



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

LAISE MAIA LOPES

EQUILÍBRIO DE FASES E MISCIBILIDADE DE BLENDS POLIMÉRICAS
FORMADAS POR FIBROÍNA DE SEDA E ALGINATO DE SÓDIO

PHASE EQUILIBRIUM AND MISCIBILITY OF SILK FIBROIN AND SODIUM
ALGINATE POLYMERIC BLENDS

Campinas

2020

LAISE MAIA LOPES

EQUILÍBRIO DE FASES E MISCIBILIDADE DE BLENDA POLIMÉRICAS
FORMADAS POR FIBROÍNA DE SEDA E ALGINATO DE SÓDIO

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da
Universidade Estadual de
Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção
do título de doutora em
Engenharia Química.

Orientadora: PROF.^a DR.^a MARISA MASUMI BEPPU

Coorientadora: PROF.^a DR.^a MARIANA AGOSTINI DE MORAES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA LAISE MAIA LOPES, E
ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A).
MARISA MASUMI BEPPU

Campinas

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

L881e Lopes, Laise Maia, 1990-
Equilíbrio de fases e miscibilidade de blendas poliméricas formadas por fibroína de seda e alginato de sódio / Laise Maia Lopes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.
Coorientador: Mariana Agostini de Moraes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biopolímeros. 2. Polissacarídeos. 3. Proteínas. 4. Termodinâmica. I. Beppu, Marisa Masumi, 1972-. II. Moraes, Mariana Agostini de, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phase equilibrium and miscibility of silk fibroin and sodium alginate polymeric blends

Palavras-chave em inglês:

Biopolymer

Polysaccharide

Protein

Thermodynamic

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Mariana Conceição da Costa

Mariana Altenhofen da Silva

Ana Rita Morales

Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Data de defesa: 14-12-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4640-7397>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0348067950271062>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por LAISE MAIA LOPES em 14 de dezembro de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores.

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (Presidente -Orientadora)

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dra. Mariana Altenhofen da Silva

UFSCAR/Araras

Videoconferência

Profa. Dra. Mariana Conceição da Costa

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho –

Escola Politécnica da USP/São Paulo

Videoconferência

Profa. Dra. Ana Rita Morales

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Às minhas avós, Arli (*in memoriam*) e Gercina, que investiram em educação e mudaram a história da minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aderaldo e Divanete, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e por impulsionarem todos os meus sonhos. Aos meus irmãos, Arthur e Tarcila, por serem meus primeiros bons exemplos para quase tudo na vida e por todo companheirismo. À minha avó, Gercina, por ser meu exemplo de luta e resiliência, por estar sempre me lembrando das minhas origens.

À Prof.^a Dr.^a Marisa Masumi Beppu pela orientação ao longo desses 6 anos. Obrigada pela confiança, desafios e oportunidades. À Prof.^a Dr.^a Mariana Agostini de Moraes pela co-orientação, conselhos, oportunidades, puxões de orelha e amizade. Foi um privilégio e um prazer ser orientada por vocês.

Ao Dr. Thomas Crouzier por ter me recebido e orientado durante o meu período de doutorado sanduíche no Laboratório de Glicociência do Instituto Real de Tecnologia. Aos colegas de laboratório, Georgia, Hongji, Kun e Ulrike por me receberem tão bem e pela troca de conhecimento.

Ao Prof.^o Dr. Rodrigo Silveira Vieira que me recebeu em seu laboratório na Universidade Federal do Ceará (UFC) e me auxiliou nas análises de RMN, absorção atômica e microscopia de fluorescência. Ao Prof.^o Dr. Diego Mantovani pelas análises de XPS.

Aos Prof.^a Dr.^a Ana Rita Morales, Prof.^o Dr. Everson Alves Miranda, Prof.^a Dr.^a Mariana Conceição da Costa e Prof.^o Dr. Theo Guenter Kieckbusch pela participação nas bancas de qualificação I e II e pelas contribuições apresentadas a esta tese.

À Dr.^a Fabiane Oliveira Farias da Universidade Federal do Paraná por me enviar a rotina TML-LLE desenvolvida pelo Prof.^o Dr.^o Luiz Stragevitch que tornou possível a estimativa dos parâmetros de interação dos modelos NRTL e UNIQUAC mostrados nesse trabalho.

Aos meus amigos: Amanda, Bruna, Filipe, Letícia, João Batista, Paulo, Olívia, Taís e Thatiane por tornarem essa caminhada mais leve. Obrigada pelas conversas e conselhos, pelo suporte emocional e por serem minha família em Campinas.

Aos amigos que fiz no Lequip, em especial: Bruno, Cynthia, Giovana, Luiz, Reginaldo, Rogério e Thiago. Obrigada pelo acolhimento, pelas conversas

acompanhadas de café e bolo da feirinha, pelos almoços no bandejão, pela parceria nos projetos acadêmicos e por dividirem o conhecimento de vocês comigo.

Aos amigos que fiz na Suécia: Felipe, Fernanda, Larissa, Miriely, Neima, Roberto, Stanis e Yasmin pelos finais de semana jogando baralho, por compartilharem e entenderem a saudade de casa e por deixarem Estocolmo um pouco menos fria e cinzenta.

Aos técnicos do LRAC, Adilson, Celso, Hugo e Lucélia pelas análises realizadas ao longo do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento das bolsas que usufruí durante o doutorado (Processos: 88882.329691/2018-01, 88887.360999/2019-00 e 88887.197168/2018-00). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A utilização de polímeros naturais em diversas áreas vem crescendo ao longo dos anos. Eles possuem características interessantes para uso como biomaterial, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Com o objetivo de criar novos produtos e melhorar suas propriedades, é comum misturar um ou mais polímeros criando blendas. Estudos mostram que blendas contendo fibroína de seda apresentam melhoria das suas propriedades mecânicas e térmicas, porém o processamento desses materiais ainda é um desafio. Blendas de fibroína de seda e alginato de sódio foram estudadas nesse trabalho, um sistema complexo devido às características dessas macromoléculas. Existem estudos sobre essas blendas poliméricas, focados, principalmente, em suas aplicações como biomaterial, no entanto, o conhecimento termodinâmico sobre os sistemas formados ainda não está consolidado, por isso, ainda é difícil controlar as propriedades desse material e seu processamento. Este trabalho, portanto, teve como objetivo estudar a separação e equilíbrio de fases de sistemas contendo fibroína de seda, alginato de sódio e água. Além disso, a influência da massa molar e da proporção de grupos manurônico e gulurônico do alginato de sódio na morfologia das fases e no equilíbrio termodinâmico foi investigada. Para isso, foram utilizadas as técnicas de espalhamento de luz estático, análises térmicas e espectroscopia de fótons excitados por raios X, entre outras. Diagramas de fases foram obtidos e os dados experimentais foram ajustados aos modelos de Flory-Huggins, *Random phase approximation*, NRTL, Uniquac e à Equação de Cohn. Os resultados mostraram diferenças no espalhamento de luz e nos parâmetros de interação polímero-polímero e polímero-solvente para as blendas preparadas com diferentes tipos de alginato de sódio. Dessa forma, foi possível estabelecer uma relação as propriedades do alginato de sódio e a separação de fases do sistema estudado. Essa abordagem é necessária, pois, trabalhos que buscam compreender melhor o comportamento termodinâmico de polímeros naturais não são comuns; desta forma, este estudo poderá contribuir significativamente para o entendimento desses sistemas.

Palavras-chaves: polímeros naturais, separação de fases, biomaterial, modelos termodinâmicos

ABSTRACT

The use of natural polymers is increasing over the years in many areas. They have interesting characteristics for biomaterials applications, such as biodegradability, biocompatibility and non-toxicity. With the purpose of creating new products and improve their properties, it is common to mix one or more polymers to form blends. Studies show that blends with silk fibroin present improvement in the thermal and mechanical properties, but the processing of those materials remains a challenge. Silk fibroin and sodium alginate blends were studied in this project, a complex system due to the characteristics of those macromolecules. There are some works in the literature showing the applicability of those blends, however, the thermodynamic knowledge about that system is not consolidated. Thus, it is difficult to control the material's properties and its processing. This project aims to study the phase separation and phase equilibrium of systems composed by silk fibroin, sodium alginate and water. Besides, the influence of sodium alginate molecular mass and proportion of manuronic and guluronic groups on the morphology of phase and phase equilibrium was investigated. To do that, it was used some techniques, such as static light scattering, thermal analysis, X-ray photoelectron spectroscopy and others. The solid-liquid phase separation was investigated acquiring phase diagram and adjusting the data to Flory-Huggins, Random phase approximation, NRTL, UNIQUAC thermodynamic models and Cohn equation. The results show differences in the light scattering and the polymer-polymer and polymer-solvent interaction parameter for the blends prepared with different sodium alginates. Thus, it was possible to establish a relation between the alginate properties and the phase separation of the system. This approach is necessary because most of the studies found in the literature have mainly focused on the application of those blends. Works that aim to better understanding of the thermodynamic behavior of these natural polymers are not common, so, we expect that this work would contribute for the understanding of those systems.

Key words: natural polymer, phase separation, biomaterial, thermodynamic models

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da estrutura primária da fibroína de seda com os principais aminoácidos presentes glicina (gly), alanina (ala) e serina (ser).....	28
Figura 2: Representação esquemática da conformação α -hélice de uma proteína. .	29
Figura 3: Representação esquemática da conformação folha- β para uma proteína: (a) folha- β paralela, (b) folha- β antiparalela.	30
Figura 4: Diagrama de fases mostrando as mudanças de conformação da estrutura da fibroína de seda que podem ocorrer ao variar a pressão osmótica. Legenda dos símbolos: ■ enovelamento aleatório, ● seda I, ▲ seda II, ◇ coexistência de enovelamento aleatório e seda I, Δ coexistência entre seda I e seda II.	31
Figura 5: Estrutura química do alginato de sódio: (G) ácido α -L gulurônico e (M) ácido β -D manurônico.	32
Figura 6: Representação da estrutura de “caixa de ovos” dos géis de alginato de sódio. O íon cálcio interage com átomos de oxigênio dos grupos carboxílicos e hidroxilas presentes na estrutura do alginato de sódio.	33
Figura 7: Ligação de hidrogênio entre a fibroína de seda e o alginato de sódio.	35
Figura 8: Imagens de microscopia das emulsões contendo alginato de sódio e caseína em pH 7,0 e 23°C.	39
Figura 9: Representação de diagrama de fases retangular. Curva binodal (-), curva spinodal (-.-), linha de amarração (- -). A região entre as curvas binodal e spinodal é chamada de metaestável.	41
Figura 10: Imagens e perfil de espalhamento de luz obtidos para a separação de fases por decomposição spinodal (a) e por nucleação e crescimento (b).....	43
Figura 11: Imagens de espalhamento de luz (a) e perfil de espalhamento de luz (b) obtidas para uma blenda que separou fases (1), blenda que formou hidrogel (2) membrana de fibroína de seda e alginato de sódio (3). Branco significa luz e preto ausência de luz.	46
Figura 12: Diagrama ternário representando a região em que a separação líquido-sólido é observada e região de formação de hidrogel.....	47
Figura 13: Esquema de reação química para a marcação do alginato de sódio com DAPI.....	59
Figura 14: Aparato para realização da técnica de espalhamento de luz. 1) Laser He-Ne; 2) Polarizador; 3) Porta amostra; 4) anteparo de PMMA; 5) fonte de alimentação do laser.	63
Figura 15: Esquema para determinação do ângulo máximo de espalhamento (θ_m), o qual pode ser calculado pela equação 1 e 2.	64
Figura 16: Fluxograma mostrando como foi feita a quantificação de cada componente na fase líquida e sólida.	66
Figura 17: Espectro de RMN de hidrogênio (^1H -RMN) para alginato-M (a) e alginato-G (b) utilizando D_2O como solvente a 70 °C. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.	72
Figura 18: Concentração de íons cálcio ao longo dos dias de diálise nas soluções de fibroína de seda e na água utilizada na diálise.....	75

Figura 19: Valores de potencial zeta (mV) das blendas de fibroína de seda (SF) e alginato-M e alginato-G SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (1), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (2) e SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (3)	76
Figura 20: Blenda de fibroína de seda e alginato de sódio (SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉) após a separação de fases e formação de fase líquida (transparente) e sólida (esbranquiçada).	78
Figura 21: Imagem de microscopia óptica obtida imediatamente após o preparo da blenda (SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₈) com alginato-M (a) e alginato-G (b). Aumento de 40x.	79
Figura 22: Imagens obtidas em microscópio de fluorescência das soluções de alginato-M (a), alginato-G (c), blenda (SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₈) de fibroína de seda e alginato-M (b) e blenda de fibroína de seda e alginato-G (d).	80
Figura 23: Esquema ilustrando a separação de fases que ocorre nas blendas de fibroína e alginato de sódio. Após o preparo da blenda (a), há formação de pseudo-micelas que com o tempo coalescem e formam um hidrogel (fase sólida) (b). Ambas as fases são ricas em água (solvente) que está representado pelo fundo azul.	81
Figura 24: Espectro de XPS de alta resolução para o C1s das membranas de fibroína de seda, alginato-M e alginato-G.	83
Figura 25: Espectro de XPS das membranas das blendas SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (A), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (B) e SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (C) utilizando alginato-G.	85
Figura 26: Espectro de XPS das membranas das blendas SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (A), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (B) e SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (C) utilizando alginato-M.	86
Figura 27: Curvas de espalhamento de luz <i>versus</i> distância das blendas SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉ (a) e SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇ (b) preparadas com alginato-M acompanhadas por 7 dias. As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz; enquanto na blenda SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉ é observado um halo, na blenda SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇ o espalhamento é similar a um disco.	88
Figura 28: Curvas de espalhamento de luz <i>versus</i> distância das blendas SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉ (a) e SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇ (b) preparadas com alginato-G acompanhadas por 7 dias. As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz; enquanto na blenda SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉ é observado um halo, na blenda SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇ o espalhamento é similar a um disco.	89
Figura 29: Mudança de morfologia com o tempo durante a separação de fases por decomposição spinodal.	90
Figura 30: Diagrama ternário indicando a região em que, possivelmente, a separação de fases ocorre por decomposição spinodal (em vermelho) e nucleação e crescimento (em azul) das blendas preparadas com alginato-M (○) e alginato-G (□).	92
Figura 31: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade <i>versus</i> distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-M: (a) SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉ , (b) SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5} , (c) SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ , (d) SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5} , (e) SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ , (f) SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5} .	94
Figura 32: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade <i>versus</i> distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de	

fibroína de seda e alginato-M: (a) $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$, (b) $SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{1,5}WA_{97}$, (d) $SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{2,0}WA_{97}$, (f) $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$	95
Figura 33: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade versus distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-G: (a) $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$, (b) $SF_{1,0}SA_{0,5}WA_{98,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$, (d) $SF_{0,5}SA_{1,0}WA_{98,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$, (f) $SF_{1,5}SA_{1,0}WA_{97,5}$	96
Figura 34: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade versus distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-G: (a) $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$, (b) $SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5}$, (e) $SF_{1,5}SA_{1,5}WA_{97}$, (d) $SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{2,0}WA_{97}$, (f) $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$	97
Figura 35: Diagrama de equilíbrio de fases para as blendas de fibroína de seda-alginato-M (a) e fibroína de seda-alginato-G (b). Fase líquida ($\blacktriangle$), fase sólida ($\square$), pontos iniciais de mistura ($\bullet$), linhas de amarração (- -).	100
Figura 36: Fração mássica de alginato-M e alginato-G na fase sólida após a separação de fases como função da fração mássica inicial de alginato de sódio em blendas que contêm a mesma fração mássica inicial de fibroína de seda (0,5%). .	101
Figura 37: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura ($\bullet$), fase líquida ($\blacktriangle$), fase sólida ($\square$). Linhas de amarração obtidas a partir dos dados experimentais (- -) e obtida a partir do modelo de Flory-Huggins (-).....	103
Figura 38: Diagrama de equilíbrio de fases para o sistema fibroína de seda-alginato-M (a) e fibroína de seda-alginato-G (b). Fase líquida (Δ), fase sólida ($\circ$), pontos iniciais de mistura ($\blacksquare$), linhas de amarração (-), região de variabilidade das fases líquida e sólida calculada utilizando o erro médio das medidas experimentais (n=3) (- -).....	104
Figura 39: Comparação dos parâmetros de Flory-Huggins (χ_{SFWA} e χ_{SAWA}) calculados pelo modelo clássico de Flory-Huggins e pelo modelo RPA para o sistema alginato-M/água, alginato-G/água e fibroína/água.	105
Figura 40: Comparação do parâmetro de Flory-Huggins (χ_{SFSA}) calculado pelo modelo clássico de Flory-Huggins e pelo modelo RPA para o sistema fibroína, água e alginato-M (a) e fibroína, água e alginato-G (b) com diferentes frações volumétricas fixas de água.	106
Figura 41: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura ($\bullet$), fase líquida ($\blacktriangle$), fase sólida ($\square$). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (- -) e obtidas a partir do modelo de Flory-Huggins/RPA (-). .	108
Figura 42: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura ($\bullet$), fase líquida ($\blacktriangle$), fase sólida ($\square$). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (- -) e obtida a partir do modelo NRTL (-).	111
Figura 43: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de	

mistura (●), fase líquida (▲), fase sólida (□). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (-.-) e obtida a partir do modelo UNIQUAC (-).	112
Figura 44: Solubilidade da fibroína de seda em soluções de alginato-M (a) e alginato-G (b) a 25 °C (1). Linearização dos dados experimentais para obtenção dos parâmetros da Equação de Cohn (2).	114
Figura 45: Segundo coeficiente virial osmótico teórico da fibroína de seda em soluções de alginato-M (■) e alginato-G (●) calculado utilizando a Equação 46, a partir dos dados obtidos da equação de Cohn.	115

Figura A 1: Curvas de espalhamento de luz versus distância das blendas SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5} (a), SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (b), SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5} (c), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (d), SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5} (e) preparadas com alginato-M. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.	118
Figura A 2 Curvas de espalhamento de luz versus distância das blendas SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (a), SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5} (b), SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇ (c), SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5} (d), SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇ (e) preparadas com alginato-M. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.	119
Figura A 3: Curvas de espalhamento de luz versus distância das blendas SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5} (a), SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (b), SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5} (c), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (d), SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5} (e) preparadas com alginato-G. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.	120
Figura A 4: Curvas de espalhamento de luz versus distância das blendas SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (a), SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5} (b), SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇ (c), SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5} (d), SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇ (e) preparadas com alginato-G. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.	121

Figura B 1: Representação esquemática da estrutura química da mucina formada por uma cadeia central protéica, com os principais aminoácidos, e glicanos em sua ramificação.	133
Figura B 2: Esquema para exemplificar a membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina.	134
Figura B 3: Fluxograma com as etapas necessárias para a funcionalização da mucina com grupos tetrazina e norboneno.	138
Figura B 4: Fotos das soluções de fibroína de seda (a) e mucina (e) e de suas blendas: SF ₇₅ /MU ₂₅ (b), SF ₅₀ /MU ₅₀ (c), SF ₂₅ /MU ₇₅ (d) logo após o preparo (1) e após 8 dias (2).	141
Figura B 5: Imagem de microscopia óptica da solução de mucina (a) e após a adição da solução de fibroína de seda (b).	142
Figura B 6: Valores médios do potencial zeta das três blendas de fibroína de seda e mucina estudadas nesse trabalho em relação à fração volumétrica de mucina (n=3).	143

Figura B 7: Imagens de micrografia da superfície (a) e da fratura (b) membranas de mucina (1) e fibroína de seda (2).	144
Figura B 8: Imagens de micrografia da superfície (1) e da fratura (2) membranas das blendas SF ₂₅ /MU ₇₅ (a), SF ₅₀ /MU ₅₀ (b) e SF ₇₅ /MU ₂₅ (c).	145
Figura B 9: Curva termogravimétrica (a) e de massa residual diferencial (b) para as membranas de fibroína de seda, mucina e suas blendas.	147
Figura B 10: Curva termogravimétrica de aditivação e experimental para as membranas das blendas SF ₂₅ /MU ₇₅ (a), SF ₅₀ /MU ₅₀ (b) e SF ₇₅ /MU ₂₅ (c).	148
Figura B 11: Termograma de DSC das membranas de fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes proporções mássicas. A curva mostrada refere-se ao segundo aquecimento. As setas pretas evidenciam a mudança de inclinação das Tgs das blendas de fibroína de seda e mucina.	150
Figura B 12: Espectro de infravermelho das membranas de fibroína de seda, mucina e de suas blendas.	152
Figura B 13: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade versus distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas SF ₂₅ /MU ₇₅ (a), SF ₅₀ /MU ₅₀ (b) e SF ₇₅ /MU ₂₅ (c).	153
Figura B 14: Curvas de espalhamento de luz versus distância das blendas SF ₂₅ MU ₇₅ (a), SF ₅₀ MU ₅₀ (b) e SF ₇₅ MU ₂₅ (c). As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz. No início, todas as blendas apresentaram espalhamento anisotrópico que evoluiu para um espalhamento do tipo disco.	155
Figura B 15: Fotos das membranas de fibroína de seda antes (a) e após (b) a funcionalização com tetrazina e da solução de fibroína de seda após a funcionalização com tetrazina (c).	156
Figura B 16: Foto da membrana híbrida de fibroína de seda e hidrogel de mucina.	157
Figura B 17: Imagens de micrografia das membranas de fibroína de seda (superfície (a) e fratura (b)), fratura das membranas híbridas de fibroína de seda e mucina (hidrogel 2,5% (c) e hidrogel 5% (d)) e dos hidrogéis de mucina (2,5 % (e) e 5% (f)).	158
Figura B 18: Perfil de liberação de EGF nas membranas de fibroína de seda e fibroína de seda funcionalizada.	159
Figura B 19: Perfil de liberação de EGF em hidrogéis de mucina em diferentes concentrações, 25 mg/mL e 5 mg/mL.	160
Figura B 20: Perfil de liberação de EGF nas membranas híbridas de fibroína de seda e hidrogel de mucina em diferentes concentrações – 2,5% e 5%.	161
Figura B 21: Espectros de infravermelho das membranas de fibroína de seda (a), fibroína de seda funcionalizada com tetrazina (b) e fibroína de seda funcionalizada com tetrazina e EGF (100 ng/mL) (c).	162
Figura B 22: Espectro de infravermelho do hidrogel de mucina (a) e hidrogel de mucina com EGF incorporado (b).	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais materiais utilizados no preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.	55
Tabela 2: Composições iniciais, em fração mássica (w), das blendas de fibroína de seda (SF), alginato de sódio (SA) e água (WA) utilizadas nesse estudo.	61
Tabela 3: Técnicas de caracterização utilizadas para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.	61
Tabela 4: Valores de densidade e volume específico do alginato de sódio, fibroína de seda e água utilizados no cálculo dos parâmetros de Flory-Huggins.....	67
Tabela 5: Valores de parâmetro de área (r) e volume (q) calculados a partir das equações 39 e 40 para a fibroína de seda, alginato de sódio e água.	69
Tabela 6: Valores obtidos de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica para os diferentes tipos de alginato de sódio utilizados nesse trabalho.....	71
Tabela 7: Proporção entre blocos M e G, fração molar dos blocos M (F_M), blocos G (F_G), blocos GG (F_{GG}), blocos MM (F_{MM}) e blocos MG/GM ($F_{MG,GM}$) do alginato-M e alginato-G.....	73
Tabela 8: Valores de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico de partícula e índice de polidispersidade para as soluções dos polímeros.....	76
Tabela 9: Percentual das ligações químicas nas membranas de fibroína de seda e alginato-G: SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (A), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (B) e SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	84
Tabela 10: Percentual das ligações químicas nas membranas de fibroína de seda e alginato-M. SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈ (A), SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈ (B) e SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈ (C).....	84
Tabela 11: Valores de q_m e D calculados a partir dos dados de intensidade máxima do espalhamento de luz para as blendas de fibroína de seda e alginato-M e alginato-G em que foi observado espalhamento de luz do tipo halo. Os valores utilizados foram os obtidos após o preparo das blendas (dia 1).	92
Tabela 12: Valores de fração mássica média (n=3) de fibroína de seda (SF), alginato de sódio (alginato-M e alginato-G) e água nas fase líquida e sólida.....	99
Tabela 13: Valores dos parâmetros de Flory-Huggins e do desvio médio quadrático para o sistema fibroína de seda-alginato de sódio e água calculado utilizando os dados de equilíbrio a 25 °C.	102
Tabela 14: Valores dos parâmetros de Flory-Huggins e do desvio médio quadrático (DMQ) para o sistema fibroína de seda, alginato de sódio e água calculado utilizando a equação do modelo RPA.....	107
Tabela 15: Valores dos parâmetros de interação e do desvio médio quadrático (DMQ) para o sistema ternário formado pela fibroína de seda (1), alginato de sódio (2) e água (3) para os modelos NRTL e UNIQUAC para os diferentes alginatos de sódio utilizados.....	110
Tabela 16: Constante de solubilidade (K_s) e constante β obtidos por meio da linearização dos dados experimentais e ajuste à equação de Cohn.....	115

Tabela A 1: Média e erro médio das frações mássicas de fibroína de seda, alginato-M e água das fases líquida e sólida obtidas experimentalmente (n=3).	122
Tabela A 2: Média e erro médio das frações mássicas de fibroína de seda, alginato-G e água das fases líquida e sólida obtidas experimentalmente (n=3).	123
Tabela A 3: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins.	124
Tabela A 4: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins.	125
Tabela A 5: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins/RPA.	126
Tabela A 6: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins/RPA.	127
Tabela A 7: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo NRTL.	128
Tabela A 8: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo NRTL.	129
Tabela A 9: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo Uniquac.	130
Tabela A 10: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo Uniquac.	131

Tabela B 1: Frações volumétricas de fibroína de seda e mucina utilizadas para o preparo das blendas de mucina e fibroína de seda.	135
Tabela B 2: Valores de temperatura de degradação para as blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes frações mássicas.	148
Tabela B 3: Valores de temperatura de transição vítrea (T_g) para a fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes proporções mássicas.	150
Tabela B 4: Principais bandas de absorção das membranas de fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina.	152
Tabela B 5: Valores de número de onda máximo (q_m) e distância periódica entre os domínios das fases (D). Os valores com subscrito 1 correspondem ao primeiro pico e com subscrito 2 ao segundo pico do centro para as bordas.	156
Tabela B 6: Principais bandas de absorção das membranas de fibroína de seda, membrana de fibroína de seda funcionalizada com Tz e fibroína de seda funcionalizada com Tz e com EGF incorporado.	162
Tabela B 7: Principais bandas de absorção do hidrogel de mucina e hidrogel de mucina com EGF incorporado.	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{ij} = parâmetro ajustável aos dados experimentais do modelo NRTL e UNIQUAC;

D - Distância periódica entre os domínios das fases;

g^E – energia de Gibbs molar em excesso;

Grupo G – Grupos gulurônicos presentes na cadeia polimérica do alginato de sódio;

Grupo M – Grupos manurônicos presentes na cadeia polimérica do alginato de sódio;

K_s – Constante de *salting-out* para curva logarítmica neperiana;

m – Concentração do agente precipitante em solução (mg/mL);

MU – Mucina;

NG – nucleação e crescimento;

q – Número de onda;

S – Solubilidade da proteína em solução (mg/mL);

SA – Alginato de sódio;

SD – decomposição spinodal;

SF – Fibroína de seda;

T – Temperatura, em Kelvin;

WA – Água;

x_i = fração molar do componente i;

α_{ij} = parâmetro ajustável de não aleatoriedade do modelo NRTL;

β – Constante relacionada ao logaritmo neperiano da solubilidade da proteína;

γ – coeficiente de atividade;

ΔG_{mix} - Variação da Energia livre de Gibbs de mistura;

ΔH_{mix} - Variação da Entalpia de mistura;

ΔS_{mix} – Variação da Entropia de mistura;

θ - Ângulo de espalhamento;

λ - Comprimento de onda da luz incidente;

μ - potencial químico;

φ_i = fração volumétrica do componente i;

χ – parâmetro de Flory-Huggins;

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	22
CAPÍTULO 2: OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1 Fibroína de seda	28
3.2 Alginato de sódio	32
3.3 Blendas de fibroína de seda e alginato de sódio	34
3.4 Mecanismos de separação de fases.....	39
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 Materiais	55
4.2 Determinação da viscosidade intrínseca e da massa molar viscosimétrica dos alginatos de sódio	55
4.3 Determinação da composição dos alginatos de sódio.....	56
4.4 Preparo da solução de fibroína de seda	57
4.5 Quantificação de íons Ca^{2+} na solução de fibroína de seda	58
4.6 Preparo da solução de alginato de sódio.....	58
4.7 Preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio – em solução e no estado sólido (membranas)	59
4.8 Caracterizações das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.....	61
4.8.1 Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico	62
4.8.2 Microscopia óptica e microscopia de fluorescência	62
4.8.3 Espalhamento de luz estático	63
4.8.4 Espectrometria de fótons excitados por raio X (XPS)	64

4.9 Quantificação dos componentes em cada fase	65
4.10 Modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio.....	66
4.11 Solubilidade da fibroína de seda em alginato de sódio – Equação de Cohn	69
CAPÍTULO 5: Resultados e Discussão	71
5.1 Caracterização físico-química dos alginatos de sódio utilizados	71
5.2 Quantificação de cálcio na solução de fibroína de seda	73
5.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	75
5.4 Aspecto físico das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio	77
5.5 Microscopia óptica e de fluorescência	78
5.6 Espectrometria de fótons excitados por raio X (XPS).....	81
5.7 Espalhamento de luz estático para blendas de fibroína de seda e alginato de sódio em solução	87
5.8 Espalhamento de luz estático para blendas de fibroína de seda e alginato de sódio em estado sólido (membranas).....	93
5.9 Equilíbrio de fases	98
5.9.1 Modelos de Flory-Huggins e RPA.....	101
5.9.2 Modelos NRTL e UNIQUAC	109
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	116
CAPÍTULO 7: APÊNDICE A – Informações suplementares para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.....	118
CAPÍTULO 8: APÊNDICE B – Blendas de fibroína de seda e mucina.....	132
8.1 Materiais e Métodos.....	134
8.1.1. Blendas de fibroína de seda e mucina.....	134
8.1.1.1 Preparo da solução de mucina e fibroína de seda.....	134
8.1.1.2 Preparo das membranas das blendas de fibroína de seda e mucina ...	135
8.1.1.3 Caracterização das blendas de fibroína de seda e mucina	135
8.1.1.3.1 Microscopia Óptica	135
8.1.1.3.2 Potencial zeta	136
8.1.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura	136
8.1.1.3.4 Ensaios térmicos.....	136

8.1.1.3.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	137
8.1.1.3.6 Espalhamento de luz estático	137
8.1.2 Desenvolvimento das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina	137
8.1.2.1 Preparo da solução de mucina funcionalizada com grupos tetrazina e norboneno para obtenção do hidrogel	137
8.1.2.2 Preparo do hidrogel de mucina	138
8.1.2.3 Funcionalização da fibroína de seda com grupos tetrazina-amina	139
8.1.2.4 Preparo da membrana assimétrica de fibroína de seda e hidrogel de mucina	139
8.1.2.5 Caracterização das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina	139
8.1.2.6 Incorporação e liberação do fator de crescimento epitelial	140
8.2 Resultados e Discussão	141
8.2.1 Aspectos físicos das blendas de fibroína de seda e mucina.....	141
8.2.2 Potencial zeta	142
8.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	143
8.2.3 Análises térmicas das blendas de fibroína de seda e mucina	146
8.2.3.1 Termogravimetria.....	146
8.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	148
8.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para as membranas de fibroína de seda, mucina e suas blendas.....	151
8.2.5 Espalhamento de luz estático	153
8.2.6 Desenvolvimento das membranas híbridas de fibroína de seda e mucina	156
8.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	157
8.2.8 Liberação de fator de crescimento epitelial.....	158
8.2.8.1 Membranas de fibroína de seda	158
8.2.3.2 Hidrogéis de mucina	159
8.2.3.3 Membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina.....	160
8.2.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	161
8.3 Conclusão	164
CAPÍTULO 9: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Polímeros são, por definição, macromoléculas com muitas (poli) unidades de repetição (meros) ligadas, entre si, por ligações covalentes (CANEVAROLO JR, 2006). Para a produção sintética de um polímero, monômeros reagem e dependendo do tamanho da sua cadeia, tipo de ligação e do tipo de monômero, diferentes materiais podem ser produzidos. As propriedades físico-químicas também podem ser alteradas a partir dessas variáveis.

