soluções individuais de cada polímero.
- Buscar outros métodos experimentais que permitam avaliar a interação entre os dois polímeros, como por exemplo, variações na densidade.
- Realizar quantificações de alginato em amostras de equilíbrio de fases via fotometria de chama, para minimizar erros experimentais.

8. Anexos

A.1. Resultados da quantificação dos componentes no equilíbrio sólido-líquido na fase líquida

Tabela 7: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 6,5.

pH = 6,5				
wt% SA	SF (g/amostra)	Desvio SF	SA (g/amostra)	Desvio SA
0,4%	0,0018	$6,5 \times 10^{-4}$	0,0108	$3,9 \times 10^{-4}$
0,6%	0,0013	$5,7 \times 10^{-5}$	0,0155	$5,6 \times 10^{-3}$
0,8%	0,0012	$1,1 \times 10^{-5}$	0,0164	$5,6 \times 10^{-3}$
1,0%	0,0011	$5,4 \times 10^{-5}$	0,0196	$1,7 \times 10^{-3}$
1,2%	0,0007	$2,3 \times 10^{-4}$	0,0256	$6,5 \times 10^{-3}$
1,4%	0,0009	$2,3 \times 10^{-5}$	0,0277	$3,5 \times 10^{-3}$
1,6%	0,0004	$3,9 \times 10^{-4}$	0,0319	$1,5 \times 10^{-3}$
1,8%	0,0004	$3,8 \times 10^{-4}$	0,0349	$1,6 \times 10^{-3}$
2,0%	0,0005	$6,4 \times 10^{-5}$	0,0435	$8,4 \times 10^{-3}$

Tabela 8: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 7,5.

pH = 7,5				
wt% SA	SF (g/amostra)	Desvio SF	SA (g/amostra)	Desvio SA
0,4%	0,0019	$6,8 \times 10^{-5}$	0,0087	$3,4 \times 10^{-5}$
0,6%	0,0014	$4,0 \times 10^{-6}$	0,0097	$1,2 \times 10^{-3}$
0,8%	0,0012	$5,8 \times 10^{-5}$	0,0161	$2,5 \times 10^{-5}$
1,0%	0,0012	$1,0 \times 10^{-4}$	0,0216	$4,8 \times 10^{-3}$
1,2%	0,0009	$3,2 \times 10^{-5}$	0,0219	$5,8 \times 10^{-3}$
1,4%	0,0009	$3,0 \times 10^{-5}$	0,0258	$1,9 \times 10^{-3}$
1,6%	0,0007	$9,0 \times 10^{-6}$	0,0266	$6,1 \times 10^{-3}$
1,8%	0,0004	$3,6 \times 10^{-4}$	0,0417	$7,8 \times 10^{-3}$
2,0%	0,0004	$6,3 \times 10^{-5}$	0,0491	$2,3 \times 10^{-4}$

Tabela 9: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 8,5.

pH = 8,5				
wt% SA	SF (g/amostra)	Desvio SF	SA (g/amostra)	Desvio SA
0,4%	0,0016	$3,1 \times 10^{-5}$	0,0086	$3,2 \times 10^{-3}$
0,6%	0,0014	$1,0 \times 10^{-4}$	0,0114	$9,2 \times 10^{-4}$
0,8%	0,0012	$1,8 \times 10^{-5}$	0,0174	$1,5 \times 10^{-3}$
1,0%	0,0010	$1,7 \times 10^{-6}$	0,0176	$4,8 \times 10^{-3}$
1,2%	0,0008	$2,6 \times 10^{-5}$	0,0205	$2,6 \times 10^{-3}$
1,4%	0,0007	$2,7 \times 10^{-5}$	0,0301	$5,2 \times 10^{-3}$
1,6%	0,0004	$1,5 \times 10^{-6}$	0,0302	$2,9 \times 10^{-4}$
1,8%	0,0003	$3,3 \times 10^{-5}$	0,0343	$1,9 \times 10^{-3}$
2,0%	0,0003	$1,7 \times 10^{-5}$	0,0413	$3,0 \times 10^{-3}$

Tabela 10: Quantificação dos componentes na fase líquida do equilíbrio sólido-líquido em pH = 9,5.