Blendas poliméricas são a mistura de um ou mais polímeros ou copolímeros, que tem como objetivo o desenvolvimento de um produto com características intermediárias às dos polímeros utilizados (UTRACKI, 1989). O uso de blendas poliméricas em diversas áreas é comum, e em razão da crescente preocupação em se utilizar materiais biodegradáveis, provenientes de fontes renováveis, a utilização de polímeros naturais no preparo de blendas vem crescendo.

Os polímeros naturais têm, em geral, características como biodegradabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade (KUNDU *et al.*, 2013). Eles podem ser utilizados em uma ampla gama de aplicações, desde a indústria de embalagens até a engenharia tecidual (ALTMAN *et al.*, 2002; MING; ZUO, 2014; NIETO, 2009; USTUNOL, 2009). Alguns polímeros naturais se destacam no desenvolvimento de biomateriais como ácido hialurônico, quitosana, celulose, colágeno, mucina, fibroína de seda e alginato de sódio, os dois últimos foram utilizados neste trabalho.

A rigor, as macromoléculas utilizadas nessa tese não são polímeros, pois não há uma única unidade de repetição. Há unidades repetitivas, nesse caso monossacarídeos e aminoácidos, que se ligam formando moléculas de alta massa molar. Esses meros se ligam aleatoriamente, portanto, a cadeia molecular pode apresentar variações dependendo da fonte dessas macromoléculas. Ainda que a rigor eles não possam ser classificados como polímeros, a literatura denomina-os de polímeros naturais e, por isso, essa nomenclatura foi utilizada.

Capítulo 1: Introdução

Dentre os polímeros naturais que são comumente utilizados no desenvolvimento de biomateriais, a fibroína de seda (SF), uma proteína produzida por artrópodes como a aranha e o bicho da seda (KUNDU *et al.*, 2013), se destaca pela alta resistência térmica e mecânica. Diversos trabalhos na literatura utilizam-na em blendas poliméricas com o objetivo de melhorar essas características no produto final (GHAELI *et al.*, 2017; MANDAL; MANN; KUNDU, 2009; MORAES *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2010; ROH *et al.*, 2006). No entanto, etapas de processamento, como a diálise, e características próprias da solução de SF, como a metaestabilidade, torna-a sensível às variações de temperatura e tensão de cisalhamento dificultam sua utilização em escala industrial, visto que esses processos podem induzir mudanças de conformação na cadeia da fibroína e alterações nas propriedades físico-químicas.

Há poucas informações sobre o comportamento termodinâmico dessa proteína isolada ou quando misturada a outras macromoléculas. Portanto, o estudo das propriedades termodinâmicas é necessário, pois, a partir delas é possível prever o comportamento das blendas poliméricas ao longo de processos de transformação. Um dos parâmetros termodinâmicos comumente estudados para blendas poliméricas é a miscibilidade entre os polímeros. Para blendas imissíveis ou parcialmente miscíveis, em que a separação de fases é observada, faz-se necessário, ainda, o estudo sobre o mecanismo de separação de fases, o qual pode fornecer informações importantes sobre a isotropia e organização das fases envolvidas.

O alginato de sódio é um polissacarídeo extraído de algas marinhas marrons, composto pelo ácido β -D manurônico (grupo M) e α -L gulurônico (grupo G) (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997). Seu uso combinado com a fibroína de seda vem sendo reportado na literatura desde a década de 90 (LIANG; HIRABAYASHI, 1992).

No Brasil, o Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (Lequip) foi um dos pioneiros do país no desenvolvimento de produtos utilizando essa blenda, com o desenvolvimento de membranas para utilização como curativo (DE MORAES, 2010), o qual teve patente depositada e concedida pelo INPI

Capítulo 1: Introdução

(Instituto Nacional de Propriedade Intelectual – PI1101774). O trabalho verificou que as blendas eram parcialmente miscíveis e, a partir desse dado, a necessidade de um estudo termodinâmico sobre as blendas surgiu, o qual foi iniciado em meu mestrado (Lopes, 2016). Diferentes composições das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio foram exploradas em solução e no estado sólido (membranas). Foi possível identificar duas regiões diferentes, uma em que havia separação de fases com formação de duas fases distintas - uma líquida e rica em alginato de sódio e outra sólida rica em fibroína de seda - e outra em que havia formação de hidrogel. O mecanismo de separação de fases foi investigado por espalhamento de luz estático e as membranas das blendas foram caracterizadas quanto à morfologia, propriedades térmicas e cristalinidade (LOPES; MORAES; BEPPU, 2018). Com esses dados, foi possível relacionar aspectos das blendas com sua composição, estabelecendo, por exemplo, uma relação entre a fração mássica inicial de alginato de sódio e a formação de fibrilas nas membranas. No entanto, a adequação dos dados de equilíbrio termodinâmico a modelos matemáticos não foi realizada, e é um dos objetivos dessa tese.

Alguns trabalhos que utilizaram alginato de sódio (MAHL, 2018; VAZ, 2012) revelaram que há uma relação entre as propriedades dos materiais obtidos e as proporções de grupos M e G presentes na cadeia do polímero. Decidiu-se, então, investigar a influência desse parâmetro na separação e no equilíbrio de fases das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, ajustando os dados obtidos a modelos termodinâmicos. Portanto, este projeto de doutorado visa estudar o equilíbrio de fases e propriedades termodinâmicas de sistemas formados por fibroína de seda e alginato de sódio com diferentes proporções de grupos M e G.

De forma complementar, durante o período do meu doutorado, houve a oportunidade de fazer um estágio sanduíche no Instituto Real de Tecnologia (Suécia), que teve como objetivo desenvolver membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina. Não há informações na literatura sobre miscibilidade e propriedades físico-químicas, tampouco trabalhos que explorem o equilíbrio termodinâmico das blendas de fibroína e mucina. Alguns estudos apontam para o potencial de utilização dessas blendas como biomaterial e a importância de

Capítulo 1: Introdução

estudar as interações entre fibroína de seda e mucina (KUNDU; PATRA; KUNDU, 2008; PETROU *et al.*, 2018; SERBAN; PANILAITIS; KAPLAN, 2012). Por se tratar de uma proteína, é esperado que o comportamento da fibroína nesse sistema seja diferente do observado nas blendas com alginato de sódio. O estudo sobre miscibilidade e sobre as interações químicas entre as proteínas é necessário para melhorar a compreensão desse sistema e posterior *design* de novos produtos, como a membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina que foi desenvolvida. Durante o estágio sanduíche foi possível realizar uma investigação inicial sobre a miscibilidade das blendas de fibroína de seda e mucina e a aplicação das membranas assimétricas como dispositivo para liberação controlada de fatores de crescimento epitelial. Não foi possível obter resultados mais avançados, como os que serão mostrados para o sistema fibroína-alginato e que são o foco desta tese de doutorado. Desta forma, os dados obtidos sobre o sistema fibroína-mucina serão mostrados no Capítulo 8 (Apêndice B).

Para facilitar o entendimento do leitor, esta tese foi organizada em capítulos, os quais tratarão das blendas do ponto de vista termodinâmico. No Capítulo 1, foi feita uma introdução ao problema abordado nesta tese e aos polímeros naturais utilizados no desenvolvimento do trabalho. O Capítulo 2 abordará os objetivos desse trabalho. O Capítulo 3 apresentará a revisão bibliográfica sobre os polímeros naturais utilizados, blendas poliméricas e aspectos gerais da termodinâmica de polímeros. O Capítulo 4 versará sobre os materiais e métodos utilizados no preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, técnicas de caracterização e o racional matemático utilizado no ajuste dos dados aos modelos termodinâmicos. O Capítulo 5 vai apresentar os resultados obtidos para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio com diferentes proporções de grupo M e G. O Capítulo 6 vai apresentar as conclusões obtidas e sugestão para trabalhos futuros. O Capítulo 7 apresenta o apêndice A em que serão mostrados os perfis de espalhamento de luz das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio que não estão mostradas no Capítulo 5 e as tabelas com dados de fração mássica dos polímeros após separação das fases. O Capítulo 8 contém o apêndice B em que serão apresentados a metodologia, os resultados obtidos e a conclusão sobre o

Capítulo 1: Introdução

projeto desenvolvido durante meu estágio sanduíche. Por último, o Capítulo 9 apresentará as referências bibliográficas utilizadas nessa tese.

CAPÍTULO 2: OBJETIVO**2.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse trabalho foi realizar uma investigação sobre o equilíbrio termodinâmico de diferentes sistemas contendo fibroína de seda, alginato de sódio e água.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização dos dois alginatos de sódio utilizados em relação à sua massa molar e proporção de grupos M e G;
- Investigar a influência da proporção de grupos M e G dos alginatos de sódio no mecanismo de separação de fases para as blendas em solução e no estado sólido (membranas);
- Após a quantificação dos componentes nas fases, ajustar os dados obtidos aos modelos termodinâmicos de Flory-Huggins, *Random phase approximation*, NRTL, UNIQUAC e Equação de Cohn.

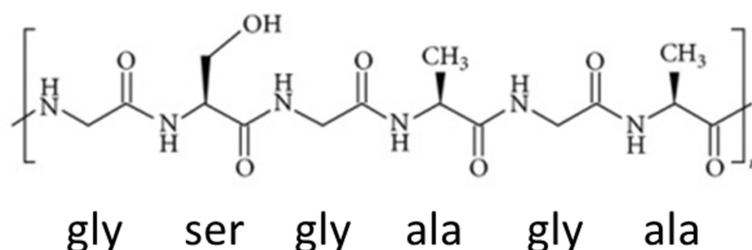
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fibroína de seda

A fibroína é uma proteína produzida por artrópodes, principalmente por aranhas e pelo bicho-da-seda, sendo o último mais utilizado em trabalhos da literatura devido à facilidade de domesticação (KUNDU *et al.*, 2013). A espécie comumente utilizada é a *Bombyx mori*. A fibroína de seda apresenta altos valores de tensão de ruptura e alta estabilidade térmica, com temperatura de degradação acima de 280 °C, além de possuir interação favorável com sistemas biológicos sem induzir respostas imunológicas adversas e promove a adesão e proliferação de vários tipos de células (KOH *et al.*, 2015). Por isso, ela é utilizada na confecção de biomateriais. Em geral, forma-se blendas com a SF e outros polímero natural para melhorar algumas das propriedades dos produtos obtidos, como resistência térmica e mecânica.

A fibroína é formada por 18 aminoácidos, sendo os principais a glicina, a alanina e a serina (Figura 1), os quais formam a cadeia leve e pesada da proteína (KIKUCHI *et al.*, 1992; SAH; PRAMANIK, 2010). Estas se ligam por meio de pontes de dissulfeto e possuem massas molares diferentes: a cadeia pesada tem aproximadamente 350 kDa e a leve 25 kDa (TANAKA; MORI; MIZUNO, 1993).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura primária da fibroína de seda com os principais aminoácidos presentes glicina (gly), alanina (ala) e serina (ser).



Fonte: SRISUWAN; BAIMARK (2013).

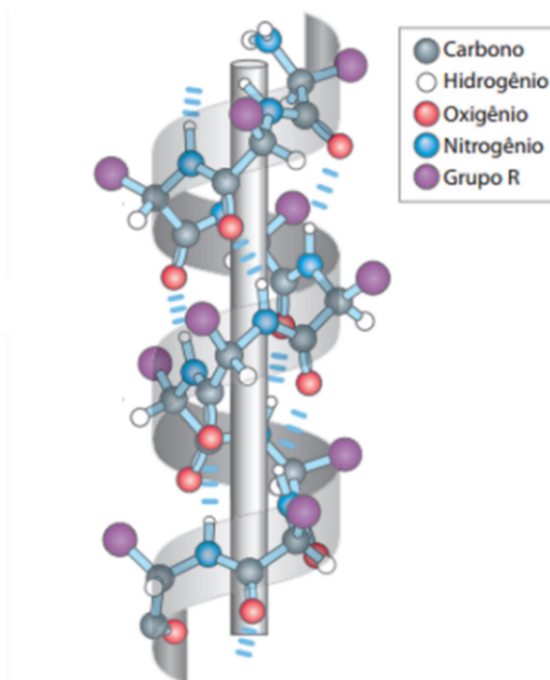
A estrutura secundária da fibroína de seda pode adquirir três conformações: α-hélice (seda I), folha-β (seda II) e enovelamento aleatório. A

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

conformação enovelamento aleatório não possui uma forma bem definida, os polipeptídeos se ligam de maneira aleatória, produzindo regiões poliméricas amorfas (CANEVAROLO JR., 2006).

A conformação α -hélice (Figura 2) é a forma metaestável da fibroína de seda. Os peptídeos estão ligados por interações de van der Waals e ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila e amino (DE MORAES, 2010). A conformação folha- β (Figura 3) é a forma mais estável da fibroína de seda. Ela é resultante das ligações de hidrogênio entre duas ou mais cadeias polipeptídicas, formando uma estrutura que remete a um conjunto de pregas (MOTTA, 2000; NELSON; COX, 2002). Assim como na conformação α -hélice, as ligações de hidrogênio ocorrem entre os grupos amino e carboxila. A diferença é que, enquanto na conformação α -hélice as ligações são intramoleculares, na conformação folha- β as ligações de hidrogênio ocorrem entre cadeias polipeptídicas vizinhas (MOTTA, 2000).

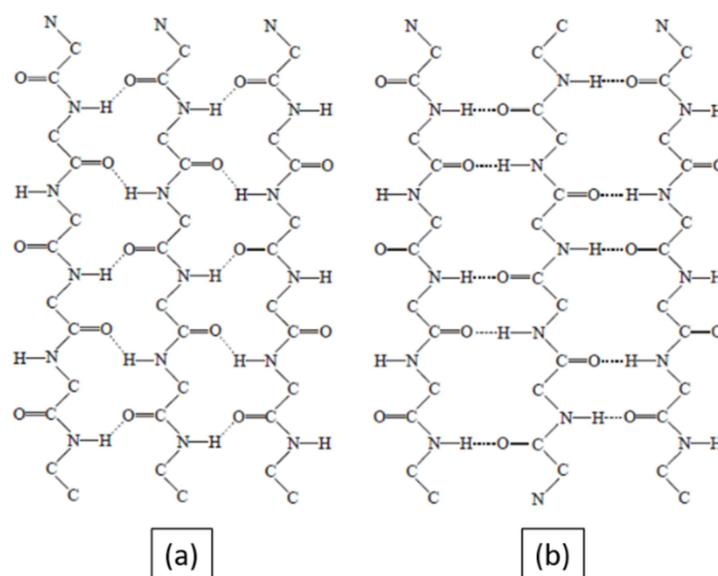
Figura 2: Representação esquemática da conformação α -hélice de uma proteína.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Figura 3: Representação esquemática da conformação folha- β para uma proteína: (a) folha- β paralela, (b) folha- β antiparalela.



Fonte: Motta (2000).

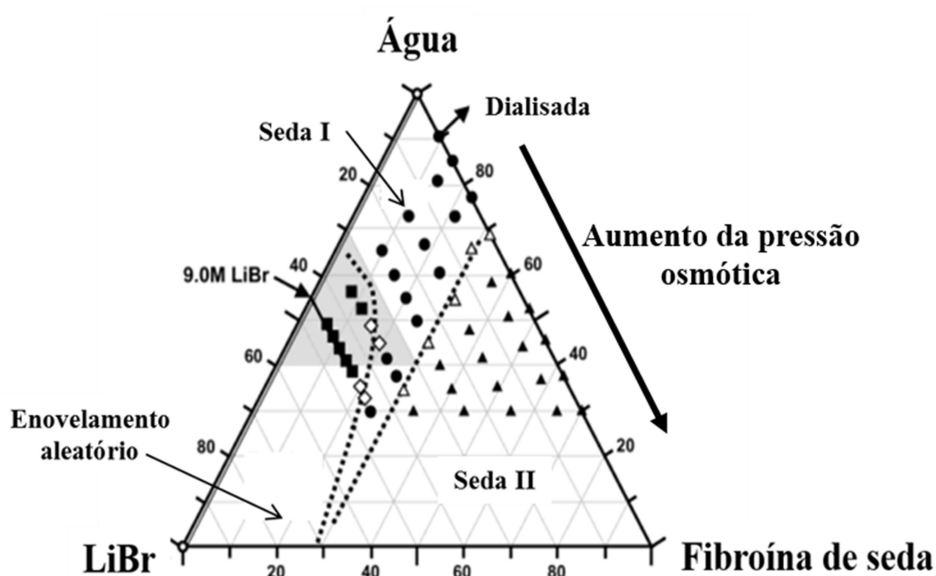
Existem dois tipos de conformação folha- β : folha- β paralela, Figura 3 (a), e folha- β antiparalela, Figura 3 (b). O primeiro tipo é composto por cadeias polipeptídicas com os terminais amino alinhados no mesmo sentido e, no segundo tipo, esses terminais estão alinhados em direção oposta (MOTTA, 2000).

Por meio de tratamentos mecânicos ou térmicos e do uso de solvente, é possível converter a estrutura de α -hélice da SF para folha- β (SOHN; STREY; GIDO, 2004). Esse fenômeno é observado durante o processamento da fibroína de seda. Após o preparo de uma solução de fibroína de seda em solução salina, esta se encontra na conformação α -hélice e, após a diálise, a retirada de sal do sistema induz a formação da estrutura folha- β (Figura 4) (SOHN; STREY; GIDO, 2004). Devido ao aumento da pressão osmótica, causada por alterações na concentração de sal e, conseqüentemente, no potencial químico do sistema, as moléculas de fibroína de seda se agrupam, modificando sua estrutura de α -hélice/enovelamento aleatório (seda I) para folha- β (seda II). Essas modificações na estrutura da fibroína de seda podem

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

ser observadas por difração de raio X e são favorecidas termodinamicamente, visto que o processo ocorre espontaneamente.

Figura 4: Diagrama de fases mostrando as mudanças de conformação da estrutura da fibroína de seda que podem ocorrer ao variar a pressão osmótica. Legenda dos símbolos: ■ enovelamento aleatório, ● seda I, ▲ seda II, ◇ coexistência de enovelamento aleatório e seda I, △ coexistência entre seda I e seda II.



Fonte: Adaptado de Sohn; Strey; Gido (2004).

A presença de polímeros hidrofílicos na solução de fibroína de seda também provoca alterações nas interações fibroína-fibroína, favorecendo a formação de estruturas mais densas e mais organizadas. Esse fenômeno foi observado com a adição de polietilenoglicol (PEG) (MATSUMOTO *et al.*, 2006) e alginato de sódio (LOPES, 2016) e é uma das hipóteses para descrever o fenômeno de separação de fases que ocorre entre os polímeros naturais.

A fibroína de seda tem várias aplicações na área médica devido às suas características de biocompatibilidade, não-toxicidade e biodegradabilidade. A sua utilização para produção de biomateriais é bem descrita e consolidada na literatura. Trabalhos relatam seu uso na confecção de matrizes para regeneração de ligamentos e ossos (ALTMAN *et al.*, 2002; FARÈ *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2005a; UCHIDA *et al.*, 2014), de curativos (CALAMAK *et al.*, 2014;

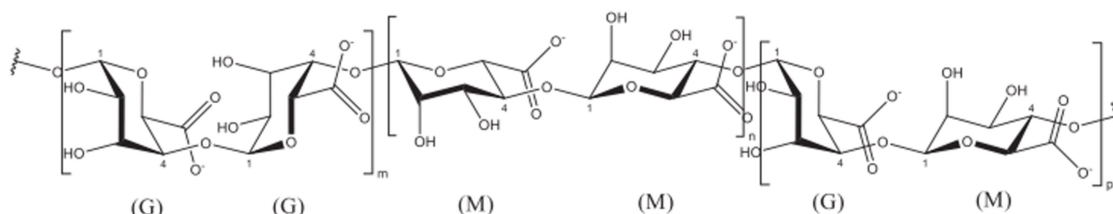
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

DE MORAES; BEPPU, 2013), de dispositivos para liberação controlada de fármacos (MARIN; MALLEPALLY; MCHUGH, 2014; YUCEL; LOVETT; KAPLAN, 2014) e de dispositivos para o tratamento de câncer (JASTRZEBSKA *et al.*, 2014).

3.2 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polissacarídeo natural extraído de algas marinhas marrons (AGULHON *et al.*, 2014). Ele tem função de conferir estrutura e flexibilidade à parede celular e intracelular, sua quantidade pode variar de 15-53% da massa seca dessas algas (ONSØYEN, 1997). Sua estrutura química (Figura 5) é formada pelos ácidos β -D manurônico (bloco M) e α -L gulurônico (bloco G), que podem se ligar entre si por ligações glicosídicas (1-4) formando blocos GG e MM ou um com o outro formando blocos GM (NAKAUMA *et al.*, 2016). A proporção e distribuição dos blocos dependem da sua origem e interferem nas propriedades físico-químicas, reológicas e mecânicas do alginato de sódio.

Figura 5: Estrutura química do alginato de sódio: (G) ácido α -L gulurônico e (M) ácido β -D manurônico.



Fonte: Agulhon *et al.* (2014).

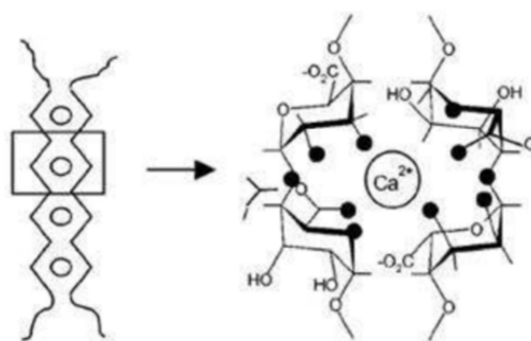
Alginatos de sódio provenientes de algas da espécie *Laminaria hyberborica* possuem, em geral, maior proporção de blocos G (ácido gulurônico), enquanto os da espécie *Macrocystis pyrifera* possuem, em geral, maior proporção de blocos M (ácido manurônico) (VAZ, 2012). A quantidade e distribuição de blocos G na estrutura do alginato influencia no processo de gelificação, que ocorre rapidamente na presença de alguns cátions multivalentes como Ca^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} e Fe^{+3} , sendo o Ca^{+2} o mais comum e efetivo (JOST *et al.*, 2014; NAKAUMA *et al.*, 2016; USTUNOL, 2009).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Os géis iônicos de alginato de sódio são insolúveis em água e a estrutura formada recebe o nome de “caixa de ovos” (Figura 6). Nesse processo, os blocos G estão alinhados lado a lado e o íon polivalente se difunde na solução de alginato de sódio preenchendo o espaço entre as cadeias, induzindo interações iônicas e formando uma rede tridimensional (TURBIANI, 2007). Esse processo depende da concentração do cátion, pH, distribuição dos blocos M e G e da força iônica (GRANT *et al.*, 1973).

Além dos géis iônicos, formados na presença dos cátions multivalentes, géis ácidos podem ser formados quando o pH da solução está abaixo do pKa do alginato de sódio (pKa = 3,4-3,6) (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997). Nesse caso, a reticulação ocorre por meio de ligações de hidrogênio e interações intermoleculares entre os blocos M e, principalmente, blocos G, os quais se unem formando uma estrutura reticulada (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; STOKKE, 2006; DRAGET; SKJÅK BRÆK; SMIDSRØD, 1994). As propriedades dos géis ácidos dependem da composição química, sequência dos blocos G e M e tamanho das cadeias poliméricas do alginato de sódio utilizado (DRAGET *et al.*, 2003).

Figura 6: Representação da estrutura de “caixa de ovos” dos géis de alginato de sódio. O íon cálcio interage com átomos de oxigênio dos grupos carboxílicos e hidroxilas presentes na estrutura do alginato de sódio.



Fonte: Bryce *et al.* (1974).

A proporção e distribuição dos blocos G e M também interfere nas características mecânicas dos géis formados. Observa-se que em alginatos de sódio com maior quantidade de blocos G, os géis apresentam maior resistência

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

mecânica por possuírem longos blocos associados e pequenos segmentos elásticos (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997). Por outro lado, géis com maior quantidade de blocos GM apresentam decréscimo do módulo de armazenamento por efeito do aumento da força friccional entre as cadeias ligadas (VAZ, 2012).

Além das diferenças já citadas, a quantidade de blocos G e M influencia na estabilidade dos géis formados. Para géis formados por reticulação iônica, o bloco G é mais importante para sua estabilização. O contrário ocorre para géis ácidos, em que a presença dos blocos M influencia mais na sua estabilidade (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997).

O alginato de sódio possui diversas aplicações, sendo utilizado desde a indústria de alimentos, como emulsificante, até a obtenção de biomateriais. Assim como a fibroína de seda, possui características que permitem sua utilização em biomaterias como a baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Algumas aplicações do alginato de sódio na área médica são: encapsulação de células para engenharia tecidual (SARKER *et al.*, 2015), suplemento alimentar (GEORG JENSEN *et al.*, 2012), curativo (BRACHKOVA *et al.*, 2011; LEUNG *et al.*, 2014; MENG *et al.*, 2010; THU; ZULFAKAR; NG, 2012) e dispositivo para liberação controlada de fármacos (BHUTANI *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2014; QURRAT-UL-AIN *et al.*, 2003).

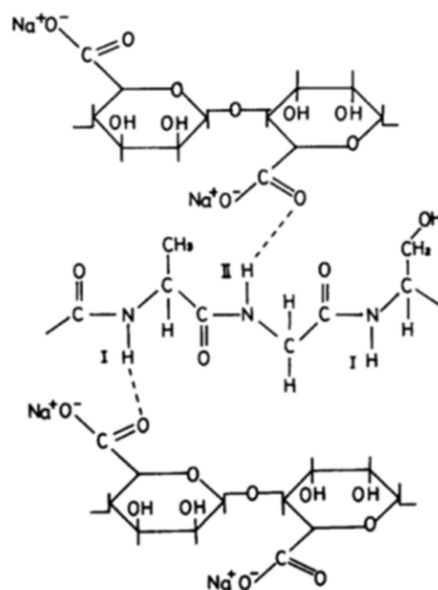
3.3 Blendas de fibroína de seda e alginato de sódio

Blendas de fibroína de seda e alginato de sódio são relatadas na literatura desde a década de 90 (LIANG; HIRABAYASHI, 1992). Apesar disso, os poucos trabalhos na literatura utilizando blendas desses polímeros para aplicações na área de engenharia tecidual iniciaram apenas nos anos 2000 (MANDAL; KUNDU, 2009; ROH *et al.*, 2006). A interação entre a fibroína e o alginato ocorre por ligações de hidrogênio (LIANG; HIRABAYASHI, 1992),

Figura 7, e as blendas formadas por esses polímeros são parcialmente miscíveis (DE MORAES *et al.*, 2014). Os trabalhos da literatura utilizam essas blendas para aplicação como biomaterial.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Figura 7: Ligação de hidrogênio entre a fibroína de seda e o alginato de sódio.



Fonte: Liang e Hirabayashi (1992).

Os trabalhos publicados utilizando essas blendas mostram que, em relação às membranas de fibroína de seda, as membranas das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio apresentam melhores propriedades mecânicas, com valores de tensão de ruptura cerca de 68% maiores (LIANG; HIRABAYASHI, 1992), maior grau de intumescimento e permeabilidade ao vapor (DE MORAES *et al.*, 2014) e estimulam a proliferação de células epiteliais, como os fibroblastos (ROH *et al.*, 2006). Esses estudos mostram a sinergia entre as macromoléculas e os efeitos positivos decorrentes da sua interação. Apesar disso, as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio são pouco estudadas na literatura.

As publicações mostram a aplicação dessas blendas como curativos de alta performance (MORAES *et al.*, 2014; ROH *et al.*, 2006), dispositivos para liberação controlada de fármacos (MANDAL; KUNDU, 2009; SRISUWAN; BAIMARK, 2013) e *scaffolds* (MING; ZUO, 2014; WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). Nos trabalhos é possível observar que as blendas de fibroína e alginato podem ser apresentadas de diversas formas, dependendo da aplicação desejada. Para aplicação como curativos, as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio são utilizadas na forma de membranas preparadas por

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

casting (DE MORAES *et al.*, 2014) e na forma de esponjas preparadas por liofilização (ROH *et al.*, 2006). Em ambos os trabalhos, as blendas apresentaram resultados que as qualificam para o uso como curativos.

No estudo desenvolvido por De Moraes *et al.* (2014) verificou-se que as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, quando comparadas às membranas de fibroína de seda, apresentavam maior grau de intumescimento, maior permeabilidade ao vapor d'água e valores maiores de tensão de ruptura e alongamento, além de aumentar a viabilidade celular. Já o trabalho de Roh *et al.* (2006) avaliou a eficácia das blendas no processo de reepitelização da pele de ratos e verificaram que as lesões diminuía significativamente após sete dias de utilização das blendas, sendo mais eficientes do que o curativo comercial Nu GauzeTM. Os autores atribuíram essa rápida reepitelização à proliferação de células epiteliais por meio da deposição de colágeno que parece ser acelerada pelas blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

Srisuwan e Baimark (2013) prepararam filmes de fibroína de seda e alginato de sódio para liberação controlada de cloridrato de tetraciclina, um medicamento antimicrobiano. Os autores adicionaram o medicamento à mistura dos polímeros antes do processo de *casting* a 40 °C, incorporando-o ao filme. A cinética de liberação foi avaliada em PBS a 37 °C e pH igual a 7,4. Os autores variaram o teor de fibroína de seda dos filmes e verificaram que quanto maior a quantidade da proteína, menor e mais lenta era a liberação do fármaco. Os autores não observaram separação de fases nos filmes, relacionando o resultado ao caráter hidrofílico dos polímeros e sua miscibilidade em meio aquoso. Uma característica interessante dos filmes foi sua morfologia, pois sua superfície era lisa e homogênea, sem a presença de estruturas globulares, um resultado oposto ao relatado por De Moraes (2014) e Lopes (2016).

Estudos recentes mostram a aplicação das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio como *scaffolds* no intuito de utilizá-los na engenharia tecidual. Em todos os trabalhos, é possível observar que há interação química entre os dois polímeros naturais e que a morfologia resultante é uma matriz com porosidade acima de 80% e poros interconectados (MING; ZUO, 2014; WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). Nos estudos conduzidos por Ming e

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Zuo (2014) e Wang *et al.* (2016), os *scaffolds* foram preparados por liofilização, enquanto que no estudo de Zhang *et al.* (2015) eles foram preparados utilizando a técnica de separação de fases termicamente induzida (TIPS). Essa técnica se baseia na separação de uma solução polimérica homogênea em duas fases contínuas, uma fase rica no polímero e outra pobre, as quais são submetidas a um tratamento térmico. Em relação à morfologia, os autores verificaram que os *scaffolds* produzidos por TIPS apresentavam alta quantidade de nano poros tridimensionais com a presença de fibrilas de fibroína de seda, diferente da morfologia observada nos *scaffolds* de fibroína de seda pura. Esse resultado indica que a adição do alginato de sódio pode promover a formação de estruturas fibrosas, o que está de acordo com o observado por Lopes (2016) para as membranas de fibroína de seda e alginato de sódio. Os trabalhos citados mostram o potencial de aplicação dos *scaffolds* das blendas de fibroína e alginato na engenharia tecidual, pois eles possibilitaram o crescimento de cristais de hidroxiapatita (MING; ZUO, 2014), adesão e proliferação de fibroblastos e osteoblastos (WANG *et al.*, 2016).