pH = 9,5				
wt% SA	SF (g/amostra)	Desvio SF	SA (g/amostra)	Desvio SA
0,4%	0,0017	$1,6 \times 10^{-6}$	0,0130	$3,2 \times 10^{-3}$
0,6%	0,0013	$6,2 \times 10^{-4}$	0,0170	$3,4 \times 10^{-3}$
0,8%	0,0013	$2,5 \times 10^{-5}$	0,0222	$2,3 \times 10^{-3}$
1,0%	0,0011	$1,8 \times 10^{-5}$	0,0201	$9,1 \times 10^{-3}$
1,2%	0,0009	$1,3 \times 10^{-5}$	0,0235	$1,1 \times 10^{-2}$
1,4%	0,0007	$8,1 \times 10^{-5}$	0,0284	$1,0 \times 10^{-2}$
1,6%	0,0006	$4,4 \times 10^{-5}$	0,0330	$1,1 \times 10^{-2}$
1,8%	0,0005	$2,1 \times 10^{-5}$	0,0405	$2,2 \times 10^{-2}$
2,0%	0,0004	$3,1 \times 10^{-5}$	0,0516	$1,1 \times 10^{-4}$

9. Referências Bibliográficas

- AJISAWA, A.; Dissolution aqueous of silk fibroin with calcium chloride / ethanol solution. **The Journal of Sericultural Science of Japan**. v. 67. n. 2. p. 91-94. 1997.
- AYUB, Z.H.; ARAI, M.; HIRABAYASHI, K.; Mechanism of the Gelation of Fibroin Solution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 57. p. 1910-1912. 1993.
- BATES, F. Polymer-Polymer Phase Behaviour. **Science**. v. 251. p. 898-905. 1991.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254.
- CHEN, C.; MATHIAS, P.M. Applied Thermodynamics for Process Modeling. **American Institute of Chemical Engineers Journal**. v. 48, n. 2, p.194-200, 2002.
- COLEMAN, M. M.; GRAF, J. F.; PAINTER, P. C.; Specific Interactions and the Miscibility of Polymer Blends: Practical Guide and Designing Miscible Polymer Mixtures. 1st ed. Pennsylvania: Technomic Publishing Company. 1991. 491p.
- ÇAİKARA, T.; DENIRCI, S.; EROGLU, M.S.; GÜVEN, O.; Poly (ethylene oxide) and its blend with sodium alginate. **Polymer**. v. 46. p. 10750-10757. 2005.
- DOUBLIER, J.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C.; Protein-polysaccharide Interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 40. p. 202-214. 2000.
- EL-HADI, A.; M.; Development of novel biopolymer blends based on poly(L-lactic acid), poly(R-3-hydroxybutyrate) and plasticizer. **Polymer Engineering and Science**. v. 54. n. 6. p. 1394-1402. 2014.
- ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA: <www.britannica.com/science/ideal-solution> Acesso em: 18/03/2018.
- ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA: <www.britannica.com/technology/calclination> Acesso em: 18/03/2018.
- FMC BIOPOLYMER: <<https://foodsci.rutgers.edu/carbohydrates/Algin%20Bklt-FMC%2001.pdf>> Acesso em: 18/09/2015.
- FRANCO, L.F.M., **Estudo do equilíbrio sólido-líquido de sistemas contendo aminoácidos e proteínas**. 2012. 126p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- FREDDI, G.; ROMANO, M.; MASSAFRA, M; et al. Silk fibroin/cellulose blend films preparation, structure and physical properties. **Journal of Applies Polymer Science**. v. 56. n. 12. p. 1537-1545. 1995.
- GLAWDEL, T.; C. REN.; Zeta Potential Measurement. In: Li. D. (eds) Encyclopedia of Microfluidics and Nano fluidics, Boston, MA. 2008.

GOODWIN, T.W.; MORTON, R.A.; The Spectrophotometric Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins. **Biochemistry Journal**. v. 40. p.628-632. 1946.

GREEN, A.A.; Studies in the physical chemistry of the proteins: The solubility of hemoglobin in concentrated salt solution. A study of the salting out of proteins. **Physical Chemistry of Proteins**. v.8. p. 495-516. 1931.

HO, M.; WANG, H.; LAU, K. Thermal Properties and structure conformation on silkworm silk fibre. **Composites Australia and CRC-ACS Conference: Diversity in Composite, Australia**. 2012.

HSU, C.C.; PRAUSNITZ, J.M. Thermodynamics of Polymer Compatibility in Ternary Systems. **Macromolecules**. v. 7, n. 3, p.320-324. 1974.

HUNTER, R.J.; **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications**. 3rd Ed. San Diego: Academic Press Inc. 1988. 386 p.

INOUE, S.; TANAKA, K.; ARISAKA, F.; KIMURA, S.; OHTOMO, K.; MIZUMO, S.; Silk Fibroin if *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain and P25, with a 6:6:1 molar ratio. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 40517-40528. 2000.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. Mc Naught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

IUPAC.<http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node33.html> Acessado em: 08/03/2018.

JAWALKAR. S.S., RAJU, K.V.S.N., HALLIGUDI, S.B., SAIRAM, M., AMINABHAVI, T.M.; Molecular Modeling Simulations to Predict Compatibility of Poly(vinyl alcohol) and Chitosan Blends: A Comparison with experiments. **Journal of Physical Chemistry**. v. 111. p. 2431-2439. 2007.

JIANG, S.; LI, F. Pressure Effects on Thermodynamics of Polymer Containing Systems. **Thermodynamics – Physical Chemistry of Aqueous Systems**. INTECH, 2011.

JIM, H.; KAPLAN, D. Mechanism of silk processing in insect and spiders. **Nature**. v. 424, p. 1057-1061. 2003.

JOHNSON, F.A.; CRAIG, D.Q.M.; MERCER, A.D. Characterization of the Block Structure and Molecular Weight of Sodium Alginates. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v 49, n. 7, p. 639-643. 1997.

KANG, C. H.; SANDLER, S. I.; Phase Behavior of aqueous two-polymer systems. **Fluid Phase Equilibria**. v. 38. p. 245-272, 1987.

KAPLAN, D.L; KIM, U.; PARK, J.; JIN, H. **Concentrated aqueous silk fibroin solutions and use thereof**. US Pat. 2013/0190222 A1, 25 jul. 2013. 30p.

KAWAHARA, Y.; FURUKAWA, K.; YAMAMOTO, T. Self-expansion Behaviour of Silk Fibroin Film. **Macromolecular Materials and Engineering**. v. 291, p. 458-462. 2006.

KUNDU, B.; RAJKHOWA, R.; KUNDU, S.,C.; WANG, X.; Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65. p. 457-470.2013.

LAMMEL, S.A.; HU, X.; PARK, S.; KAPLAN, D.L.; SCHEIBEL, T. R. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. **Biomaterials**. v. 31. p. 4583-4591. 2010.

LARSSON, M.; HILL, A.; DUFFY, J.; Suspension Stability: Why Particle Size, Zeta Potential and Rheology are Important. **Annual Transactions of the Nordic Rheology Society**. Vol. 20. P. 209-2014. 2012.

LEE, S.A.B; PARK, E.K; LIM, Y.M; CHO, S.K; KIM.S.Y. Preparation of alginate/poly(N-propylacrylamide) semi-interpenetrating and fully interpenetrating polymer network hydrogels with γ -ray irradiation and their swelling behaviors. **Journal of Applied Polymer Science**. v.100, p. 4439-4446. 2006.

LEE, K.; KWEON, H.; YEO, J.; WOO, S.; LEE, J.; PARK, Y.H. Structural and Physical Properties of Silk Fibroin/Alginate Blend Sponges. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 93, p. 2174-2179.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X.; Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**. v. 94. p. 1-6. 2009.

LIANG, C.X.; HIRABAYASHI, K. Improvements of the Physical Properties of Fibroin Membranes with Sodium Alginate. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 45, p. 1937-1943.

LIU, X.; ZHANG, K. Silk Fiber – Molecular Formation Mechanism, Structure-Property Relationship and Advanced Applications. In: **Oligomerization of Chemical and Biological Compounds**. Claire Lesieur, IntechOpen, doi: 10.5772/57611. p. 69-102. 2014.

LOERTSCHER, J; MINDERHOUT, V. **Foundations of Biochemistry**. 3rd ed. Pacific Crest Software, Incorporated. 142p. 2011.

LOPES, L.M. **Estudo Termodinâmico de Blendas de Fibroína de Seda e Alginato de Sódio**. 2016. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

MARK, J. E.; **Physical Properties of Polymers Handbook**. 2nd ed. Cincinnati: Springer 2007. 1073p.

MARY, C.S.; SWAMIAPPAN, S.; Sodium alginate with PEG/PEO Blends as floating Drug Delivery Carrier – In vitro evaluation. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. v. 6. p 435-442. 2016.

MESSION, J.; ASSIFAOU, C.; LAFARGE, C.; SAUREL, R. CAYOT, P. Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins-sodium alginate-water ternary system. **Food Hydrocolloids**. v. 28, p. 333-343. 2012.

MORAES, M.; A.; **Obtenção e caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio**. 2010. 144f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas -SP.

MORAES, M. A.; BEPPU, M. M Biocomposite Membranes of Sodium Alginate and Silk Fibroin Fibers for Biomedical Applications. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 130, n. 5, p. 3451-3475, 2013.

MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Silk fibroin and sodium alginate blend: Miscibility and physical characteristics. **Materials Science and Engineering C**. v. 40, p. 85-91. 2014.

MYERSON. A.S.; **Handbook of Industrial Crystallization**. 2nd Ed. Butterworth Heinemann. 2002. 313p.

NOGUEIRA, G.M.; RODAS, A.C.D.; LEITE, C.A.P.; GILES, C.; HIGA, O.Z.; POLAKIEWICS, B.; BEPPU, M.M. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8446-8451, 2010.