As propriedades termodinâmicas do sistema formado por esses polímeros naturais ainda são pouco exploradas na literatura. É possível citar dois trabalhos que estudaram o equilíbrio de fases das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio. O primeiro deles é a dissertação de mestrado de minha autoria (LOPES, 2016), em que doze blendas com diferentes composições foram estudadas e caracterizadas quanto à morfologia, cristalinidade, interação química, propriedades térmicas e espalhamento de luz. A partir das observações das blendas em solução e suas membranas, foi possível estabelecer uma relação entre a composição das blendas e suas características. O acompanhamento cinético da separação de fases mostrou que diferentes comportamentos eram observados, algumas blendas formaram duas fases distintas, uma líquida e uma sólida, enquanto outras blendas formaram hidrogéis. As blendas que formaram fases distintas, tiveram seus componentes em cada fase quantificados e diagramas de fases foram obtidos a partir desses dados. O parâmetro de Flory-Huggins foi estimado a partir dos dados de temperatura de transição vítrea e o mecanismo de separação de

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

fases também foi estudado, tanto para as blendas em solução como para as membranas.

O segundo trabalho, desenvolvido por Brada (2019), explorou a influência do pH no equilíbrio de fases. Para isso, a autora estudou três blendas com composição distinta em pHs iguais a 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 e 10,0. Ela verificou a formação de duas fases distintas, uma líquida e uma sólida, porém não foram observadas diferenças significativas no equilíbrio de fases com a mudança do pH, assim, é possível que para pHs básicos, as blendas se comportem de forma semelhante. A autora também explorou a solubilidade da fibroína de seda em solução de alginato de sódio em diferentes pHs (6,5, 7,5, 8,5 e 9,5), adequando os dados obtidos à equação de Cohn. A partir da linearização da equação, foi determinada a constante de solubilidade, a qual não variou de forma significativa com a mudança de pH.

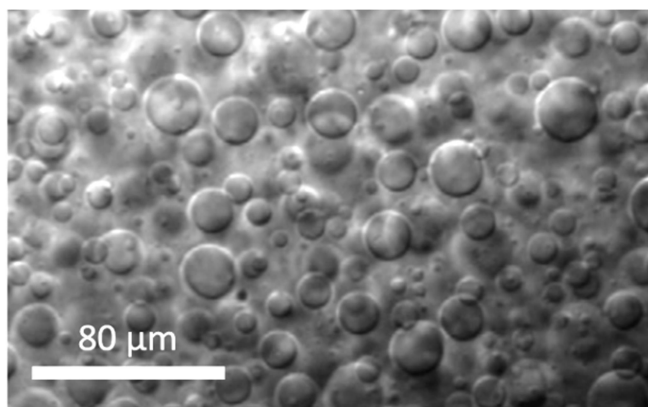
Existem artigos que relatam a interação do alginato de sódio com outras proteínas, visto que sistemas de proteínas e polissacarídeos são comuns na indústria alimentícia. Dois exemplos de sistemas formados por alginato de sódio e proteínas são os estudos desenvolvidos em sistemas formados por alginato de sódio e caseína (ANTONOV; MOLDENAERS, 2011; PACEK *et al.*, 2000) e alginato de sódio e proteína da ervilha (MISSION *et al.*, 2012). Esses estudos trazem informações importantes para o melhor entendimento do sistema formado pelo alginato de sódio e fibroína de seda. Em ambos sistemas (alginato-caseína e alginato-proteína da ervilha) há separação de fases e formação de estruturas globulares de proteína, mesmo em sistemas com concentrações baixas dos polímeros, o que também ocorre no sistema alginato-fibroína.

No sistema estudado por Antonov e Moldenaers (2011) foi observado que ocorria separação de fases e que as estruturas globulares proteicas podiam ser observadas em solução e não apenas nas membranas formadas pelos polímeros, como mostra a Figura 8. Além disso, os autores estudaram a influência da presença do dextran sulfato de sódio (DSS), um polieletrólito forte, no sistema polissacarídeo-proteína e verificaram que há diferenças significativas no equilíbrio de fases devido à interação do DSS com a caseína.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

A caseína, assim como a fibroína de seda, é uma proteína que tem a tendência de se organizar em micelas e tem o ponto isoelétrico próximo da fibroína de seda ($pI = 4,6$), estando carregada negativamente em pH neutro. Dessa forma, espera-se que o comportamento do sistema alginato-fibroína seja similar ao sistema alginato-caseína.

Figura 8: Imagens de microscopia das emulsões contendo alginato de sódio e caseína em pH 7,0 e 23°C.



Fonte:Antonov e Moldenaers (2011)

3.4 Mecanismos de separação de fases

Sistemas formados por macromoléculas são complexos e, por vezes, são obtidos sistemas imiscíveis ou parcialmente miscíveis onde a separação de fases é observada (DE MORAES *et al.*, 2014; MESSION *et al.*, 2012; PACEK *et al.*, 2000). Blendas com essas características, geralmente, apresentam uma morfologia complexa com propriedades e microestrutura diferenciada.

O mecanismo de separação de fases é um ponto-chave para entender esses sistemas e a sua morfologia. Há dois possíveis mecanismos de separação de fases, por nucleação e crescimento e por decomposição spinodal. Dependendo do mecanismo de separação de fases que ocorrer, diferentes morfologias podem ser obtidas, conferindo características diversas aos produtos obtidos.

O mecanismo de separação de fases por nucleação e crescimento ocorre quando a mistura polimérica, inicialmente monofásica e estável, atravessa a região de metaestabilidade, Figura 9, formando núcleos que

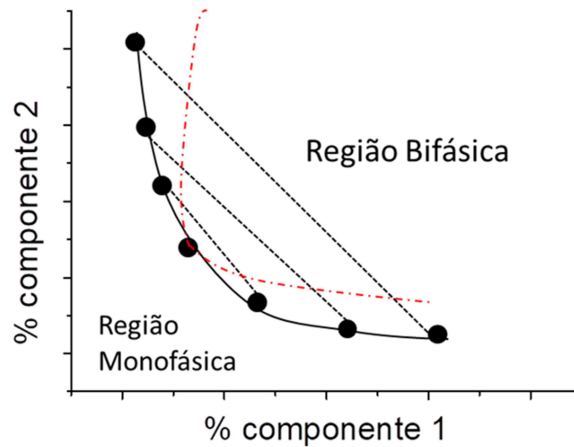
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

crescem com o tempo sem que a composição seja alterada (MAGGIONI, 1999). Esse processo é caracterizado pelo surgimento de regiões que possuem arranjos ordenados de moléculas (núcleos), as quais crescem até estabilizarem (MANRICH; ZANOTTO; HAGE, 1992). Ele não ocorre espontaneamente, sendo necessária uma energia de ativação e a morfologia resultante é do tipo matriz-domínio.

O mecanismo de separação de fases por decomposição spinodal ocorre quando a mistura polimérica atravessa rapidamente a curva spinodal, geralmente, próximo ao ponto crítico, separando-se em duas ou mais fases. Diferentemente do mecanismo de nucleação e crescimento, em que a composição dos domínios não muda com o tempo, no mecanismo de separação spinodal isso pode ser observado resultando em duas fases contínuas entrelaçadas (MAGGIONI, 1999). Essa morfologia também é chamada de *interpenetrated polymer network* (IPN), que pode coalescer com o passar do tempo formando uma morfologia matriz-domínio com alta conectividade.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Figura 9: Representação de diagrama de fases retangular. Curva binodal (-), curva spinodal (-.-), linha de amarração (- -). A região entre as curvas binodal e spinodal é chamada de metaestável.



Fonte: Elaborado pela autora.

A separação de fases pode ser investigada a partir da difração de luz, pois quando um laser incide sobre um sistema dois comportamentos podem ser observados: um halo, em que é observado um pico de intensidade de luz (

Figura 10 (a)), ou um disco de luz, onde há o decaimento da intensidade de luz em relação ao ângulo (

Figura 10 (b)). Quando o halo é observado pode-se dizer que a separação de fases ocorreu por decomposição spinodal. Já quando o disco é observado, o mecanismo de separação de fases observado é o de nucleação e crescimento.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Para separação de fases por decomposição spinodal, a teoria linear de Cahn (CAHN, 1965) pode ser utilizada. Essa teoria relaciona flutuações de concentração com número de onda “q” com o ângulo de espalhamento de luz, de acordo com a equação 1. Algumas flutuações são predominantes e geram um pico de intensidade de luz, como pode ser visto no gráfico intensidade *versus* ângulo de espalhamento na

Figura 10 (a). Esse máximo de intensidade está relacionado com a distância periódica entre os domínios das fases do sistema, o qual pode ser calculado utilizando a equação 2. Nos estágios iniciais da separação de fases por decomposição spinodal, a intensidade de luz cresce exponencialmente com o tempo (MAGGIONI, 1999).

$$q_m = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta_m}{2} \quad (\text{equação 1})$$

$$q_m = \frac{2\pi}{D} \quad (\text{equação 2})$$

Onde q é o número de onda; θ é o ângulo de espalhamento; λ é o comprimento de onda da luz incidente e D é a distância periódica entre os domínios das fases.

Segundo Maggioni (1999), utilizando a teoria linear de Cahn também é possível relacionar o crescimento exponencial da intensidade de luz com a taxa de crescimento da amplitude de uma flutuação em um número de onda fixo por meio da equação 3.

$$I(q,t) \sim e^{(2R(q)t)} \quad (\text{equação 3})$$

Onde I é a intensidade de luz espalhada; t é o tempo depois de iniciada a separação de fases e R(q) é a taxa de crescimento da amplitude de uma flutuação com número de onda “q”.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Para calcular o valor de $R(q)$, traça-se um gráfico de $\ln I$ *versus* t , em que o valor da inclinação da reta obtida representa $R(q)$. Segundo a teoria linear de Cahn, o valor de $R(q)$ pode ser utilizado para calcular o coeficiente de difusividade aparente do polímero. Para isso, é necessário traçar um gráfico $R(q)/q^2$ *versus* q^2 , que resultará em uma reta e extrapolá-la para o valor de q igual a zero, equação 4. O valor do coeficiente de difusão aparente fornecerá uma compreensão do quão rápido ocorrerá a separação de fase.

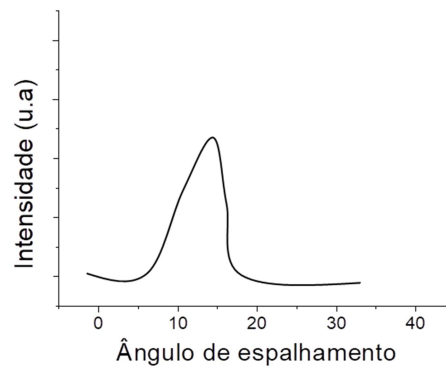
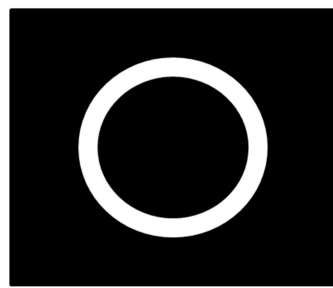
$$D_{app} = \lim_{q \rightarrow 0} \left(\frac{2R(q)}{q^2} \right) \quad (\text{equação 4})$$

onde D_{app} é o coeficiente de difusão aparente.

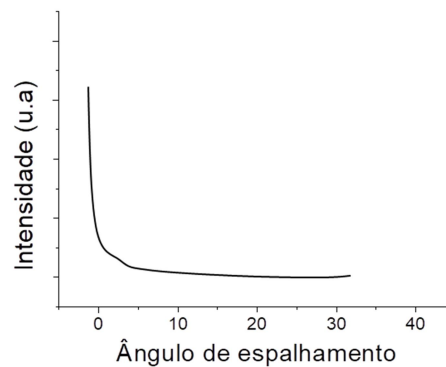
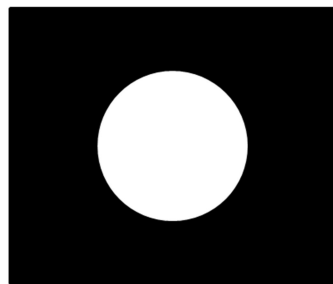
Figura 10: Imagens e perfil de espalhamento de luz obtidos para a separação de fases por decomposição spinodal (a) e por nucleação e crescimento (b).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

(a)



(b)



Fonte: Adaptado de Inoue (1995)

Para sistemas em que a separação de fases ocorre pelo mecanismo de nucleação e crescimento a técnica de espalhamento de luz também pode ser utilizada, no entanto, a teoria linear de Cahn não é válida. Nesse caso, a intensidade da luz espalhada é dada pela equação 5 (WIJMANS; RUTTEN; SMOLDERS, 1985).

$$I = k (t - \tau)^n \quad (\text{equação 5})$$

Onde I é a intensidade de luz espalhada; k é a taxa de crescimento do núcleo; τ é o tempo necessário para iniciar a nucleação; t é o tempo total necessário para o sistema separar fases e n é uma constante que determina se a nucleação é homogênea ou heterogênea.

Para encontrar o valor de “ n ” é necessário traçar um gráfico de $\log I$ versus $\log t$, em que a inclinação da reta obtida será igual ao valor de n . Se esse valor for próximo de 3, a nucleação é heterogênea e se for próximo de 4, a nucleação é homogênea (MAGGIONI, 1999).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

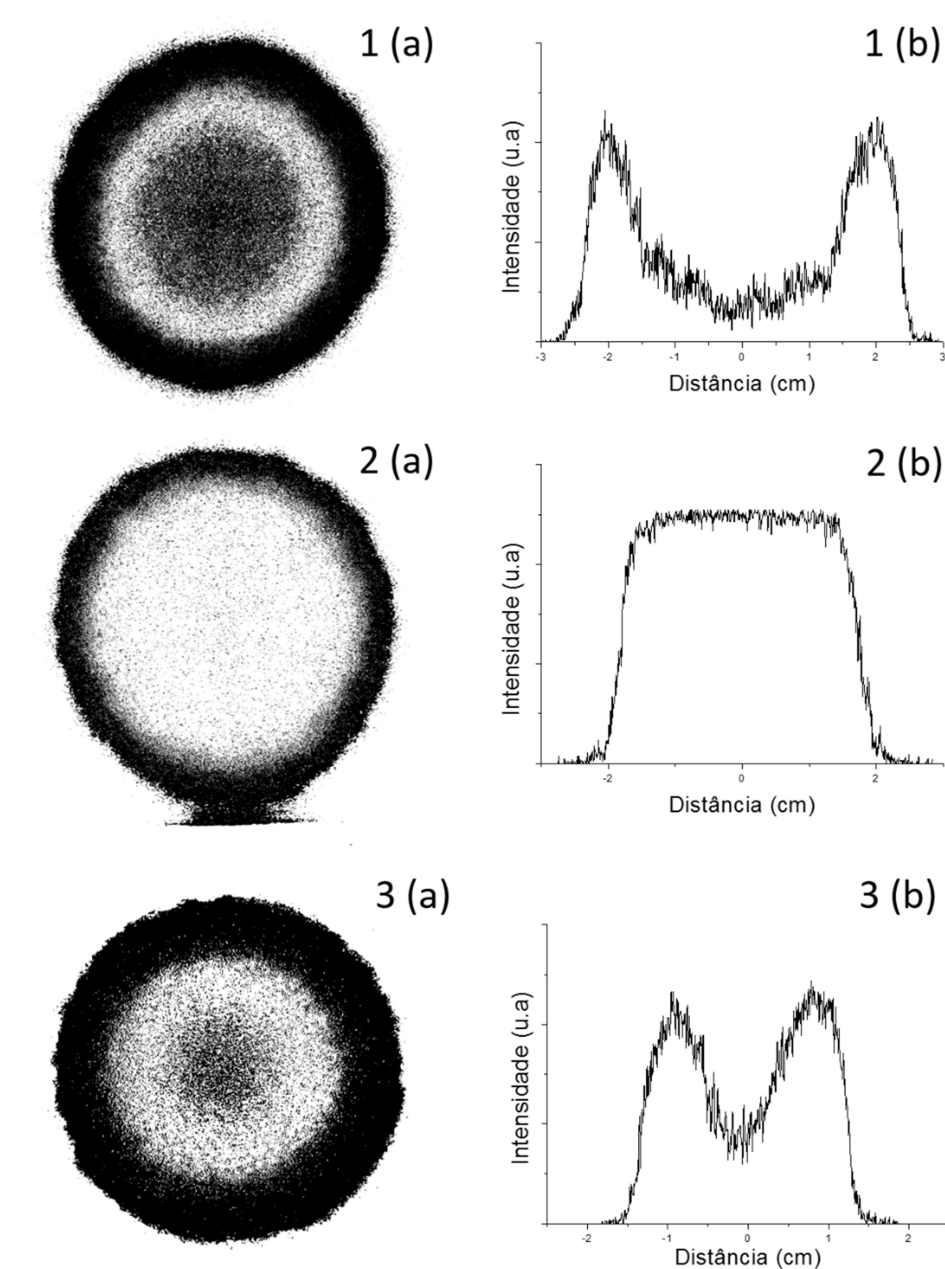
No caso das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, estudos iniciados por mim no mestrado sugerem que o mecanismo de separação de fases para as blendas ocorre por decomposição spinodal. Durante o trabalho foram estudadas doze blendas diferentes variando-se a fração mássica dos componentes, representando uma pequena área do diagrama de fases. Observou-se que pequenas mudanças na composição da blenda causavam mudanças significativas no espalhamento de luz..

Na Figura 11, é possível observar o espalhamento de luz e o perfil de espalhamento de luz obtidos para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio em solução e no estado sólido (membrana). Para o sistema em solução, foram encontrados dois perfis de espalhamento, o primeiro (Figura 11-1(a)), mostra a presença de um halo, característico do mecanismo de separação de fases por decomposição spinodal. Também foram observadas, para as blendas em que houve formação de hidrogel, o espalhamento em forma de disco (Figura 11-2(a)), sugerindo que a morfologia observada para essas blendas pode ser diferente daquelas em que a separação sólido-líquido é observada. A Figura 12 mostra as regiões do diagrama de fases em que duas fases distintas (uma líquida e uma sólida) são observadas, e outra em que as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio formaram hidrogel.

Geralmente, a separação por decomposição spinodal é observada em uma região estreita do diagrama de fases, no entanto, os resultados obtidos durante a realização de trabalhos anteriores (Lopes, 2016) indicaram que esse mecanismo de separação pode ocorrer em uma região mais ampla do diagrama de fases. Além disso, também foi observado que o espalhamento de luz se modificava durante a cinética de separação de fase, principalmente em blendas que apresentavam o perfil de espalhamento similares a Figura 11-2(b).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

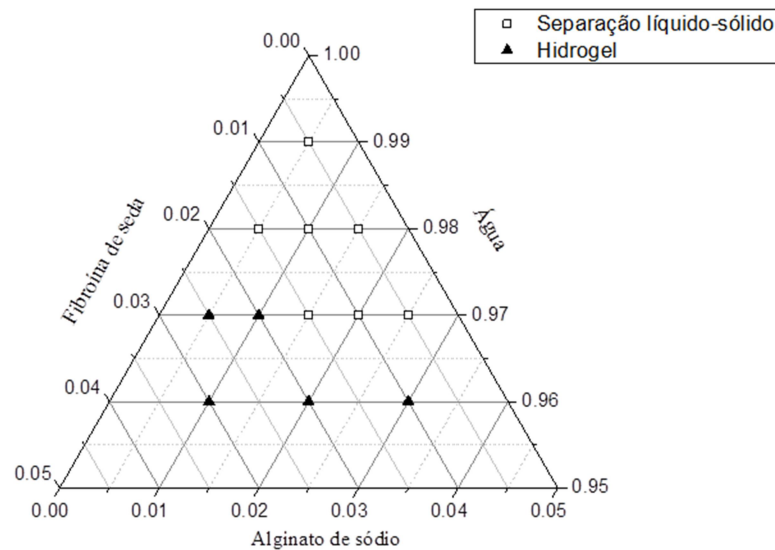
Figura 11: Imagens de espalhamento de luz (a) e perfil de espalhamento de luz (b) obtidas para uma blenda que separou fases (1), blenda que formou hidrogel (2) membrana de fibroína de seda e alginato de sódio (3). Branco significa luz e preto ausência de luz.



Fonte: Lopes (2016).

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Figura 12: Diagrama ternário representando a região em que a separação líquido-sólido é observada e região de formação de hidrogel.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Termodinâmica de blendas poliméricas

Uma característica importante a ser investigada nas blendas poliméricas é a miscibilidade, a qual é governada pela termodinâmica, mais especificamente, pela variação da energia livre de Gibbs de mistura (ΔG_{mix}) (KIM; MIN; KANG, 2006). Para uma blenda ser miscível, dois critérios termodinâmicos precisam ser satisfeitos. O primeiro é que valor de ΔG_{mix} , calculado por meio da equação 6, precisa ser negativo. O segundo critério é que a segunda derivada da variação da energia livre de Gibbs de mistura em relação à fração volumétrica do polímero estudado a temperatura e pressão constantes, seja maior que zero (equação 7).

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} \quad (\text{equação 6})$$

$$\left(\frac{\partial^2 \Delta G_{mix}}{\partial \phi_i^2} \right)_{T,P} > 0 \quad (\text{equação 7})$$

onde ΔH_{mix} é a entalpia de mistura; ΔS_{mix} é a entropia de mistura; T é a temperatura; P é a pressão e ϕ_i é a fração volumétrica do polímero estudado.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Para uma mistura de polímeros, geralmente, os valores de energia livre de Gibbs são positivos, pois a contribuição entrópica é pequena, pois a alta massa molar dos polímeros dificultam o seu rearranjo molecular (TAGER, 1977) e a contribuição entálpica é positiva, nos casos em que as forças de van der Waals são predominantes (KIM; MIN; KANG, 2006). No entanto, nos casos em que outras interações moleculares ocorrem, como dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, há possibilidade de miscibilidade ou miscibilidade parcial entre os polímeros (KIM; MIN; KANG, 2006).

Uma forma simples de determinar a miscibilidade de uma blenda é por meio da investigação da temperatura de transição vítrea (T_g). Blendas poliméricas miscíveis apresentam um valor de T_g intermediário aos valores das T_g s dos polímeros isolados, blendas parcialmente miscíveis apresentam dois valores de T_g s intermediários aos valores das T_g s dos polímeros isolados, e blendas imiscíveis apresentam dois valores iguais aos valores das T_g s dos polímeros isolados.

A T_g de uma blenda pode ser determinada por meio de técnicas térmicas, como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise dinâmico-mecânica (DMA), que podem ser utilizadas para calcular o valor do parâmetro de interação entre os polímeros constituintes da blenda, como o parâmetro de Flory-Huggins (χ_{12}). Durante os estudos desenvolvidos anteriormente (Lopes, 2016), esse parâmetro foi calculado utilizando a equação de Kim e Burns (1987). O resultado obtido foi positivo e próximo de zero, o que evidencia a miscibilidade parcial das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

A partir do conhecimento sobre a interação polimérica, é possível ajustar os dados de equilíbrio termodinâmico a modelos existentes. O primeiro modelo desenvolvido para macromoléculas foi o de Flory-Huggins, o qual possui uma parcela referente às contribuições entálpicas, equação 8, que considera os efeitos de tamanho e forma de moléculas, e outra às contribuições entrópicas, que considera as interações intermoleculares, equação 9 (YANO, 2007). Substituindo as equações 8 e 9 na equação 6, a equação estendida de Flory-Huggins é obtida, que pode ser utilizada em sistemas com qualquer quantidade

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

de componentes. A equação mais conhecida é a utilizada para sistemas com dois componentes, que podem ser polímero-solvente ou polímero-polímero.

$$\frac{\Delta H}{RT} = \left(\sum_i x_i \frac{V_i}{V_s} \right) \sum_i \sum_{j>i} \frac{\chi_{ij}}{T} \varphi_i \varphi_j \quad (\text{equação 8})$$

$$\frac{\Delta S}{R} = - \sum x_i \ln \varphi_i \quad (\text{equação 9})$$

onde x_i é a fração molar da espécie i , V_i e V_s são os volumes por quantidade de matéria da espécie i e do soluto, respectivamente; χ_{ij} é o parâmetro de interação de Flory-Huggins da espécie i com a j ; e φ_1 e φ_2 são as frações volumétricas da espécie 1 e 2, respectivamente;

Para que um sistema com i componentes e π fases, sem reação química, atinja o equilíbrio termodinâmico, é necessário que haja equilíbrio térmico, mecânico e químico. Matematicamente, essa condição pode ser expressa como:

$$T^{\text{fase 1}} = T^{\text{fase 2}} = T^{\text{fase 3}} = \dots = T^{\text{fase } \pi}$$

$$P^{\text{fase 1}} = P^{\text{fase 2}} = P^{\text{fase 3}} = \dots = P^{\text{fase } \pi}$$

$$\mu_i^{\text{fase 1}} = \mu_i^{\text{fase 2}} = \mu_i^{\text{fase 3}} = \dots = \mu_i^{\text{fase } \pi} \quad \forall i$$

onde μ é o potencial químico.

O potencial químico pode se relacionar com a atividade (a) de um componente pela equação 10. A atividade pode ser uma função de diferentes parâmetros, a depender do modelo termodinâmico escolhido.

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (\text{equação 10})$$

onde μ_i^0 é o potencial químico em um estado de referência e R é a constante universal dos gases.

Em um sistema em equilíbrio essa relação pode ser útil, visto que o critério de igualdade de potenciais químicos é uma condição bastante utilizada na modelagem matemática e cálculo da composição dos componentes em cada fase. Uma outra forma é pelo cálculo do valor mínimo da energia de

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

Gibbs. Para o modelo de Flory-Huggins, a atividade pode ser calculada utilizando a equação 11 (PESSOA FILHO, 2002).

$$\ln a_i = 1 + \ln \varphi_i - V_i \sum_i \frac{\varphi_i}{V_i} + \frac{V_i}{V_s} \left(\sum_j \frac{\chi_{ij}}{T} \varphi_j - \sum_k \sum_{j>k} \frac{\chi_{kj}}{T} \varphi_k \varphi_j \right) \quad (\text{equação 11})$$

O modelo de Flory-Huggins é baseado em três hipóteses:

1. A conformação dos polímeros é considerada igual àquelas de cadeia ideal, independente da composição;
2. O polímero fundido é tido como incompressível e os monômeros ocupam volumes iguais;
3. As flutuações locais de composição são negligenciadas.

Na prática, nenhuma dessas hipóteses é válida, pois a conformação do polímero depende da composição, os volumes ocupados pelos monômeros não são iguais e as flutuações na composição tem influência fundamental no comportamento das fases (SCHMID, 2011).

O parâmetro de Flory-Huggins (χ) não é fixo, ele deriva das interações energéticas entre os polímeros e depende da composição da blenda, da temperatura e do tamanho das cadeias (SCHMID, 2011). Ele fornece informações a respeito da miscibilidade de uma blenda, visto que a separação de fases é favorecida para valores positivos de χ (JIMENEZ, 2007).

Um outro modelo que pode ser utilizado para calcular o parâmetro de Flory-Huggins é o de *random phase approximation* (RPA). Esse modelo, introduzido por de Gennes (1979), é uma aproximação de campo médio que negligencia contribuições de flutuações térmicas e assume a conformação da cadeia polimérica como sendo de cadeia gaussiana imperturbável (SCHWAHN, 2005). Ele relaciona flutuações de espalhamento, normalmente de espalhamento de neutrons em baixo ângulo (SANS), com alguns parâmetros inerentes às moléculas envolvidas, como fator de forma, e também de parâmetros de interação como o de Flory-Huggins, como mostra a equação 12. O fator de estrutura ($S(Q)$) é uma descrição matemática bastante útil na interpretação dos dados de SANS e fornece informações de como a radiação incidente é espalhada (SLATER; NOOLANDI, 1986). O modelo RPA apresenta-

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

se como uma boa alternativa para sistemas coloidais e que contenham proteínas (TAVARES; PRAUSNITZ, 2004), por isso, foi utilizado nessa tese.

$$\frac{1}{S(Q)} = \frac{1}{\phi V_A P_A(Q)} + \frac{1}{(1 - \phi) V_B P_B(Q)} - 2\chi_{AB} \quad (\text{equação 12})$$

Onde $S(Q)$ é o fator de estrutura em determinado comprimento de onda (Q), P_A e P_B são os fatores de forma dos polímeros A e B, ϕ é a fração volumétrica do polímero A e V_A e V_B são os volumes molares dos polímeros A e B.

O inverso do fator de estrutura em $Q=0$ pode ser relacionado com a energia livre de Gibbs por meio da equação 13, e nessa condição, o parâmetro de Flory-Huggins pode ser dado pela equação 14 (SCHWAHN, 2005).

$$S^{-1}(0) = \left(\frac{\partial^2 \Delta G_{mix}}{\partial \phi_i^2} \right) \quad (\text{equação 13})$$

$$2\chi_{AB} = \frac{1}{\phi V_A P_A(Q)} + \frac{1}{(1 - \phi) V_B P_B(Q)} \quad (\text{equação 14})$$

O fator de forma ($P(Q)$) é definido pela equação 15, portanto na condição de $Q=0$, ele será igual a 1 (HOSSAIN, K. S.; NEMOTO, 1999).

$$P(Q) = \frac{I(Q)}{I(0)} \quad (\text{equação 15})$$

Onde $I(Q)$ e $I(0)$ são os valores de intensidade de espalhamento no ângulo Q e zero, respectivamente.

Há outros modelos termodinâmicos que também podem ser utilizados em sistemas contendo macromoléculas, como o NRTL (*Non-Random, Two Liquids*), desenvolvido por Renon e Prausnitz (1968), que é aplicável a sistemas parcialmente miscíveis e o modelo UNIQUAC (*Universal Quasi Chemical*), desenvolvido por Abrams e Prausnitz (1975), que, assim como Flory-Huggins, relaciona a energia livre de Gibbs com contribuições entrópicas e entálpicas.

O modelo NRTL se baseia na energia de Gibbs molar em excesso representado pela equação 16.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

$$\frac{g^E}{RT} = \sum_{i=1}^m x_i \frac{\sum_{j=1}^m \tau_{ji} G_{ji} x_j}{\sum_{l=1}^m G_{li} x_l} \quad (\text{equação 16})$$

Onde G_{ji} e τ_{ji} são dados pelas equações 17 e 18, respectivamente:

$$G_{ji} = \exp(-\alpha_{ji} \tau_{ji}) \quad (\text{equação 17})$$

$$\tau_{ji} = \frac{A_{ji}}{T} \quad (\text{equação 18})$$

α_{ij} são os parâmetros ajustáveis que representam a não aleatoriedade da mistura ($\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$), A_{ji} são os parâmetros ajustáveis aos dados experimentais do equilíbrio ($A_{ij} \neq A_{ji}$) e m é a quantidade total de componentes da mistura.

Os parâmetros podem ser ajustados em termos do coeficiente de atividade, a partir da equação 19.

$$\ln \gamma_i = \frac{\sum_{j=1}^m \tau_{ji} G_{ji} x_j}{\sum_{l=1}^m G_{li} x_l} + \sum_{j=1}^m \frac{x_j G_{ij}}{\sum_{l=1}^m G_{lj} x_l} \left(\tau_{ij} - \frac{\sum_{r=1}^m x_r \tau_{rj} G_{rj}}{\sum_{l=1}^m G_{lj} x_l} \right) \quad (\text{equação 19})$$

O modelo UNIQUAC é aplicável a moléculas de diversos tamanhos, portanto, pode ser utilizado para polímeros (AGUIAR, 2009). Assim como o NRTL, ele se baseia na energia de Gibbs molar em excesso, a qual é determinada pela soma de uma parte combinatorial e residual, como mostrado na equação 20. A parte combinatorial expressa as contribuições entrópicas dos componentes e a parte residual expressa as contribuições entálpicas. Matematicamente, elas podem ser representadas pelas equações 21 e 22.

$$\frac{g^E}{RT} = \left(\frac{g^E}{RT} \right)_{\text{combinatorial}} + \left(\frac{g^E}{RT} \right)_{\text{residual}} \quad (\text{equação 20})$$

$$\left(\frac{g^E}{RT} \right)_{\text{combinatorial}} = \sum_i x_i \ln \frac{\phi_i}{x_i} + \frac{z}{2} \sum_i x_i q_i \ln \frac{\theta_i}{\phi_i} \quad (\text{equação 21})$$

$$\left(\frac{g^E}{RT} \right)_{\text{residual}} = - \sum_i q_i x_i \ln S_i \quad (\text{equação 22})$$

onde g^E é a energia de Gibbs molar em excesso e S_i é dado pela equação 23.

$$S_i = \sum_j \theta_j \tau_{ij} \quad (\text{equação 23})$$

em que $\tau_{ij} = e^{\left(\frac{-A_{ij}}{T}\right)}$ e A_{ij} são os parâmetros ajustáveis do modelo.

O coeficiente de atividade pode ser expresso pela equação 24 (PESSOA FILHO, 2002).

$$\ln \gamma_i = 1 + \ln \varphi_i - \frac{\varphi_i}{x_i} + \frac{z}{2} q_i \left(\ln \left(\frac{\theta_i}{\varphi_i} \right) + \frac{\varphi_i}{\theta_i} - 1 \right) + q_i \left(1 - \ln S_i - \sum_j \frac{\theta_j \tau_{ij}}{S_j} \right) \quad (\text{equação 24})$$

Para sistemas proteicos com a presença ou não de eletrólitos que apresentam separação líquido-sólido com formação de precipitados, como é o caso da blenda fibroína-alginato, uma equação simples que ajusta os dados de equilíbrio é a equação de Cohn (equação 25), que relaciona a solubilidade da proteína com a constante de *salting-out* (K_s) (COHN, 1925).

$$\ln(S) = \beta - K_s m \quad (\text{equação 25})$$

onde S é a solubilidade da proteína; K_s é a constante de solubilidade da proteína; m é a concentração do agente precipitante e β é a constante relacionada à carga líquida da proteína, para não eletrólitos, esse parâmetro está relacionado à solubilidade da proteína na ausência de agentes precipitantes.

3.6 Considerações Finais

Os estudos sobre as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio foram iniciados no Lequip em 2010 com o desenvolvimento de membranas dessas blendas que apresentaram potencial de aplicação como curativo de alta performance (DE MORAES, 2010). Nesse estudo, três blendas foram produzidas, variando a proporção volumétrica dos polímeros e verificou-se que as blendas eram parcialmente miscíveis e que apresentavam separação de

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

fase. A continuidade deste estudo foi realizada em meu mestrado (Lopes, 2016), o qual explorou 12 blendas com composições diferentes, caracterizando-as físico-quimicamente em relação à sua morfologia, cristalinidade, separação de fases e interação química. Além disso, diagramas de fase ternários foram gerados a partir de dados de equilíbrio termodinâmico.

Apesar do avanço no entendimento desse sistema, proporcionado pelos trabalhos anteriores, algumas questões ainda não estão bem consolidadas, por exemplo, a modelagem dos dados de equilíbrio termodinâmico a um modelo matemático. Devido ao grau de complexidade do sistema, essa tese de doutorado explorou variáveis como a composição mássica das blendas e a influência da composição química do alginato de sódio, proporção M/G, no mecanismo de separação de fases e no equilíbrio termodinâmico.

CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS**4.1 Materiais**

Na Tabela 1 estão listados os principais materiais utilizados para o preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

Tabela 1: Principais materiais utilizados no preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

Material	Origem	Marca
Alginato de sódio M	<i>Macrocystis pyrifera</i>	FMC Polymers
Alginato de sódio G	<i>Laminaria Hyperborea</i>	FMC Polymers
Fibroína de seda	<i>Bombyx mori</i>	Bratac (doação)
Cloreto de Cálcio P.A		Dinâmica
Álcool etílico absoluto P.A		Synth
Cloreto de sódio P.A		Dinâmica
1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)		Sigma-Aldrich
4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI)		Sigma-Aldrich

4.2 Determinação da viscosidade intrínseca e da massa molar viscosimétrica dos alginatos de sódio

A viscosidade intrínseca (η_{int}) foi determinada utilizando soluções de alginato de diferentes concentrações – 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 e 0,3 g/dL - que foram diluídas em solução de NaCl 0,1 mol/L.

Os ensaios foram feitos no Laboratório de graduação da Faculdade de Engenharia Química (Unicamp) utilizando um viscosímetro capilar do tipo Ostwald-Cannon-Fenske e um banho de recirculação termostático (Nova Ética, Brasil) a $25 \pm 0,1$ °C. O volume de solução de alginato de sódio utilizado foi igual a 8,0 mL e o tempo de escoamento foi marcado com um cronômetro digital. Para cada solução, cinco medidas de tempo foram realizadas e a média foi utilizada para o cálculo da viscosidade.

Capítulo 4: Materiais e Métodos

As viscosidades específica (η_{esp}) e relativa (η_{rel}) foram calculadas utilizando as Equações 26 a 30 (LUCAS *et al.*, 2001). Já a viscosidade intrínseca foi determinada pela extrapolação da curva η_{esp}/C versus C até zero e $\ln(\eta_{rel})/C$ versus C até zero.

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad \text{equação 26}$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{equação 27}$$

$$\eta_{esp.red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{equação 28}$$

$$\eta_{ine} = \frac{\ln \eta_{rel}}{C} \quad \text{equação 29}$$

$$\eta_{int} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{ine} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{esp.red} \quad \text{equação 30}$$

onde t é o tempo de escoamento da solução de alginato no viscosímetro (s); t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro (s); C é a concentração da solução de alginato (g/dL); η_{ine} é a viscosidade inerente (dL/g) e $\eta_{esp.red}$ é a viscosidade específica reduzida (dL/g).

A massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$) foi estimada utilizando os dados de viscosidade intrínseca. Para isso, a equação de Mark-Houwink (equação 31) foi utilizada com valores de K e α iguais a $1,228 \times 10^{-4}$ e 0,963, respectivamente (VAZ, 2012).

$$\eta_{int} = K (\overline{M}_v)^\alpha \quad \text{equação 31}$$

4.3 Determinação da composição dos alginatos de sódio

A proporção molar dos resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), as frações molares de GG, MM e GM/MG e as sequências F_{GG} , F_{MM} e $F_{GM/MG}$ foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H em água deuterada (D_2O) a 70 °C utilizando o espectrômetro Bruker 300 Mhz. As análises foram realizadas no Centro Nordeste de Aplicação e uso da RMN (CENAUREMN/UFC).

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software MestReNova 14.1.0 (Mestrelab Research S.L., Espanha) e calculados utilizando as equações 32 a 36 (GRASDALEN, 1983).

Capítulo 4: Materiais e Métodos

$$F_G = \frac{I_{5,05}}{(I_{4,67} + I_{4,45})} \quad \text{equação 32}$$

$$F_G + F_M = 1 \quad \text{equação 33}$$

$$F_{GG} = \frac{I_{4,45}}{(I_{4,67} + I_{4,45})} \quad \text{equação 34}$$

$$F_G = F_{GG} + F_{GM} \quad \text{equação 35}$$

$$F_M = F_{MM} + F_{MG} \quad \text{equação 36}$$

onde $I_{5,05}$, $I_{4,67}$ e $I_{4,45}$ são as intensidades dos picos 5,05, 4,67 e 4,45 ppm; F_G é a fração molar dos blocos G; F_M é a fração molar dos blocos M; F_{GG} , F_{MG} , F_{MM} e F_{GM} são as frações molares dos grupos GG, MG, MM e GM, respectivamente.

4.4 Preparo da solução de fibroína de seda

Para o preparo da solução de fibroína de seda foram utilizados casulos do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* doados pela Fiação Bratac (Paraná, Brasil). Inicialmente, os casulos foram cortados e lavados para retirada de impurezas. A etapa seguinte foi a retirada da sericina, também chamada de degomagem. A sericina é uma proteína hidrossolúvel que também constitui o casulo do bicho-da-seda, unindo as fibras de fibroína de seda, como uma cola (KHAMPIENG; ARAMWIT; SUPAPHOL, 2015). Esse processo foi feito da seguinte forma: 50 g de casulos foram colocados em 600 mL de solução de Na_2CO_3 1 g/L durante 30 min em banho termostático da marca Tecnal (São Paulo, Brasil) a 85°C. O processo foi repetido três vezes e, ao final, os fios de fibroína foram lavados abundantemente com água para retirar qualquer vestígio de solução. Os fios foram secos à temperatura ambiente por 24 a 48 h.

Após secagem, os fios foram moídos em moinho de facas modelo TE-651/2 da marca Tecnal (São Paulo, Brasil) utilizando peneira mesh nº 10. A etapa de moagem foi feita para facilitar a dissolução da fibroína. Os fios moídos foram dissolvidos em solução ternária de cloreto de cálcio, etanol e água ($\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:8 molar) a 85°C até completa dissolução dos fios.

A solução de fibroína de seda foi dialisada utilizando água ultrapura (MilliQ) com membrana de diálise com corte de massa molar de 3,5 kDa da marca Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). A diálise foi feita utilizando a proporção de 15 mL de água para cada mililitro de solução de

Capítulo 4: Materiais e Métodos

fibroína de seda. A cada 24 h a água foi trocada, repetindo-se o processo até completar 72 h de diálise. Ao final da diálise, a solução de fibroína de seda foi centrifugada por 15 min utilizando rotação de 2325 RCF em uma centrífuga da marca CentriBio (Brasil).

A concentração final da solução foi determinada por gravimetria, em que 1 mL da solução de fibroína de seda foi colocado em uma placa de Petri previamente pesada e a água foi evaporada em uma estufa à 60°C até que não houvesse mudança no peso da placa.

4.5 Quantificação de íons Ca^{2+} na solução de fibroína de seda

A diálise da solução de fibroína de seda tem como objetivo remover os sais (cloreto de cálcio) e álcool (etanol) presentes na solução ternária. O cálcio é um agente reticulante do alginato de sódio e, portanto, pode induzir a formação de hidrogel. Dessa forma, é importante quantificá-lo na solução de fibroína de seda após a diálise, visto que ela foi utilizada no preparo das blendas.

A quantificação de cálcio na solução de fibroína de seda foi feita por meio de espectrofotometria de absorção atômica no Laboratório de Análise de Traços da Universidade do Ceará. O objetivo foi quantificar os íons Ca^{2+} ao longo do processo de diálise. Para isso, o processo de diálise foi realizado como descrito anteriormente e amostras da solução de fibroína foram retiradas a cada 24 horas. A análise foi realizada em triplicata.

As amostras foram diluídas em solução de H_2NO_3 1% e analisadas no espectrômetro de absorção atômica modelo AA240FS da marca Varian (EUA). A curva padrão foi feita de 0 a 200 ppm utilizando padrão de cálcio mono elementar de 1000 mg/L da marca Specsol.

4.6 Preparo da solução de alginato de sódio

Dois tipos de alginatos de sódio diferentes, doados pela FMC Biopolymer, foram utilizados: um obtido de algas marinhas da espécie *Macrocystis pyrifera*, o qual será referido como alginato-M, rico em grupos manurônicos, e outro da espécie *Laminaria hiperboria*, o qual será referido como alginato-G, rico em grupos gulurônicos. As soluções de cada tipo de

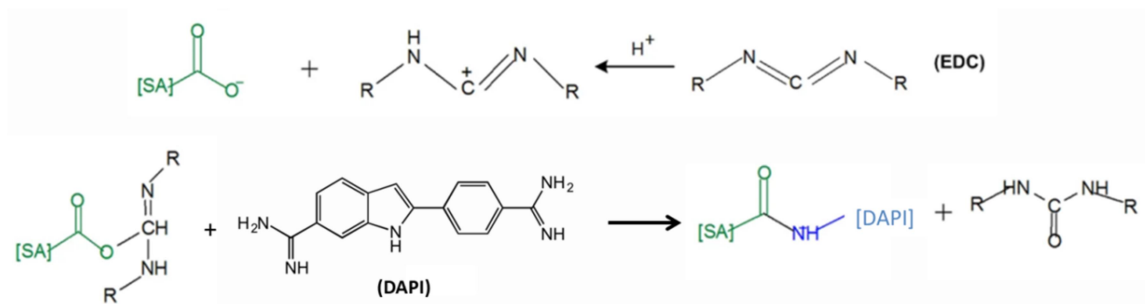
Capítulo 4: Materiais e Métodos

alginato de sódio foram feitas por dissolução em água destilada, seguida por repouso de três dias para completa solvatação do pó de alginato de sódio, e agitação no quarto dia para completa dissolução.

Para realizar a quantificação do alginato de sódio na fase líquida foi necessário marcá-lo com uma molécula fluorescente. O marcador utilizado foi o 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI), o qual tem comprimento de onda de emissão igual a 358 nm e de excitação igual a 461 nm. A marcação do alginato de sódio se faz necessária pois ele absorve no comprimento de onda igual a 280 nm, interferindo na quantificação da fibroína de seda na fase líquida.

A marcação do alginato de sódio com DAPI foi feita adicionando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) à solução de alginato de sódio sob agitação a 4 °C de forma que sua concentração fosse igual a 0,2 mg/mL. Após dissolução, DAPI foi adicionado de forma que a sua concentração fosse igual a 0,1 mg/mL. A Figura 13 mostra um esquema de como ocorre a reação química entre o alginato, EDC e DAPI. O sistema alginato-DAPI foi mantido em banho de gelo e sob agitação por 48 h. A solução resultante foi dializada por 72 h utilizando água destilada na proporção 1:100, trocada a cada 24 h.

Figura 13: Esquema de reação química para a marcação do alginato de sódio com DAPI.



Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2016).

4.7 Preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio – em solução e no estado sólido (membranas)

A fibroína de seda foi adicionada à solução de alginato de sódio lentamente e sob agitação magnética em diferentes proporções mássicas. Não houve ajuste de pH após o preparo das soluções, o qual se encontrava em

Capítulo 4: Materiais e Métodos

torno de 7,0 para ambas soluções poliméricas. As proporções mássicas que foram utilizadas tiveram como base o trabalho de mestrado (LOPES, 2016) e estão indicadas na Tabela 2. Sabe-se que na região com maior concentração de polímeros, ocorre formação de hidrogéis de fibroína de seda e alginato de sódio. Portanto, os pontos investigados no doutorado exploraram de forma mais detalhada e minuciosa a região do diagrama de fases em que a separação de fases líquido-sólido é observada. As blendas foram mantidas à temperatura ambiente, em torno de 25°C, em um banho termostático da marca Tecnal (São Paulo, Brasil).

As mesmas proporções mássicas das blendas foram utilizadas para produção das blendas no estado sólido (membranas) dos polímeros naturais, as quais foram feitas pelo método de *casting*. O método de *casting*, também chamado de evaporação de solvente, é um dos métodos mais utilizados para preparação de membranas devido à facilidade da técnica e ao baixo custo. As membranas foram colocadas em uma estufa a 25°C e retiradas após completa evaporação da água. A nomenclatura utilizada no trabalho para se referir às blendas de fibroína de seda e alginato de sódio tanto em solução quanto no estado sólido (membranas) será: $SF_xSA_yWA_z$ onde x, y e z são as frações mássicas dos componentes (em percentagem), SF é fibroína de seda, SA é alginato de sódio e WA é água.

Capítulo 4: Materiais e Métodos

Tabela 2: Composições iniciais, em fração mássica (w), das blendas de fibroína de seda (SF), alginato de sódio (SA) e água (WA) utilizadas nesse estudo.

Blenda (nomenclatura)	wSF	wSA	wWA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	0,005	0,005	0,990
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	0,010	0,005	0,985
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	0,015	0,005	0,980
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	0,005	0,010	0,985
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	0,010	0,010	0,980
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	0,015	0,010	0,975
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	0,005	0,015	0,980
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	0,010	0,015	0,975
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	0,015	0,015	0,970
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	0,005	0,020	0,975
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	0,010	0,020	0,970
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	0,005	0,025	0,970

4.8 Caracterizações das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio

Algumas das técnicas de caracterização utilizadas nessa tese estão mostradas na Tabela 3. As análises foram realizadas com o objetivo de obter informações sobre carga superficial, composição química e morfologia de fases, por exemplo. Os próximos tópicos trazem informações específicas sobre cada técnica utilizada.

Tabela 3: Técnicas de caracterização utilizadas para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

Objetivo	Material	Técnica
Tamanho hidrodinâmico de partícula e potencial zeta	Solução de SF, SA e blendas de SF/SA	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta
Ligações/interações químicas		Espectrometria de fótons excitados por raio X (XPS)
Separação líquido-líquido	Blendas de SF/SA	Microscopia óptica e de fluorescência
Morfologia/periodicidade das fases		Espalhamento de luz estático

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4.8.1 Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico

Soluções de fibroína de seda e alginato de sódio e blendas dos polímeros foram analisadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico e ao potencial zeta utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico. O equipamento utilizado foi o ZetaSizer Nanoseries, marca Malvern (Worcestershire, Inglaterra). Para analisar o diâmetro hidrodinâmico, foi utilizada cubeta de poliestireno e para medição do potencial zeta, foi utilizada célula capilar de polycarbonato com eletrodos de berílio/cobre folheados a ouro e também célula de imersão acoplada às cubetas de poliestireno.

Foram utilizadas soluções dos polímeros de concentração 1g/L a 25°C e caminho óptico de 1 cm. O potencial zeta das blendas SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈, SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈ e SF_{0,5}SA_{1,5}WA₉₈ também foi medido. Os índices de refração e absorbância utilizados para o alginato de sódio foram 1,33 e 0,001 UA e para a fibroína de seda 1,45 e 0,001 UA medidos em refratômetro (Instrutherm, Brasil) e em leitor de placas modelo Varioskan LUX (ThermoFisher Scientific, USA), respectivamente. As medidas foram feitas em triplicata.

4.8.2 Microscopia óptica e microscopia de fluorescência

A microscopia óptica foi utilizada para analisar a morfologia da mistura entre solução de fibroína de seda e alginato de sódio logo após a mistura das duas soluções. Para isso, a solução de alginato de sódio foi colocada em uma lâmina de vidro, então a solução de fibroína de seda foi adicionada à solução de alginato de sódio e misturada gentilmente com auxílio de uma espátula. Imagens foram coletadas utilizando microscópio óptico da marca Nikon (Tóquio, Japão) modelo Eclipse E200.

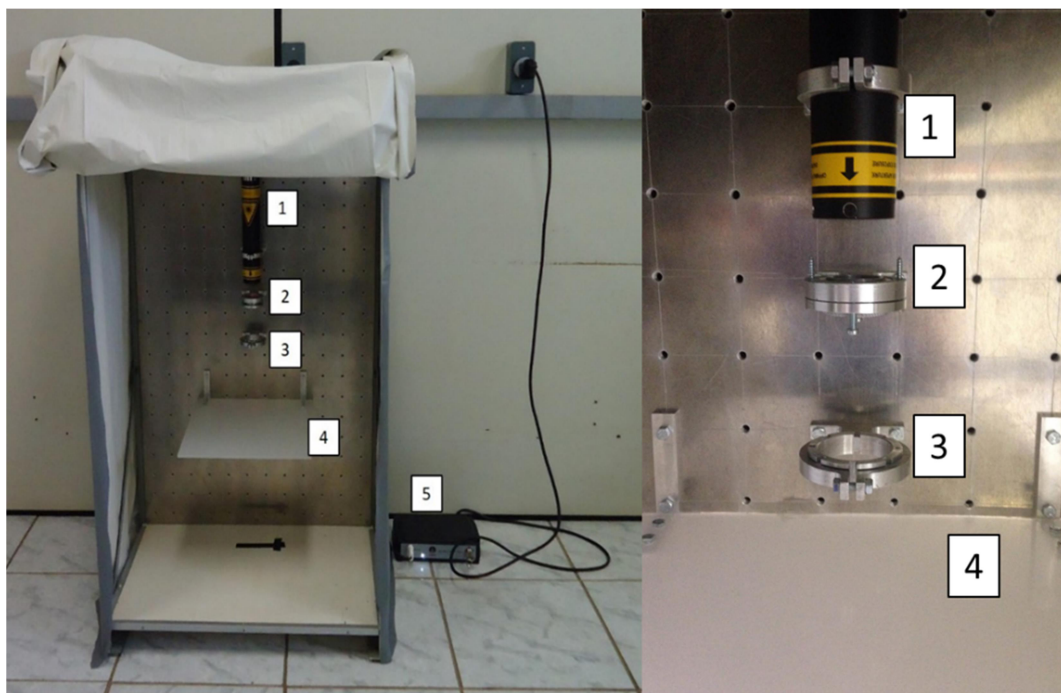
A formação de estruturas globulares foi observada durante a análise no microscópio óptico. Para investigar a composição dessas estruturas, a microscopia de fluorescência foi feita utilizando alginato de sódio marcado com DAPI. As amostras foram obtidas na Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará utilizando microscópio de fluorescência modelo LSM 710 da marca Zeiss (Alemanha).

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4.8.3 Espalhamento de luz estático

A técnica de espalhamento de luz estático foi utilizada para investigar o mecanismo de separação de fases das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio. Para isso foi utilizado um aparato (Figura 14) formado por: 1) laser de He-Ne da marca Research Electro-Optics (Colorado, Estados Unidos), modelo 30991, com comprimento de onda igual a 632,8 nm; 2) polarizador de diâmetro igual a 1000 μm da marca Edmund Optics (Nova Jersey, Estados Unidos), que tem por objetivo identificar a isotropia do sistema; 3) porta amostra feito de alumínio em formato circular de diâmetro interno de 5 cm e diâmetro externo de 6,5 cm; 4) anteparo de polimetilmetacrilato (PMMA), para projeção da imagem transmitida; 5) fonte de alimentação do laser (220 V) da marca Research Electro-Optics (Colorado, Estados Unidos).

Figura 14: Aparato para realização da técnica de espalhamento de luz. 1) Laser He-Ne; 2) Polarizador; 3) Porta amostra; 4) anteparo de PMMA; 5) fonte de alimentação do laser.



Fonte: Elaborado pela autora.

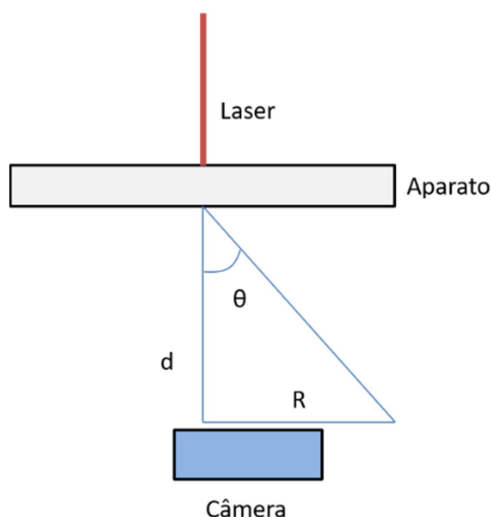
Após o preparo das blendas, elas foram transferidas para uma placa de petri de poliestireno que foi colocada no porta amostra. Imagens de espalhamento de luz foram captadas por câmera fotográfica Sony cybershot de

Capítulo 4: Materiais e Métodos

14.1 megapixels (Sony, Japão) durante 7 dias a fim de monitorar a separação de fases e determinar, utilizando as mudanças no perfil de espalhamento, o equilíbrio termodinâmico do sistema. As imagens foram tratadas no software ImageJ (National Institute of Health, Estados Unidos).

As distâncias entre os domínios das fases também foram calculadas utilizando as imagens obtidas utilizando o ângulo de espalhamento máximo, o qual foi obtido por meio de relações trigonométricas, como mostra a Figura 15, onde a distância d foi igual a 5 cm. Para calcular a distância entre os domínios das fases foram utilizadas as equações 1 e 2, mostradas no Capítulo 3.

Figura 15: Esquema para determinação do ângulo máximo de espalhamento (θ_m), o qual pode ser calculado pela equação 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8.4 Espectrometria de fótons excitados por raio X (XPS)

A espectrometria de fótons excitados, também chamada de espectrometria de elétrons para análise química (ESCA) tem por objetivo determinar a composição química das camadas superficiais de um dispositivo.

A análise de XPS foi realizada no *Laboratoire de Biomateriaux et Bioingénierie* (LBB) da *Université Laval* coordenado pelo Professor Dr. Diego Mantovani e localizado no *Centre de Recherche de l'Hôpital Saint-Fraçois d'Assie*. As condições de análise foram feitas utilizando o sistema PHI 5600-ci da marca Physical Electronics (Estados Unidos).

Capítulo 4: Materiais e Métodos

Para obter o espectro *survey*, uma fonte de alumínio padrão de raios-X foi utilizada (Al K α , 1486,6 eV) com carga de neutralização e os espectros de alta resolução foram obtidos usando um ânodo padrão de magnésio (Mg K α 1253,6 eV) sem compensação de cargas. A detecção foi feita utilizando um ângulo de 45° em relação a superfície normal e a área analisada foi de 0,005 cm². Foram analisadas cinco amostras: membranas de fibroína de seda e alginato-M e alginato-G isolados e as membranas de blendas com composição inicial de SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈, SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈ e SF_{0,5}SA_{1,5}WA₉₈. Os dados foram analisados utilizando o software CasaXPS.

4.9 Quantificação dos componentes em cada fase

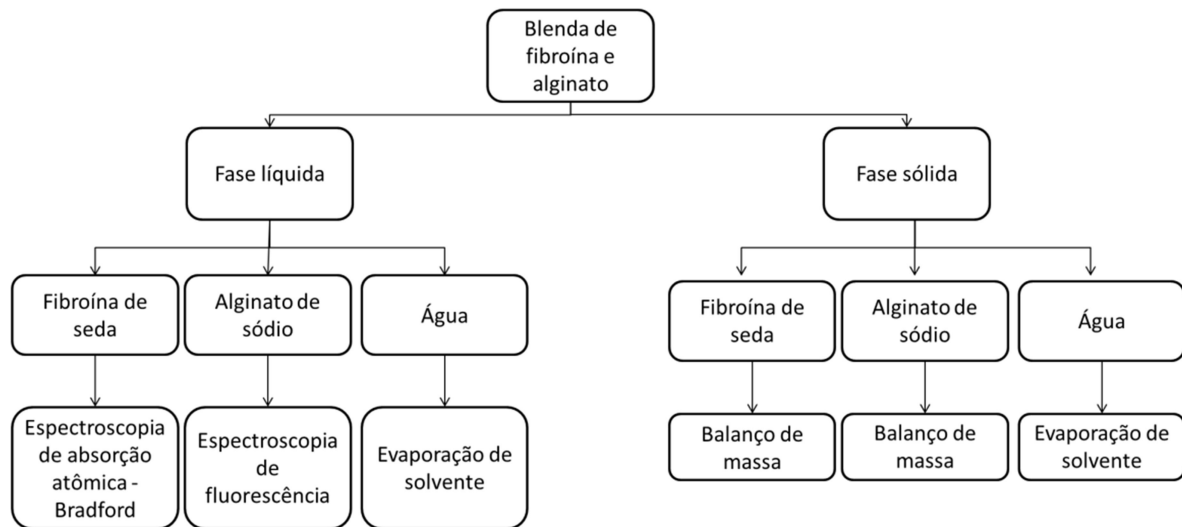
Após a separação de fases, as blendas foram centrifugadas e os componentes de cada fase foram quantificados como mostrado no fluxograma da

Figura 16. Na fase líquida, a fibroína de seda e o alginato de sódio foram quantificados utilizando a técnica de espectroscopia de absorção e fluorescência, respectivamente. A espectroscopia de fluorescência é um processo de fotoluminescência em que ocorre a excitação dos átomos ou moléculas por absorção da radiação eletromagnética (SKOOG, 2005). Uma das principais características dessa técnica é a sensibilidade, a qual é até três vezes maior do que a espectroscopia de absorção.

A fibroína de seda foi quantificada utilizando o método de Bradford de quantificação de proteínas. Esse método foi escolhido pois não sofre interferência de polissacarídeos. A curva padrão foi feita utilizando solução de fibroína de seda ao invés de albumina de soro bovino (BSA) para obter resultados mais confiáveis. A análise foi feita utilizando placas de 96 poços, em que 10 μ L da amostra foram misturados com 190 μ L de reagente de Bradford (Scienco, Brasil). Após 30 minutos, a placa foi lida em um Leitor de Placas modelo Varioskan LUX (ThermoFisher Scientific, USA), o qual também foi utilizado para realizar as medidas de fluorescência do alginato de sódio.

Capítulo 4: Materiais e Métodos

Figura 16: Fluxograma mostrando como foi feita a quantificação de cada componente na fase líquida e sólida.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na fase sólida, a fibroína de seda e o alginato de sódio foram quantificados por balanço de massa utilizando a equação 37.

$$m_i^{FS} = m_i^T - m_i^{FL} \quad (\text{equação 37})$$

Onde m_i^{FS} é a massa do componente na fase sólida, em gramas;

m_i^T é a massa total do componente na blenda, em gramas;

m_i^{FL} é a massa do componente na fase líquida, em gramas.

4.10 Modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio

A partir da quantificação dos componentes em cada fase, as frações mássica e volumétrica foram calculadas. Para o cálculo dos parâmetros de Flory-Huggins, a equação 11 (Capítulo 3: Revisão Bibliográfica) foi utilizada. Para cada componente, em cada fase, ela pode ser escrita conforme mostrado nas equações 38, 39 e 40, obtendo-se um sistema de equações lineares. Este sistema é facilmente resolvido e os valores dos parâmetros de Flory-Huggins da fibroína de seda-alginato de sódio, alginato de sódio-água e fibroína de seda-água - χ_{SASF} , χ_{SAWA} e χ_{SFWA} , respectivamente - podem ser encontrados.

Capítulo 4: Materiais e Métodos

$$\ln a_{SF} = \ln \varphi_{SF} + (1 - \varphi_{SF}) - \left(\frac{V_{SF}}{V_{SA}}\right) \varphi_{SA} - \left(\frac{V_{SF}}{V_{WA}}\right) \varphi_{WA} \quad (\text{equação 38})$$

$$+ \left((\chi_{SASF} \varphi_{SA} + \chi_{SFWA} \varphi_{WA}) * (\varphi_{SA} + \varphi_{WA}) \right) \\ - \chi_{SAWA} \left(\frac{V_{SF}}{V_{SA}}\right) \varphi_{SA} \varphi_{WA}$$

$$\ln a_{SA} = \ln \varphi_{SA} + (1 - \varphi_{SA}) - \left(\frac{V_{SA}}{V_{SF}}\right) \varphi_{SF} - \left(\frac{V_{SA}}{V_{WA}}\right) \varphi_{WA} \quad (\text{equação 39})$$

$$+ \left(\left(\chi_{SASF} \varphi_{SF} \frac{V_{SA}}{V_{SF}} + \chi_{SAWA} \varphi_{WA} \right) * (\varphi_{SF} + \varphi_{WA}) \right) \\ - \chi_{SFWA} \left(\frac{V_{SA}}{V_{SF}}\right) \varphi_{SF} \varphi_{WA}$$

$$\ln a_{WA} = \ln \varphi_{WA} + (1 - \varphi_{WA}) - \left(\frac{V_{WA}}{V_{SF}}\right) \varphi_{SF} - \left(\frac{V_{WA}}{V_{SA}}\right) \varphi_{SA} \quad (\text{equação 40})$$

$$+ \left(\left(\chi_{SFWA} \varphi_{SF} \frac{V_{WA}}{V_{SF}} + \chi_{SAWA} \varphi_{SA} \right) * (\varphi_{SF} + \varphi_{SA}) \right) \\ - \chi_{SFSA} \left(\frac{V_{WA}}{V_{SF}}\right) \varphi_{SF} \varphi_{SA}$$

A fração volumétrica foi calculada a partir da fração mássica, utilizando a equação 41. Os valores de densidade e volume específico para o alginato de sódio (LEE *et al.*, 2000), a fibroína de seda (MINOURA; TSUKADA; NAGURA, 1990) e água estão mostrados na Tabela 4.

$$\varphi_i = \frac{w_i/p_i}{\sum w_i/p_i} \quad (\text{equação 41})$$

onde w_i e p_i são a fração mássica e densidade de cada componente, respectivamente.