OLABISI, O.; Interpretations of polymer-polymer miscibility. **Journal of Chemical Education**. v. 58, p. 944-950, 1981.

OLIVEIRA, L.H.; **Estudo Termodinâmico do Equilíbrio Líquido-Líquido visando a Remoção do Enxofre do Óleo Diesel com Líquidos Iônicos**. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – SP.

PARAMESWARANPILAI, S; GROHENS, T. Y. In: GROHENS, T. Y.; JYOTISHKUMAR, P. (Ed.). **Characterization of Polymer Blends, Miscibility, Morphology and Interfaces**. 1^a Edição. John Wiley & Sons, 2015. Páginas 1-6.

PARK, K., E.; JUNG, S.Y.; LEE, S.L.; MIN, B.; PARK, W.H.; Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**. v 38. n. 3-5. p. 165-173. 2006.

PRAUSNITZ, J.M.; LICHTENTHALER, R.N.; AZEVEDO, E.G. de. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria**. New Jersey: Prentice Hall PTR. 3rd ed. 1999. 960 p.

RIBEIRO, M.; DE MORAES, M., A.; BEPPU, M., M.; MONTEIRO, F., J.; FERRAZ, M. The role of dialysis and freezing on structural conformation, thermal properties and morphology of silk fibroin hydrogels. **Biomatter**. v. 4 e28536. 2014.

ROBESON, L. M. **Polymer Blends: A Comprehensive Review**. Cincinnati: Hanser Gardner Publications, Inc. 2007. 459 p.

ROCHA, S.A.; **Cálculo do equilíbrio sólido-líquido e ajuste de parâmetros para modelos termodinâmicos em misturas binárias e ternárias de ácidos graxos, seus ésteres e triacilgliceróis**. 2011. 249 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – SP.

ROCKWOD, D.N.; PREDA, R.C.; YUCEL, T.; WANG, X.; LOVETT, M.L.; KAPLAN, D. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature Protocols**. v. 6, n. 10. p. 1612-1631, 2011.

ROH, D.; KANG, S.; KIM, R.; KWON, Y.; KWEON, H.Y.; LEE, K.; PARK, Y.; BAEK, R.; HEO, C.; LEE, J. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. **Matter Med**. v. 17, p. 547-552, 2006.

SANDLER, S.I. **Chemical, Biochemical and Engineering Thermodynamics**. 4th Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2006. 945 p.

SCHOESER, M. **Silk**. 1st ed. New Haven: Yale University Press, 2007. 256 p.

SILVA, L. M.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**. v. 42, p. 273-278, 2000.

SIMEONE, M.; ALFANI, A.; GUIDO, S. Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. **Food Hydrocolloids**. v. 18, p. 463-470. 2004.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M.; **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7^a Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos. 2007. 626 p.

SOARES, J.P.; SANTOS, J.E.; CHIERICE, G.O.; CAVALHEIRO, E.T.G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**. v. 29, n. 2, p. 57-63, 2004.

SONG, Y.; LIU, L.; SHEN, H.; YOU, J.; LUO, Y.; Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food Control**. V. 22. p. 608-615. 2011.

TIMASHEFF, S., N.; The control of protein stability and association by weak interactions with water. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**. v. 22. p. 67-97. 1993.

TSUKADA, M.; FREDDI, G.; CRIGHTON, S.; Structure and Compatibility of Poly(vinyl Alcohol)-Silk Fibroin (PVA/SF) Blend Films. **Journal of Polymer Science B**. v. 32. p. 243-248. 1994.

UTRACKI, L.A. **Polymer Alloys and Blends: Thermodynamics and Rheology**. New York: Hanser Publisher, 1989.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C., W.; **Fundamentos de Bioquímica: A vida em nível molecular**. 4^a Ed.. Artmed. 2014. 1200p.

YAMADA, H.; NAKAO, H.; TAKASU, Y.; TSUBOUCHI, K.; Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. **Materials Science and Engineering**. v. 14. p. 41-46. 2001.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J.; Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. v. 21. p. 787-793. 1998.

ZHANG, H.; LIU, X.; YANG, M.; ZHU, L; Silk fibroin/sodium alginate composite nano-fibrous scaffold prepared through thermally induced phase-separation (TIPS) method for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**. v. 55. p. 8-13. 2015.

ZHOU, C.; CONFALONIERI, F.; JAEQUET, M.; PERASO, R.; LI, Z.; JANIN, JOEL. Silk Fibroin: Structural Implications of a Remarkable Amino Acid Sequence. **Proteins: Structure, Function and Genetics**. v. 44, p. 119-122, 2001.

ZHU, H.; FENG, X.; ZHANG, H.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; Structural Characteristics and Properties of silk fibroin/Poly(lactic acid) Blend Films. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. v. 20. n. 9. p. 1259-1274. 2009.