Tabela 4: Valores de densidade e volume específico do alginato de sódio, fibroína de seda e água utilizados no cálculo dos parâmetros de Flory-Huggins.

	Densidade (g/cm ³)	Volume específico (cm ³ /g)
Água	1,00	1,00
Alginato de sódio	0,875	1,14
Fibroína de seda	1,32	0,757

Capítulo 4: Materiais e Métodos

O modelo RPA também foi utilizado para calcular o parâmetro de Flory-Huggins, utilizando-se a equação 14. A partir dos valores obtidos, novos valores de fração mássica foram calculados utilizando o modelo de Flory-Huggins clássico.

A modelagem dos dados experimentais para os modelos NRTL e UNIQUAC foi feita utilizando o software TME-LLE versão 2.0 escrito em linguagem Fortran e desenvolvido por Stragevitch e D'Ávila (1997). O software foi desenvolvido para estimar os parâmetros de interação binária para modelos de energia livre de Gibbs com qualquer número de componentes e diferentes temperaturas por meio da minimização da função objetivo (FO) mostrada na equação 42 utilizando o método simplex modificado. Ele foi escolhido pela facilidade de utilização e versatilidade do programa.

$$FO = \sum_j^N \sum_i^P (x_{i,N}^{FL,exp} - x_{i,N}^{FL,cal})^2 + (x_{i,N}^{FS,exp} - x_{i,N}^{FS,cal})^2 \quad (\text{equação 42})$$

Os parâmetros de estrutura r e q , utilizados no modelo UNIQUAC foram estimados utilizando o método de contribuição de subgrupos, conforme equação 43 e 44 e estão mostrados na Tabela 5. Os valores de parâmetro (R_k e Q_k) foram retirados da literatura (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007). Isso foi necessário, pois, não há na literatura informações sobre os parâmetros r e q para alginato de sódio e fibroína de seda. Para a fibroína, os subgrupos considerados foram os presentes na estrutura química da alanina, serina e glicina, os quais são os principais aminoácidos presentes na estrutura da fibroína de seda. Já para o alginato de sódio, foram considerados os subgrupos dos ácido α -L-gulurônico e β -D-manurônico.

$$r_i = \sum_k \vartheta_k^i R_k \quad (\text{equação 43})$$

$$q_i = \sum_k \vartheta_k^i Q_k \quad (\text{equação 44})$$

Capítulo 4: Materiais e Métodos

Onde o ν_k^i é o número de subgrupos do tipo k em uma molécula da espécie i, R_k e Q_k são, respectivamente, o volume relativo e a área relativa de cada subgrupo presente em cada molécula.

O desvio médio quadrático (DMQ) dado pela equação 45 foi utilizado para avaliar a correlação entre os dados experimentais e os dados teóricos obtidos pelos modelos termodinâmicos.

$$DMQ = \sqrt{\frac{\sum_1^N \sum_{i=1}^P \left\{ \left(w_{i,n}^{FL,exp} - w_{i,n}^{FL,cal} \right)^2 + \left(w_{i,n}^{FS,exp} - w_{i,n}^{FS,cal} \right)^2 \right\}}{2NP}} \quad (\text{equação 45})$$

Tabela 5: Valores de parâmetro de área (r) e volume (q) calculados a partir das equações 39 e 40 para a fibroína de seda, alginato de sódio e água.

substância	r	Q
Alginato de sódio	6,0192	5,301
Fibroína de seda	10,1413	9,415
Água	0,9200	1,400

Onde N é o número de linhas de amarração de cada sistema, P é o número de componentes e os sobreescritos exp e cal se referem aos valores de fração mássica experimental e calculada, respectivamente.

4.11 Solubilidade da fibroína de seda em alginato de sódio – Equação de Cohn

O estudo de solubilidade da fibroína de seda nas diferentes soluções de alginato de sódio foi feito utilizando amostras com volume constante das soluções dos polímeros com diferentes concentrações das soluções de alginato de sódio. Amostras de 5 mL foram preparadas, compostas por 4,5 mL de solução de alginato de sódio e 0,5 mL de solução de fibroína de seda de concentração 2%. A concentração das soluções de alginato de sódio variou

Capítulo 4: Materiais e Métodos

entre 0,4% (m/m) e 1,4% (m/m). As blendas foram mantidas em banho termostático a 25 °C por 8 dias. As fases foram separadas por centrifugação e os polímeros foram quantificados na fase líquida como já descrito anteriormente. Após a quantificação, os dados foram adequados à Equação de Cohn (equação 21) e as constantes β de solubilidade (K_s) foram determinadas.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

CAPÍTULO 5: Resultados e Discussão

5.1 Caracterização físico-química dos alginatos de sódio utilizados

Os resultados de viscosidade intrínseca dos alginatos de sódio foram obtidos experimentalmente de acordo com a metodologia descrita na seção 4.2. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para viscosidade e massa molar viscosimétrica, calculada utilizando a equação de Mark-Houwink.

Tabela 6: Valores obtidos de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica para os diferentes tipos de alginato de sódio utilizados nesse trabalho.

	Alginato-M	Alginato-G
$\eta_{int}(\frac{dL}{g})$	4,47	8,21
$\overline{M}_v (Da)$	$5,40 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$

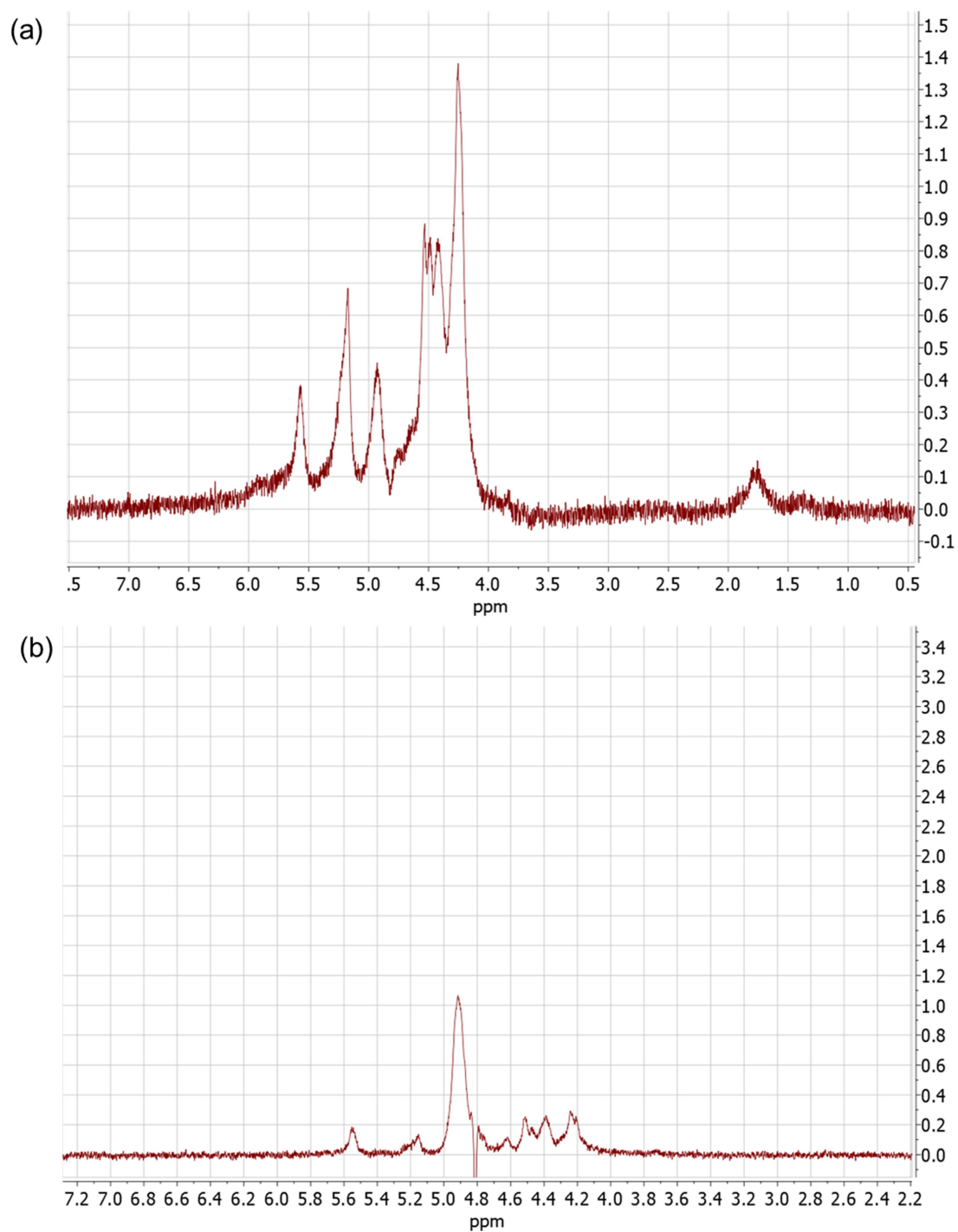
Os valores de viscosidade para os dois tipos de alginato são bastante diferentes. Essa característica pode ser notada empiricamente ao manipular as soluções de alginato de sódio.

Os espectros de RMN de hidrogênio (1H -RMN) para os dois tipos de alginato utilizados estão mostrados na Figura 17. Os espectros apresentaram sinais característicos entre 5,05 e 4,55 ppm, referentes ao hidrogênio ligado aos blocos G e M, respectivamente (GRASDALEN, 1983; PARCHEN, 2001). As frações dos blocos M e G e sua proporção para os alginatos estudados estão mostrados na Tabela 7.

Os espectros dos alginatos apresentaram deslocamentos químicos próximos de 5,3 ppm, os quais podem ser atribuídos ao hidrogênio da extremidade redutora (PARCHEN, 2001) que encontra-se em valores mais altos quando comparados aos hidrogênios da cadeia interna. A presença desse sinal sugere alginatos com massa molar mais baixa (GRASDALEN, 1983).

Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 17: Espectro de RMN de hidrogênio (^1H -RMN) para alginato-M (a) e alginato-G (b) utilizando D_2O como solvente a 70°C . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.



Capítulo 5: Resultados e Discussão

Tabela 7: Proporção entre blocos M e G, fração molar dos blocos M (F_M), blocos G (F_G), blocos GG (F_{GG}), blocos MM (F_{MM}) e blocos MG/GM ($F_{MG,GM}$) do alginato-M e alginato-G.

Alginato	M/G	F_M	F_G	F_{MM}	F_{GG}	$F_{MG,GM}$
Alginato-M	2,03	0,67	0,33	0	0,33	0,67
Alginato-G	0,43	0,30	0,70	0,14	0,54	0,16

A razão entre blocos M e G reportada na literatura para alginatos de sódio extraídos de algas marinhas marrons encontra-se entre 0,4 e 1,94, sendo maior nos alginatos de sódio provenientes de algas da espécie *Macrocystis pyrifera* (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997; SARTORI *et al.*, 1997; VAZ, 2012). A quantidade de blocos G e M presentes na cadeia polimérica está diretamente relacionada à sua configuração e, conseqüentemente, à sua interação com outros polímeros e íons. Conforme apresentado na Tabela 6, o alginato-M, extraído de algas marinhas da espécie *Macrocystis pyrifera*, possui maior proporção de grupos manurônicos (M) na cadeia, os quais se encontram predominantemente alternados (MG/GM), enquanto o alginato-G, extraído de algas marinhas da espécie *Laminaria hyperborea*, apresenta maior proporção de grupos gulurônicos (G), predominantemente ligados entre si (GG).

5.2 Quantificação de cálcio na solução de fibroína de seda

A concentração de íons cálcio ao longo do processo de diálise está mostrada na Figura 18. É possível notar uma redução brusca na concentração de cálcio na solução inicial de fibroína de seda após o primeiro dia de diálise, ao final do processo a concentração de Ca^{2+} foi igual a $7,36 \times 10^{-4}$ g/mL. A concentração dentro e fora da membrana de diálise foi muito próxima, indicando que o equilíbrio foi atingido em todos os dias. É importante ressaltar que os dados apresentados na Figura 18 são resultados obtidos após a troca de água de diálise a cada 24 horas, conforme o procedimento apresentado na sessão de materiais e métodos.

Durante o processo de diálise da fibroína de seda é comum observar a formação de precipitado branco, indicando uma possível transição de conformação da fibroína de seda de α -hélice para folha- β (RAMÍREZ, 2016), conforme indica o trabalho conduzido por Li *et al.* (2001) que analisou esses

Capítulo 5: Resultados e Discussão

precipitados por espectroscopia Raman, verificando a presença predominante de folha- β . Esse fenômeno pode estar ligado à queda brusca na concentração do cloreto de cálcio. Durante o processo de dissolução das fibras de fibroína de seda, o íon Ca^{2+} forma um complexo quelante estável entre os grupos hidroxil presentes nas cadeias da serina e tirosina e também se liga aos grupos carboxílicos, quebrando ligações de hidrogênio e de van der Waals entre os peptídeos (SHEN *et al.*, 2018). Dessa forma, a remoção dos íons por meio da diálise provoca uma mudança de arranjo molecular e, conseqüentemente, de conformação da fibroína de seda.

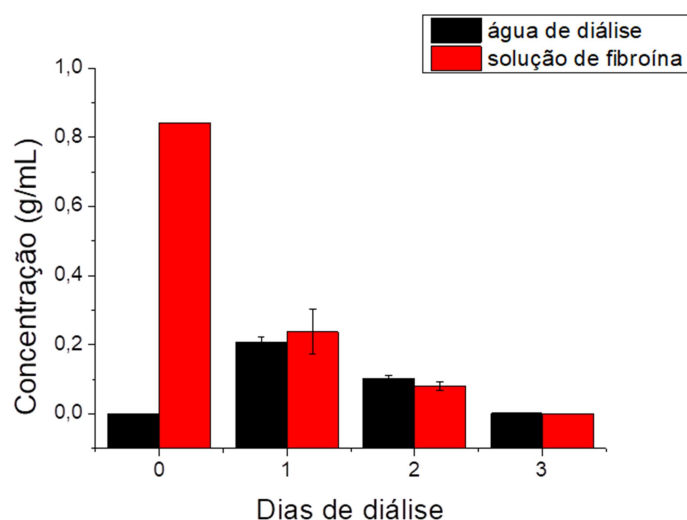
Um estudo desenvolvido por Yang, Kwak e Lee (2013) avaliou os efeitos do lítio residual em filmes de fibroína de seda. O brometo de lítio é um dos sais utilizados para dissolução dos fios de fibroína de seda. Os autores avaliaram a concentração do sal medindo a condutividade da solução dialisada em diferentes tempos e observaram que, assim como no sistema usando CaCl_2 , há uma queda brusca na concentração do sal nas primeiras 10 h de diálise. Os autores também observaram uma mudança na conformação da fibroína de seda nos filmes que foram preparados com soluções de diálise em diferentes tempos. Para os filmes preparados com solução de fibroína de seda com 8 h de diálise, a estrutura secundária da fibroína se encontrava em maior quantidade na conformação enovelamento aleatório. No entanto, após 24 h de diálise, a conformação folha- β era predominante, indicando que a remoção do lítio induz a transição de cadeia da fibroína de seda.

Além das mudanças provocadas na conformação da fibroína de seda, íons cálcio são utilizados como agente reticulante do alginato de sódio (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997). Ao entrar em contato com esse íon, as cadeias de alginato de sódio mudam sua conformação de linear para caixa-de-ovos (Figura 6), estruturas auto-organizáveis que são responsáveis pela formação rápida de hidrogéis. Por isso, é importante que a sua concentração no sistema estudado seja baixa, para evitar interferências na conformação e interação entre a fibroína de seda e o alginato de sódio. O grupo gulurônico (G) tem maior facilidade de formar essas estruturas, então, é esperado que alginatos com maior proporção desse grupo na cadeia, como o alginato-G, sejam mais sensíveis à presença de cálcio. Os resultados

Capítulo 5: Resultados e Discussão

apresentados na Figura 18, trazem evidências da importância desse estudo, principalmente para as membranas das blendas, pois a remoção do solvente pode causar um aumento da concentração local de íons cálcio e, conseqüentemente, mudanças na conformação da cadeia desse polímero.

Figura 18: Concentração de íons cálcio ao longo dos dias de diálise nas soluções de fibroína de seda e na água utilizada na diálise.



5.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os valores de potencial zeta e tamanho de partícula para as soluções de fibroína de seda, alginato-M e alginato-G estão mostrados na Tabela 8. O pH das soluções de fibroína e alginato após o preparo foi próximo ao neutro, assim, a fibroína encontrava-se acima do seu ponto isoelétrico (pI 4,2) (WENK; MERKLE; MEINEL, 2011) e o alginato de sódio acima do seu pKa o que justifica os valores de potencial zeta encontrados. Nessa condição, o alginato de sódio se encontra com os grupos carboxílicos desprotonados, por isso, sua carga é negativa. A média do potencial zeta do alginato-G é ligeiramente mais negativa, o que pode sugerir que há mais grupos carboxílicos desprotonados em sua estrutura do que no alginato-M.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico dos alginatos de sódio utilizados é similar e ambas as soluções apresentam polidispersidade de média a alta ($PdI > 0,5$), o que indica a presença de partículas de diversos tamanhos. As soluções de alginato de sódio apresentam valores de diâmetro significativamente superiores aos da fibroína de seda, o que pode ser

Capítulo 5: Resultados e Discussão

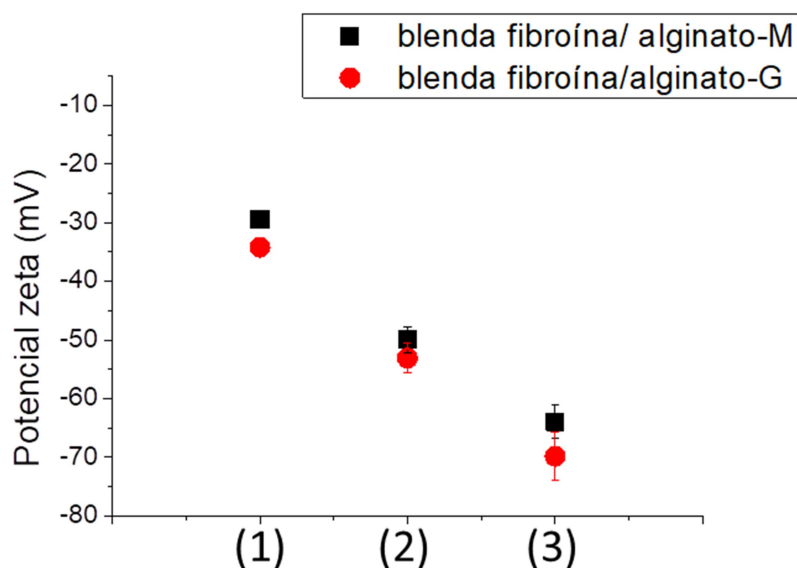
justificado pela natureza dos polímeros. O alginato de sódio é um polímero hidrofílico e, por isso, em solução aquosa tende a permanecer em conformação linear. Já a fibroína de seda apesar de suas regiões hidrofílicas, tem a maioria dos seus resíduos (~79%) hidrofóbicos. Dessa forma, em solução aquosa, a proteína tende a se organizar em pseudo-micelas, reduzindo o diâmetro hidrodinâmico (KIM *et al.*, 2005b; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

Tabela 8: Valores de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico de partícula e índice de polidispersidade para as soluções dos polímeros.

Amostra	Potencial zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl
Alginato-M	$-57,9 \pm 0,4$	$1390 \pm 312,5$	$0,923 \pm 0,110$
Alginato-G	$-61,8 \pm 6,0$	$1338 \pm 335,9$	$0,552 \pm 0,101$
Fibroína de seda	$-12,7 \pm 0,3$	$304,4 \pm 4,3$	$0,323 \pm 0,007$

Os valores de potencial zeta para as blendas $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$, $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$ e $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$ estão mostrados na Figura 19. A medição do diâmetro hidrodinâmico não foi possível, pois os valores medidos foram superiores ao limite medido pelo equipamento.

Figura 19: Valores de potencial zeta (mV) das blendas de fibroína de seda (SF) e alginato-M e alginato-G $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$ (1), $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$ (2) e $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$ (3)



Capítulo 5: Resultados e Discussão

É possível observar que diferentes valores foram obtidos ao variar a proporção entre as soluções de alginato de sódio e fibroína de seda, sendo que não houve diferenças significativas entre os tipos de alginato de sódio utilizados. Apesar das soluções dos dois polímeros isoladamente apresentarem valores de potencial zeta negativo, é possível observar que ao aumentar a quantidade de fibroína de seda, o valor do potencial zeta da blenda se torna mais positivo. Isso indica que há uma compensação de cargas entre os polímeros devido às interações químicas que podem estar ocorrendo entre os grupos carboxila do alginato de sódio e aminas da fibroína de seda.

5.4 Aspecto físico das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio

A solução de fibroína de seda, após a diálise, apresenta instabilidade, a qual pode ser percebida pela formação espontânea de gel e também pela formação de fibrilas ao aplicar agitação média ou alta. Por isso, no preparo das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio é necessário ponderar a agitação magnética utilizada para que se obtenha uma boa homogeneização sem a formação de fibrilas de seda.

Uma limitação do sistema fibroína-alginato é a utilização da técnica de ponto de névoa para determinação da curva binodal, visto que observa-se turbidez ao adicionar pequenas quantidades da solução de fibroína de seda à solução de alginato de sódio sugerindo que há separação de fases líquido-líquido com formação imediata de partículas (BRADA, 2019).

Após atingir o equilíbrio de fases, observou-se a formação de uma fase líquida transparente, que se assemelha à solução de alginato de sódio, e uma fase sólida esbranquiçada que se assemelha aos hidrogéis de fibroína de seda formados pela transição da sua cadeia de α -hélice para folha- β (MATSUMOTO *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2011) como mostrado na Figura 20. Apesar das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio encontrarem-se em uma região de potencial zeta teoricamente estável ($\zeta < -30$) (DERJAGUIN AND LANDAU, 1941), a proteína precipita formando a fase sólida. Isso pode acontecer tanto pelo aumento da pressão osmótica quanto pela adição de um polímero hidrofílico (SOHN; STREY; GIDO, 2004). O alginato de sódio age como um

Capítulo 5: Resultados e Discussão

agente precipitante, favorecendo as interações fibroína-fibroína e a formação de folha- β .

Figura 20: Blenda de fibroína de seda e alginato de sódio ($SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$) após a separação de fases e formação de fase líquida (transparente) e sólida (esbranquiçada).

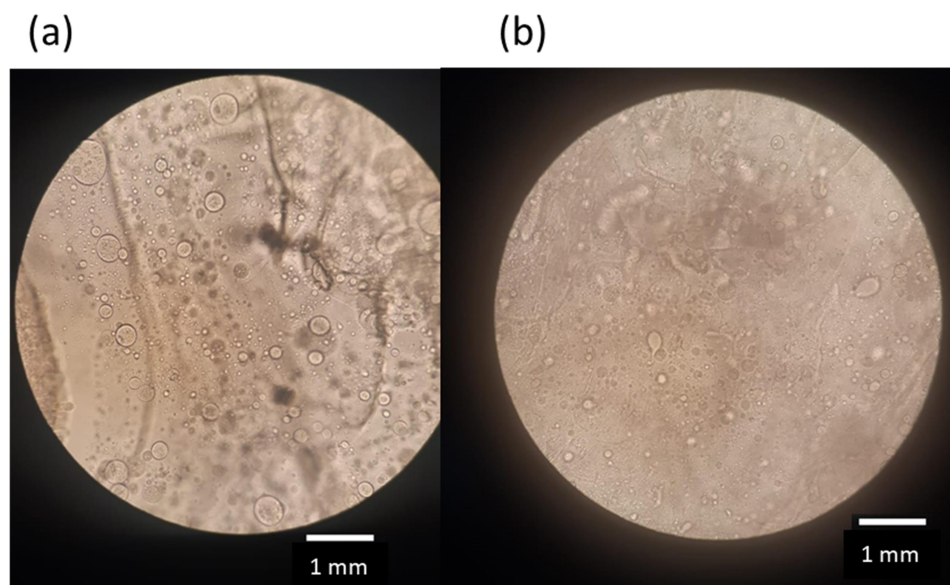


5.5 Microscopia óptica e de fluorescência

Na Figura 21 observa-se a imagem de microscopia óptica obtida logo após a mistura das soluções de alginato-M e fibroína de seda. Foi observada separação de fases imediata entre as soluções, com a formação de estruturas similares à micela, com diâmetro médio de $0,247 \pm 0,120$ mm. O mesmo foi observado para as blendas preparadas com alginato-G. Possivelmente, a turbidez observada ao preparar as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio deve-se à formação dessas estruturas.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 21: Imagem de microscopia óptica obtida imediatamente após o preparo da blenda ($\text{SF}_{0,5}\text{SA}_{0,5}\text{WA}_{98}$) com alginato-M (a) e alginato-G (b). Aumento de 40x.



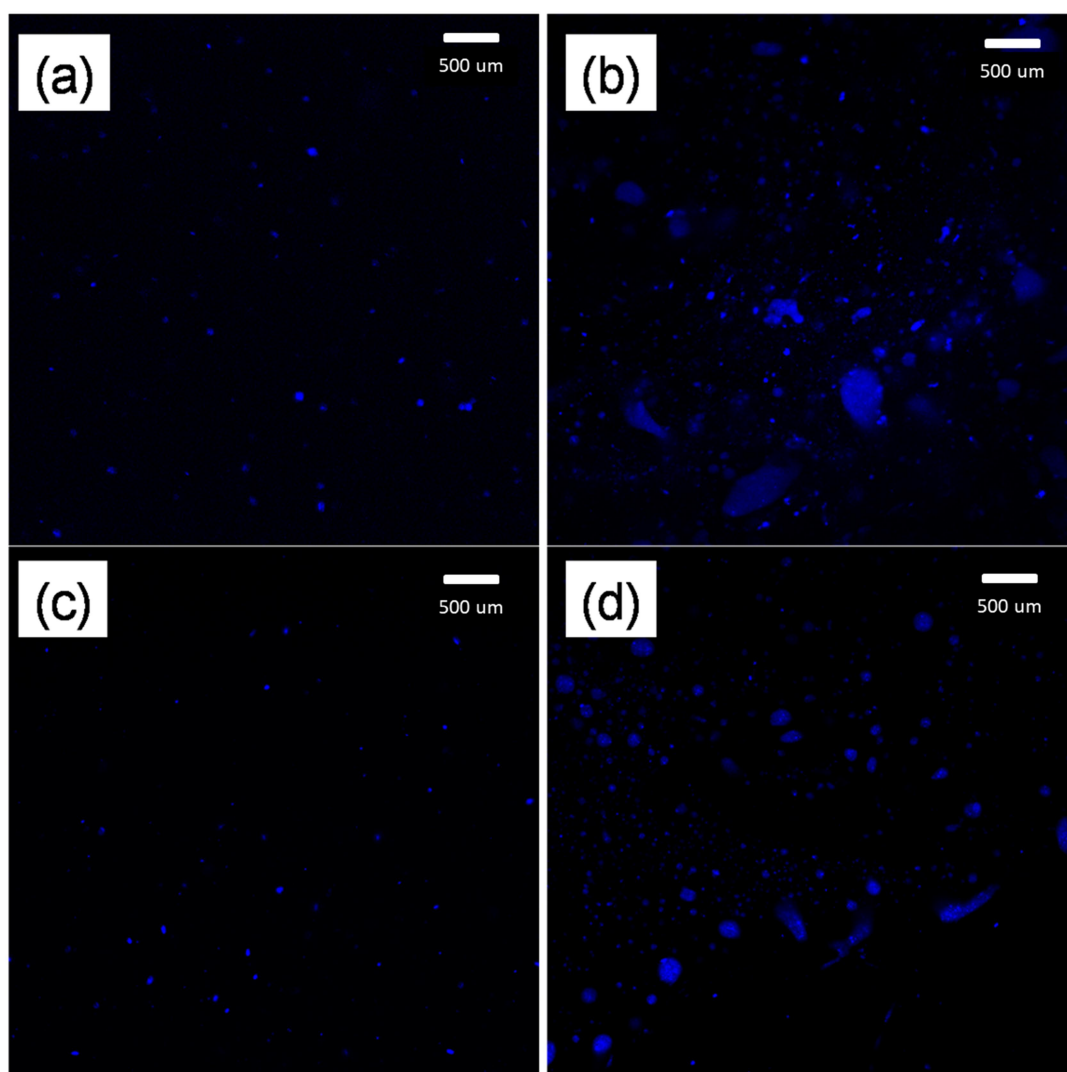
A microscopia de fluorescência foi realizada a fim de verificar a composição dessas estruturas. Os alginato-M e alginato-G foram marcados com DAPI como descrito anteriormente e a solução de fibroína de seda foi adicionada a seguir. As imagens obtidas estão mostradas na Figura 22. É possível observar as partículas de alginato de sódio marcadas com DAPI antes da adição de fibroína por apresentarem fluorescência homogênea. Após a adição de fibroína, as mesmas “pseudo-micelas” observadas no microscópio óptico foram detectadas. É possível observar que elas contêm alginato de sódio mas são heterogêneas, indicando a presença de fibroína de seda. É possível observar partículas de alginato de sódio fora das “pseudo-micelas”, indicando que parte do polímero se mantém na segunda fase.

Estruturas semelhantes a essa são observadas nas membranas de fibroína de seda e alginato de sódio (DE MORAES *et al.*, 2014; LOPES; MORAES; BEPPU, 2018). Em estudo conduzido por de Moraes e colaboradores (2014), verificou-se que as estruturas observadas eram formadas por ambos polímeros e que após a formação da membrana, é possível extrair a fibroína de seda e formar poros, conferindo uma microestrutura bastante interessante para esse material. Então, é possível que

Capítulo 5: Resultados e Discussão

os glóbulos observados nas membranas sejam formados ainda em solução. A formação de “pseudo-micelas” também foi verificada em outros sistemas de polissacarídeo e proteínas como alginato-caseína e alginato-proteína de soja (ANTONOV; MOLDENAERS, 2011; MESSION *et al.*, 2012).

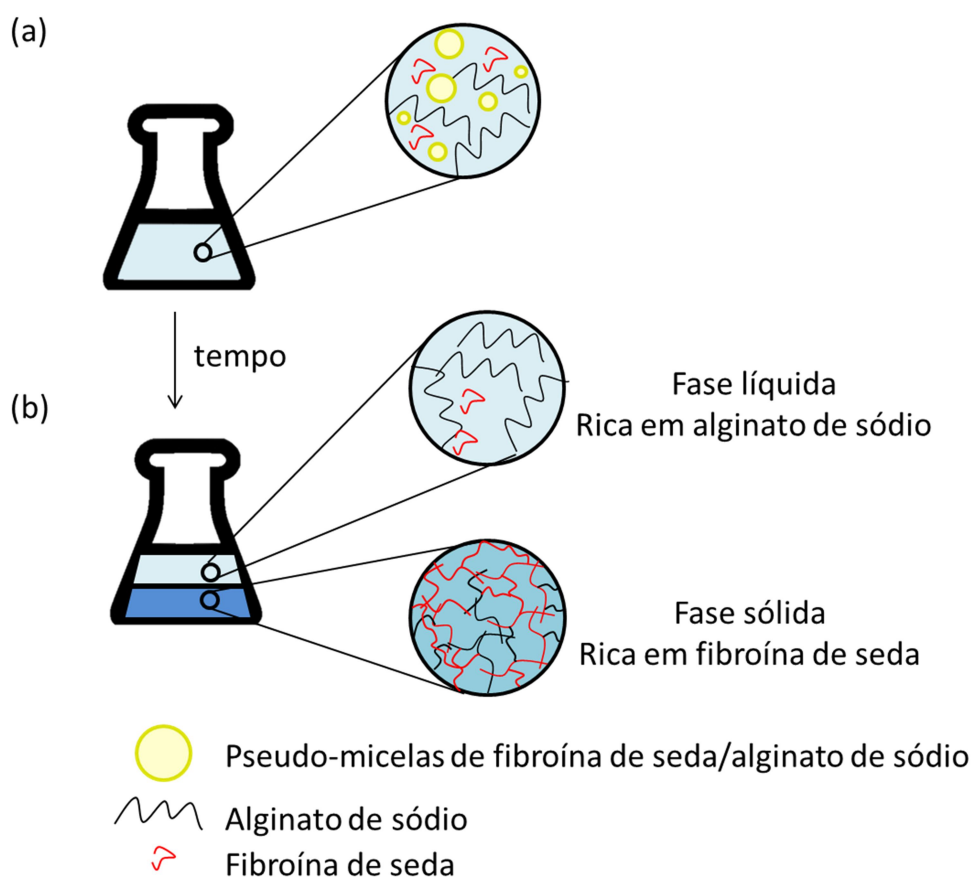
Figura 22: Imagens obtidas em microscópio de fluorescência das soluções de alginato-M (a), alginato-G (c), blenda ($SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{98}$) de fibroína de seda e alginato-M (b) e blenda de fibroína de seda e alginato-G (d).



A separação de fases ocorre imediatamente após o contato da fibroína de seda com a solução de alginato de sódio. É possível que as pseudo-micelas observadas na microscopia óptica e de fluorescência interajam e coalesçam com o tempo, aprisionando moléculas de água e formando a fase sólida, que se assemelha a um hidrogel (Figura 23).

Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 23: Esquema ilustrando a separação de fases que ocorre nas blends de fibroína e alginato de sódio. Após o preparo da blenda (a), há formação de pseudo-micelas que com o tempo coalescem e formam um hidrogel (fase sólida) (b). Ambas as fases são ricas em água (solvente) que está representado pelo fundo azul.



Fonte: Adaptado de Lopes, de Moraes e Beppu (2020)

5.6 Espectrometria de fótons excitados por raio X (XPS)

A análise de XPS foi utilizada para analisar os grupos químicos que estão envolvidos na formação das membranas das blends de fibroína de seda e alginato de sódio. As curvas de alta resolução do carbono para a fibroína de seda, alginato-M e alginato-G estão mostradas na Figura 24. Todos os componentes apresentam predominância de ligações C-C (285 eV) (TAKETA *et al.*, 2020), o que é esperado, visto que nos polímeros essa é a interação mais presente.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

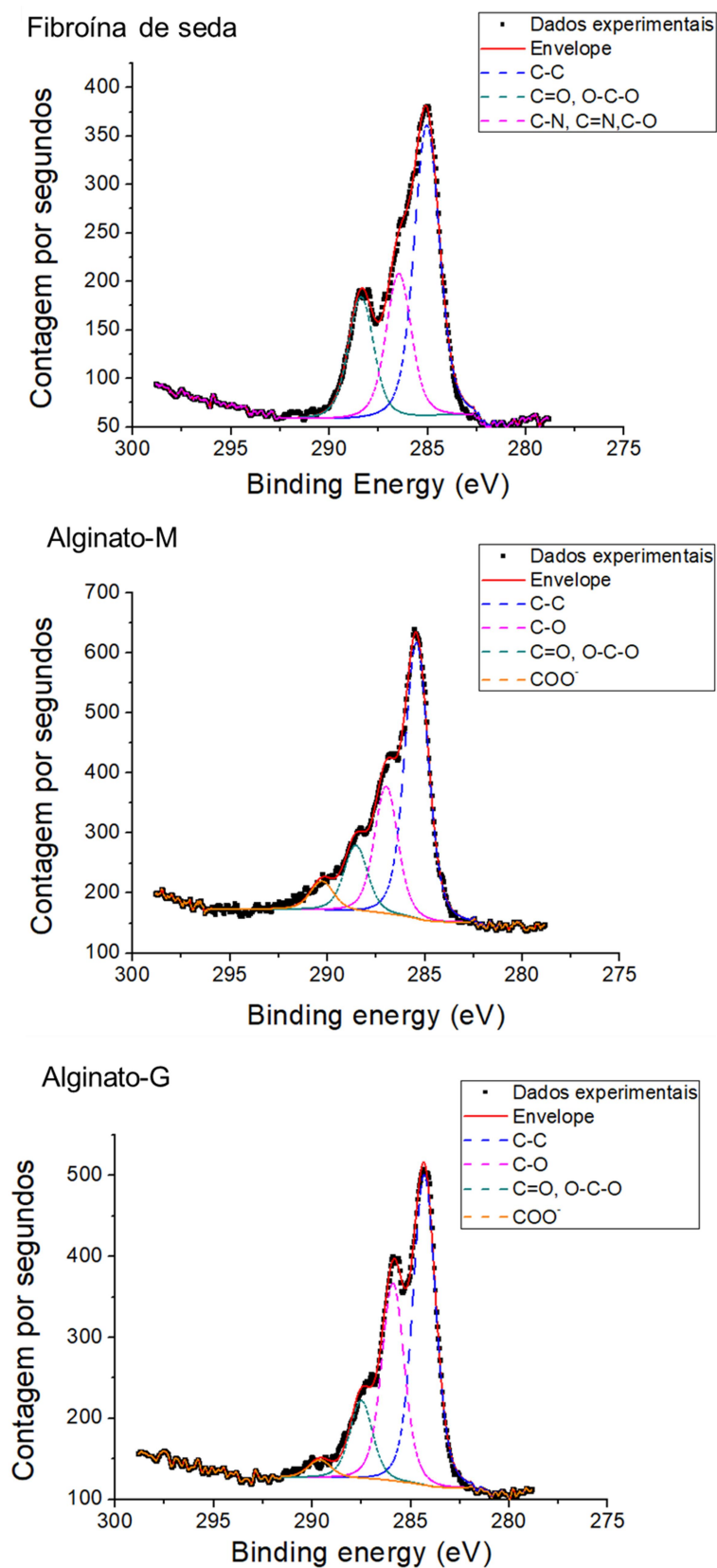
Para a membrana de fibroína de seda, o percentual das ligações C-C corresponde a 52,3% das ligações de carbono. Outros dois picos foram identificados, o primeiro com valor de 286,5 eV, correspondente a ligação C-O e o segundo com 288,4 eV, correspondente a ligação C-N. Eles correspondem a 25,9% e 21,8% das ligações de carbono, respectivamente.

Já para as membranas de alginato-M e alginato-G, o percentual das ligações C-C correspondem, respectivamente, a 55,6% e 51,5%. Foram identificados outros três picos correspondentes a ligação C=O com valores de 288,1 eV (alginato-M) e 288,3 eV (alginato-G), ligação C-O com valores de energia de ligação de 286,5 eV (alginato-M) e 286,7 eV (alginato-G) e ligação O-C=O com valores de energia de ligação de 289,8 eV (alginato-M) e 290,4 eV (alginato-G) (TAKETA, 2017).

A principal diferença entre os dois alginatos é o percentual de ligações C=O e O-C=O. Na membrana de alginato-M, a ligação carbonila corresponde a 25,6% das ligações de carbono, enquanto na membrana de alginato-G esse percentual é igual a 32,8%. Já para a ligação carboxila, os percentuais são de 5,7% (alginato-M) e 2,9% (alginato-G). Essa diferença pode ser atribuída à conformação da cadeia polimérica e à forma como os grupos funcionais ficam expostos quando as membranas são formadas. As membranas de alginato-G possuem mais grupos carbonila livres, portanto é provável que eles interajam melhor com a fibroína de seda, visto que a ligação entre os polímeros ocorre entre esse grupo e a amina da proteína.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 24: Espectro de XPS de alta resolução para o C1s das membranas de fibroína de seda, alginato-M e alginato-G.



Capítulo 5: Resultados e Discussão

Os espectros de XPS para as membranas das blendas de fibroína de seda e alginato-G e alginato-M estão mostrados nas Figura 25 e 26, respectivamente. Em ambos espectros, três picos foram observados, correspondentes às ligações C-C (285 eV), C-N, C=N e C-O (286,6 eV) C=O (288,5 eV). Os percentuais de cada ligação estão mostrados nas Tabelas 9 e 10. O pico relativo ao grupo carboxila (~290 eV) não foi observado, corroborando a literatura que indica que esse grupo está envolvido na ligação de hidrogênio que ocorre entre a fibroína de seda e o alginato de sódio (LIANG; HIRABAYASHI, 1992).

Tabela 9: Percentual das ligações químicas nas membranas de fibroína de seda e alginato-G: SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈ (A), SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈(B) e SF_{0,5}SA_{1,5}WA₉₈

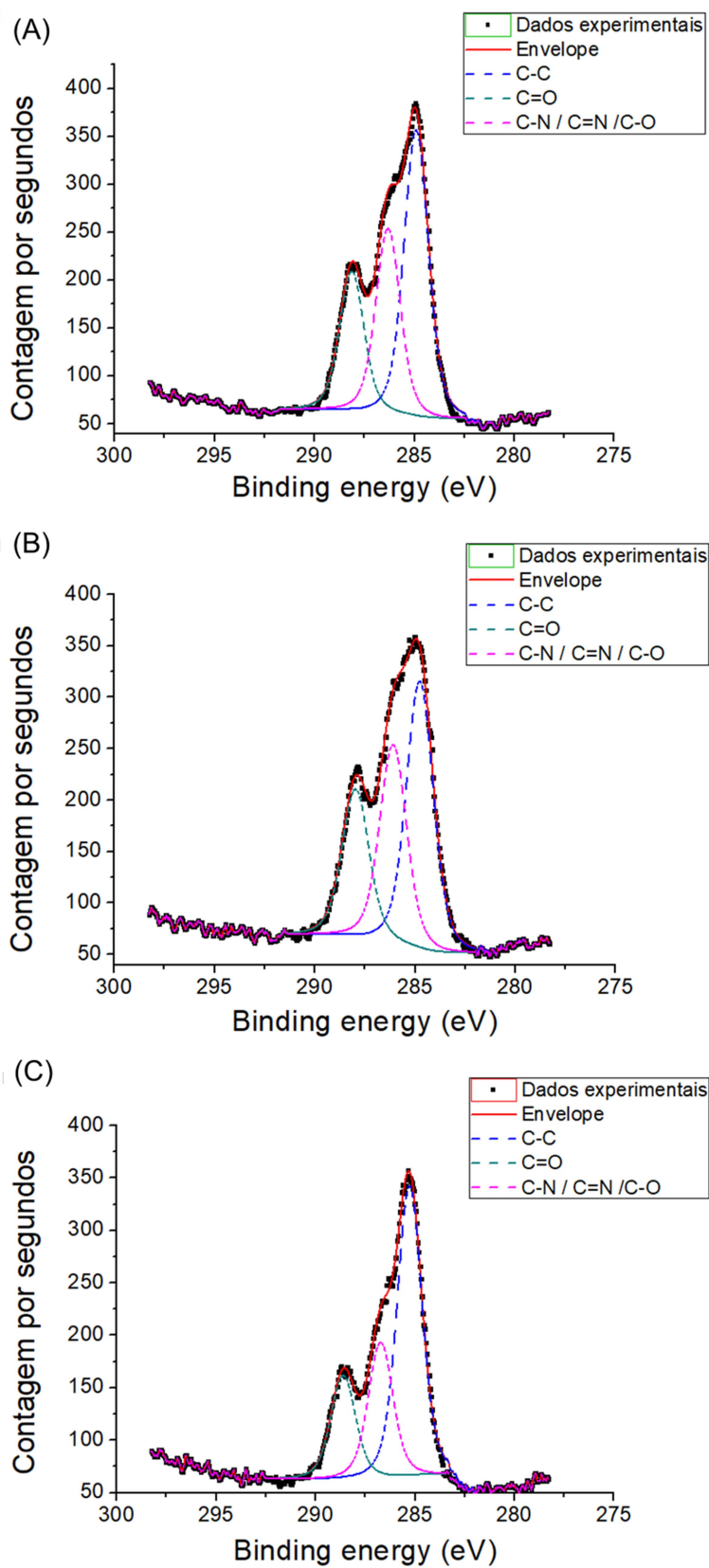
Membrana	Ligação química		
	C-C	C=O	C-N / C=N / C-O
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	54,96	25,58	19,45
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	43,68	32,25	24,06
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	47,04	30,23	22,74

Tabela 10: Percentual das ligações químicas nas membranas de fibroína de seda e alginato-M. SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈ (A), SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈ (B) e SF_{0,5}SA_{1,5}WA₉₈ (C).

Membrana	Ligação química		
	C-C	C=O	C-N / C=N / C-O
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	57,26	18,22	24,52
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	40,08	25,98	33,94
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	37,14	25,95	36,91

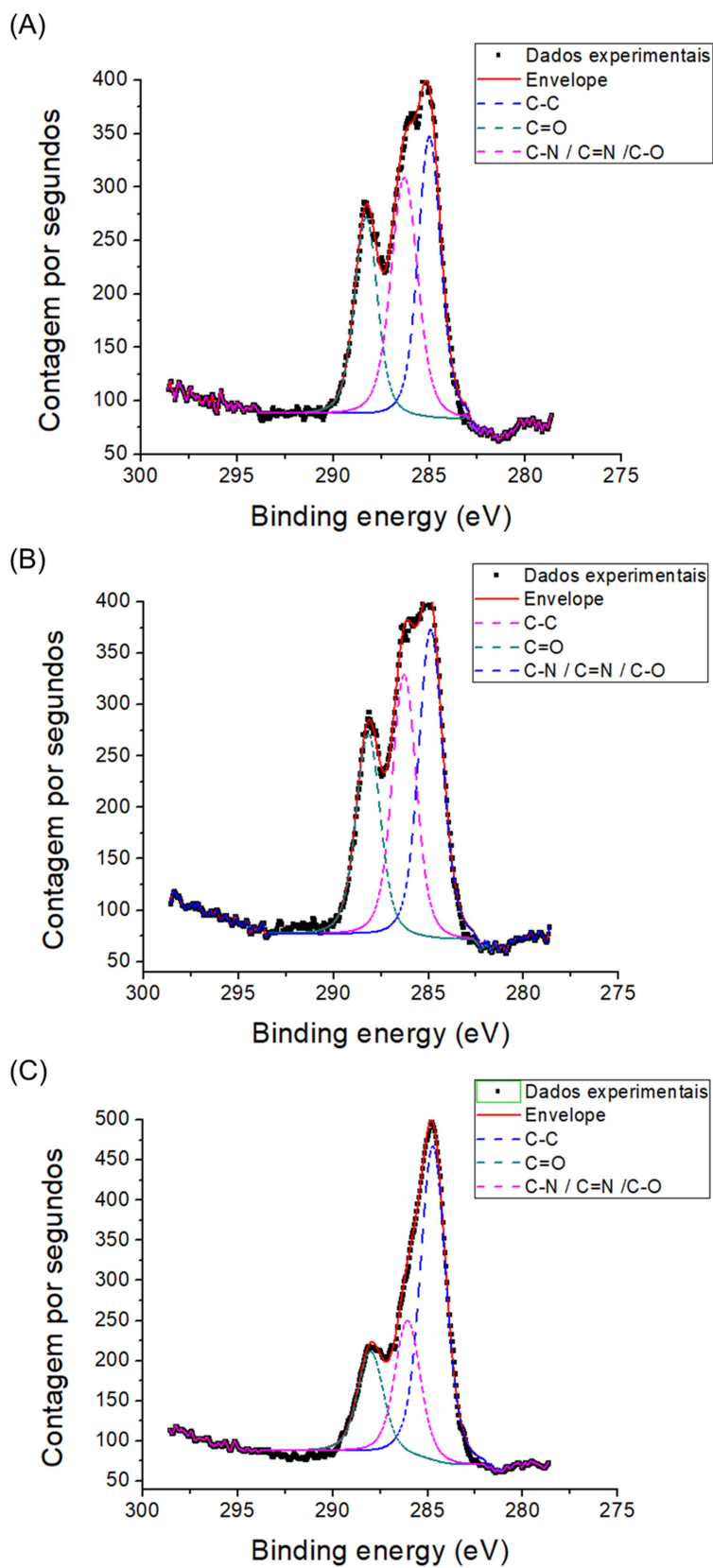
Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 25: Espectro de XPS das membranas das blends $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$ (A), $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$ (B) e $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$ (C) utilizando alginato-G.



Capítulo 5: Resultados e Discussão

Figura 26: Espectro de XPS das membranas das blendas $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$ (A), $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$ (B) e $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$ (C) utilizando alginato-M.



5.7 Espalhamento de luz estático para blendas de fibroína de seda e alginato de sódio em solução

O mecanismo de separação de fases pode ser determinado pela técnica de espalhamento de luz estático, relacionando o perfil de espalhamento com o mecanismo de separação, que pode ser por decomposição spinodal ou nucleação e crescimento. Para isso, é necessário que a análise seja feita durante a passagem da mistura entre a região monofásica para a bifásica, por meio de mudanças *in situ* da concentração dos polímeros. Para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, a região líquida monofásica é bastante reduzida, como será mostrado nos próximos tópicos. A fração mássica da fibroína de seda nessa região é da ordem de 10^{-4} , dificultando a execução experimental dessa análise. Para induzir a separação de fases, isto é, passar da região monofásica para a bifásica, seria necessário promover uma mudança de temperatura ou aumentar controladamente a concentração da fibroína de seda concomitantemente à análise de laser, o que demandaria um sistema de agitação para homogeneização *in situ*, e interferiria na difração do laser. Devido a essas limitações experimentais, não foi possível acompanhar a passagem da blenda da região monofásica para a bifásica e, conseqüentemente, não foi possível determinar o mecanismo de separação de fases. Todas as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio investigadas nesse trabalho apresentaram formação das pseudo-micelas discutidas anteriormente, caracterizada pela mudança imediata de turbidez ao adicionar a solução de fibroína de seda na de alginato de sódio. Ainda assim, o espalhamento de luz pode fornecer informações sobre isotropia e periodicidade dos domínios das fases, por isso, a análise foi conduzida para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

As Figuras 27 e 28 mostram as curvas de espalhamento de luz em função da distância obtidas por 7 dias e as imagens obtidas no início e no final do experimento para as blendas SF_{0,5}SA_{0,5}WA₉₉ e SF_{0,5}SA_{2,5}WA₉₇ utilizando os diferentes tipos de alginato de sódio. As demais curvas estão mostradas nas Figuras A1 e A2, para blendas preparadas com alginato-M, e Figura A3 e A4, para blendas preparadas com alginato-G, no Apêndice A.

Figura 27: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$ (a) e $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$ (b) preparadas com alginato-M acompanhadas por 7 dias. As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz; enquanto na blenda $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$ é observado um halo, na blenda $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$ o espalhamento é similar a um disco.

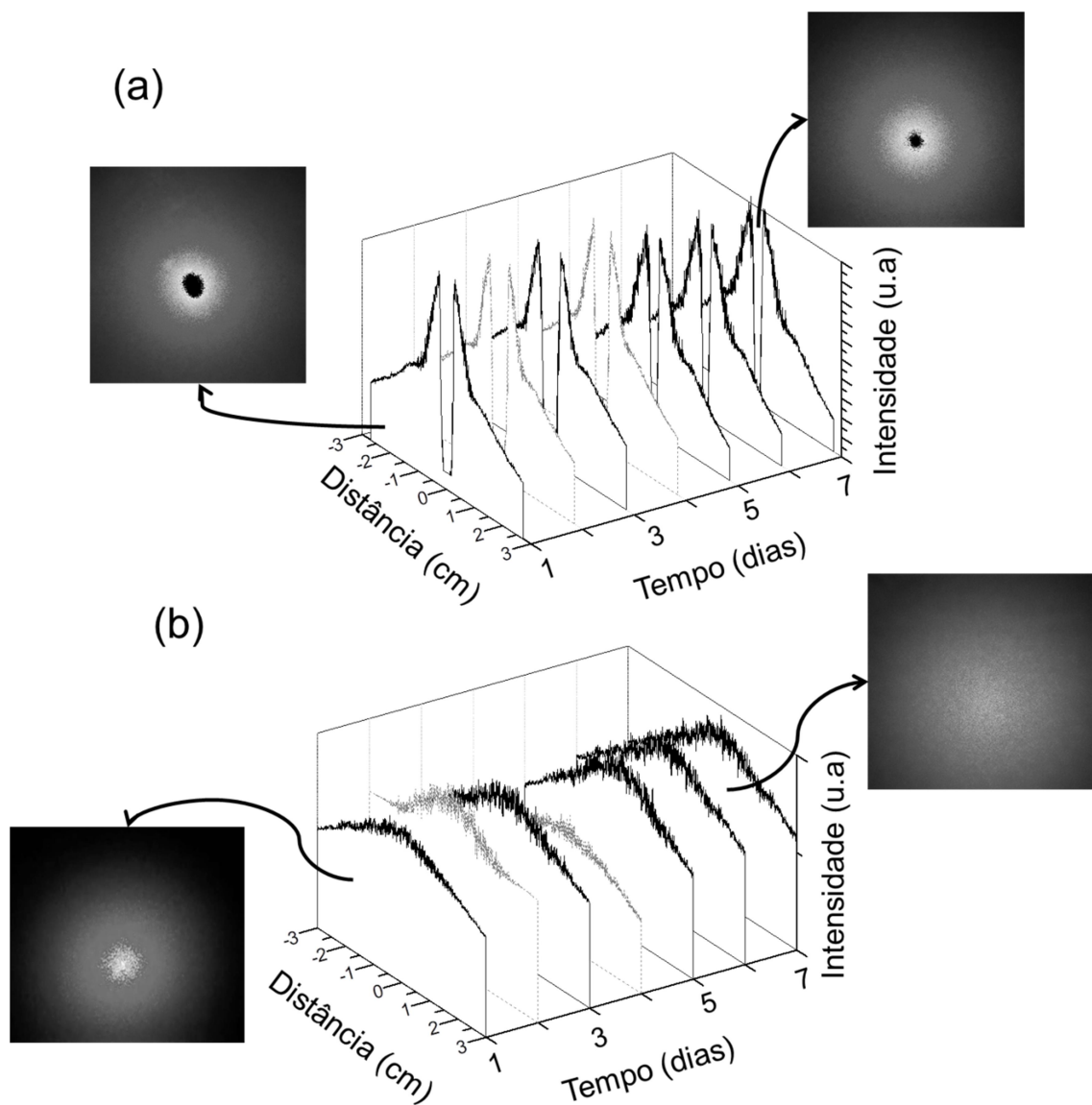
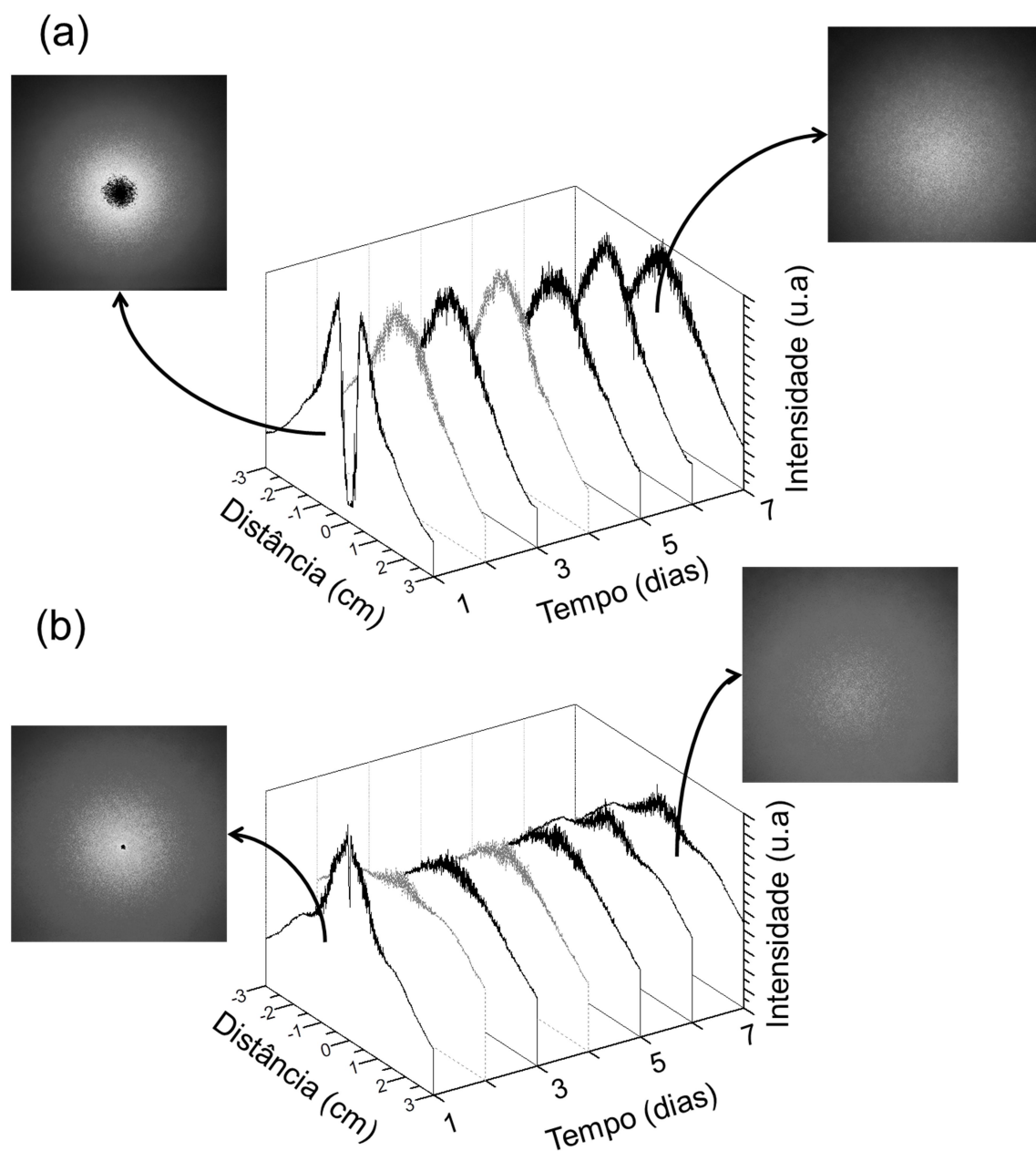


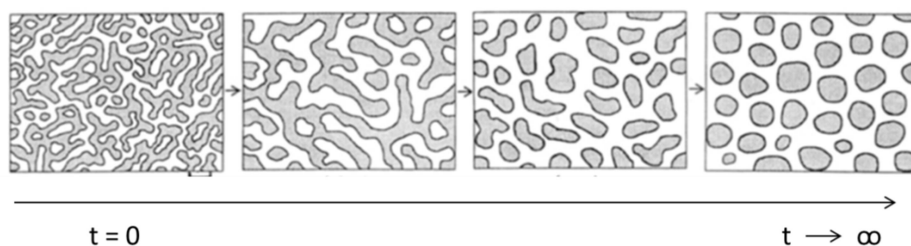
Figura 28: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$ (a) e $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$ (b) preparadas com alginato-G acompanhadas por 7 dias. As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz; enquanto na blenda $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$ é observado um halo, na blenda $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$ o espalhamento é similar a um disco.



É possível observar que o espalhamento de luz é isotrópico para todas as blendas estudadas e modifica-se ao longo dos dias, indicando o estado de não equilíbrio das blendas. A variação também pode ser uma consequência da coalescência das pseudo-micelas e formação da fase sólida, que dificulta a passagem de luz do laser, modificando a intensidade e o perfil de espalhamento. É possível notar que a partir do sexto dia não há mudanças significativas no espalhamento de luz, sugerindo que o sistema alcançou o equilíbrio termodinâmico.

Para as blendas $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$ e $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$ as imagens obtidas de espalhamento de luz logo após o preparo das blendas foram semelhantes para os dois tipos de alginato de sódio. Ambas as blendas apresentaram um halo de espalhamento de luz, sugerindo distâncias entre domínios de fase periódicos, ou seja, a presença de microestrutura com maior organização. Porém, após o primeiro dia de preparo da blenda $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$, o espalhamento de luz observado para a blenda preparada com alginato-G modificou-se para um perfil do tipo disco. Em alguns sistemas é observado a evolução da estrutura do material com o tempo, que passa de fases periódicas e interconectadas para um morfologia do tipo matriz-domínio com glóbulos interconectados, como mostra a Figura 29 (INOUE, 1995). Esse tipo de morfologia (matriz-domínio) é observada para as membranas das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio (LOPES; MORAES; BEPPU, 2018; MORAES *et al.*, 2014). Dessa forma, é possível que alginatos com maior quantidade de grupos-G e maior massa molar apresentem maior tendência em formar esse tipo de estrutura, alterando a periodicidade dos domínios das fases e o espalhamento de luz.

Figura 29: Mudança de morfologia com o tempo durante a separação de fases por decomposição spinodal.



Fonte: Inoue (1995).

Já a segunda blenda ($\text{SF}_{0,5}\text{SA}_{2,5}\text{WA}_{97}$), apresentou imagens de espalhamento do tipo disco, sugerindo que elas não possuem domínios de fases periódicos. Analisando as demais blendas, é possível identificar uma região em que foi observado espalhamento do tipo halo, possivelmente, com a formação de domínios periódicos de fases e outra em que é observado espalhamento de luz do tipo disco. Para blendas preparadas com alginato-M, o espalhamento de luz com a presença de halo foi observado para uma maior quantidade de blendas (Figura 30). Esse tipo de padrão de espalhamento, sugere a formação de blendas com distâncias periódicas entre os domínios de fase, o que pode ocorrer quando a região metaestável é cruzada rapidamente ou quando há uma variação de temperatura na região próxima ao ponto crítico. Dessa forma, é possível que exista uma diferença na região metaestável nos diferentes sistemas, com mudanças também no equilíbrio de fases.

Além de apresentarem diferenças na proporção dos grupos M e G, a massa molar dos alginatos de sódio utilizados é bastante diferente e pode interferir na organização das fases, visto que influencia na interação do biopolímero com os demais componentes. Essa influência já foi estudada em trabalhos anteriores e foi verificado que essas características interferiam significativamente nas propriedades mecânicas e de barreira das membranas de alginato estudadas (VAZ, 2012). O alginato-G possui maior quantidades de grupos gulurônicos e maior massa molar, então, é possível que haja um efeito combinado dessas características do alginato de sódio na organização das fases das blendas estudadas. Para as blendas que apresentaram formação de halo de espalhamento de luz, foi possível calcular a distância periódica dos domínios de fase (D) utilizando o valor de intensidade de luz máxima, conforme mostrado na Tabela 11.

Figura 30: Diagrama ternário indicando a região em que, possivelmente, a separação de fases ocorre por decomposição spinodal (em vermelho) e nucleação e crescimento (em azul) das blendas preparadas com alginato-M (○) e alginato-G (□).

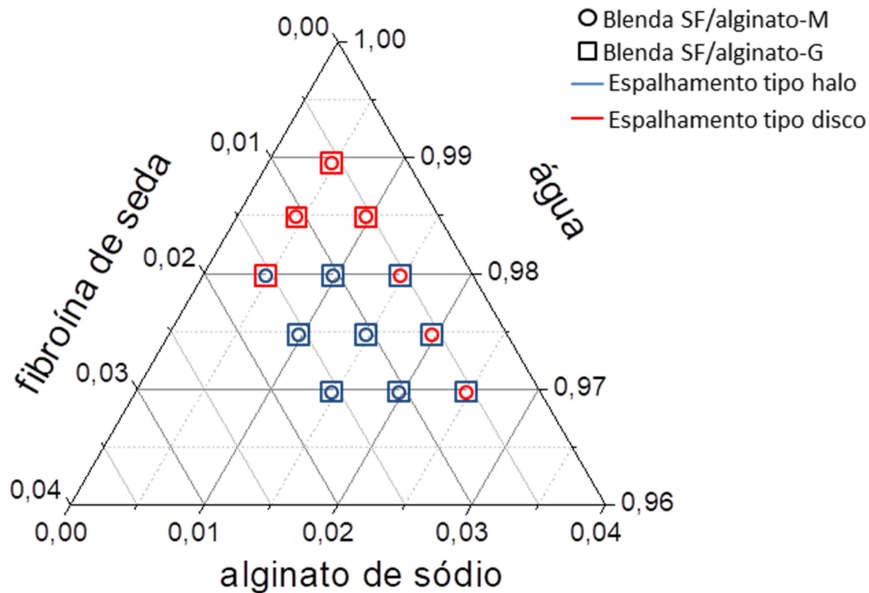


Tabela 11: Valores de q_m e D calculados a partir dos dados de intensidade máxima do espalhamento de luz para as blendas de fibroína de seda e alginato-M e alginato-G em que foi observado espalhamento de luz do tipo halo. Os valores utilizados foram os obtidos após o preparo das blendas (dia 1).

Blenda		q_m (nm^{-1})	D (μm)
Alginato-M	SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	0,012	0,52
	SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	0,011	0,57
	SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	0,011	0,57
	SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	0,018	0,35
	SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	0,010	0,63
Alginato-G	SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	0,003	2,09
	SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	0,020	0,31
	SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	0,017	0,37
	SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	0,015	0,42

5.8 Espalhamento de luz estático para blendas de fibroína de seda e alginato de sódio em estado sólido (membranas)

As membranas das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio também foram analisadas quanto ao seu espalhamento de luz. Os perfis de espalhamento de luz e imagens obtidas na análise de espalhamento de luz estática com laser de He-Ne para as membranas de fibroína de seda e alginato-M estão mostrados nas Figura 31 e 34 e para as membranas preparadas com alginato-G estão mostradas nas Figuras 35 e 36, respectivamente.

É possível observar, para todas as blendas estudadas, um perfil de espalhamento de luz isotrópico, semelhante ao observado em trabalhos anteriores (LOPES, 2016). Assim como para as blendas em solução, foi possível observar diferenças significativas ao comparar os perfis de espalhamento de luz obtidos com os diferentes tipos de alginato (alginato-G e alginato-M). Para as membranas preparadas com alginato-M (maior quantidade de grupos M) apenas as três primeiras blendas, as quais contém a menor fração mássica de alginato, apresentam halos e picos de intensidade, indicando regularidade e alta organização das fases. Para as outras blendas, é observado que a intensidade de luz decai ao longo da distância e as imagens obtidas se assemelham a um disco, indicando que não há periodicidade das fases. Já para as membranas preparadas com alginato-G, o perfil de espalhamento e as imagens obtidas mostraram que, excetuando-se a membrana da blenda $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$, o perfil de espalhamento de luz apresentou um pico de intensidade com a observação de halo na imagem obtida, sugerindo que há periodicidade das fases.

Esse resultado indica que a remoção do solvente por evaporação pode causar modificações significativas no arranjo molecular entre a fibroína de seda e o alginato de sódio. O alginato-G possui em sua cadeia polimérica maior quantidade de grupos G, que necessitam de uma menor quantidade de íons cálcio para formar a estrutura de caixa de ovos quando comparado a alginatos ricos em grupos M (VAZ, 2012). É possível que a evaporação do solvente cause um aumento local da concentração de íons Ca^{+2} , induzindo a formação dessas estruturas que apresentam um alto grau de organização e

periodicidade. Por isso, o espalhamento de luz observado para esse tipo de alginato de sódio sugere a presença de fases periódicas e organizadas.

Figura 31: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade *versus* distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-M: (a) $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$, (b) $SF_{1,0}SA_{0,5}WA_{98,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$, (d) $SF_{0,5}SA_{1,0}WA_{98,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$, (f) $SF_{1,5}SA_{1,0}WA_{97,5}$.

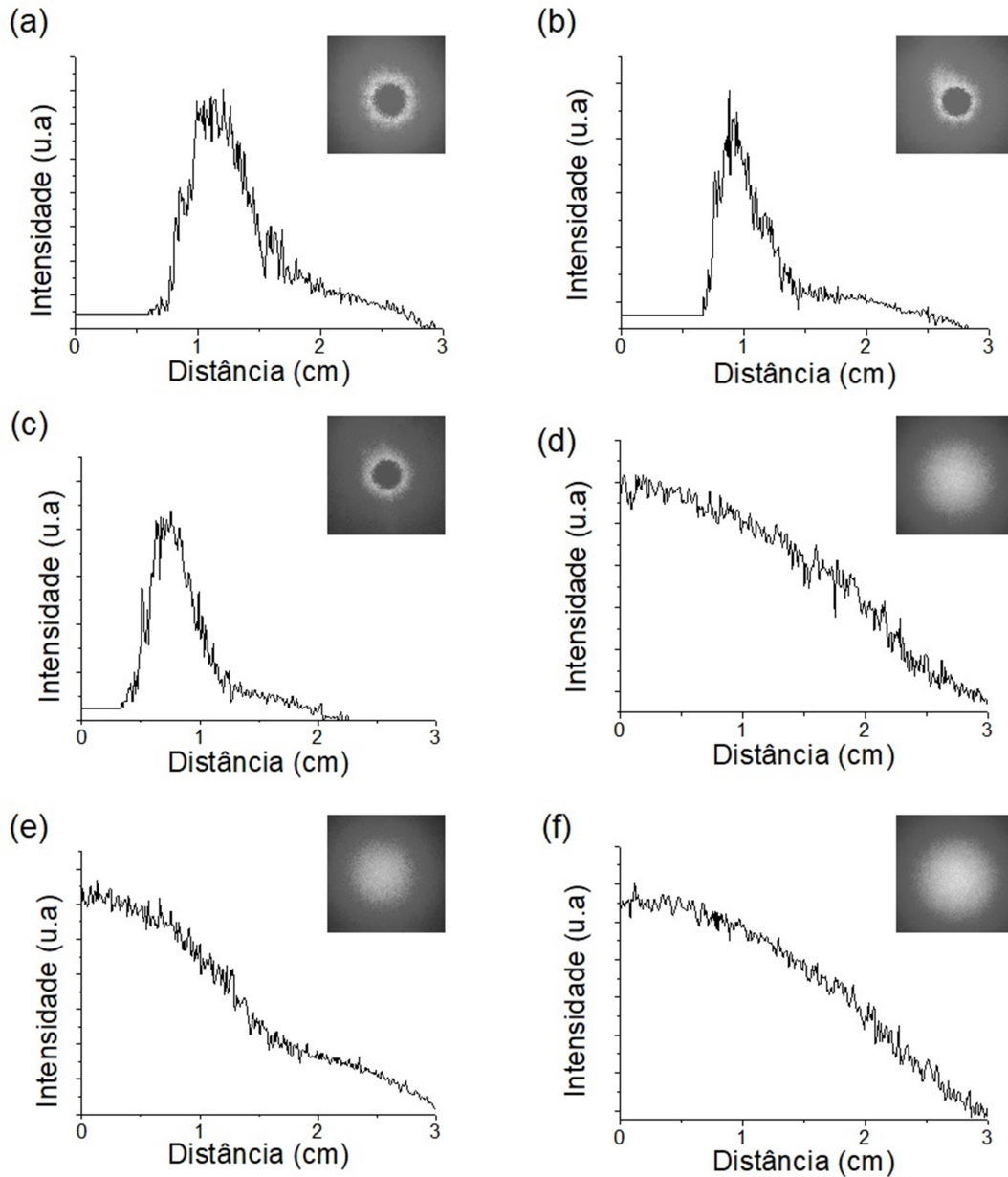


Figura 32: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade *versus* distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-M: (a) $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$, (b) $SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{1,5}WA_{97}$, (d) $SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{2,0}WA_{97}$, (f) $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$.

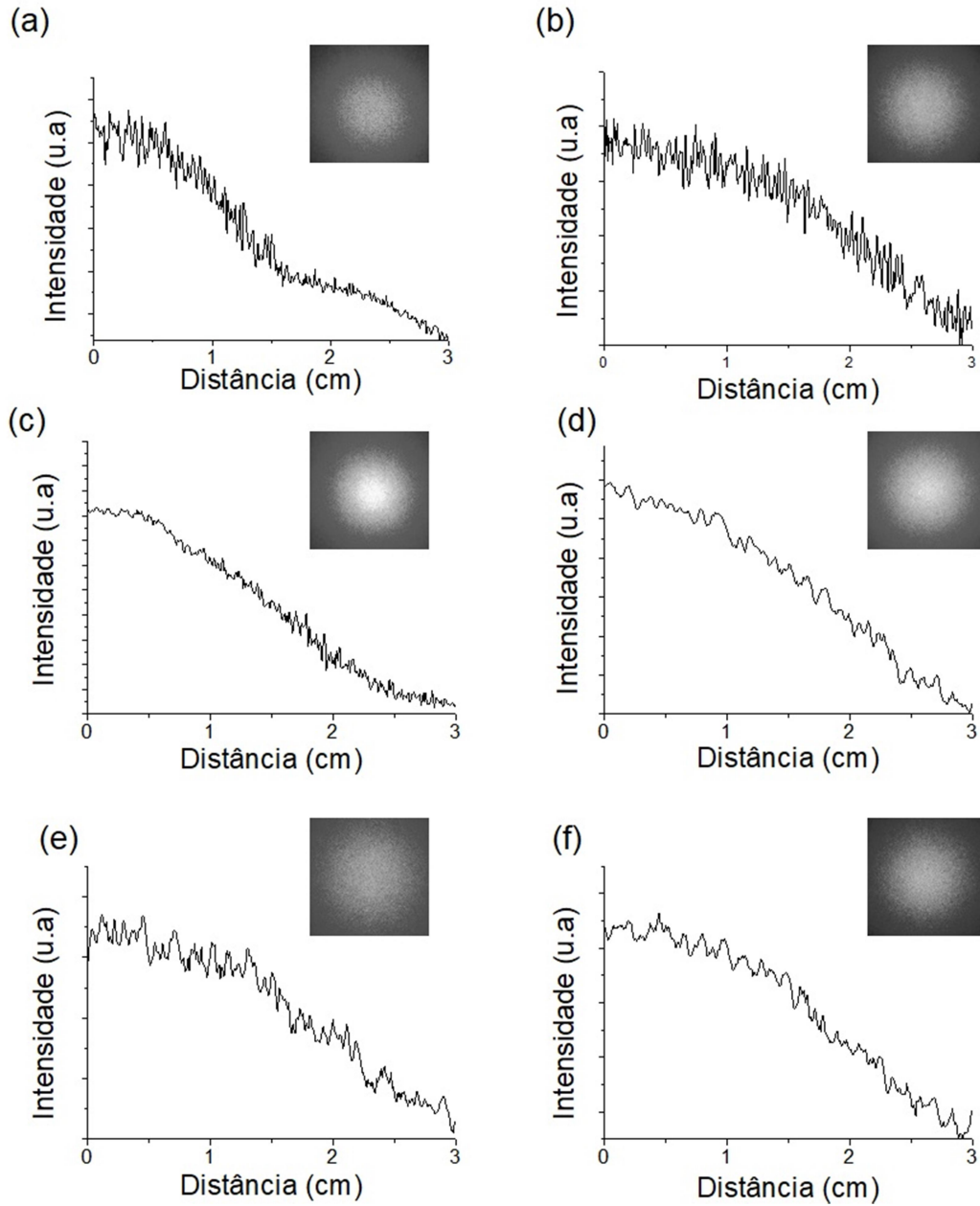


Figura 33: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade *versus* distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-G: (a) $SF_{0,5}SA_{0,5}WA_{99}$, (b) $SF_{1,0}SA_{0,5}WA_{98,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{0,5}WA_{98}$, (d) $SF_{0,5}SA_{1,0}WA_{98,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{1,0}WA_{98}$, (f) $SF_{1,5}SA_{1,0}WA_{97,5}$.

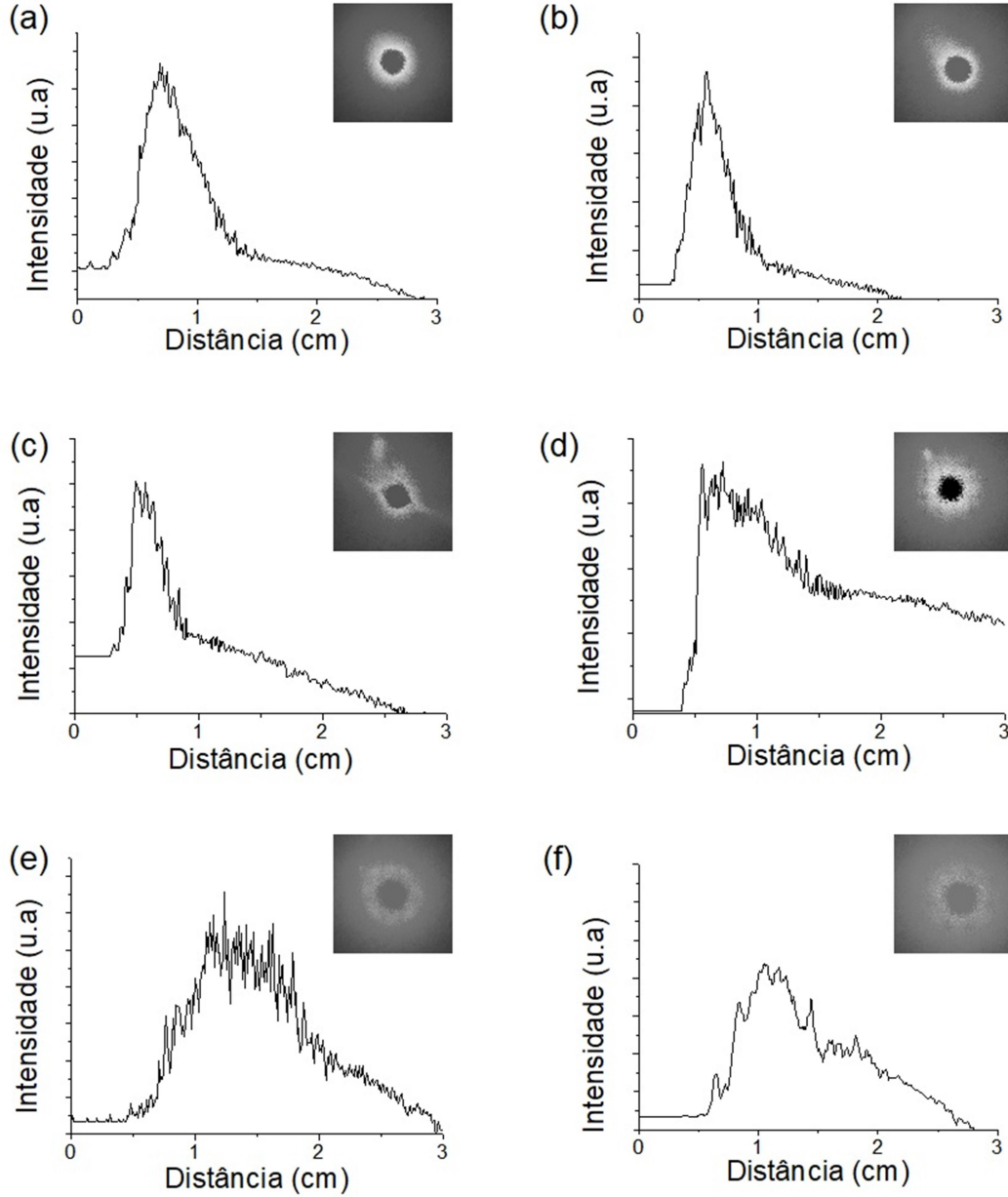
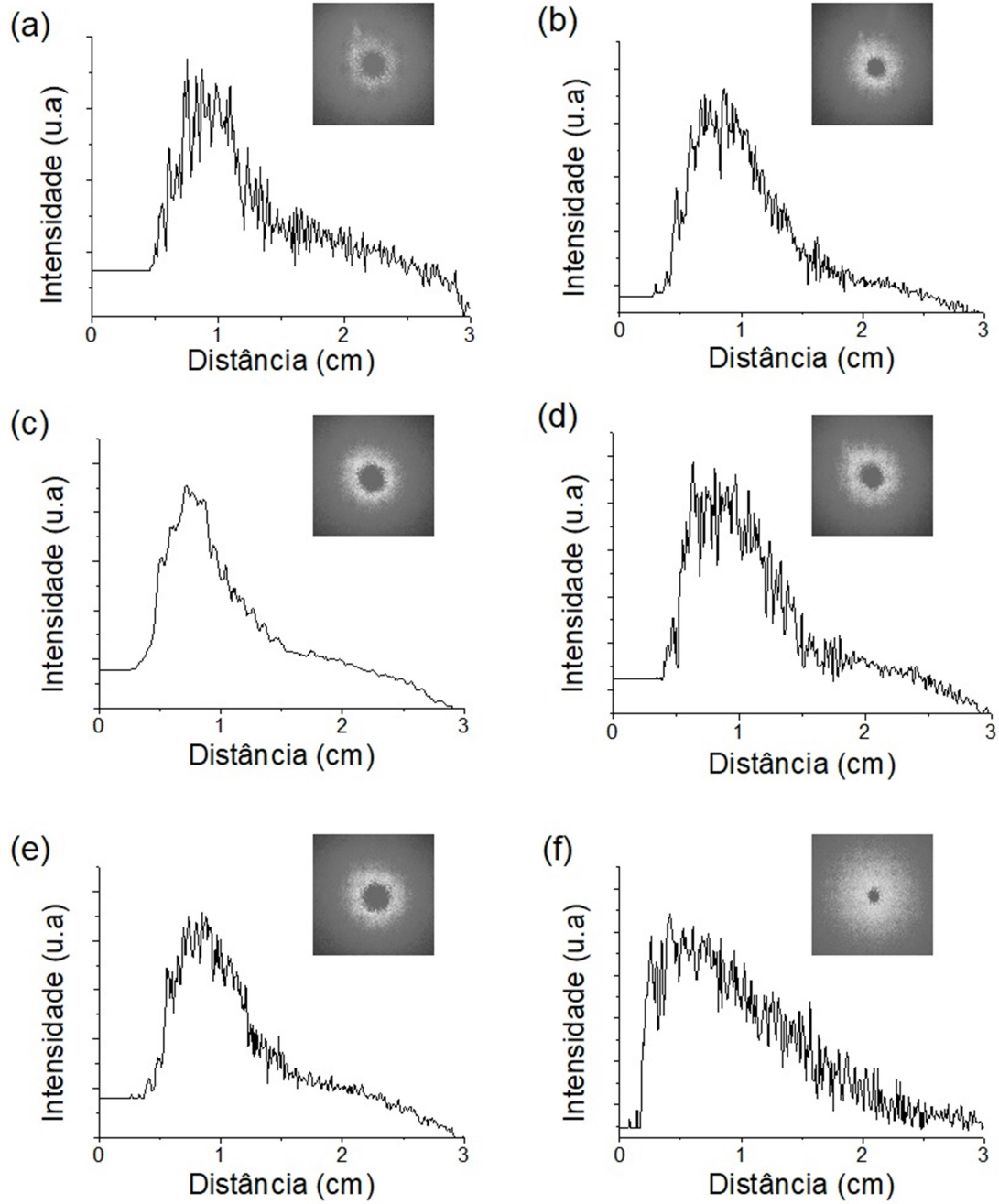


Figura 34: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade *versus* distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas de fibroína de seda e alginato-G: (a) $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$, (b) $SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5}$, (c) $SF_{1,5}SA_{1,5}WA_{97}$, (d) $SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5}$, (e) $SF_{1,0}SA_{2,0}WA_{97}$, (f) $SF_{0,5}SA_{2,5}WA_{97}$.



5.9 Equilíbrio de fases

Após o preparo das blendas e formação de duas fases distintas, os componentes de cada fase foram quantificados pelas técnicas descritas no Capítulo 4. A quantificação foi realizada após alcançar o equilíbrio termodinâmico, ou seja, no oitavo dia após o preparo da blenda. Esse tempo foi determinado utilizando a técnica de espalhamento de luz estático. Os valores de fração mássica média de fibroína de seda, alginato de sódio e água em cada fase estão mostrados na Tabela 12 e os diagramas ternários para as blendas preparadas com os diferentes alginatos de sódio estão mostradas na Figura 35. Os dados de equilíbrio de fase foram utilizados para o ajuste aos modelos de Flory-Huggins, RPA, NRTL e UNIQUAC.

Durante a separação de fases, é esperado que o alginato de sódio permaneça na fase líquida, visto que ele é um polímero hidrofílico e tem maior afinidade com o solvente. Porém, blendas com maior fração mássica de alginato de sódio também apresentaram maior quantidade desse polímero na fase sólida. A análise foi feita comparando blendas com a mesma fração mássica inicial de fibroína de seda e diferentes frações mássicas de alginato de sódio, conforme mostrado na Figura 36. É possível que as “pseudo-micelas” formadas após o preparo das blendas se aglomerem e precipitem formando a fase sólida (Figura 23). Dessa forma, uma hipótese é que blendas com maior fração mássica inicial de alginato de sódio, formem micelas com maior concentração desse polímero, aprisionando-o e enriquecendo a fase sólida. Esse comportamento foi observado por outros autores para o sistema fibroína-alginato e para outros sistemas proteína-polissacarídeo como alginato-proteína da ervilha e κ -carragena-proteína da soja (BRADA, 2019; LI *et al.*, 2008; MESSION *et al.*, 2012).

Tabela 12: Valores de fração mássica média (n=3) de fibroína de seda (SF), alginato de sódio (alginato-M e alginato-G) e água nas fase líquida e sólida.

Blendas	Alginato-M						Alginato-G					
	Fase líquida			Fase sólida			Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	1,77x10 ⁻⁴	2,79x10 ⁻³	0,99	2,51x10 ⁻²	1,79x10 ⁻²	0,96	5,45x10 ⁻⁴	9,70x10 ⁻⁴	0,99	4,06x10 ⁻²	3,77x10 ⁻²	0,92
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	1,38x10 ⁻⁴	1,52x10 ⁻³	0,99	3,68x10 ⁻²	1,42x10 ⁻²	0,95	6,33x10 ⁻⁴	5,44x10 ⁻⁴	0,99	5,68x10 ⁻²	2,74x10 ⁻²	0,92
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	6,31x10 ⁻⁴	4,81x10 ⁻⁴	0,99	7,25x10 ⁻²	2,21x10 ⁻²	0,91	9,38x10 ⁻⁴	7,37x10 ⁻⁴	0,99	7,23x10 ⁻²	2,23x10 ⁻²	0,91
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	2,09x10 ⁻⁴	2,34x10 ⁻³	0,99	4,06x10 ⁻²	6,61x10 ⁻²	0,89	1,34x10 ⁻³	7,84x10 ⁻³	0,99	5,84x10 ⁻²	6,26x10 ⁻²	0,88
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	1,67x10 ⁻⁴	1,74x10 ⁻³	0,99	4,78x10 ⁻²	3,98x10 ⁻²	0,91	1,75x10 ⁻³	4,20x10 ⁻³	0,99	6,42x10 ⁻²	4,95x10 ⁻²	0,89
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	2,42x10 ⁻⁴	1,46x10 ⁻³	0,99	5,84x10 ⁻²	3,39x10 ⁻²	0,91	1,77x10 ⁻³	3,39x10 ⁻³	0,99	7,20x10 ⁻²	3,87x10 ⁻²	0,89
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	6,55x10 ⁻⁴	7,92x10 ⁻³	0,99	4,61x10 ⁻³	9,04x10 ⁻²	0,86	1,69x10 ⁻³	1,21x10 ⁻²	0,99	4,20x10 ⁻²	5,73x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	2,08x10 ⁻⁴	7,23x10 ⁻³	0,99	5,94x10 ⁻²	6,36x10 ⁻²	0,88	1,12x10 ⁻³	1,17x10 ⁻²	0,99	7,34x10 ⁻²	4,58x10 ⁻²	0,88
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	6,46x10 ⁻⁴	1,36x10 ⁻²	0,98	7,74x10 ⁻²	2,73x10 ⁻²	0,89	1,08x10 ⁻³	6,09x10 ⁻³	0,99	8,02x10 ⁻²	5,51x10 ⁻²	0,86
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	3,29x10 ⁻⁴	1,07x10 ⁻²	0,99	3,92x10 ⁻²	9,03x10 ⁻²	0,87	3,62x10 ⁻⁴	1,13x10 ⁻²	0,99	4,02x10 ⁻²	8,69x10 ⁻²	0,87
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	3,59x10 ⁻⁴	2,00x10 ⁻²	0,98	7,05x10 ⁻²	5,58x10 ⁻²	0,87	9,20x10 ⁻⁴	1,23x10 ⁻²	0,99	5,97x10 ⁻²	7,05x10 ⁻²	0,87
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	3,18x10 ⁻⁴	1,58x10 ⁻²	0,98	4,88x10 ⁻²	1,08x10 ⁻¹	0,84	2,69x10 ⁻³	2,19x10 ⁻²	0,97	3,49x10 ⁻²	9,52x10 ⁻²	0,87

Figura 35: Diagrama de equilíbrio de fases para as blends de fibroína de seda-alginato-M (a) e fibroína de seda-alginato-G (b). Fase líquida ($\blacktriangle$), fase sólida ($\square$), pontos iniciais de mistura ($\bullet$), linhas de amarração (- -).

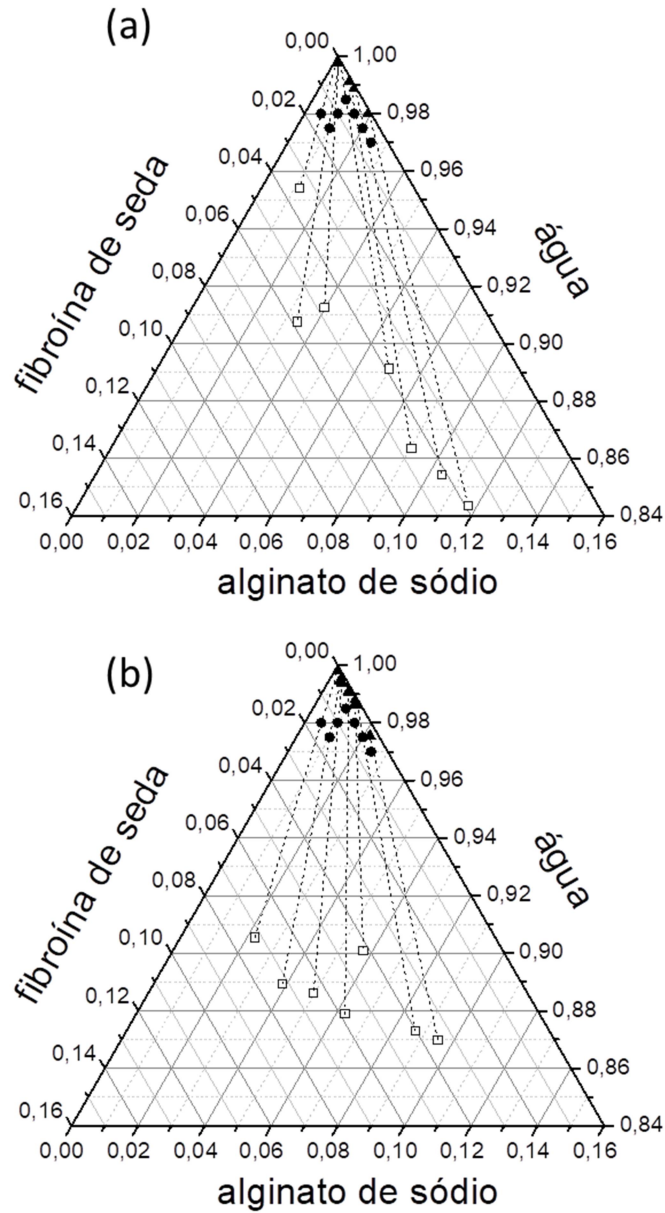
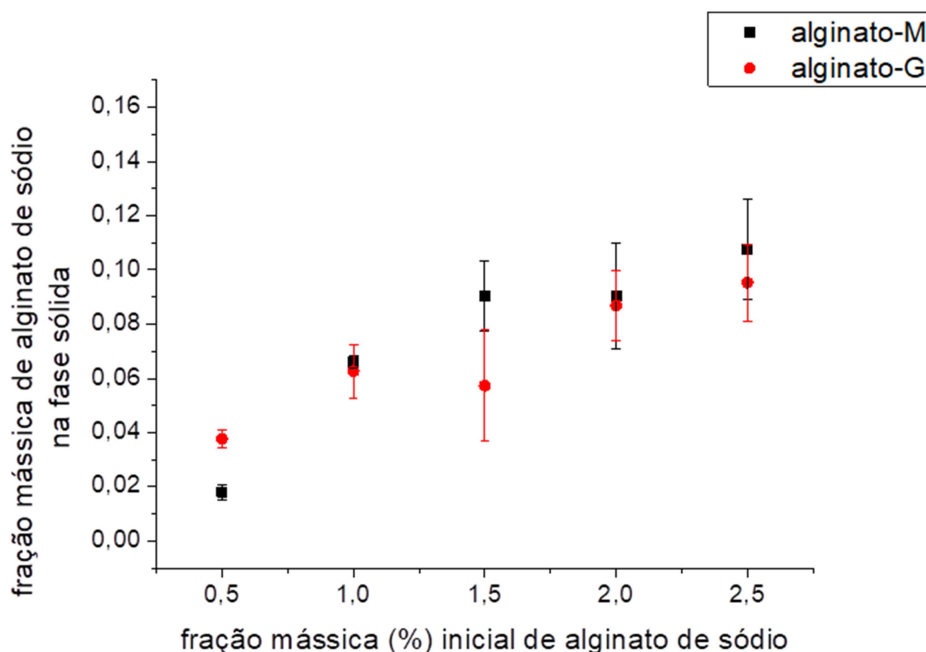


Figura 36: Fração mássica de alginato-M e alginato-G na fase sólida após a separação de fases como função da fração mássica inicial de alginato de sódio em blendas que contém a mesma fração mássica inicial de fibroína de seda (0,5%).



5.9.1 Modelos de Flory-Huggins e RPA

Os valores dos parâmetros de Flory-Huggins estão mostrados na Tabela 13, e os valores de fração mássica calculados a partir do modelo estão mostrados na Tabela A3 e A4 do Apêndice A, os quais foram plotados nos diagramas ternários mostrados na Figura 37. Na figura, cada ponto foi representado por uma cor, para facilitar a visualização e interpretação do leitor. Os valores de parâmetro de interação fibroína-alginato (χ_{SFSA}) foram próximos aos encontrados em trabalhos anteriores (LOPES, 2016), em que dados de temperatura de transição vítrea foram utilizados para calculá-los. Já os valores de χ_{SAWA} e χ_{SFWA} variaram em relação ao tipo de alginato de sódio utilizado, mas se mantiveram na mesma ordem de grandeza. Os parâmetros foram ajustados a partir dos dados experimentais, e, visto que esses são diferentes para os sistemas com diferentes tipos de alginato, é esperado que os valores variem um pouco. Para o alginato de sódio, o valor do parâmetro de interação alginato-água reportado na literatura é em torno de 0,025 (CHAN; NEUFELD, 2009). Para a fibroína de seda, esse valor é próximo de 0,95 (WHITTAKER *et*

al., 2014). Os valores de χ encontrados a partir do modelo de Flory-Huggins foram abaixo de 0,5 sugerindo que a água pode ser um bom solvente para ambos polímeros nas condições estudadas (PRAUSNITZ, LICHTENTHALER, DE AZEVEDO, 1998).

A curva binodal pode ser determinada experimentalmente pelo método de ponto de névoa, em que as soluções límpidas dos polímeros são misturadas controladamente até que a blenda se torne turva e a mistura é considerada bifásica. Para o sistema fibroína-alginato, esse experimento é difícil de ser feito na prática pelas limitações mencionadas anteriormente, como o rápido turvamento da blenda mesmo em baixas frações mássicas de fibroína de seda e alginato de sódio. No entanto, foi possível estimar a curva binodal a partir do modelo de Flory-Huggins, mostrada na Figura 37.

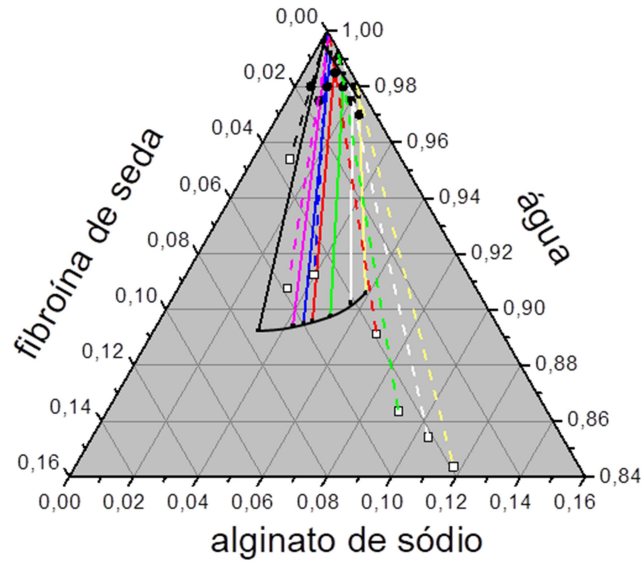
O valor do desvio médio quadrático (DMQ) do modelo foi cerca de 2%. Apesar do DMQ ser pequeno, a baixa adequação dos dados experimentais ao modelo de Flory-Huggins é notada com facilidade no diagrama ternário. Por se tratar de uma região pequena do diagrama de fases, pequenas variação na fração mássica podem provocar mudanças significativas nas linhas de amarração do diagrama. Isso fica mais claro quando, por exemplo, os erros médios das medidas de fração mássica experimentais são plotados no diagrama ternário, como mostrado na Figura 38.

Tabela 13: Valores dos parâmetros de Flory-Huggins e do desvio médio quadrático para o sistema fibroína de seda-alginato de sódio e água calculado utilizando os dados de equilíbrio a 25 °C.

	χ_{SASF}	χ_{SFWA}	χ_{SAWA}	DMQ
Alginato-M	0,0087	0,1240	0,0301	1,93
Alginato-G	0,0060	0,0886	0,0163	1,41

Figura 37: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura (●), fase líquida (▲), fase sólida (□). Linhas de amarração obtidas a partir dos dados experimentais (-.-) e obtida a partir do modelo de Flory-Huggins (-).

(a)



(b)

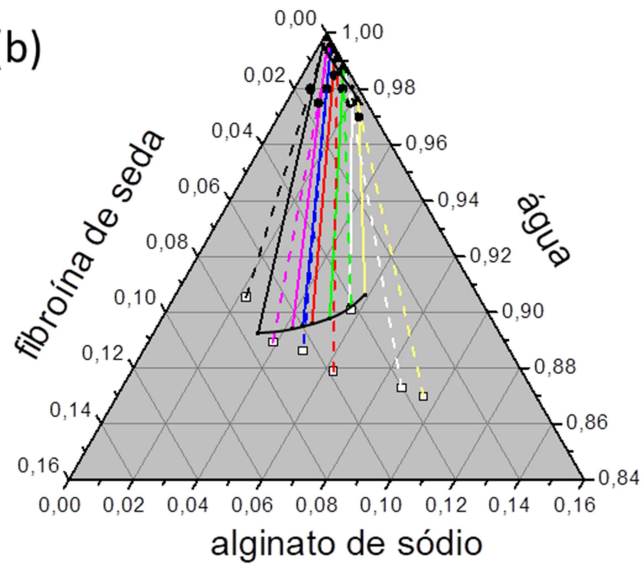
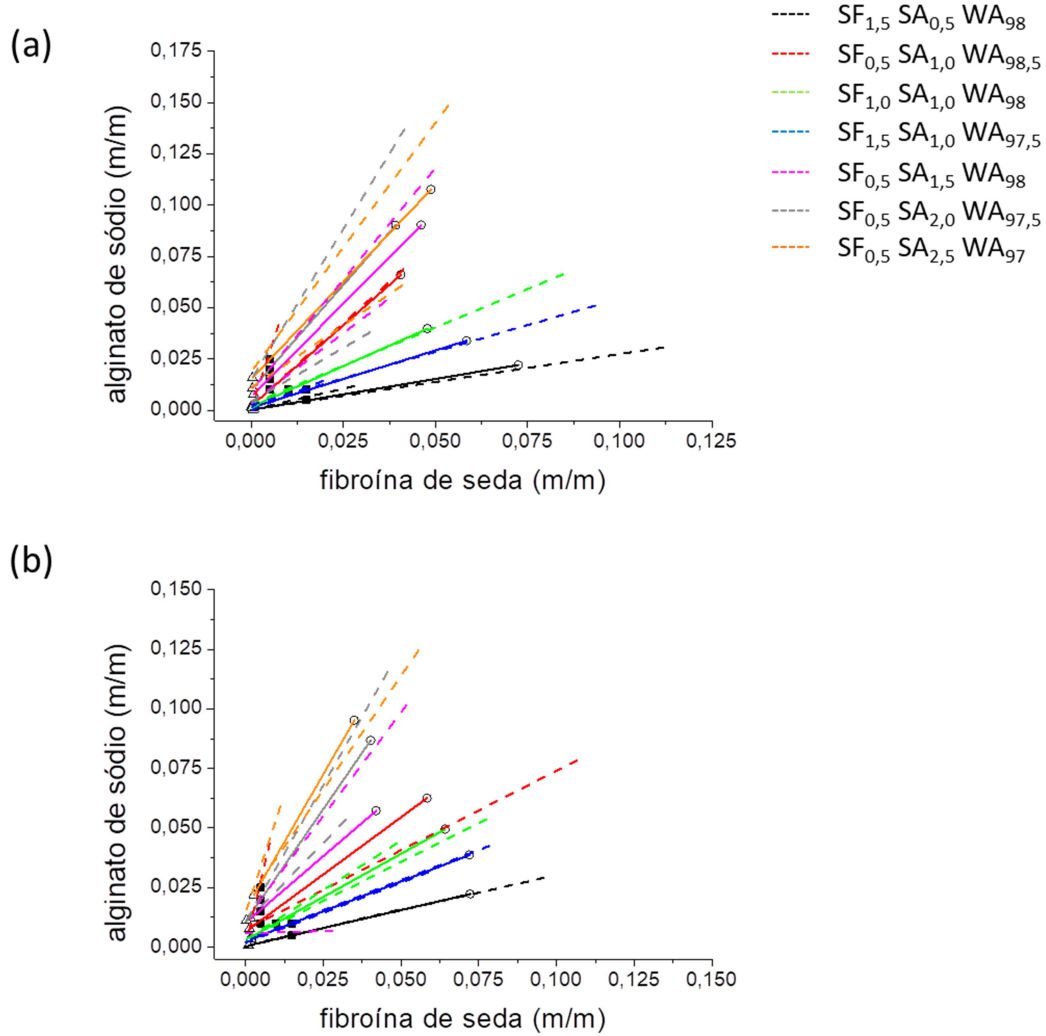


Figura 38: Diagrama de equilíbrio de fases para o sistema fibroína de seda-alginato-M (a) e fibroína de seda-alginato-G (b). Fase líquida (Δ), fase sólida ($\circ$), pontos iniciais de mistura ($\blacksquare$), linhas de amarração (-), região de variabilidade das fases líquida e sólida calculada utilizando o erro médio das medidas experimentais ($n=3$) (- -).

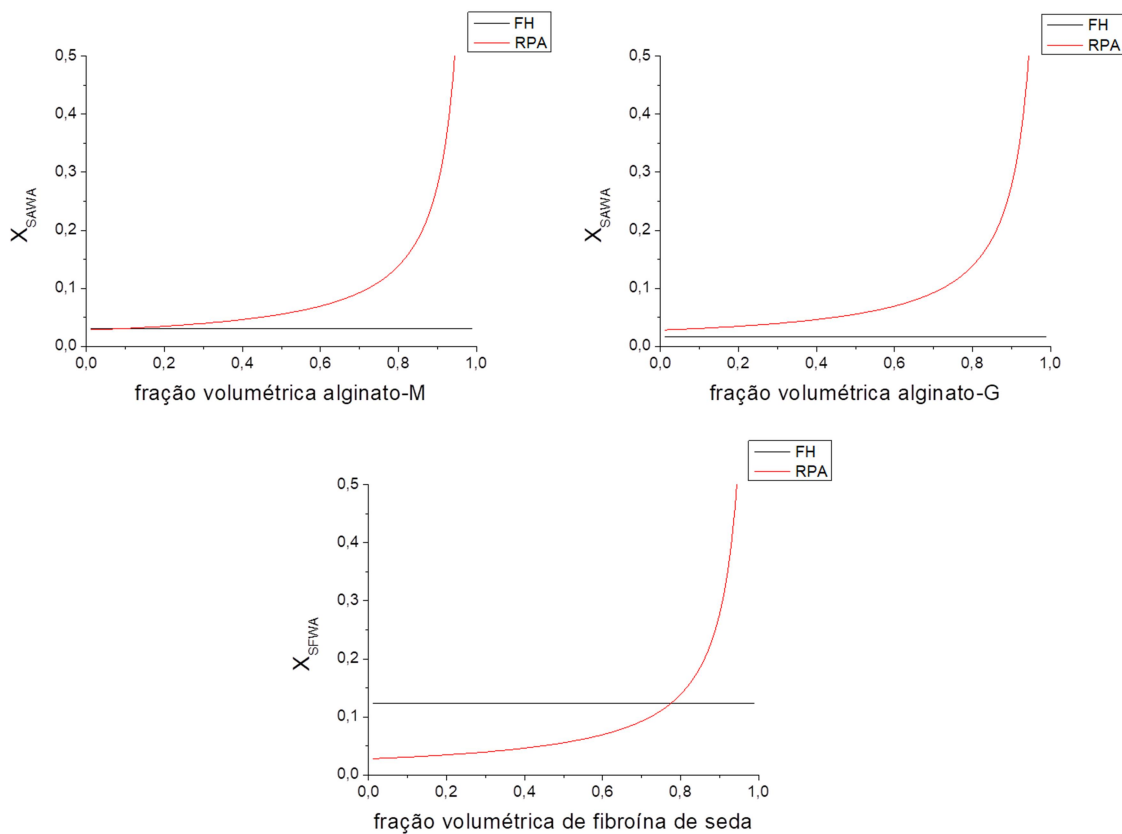


Devido à baixa adequação do modelo de Flory-Huggins aos dados experimentais, o modelo RPA foi utilizado para calcular novos valores para os parâmetro de Flory-Huggins e utilizá-los novamente na equação extendida de Flory-Huggins. O modelo RPA foi escolhido, pois, a literatura apresenta-o como um bom modelo para sistemas coloidais e que tenham aminoácidos e proteínas em sua composição (TAVARES; PRAUSNITZ, 2004).

Para determinar o novos valores de χ_{SFWA} e χ_{SAWA} , a equação 14, apresentada no Capítulo 3 foi utilizada. Ao contrário do modelo de Flory-

Huggins clássico, o parâmetro de Flory-Huggins utilizado no modelo RPA varia com a fração volumétrica dos componentes do sistema, conforme mostrado nas Figura 39 e 42. Para os pares polímero-solvente (Figura 39), é possível observar que os valores do parâmetro de Flory-Huggins/RPA são positivos e crescem exponencialmente a medida que a fração volumétrica aumenta, aproximando-se do valor crítico de miscibilidade entre polímero e solvente ($\chi = 0,5$) (PRAUSNITZ, LICHTENTHALER, DE AZEVEDO, 1998). Na prática, observa-se que, ao aumentar a fração volumétrica do polímero, há uma tendência de precipitação e formação de uma fase sólida.

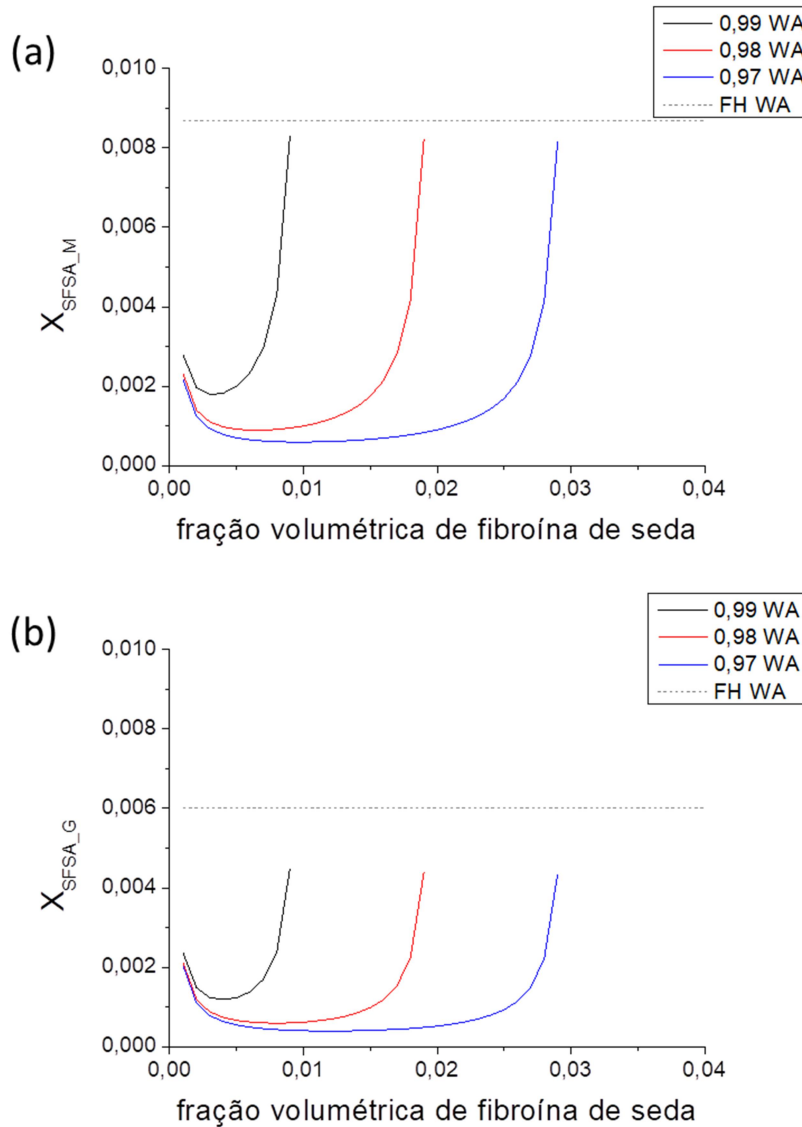
Figura 39: Comparação dos parâmetros de Flory-Huggins (χ_{SFWA} e χ_{SAWA}) calculados pelo modelo clássico de Flory-Huggins e pelo modelo RPA para o sistema alginato-M/água, alginato-G/água e fibroína/água.



Para a determinação do parâmetro χ_{SFWA} , a equação 14 também foi utilizada. Ela é aplicada para sistemas binários, então, para que o modelo representasse melhor o sistema estudado, a fração mássica de água foi adicionada à equação 14 como uma constante (C), visto que a quantidade de água varia pouco na região do diagrama de fases estudada (de 97% a 99%). A

variação do parâmetro de Flory-Huggins para o par fibroína-alginato em função da fração volumétrica de fibroína de seda está mostrada na Figura 40.

Figura 40: Comparação do parâmetro de Flory-Huggins (χ_{SFSA}) calculado pelo modelo clássico de Flory-Huggins e pelo modelo RPA para o sistema fibroína, água e alginato-M (a) e fibroína, água e alginato-G (b) com diferentes frações volumétricas fixas de água.



Observa-se que os gráficos apresentam tendências similares, independente da fração volumétrica de água considerada. O valor do parâmetro de Flory-Huggins calculado por RPA se aproxima do valor obtido pelo modelo clássico à medida que a fração volumétrica de fibroína de seda aumenta e de alginato de sódio diminui. É possível, então, que os modelos

possuam resultados semelhantes para sistemas em que há uma dissociação completa entre os polímeros.

Os parâmetros de Flory-Huggins, geralmente, não variam com a fração mássica dos componentes do sistema. Por isso, a média dos valores dos parâmetros calculados pela equação do modelo RPA (Tabela 14) foi utilizada para o ajuste do modelo de Flory-Huggins. Os valores das frações mássicas teóricas (Tabelas A5 e A6) foram plotadas no diagrama ternário apresentado na Figura 41 e o valor de DMQ para cada sistema está indicado na Tabela 14. É possível notar que o desvio médio quadrático para o sistema com alginato-M apresentou um ajuste ligeiramente melhor do que utilizando o modelo de Flory-Huggins clássico, o que pode indicar que o modelo Flory-Huggins/RPA é mais adequado a sistemas compostos por polímeros que têm a tendência de, em solução, apresentar cadeias mais lineares.

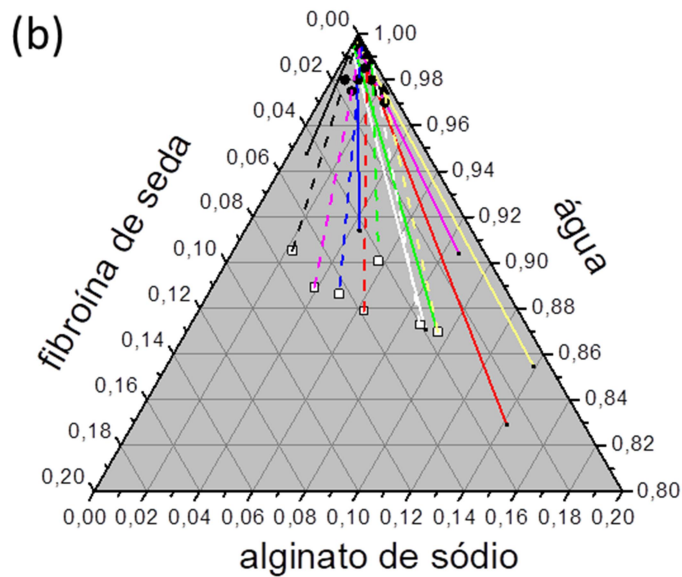
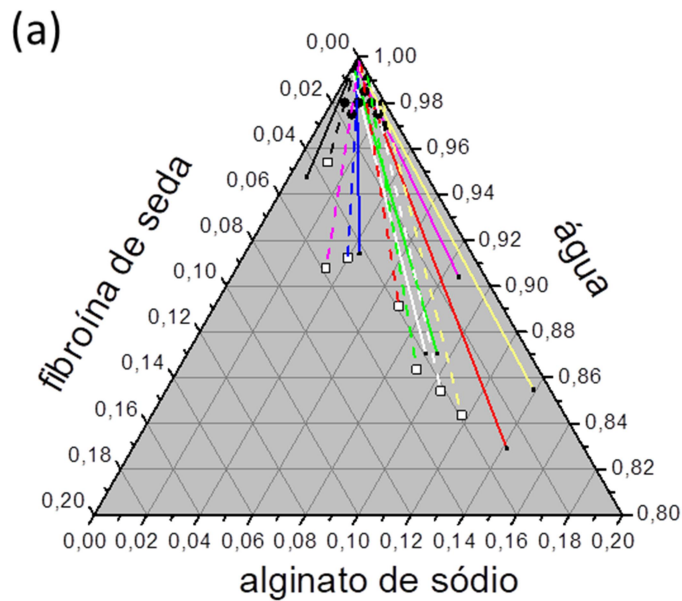
Tabela 14: Valores dos parâmetros de Flory-Huggins e do desvio médio quadrático (DMQ) para o sistema fibroína de seda, alginato de sódio e água calculado utilizando a equação do modelo RPA.

	X_{SASF}	X_{SFWA}	X_{SAWA}	DMQ
Alginato-M	0,0018	0,0815	0,0725	1,66
Alginato-G	0,0011	0,0815	0,0850	1,93

É importante frisar que os parâmetros calculados utilizando a equação do modelo RPA foram obtidos na condição de $S(Q=0)$, em que o fator de forma é igual a 1, o que torna o ajuste bastante simplificado. Nessa situação, a média do parâmetro de interação SF-SA é próxima a zero, o que indicaria a não interação entre os polímeros, o que é sabido que acontece. Seria interessante, então, investigar condições em que $Q \neq 0$ por meio da técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS) e verificar se há um melhor ajuste dos dados (HAMMOUDA, 1994; KRUIF; TUINIER, 2001; REICHART *et al.*, 1997). Ainda não é possível realizar essa análise no Brasil. Há um projeto em andamento para a construção do Reator Multipropósito Brasileiro (RMB) no estado de São Paulo, que vai utilizar feixe de nêutrons e possibilitar a

realização de SANS. Dessa forma, no futuro, será possível utilizar essa técnica para explorar o sistema fibroína-alginato.

Figura 41: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura (●), fase líquida (▲), fase sólida (□). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (-.-) e obtidas a partir do modelo de Flory-Huggins/RPA (-).



5.9.2 Modelos NRTL e UNIQUAC

Os dados experimentais de fração mássica também foram utilizados para calcular os parâmetros de interação dos modelos NRTL e UNIQUAC, mostrados na Tabela 15. Os valores de fração mássica calculados a partir dos modelos termodinâmicos estão mostrados nas Tabelas A5 a A8 do Apêndice A e foram plotados nos diagramas ternários mostrados nas Figura 42 e 45.

Para o modelo NRTL, os valores dos parâmetros ajustáveis ($A_{i,j}$ e $A_{j,i}$) e de não-aleatoriedade ($\alpha_{i,j}$) fibroína-alginato e alginato-água apresentaram valores significativamente diferentes ao alterar o tipo de alginato de sódio utilizado. O mesmo não foi observado para os parâmetros ajustáveis relativos ao par fibroína-água, que possuem valores diferentes, porém da mesma ordem de grandeza.

O modelo UNIQUAC apresentou um bom ajuste aos dados experimentais. Diferente do modelo NRTL, os parâmetros ajustáveis ($A_{i,j}$ e $A_{j,i}$) não apresentaram diferenças significativas com a mudança do tipo de alginato de sódio, com valores na mesma ordem de grandeza para ambos os sistemas, exceto o parâmetro $A_{1,2}$ referente ao parâmetro ajustável fibroína-alginato.

As diferenças entre os parâmetros observadas podem ser consequência da mudança de configuração da cadeia do alginato de sódio, visto que para o par fibroína-água não foram observadas mudanças significativas. A fração dos grupos M e G na cadeia do alginato de sódio ocasiona mudança na disposição dos grupos funcionais, conforme verificado nos experimentos de XPS. Entretanto, é importante reconhecer que a massa molar pode ter efeito na entropia de mistura, visto quanto maior o seu valor, maior é a cadeia polimérica e menores são as possibilidades de arranjo molecular. Esses dois fatores (disposição de blocos M/G e massa molar), podem acarretar modificações na interação entre o alginato de sódio e os outros componentes. Um trabalho futuro pode explorar a contribuição específica de cada um desses fatores na morfologia das blendas estudadas. Os modelos NRTL e UNIQUAC apresentaram valores de DMQ menores do que o modelo de Flory-Huggins e Flory-Huggins/RPA e o que melhor se adequou aos dados experimentais foi o UNIQUAC. É possível que isso ocorra, pois, o modelo UNIQUAC utiliza dados

de forma e volume das moléculas envolvidas no sistema para a determinação dos parâmetros ajustáveis, o que pode gerar melhores resultados.

Tabela 15: Valores dos parâmetros de interação e do desvio médio quadrático (DMQ) para o sistema ternário formado pela fibroína de seda (1), alginato de sódio (2) e água (3) para os modelos NRTL e UNIQUAC para os diferentes alginatos de sódio utilizados.

Modelo	Sistema	i,j	$A_{i,j}$	$A_{j,i}$	$\alpha_{i,j}$	DMQ
NRTL	Alginato-M	1,2	-3000,0	-2665,4	0,3760	1,07
		1,3	-1925,8	10392	0,2000	
		2,3	782,10	2971,2	0,4700	
	Alginato-G	1,2	935,01	-65,914	0,4700	0,99
		1,3	-2520,3	15031	0,2000	
		2,3	2183,4	-15,325	0,2598	
UNIQUAC	Alginato-M	1,2	8636,1	-332,16	-	0,56
		1,3	-553,24	990,73	-	
		2,3	-163,24	548,37	-	
	Alginato-G	1,2	809,31	-265,50	-	0,45
		1,3	-519,67	1052,9	-	
		2,3	-109,94	342,78	-	

Figura 42: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura (●), fase líquida (▲), fase sólida (□). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (-.-) e obtida a partir do modelo NRTL (-).

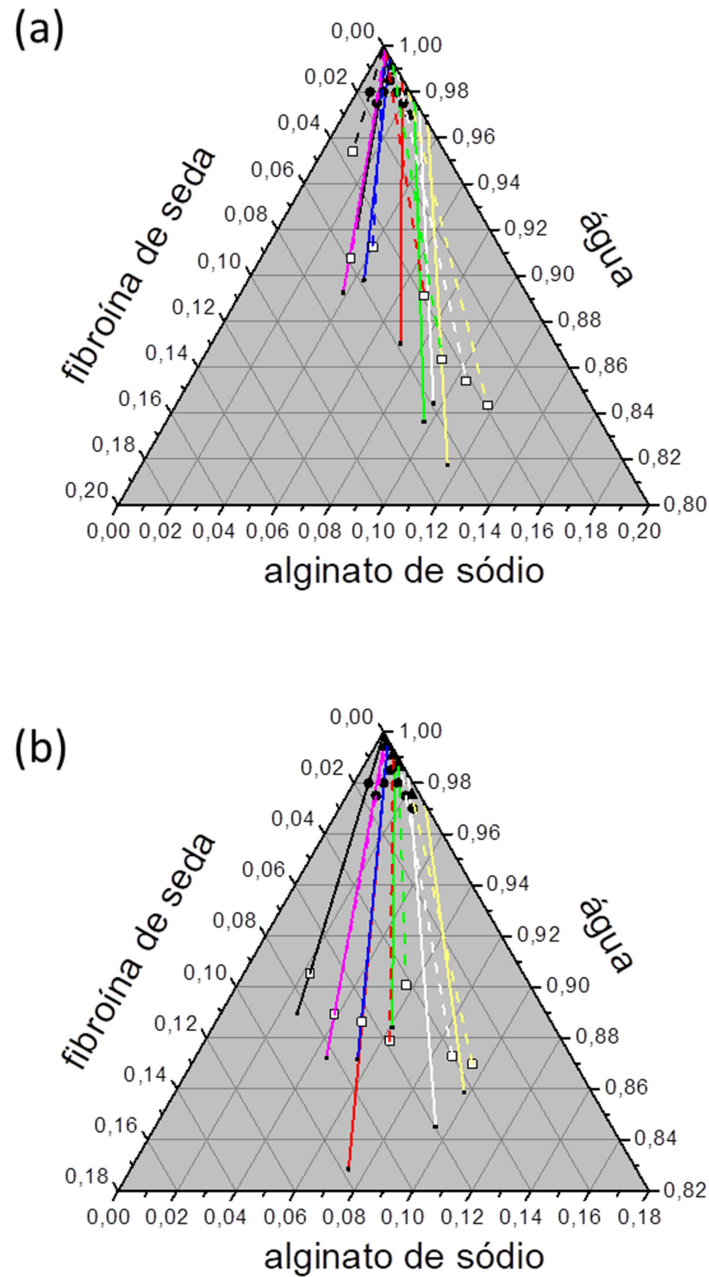
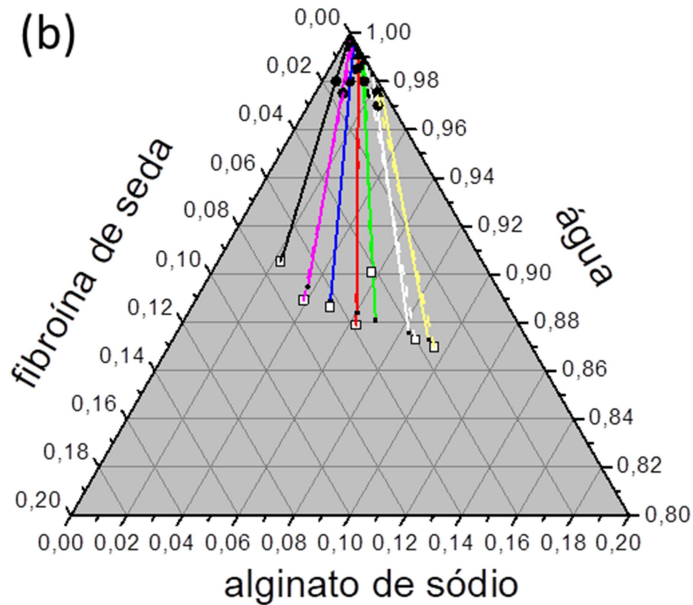
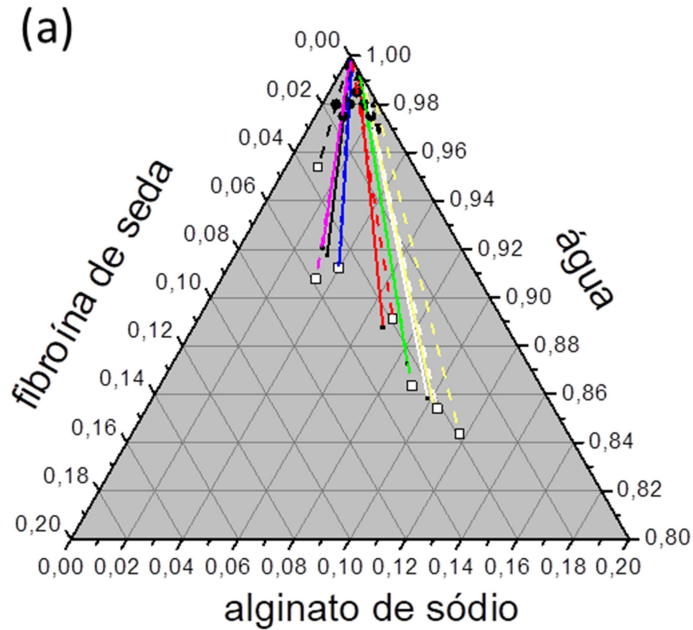


Figura 43: Diagrama de equilíbrio de fases do sistema fibroína de seda, água e alginato-M (a) e fibroína de seda, água e alginato-G (b) a 25 °C. Pontos iniciais de mistura (●), fase líquida (▲), fase sólida (□). Linhas de amarração obtida a partir dos dados experimentais (-.-) e obtida a partir do modelo UNIQUAC (-).



Uma outra abordagem termodinâmica para o sistema é a partir do estudo do efeito *salting out* do alginato de sódio no sistema ternário, o qual foi investigado pela Equação de Cohn, a qual pode ser utilizada para analisar

separações de fase do tipo líquido-sólido. Os parâmetros β e K_s obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais (Figura 44) para cada sistema estão mostrados na Tabela 16. O parâmetro K_s é chamado de constante de *salting out* e expressa a capacidade do alginato de sódio em induzir esse efeito. O valor obtido para o alginato-G foi superior ao alginato-M, o que sugere que ele possui maior capacidade de precipitar a fibroína de seda.

O fenômeno de *salting out* ocorre quando moléculas solúveis em água são excluídas da fase aquosa devido à alta concentração de um sal (TIMASHEFF, 1993). Apesar de não ser, por definição um sal, o alginato de sódio promove um efeito similar, pois por ser hidrofílico, o polímero permanece solvatado em água, estimulando as interações fibroína-fibroína e sua posterior precipitação. Um fenômeno semelhante é observado em sistemas fibroína-PEG (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Brada (2019) investigou sistemas de fibroína de seda e alginato de sódio e modelou os dados de equilíbrio à equação de Cohn, obtendo valores de K_s de mesma ordem de grandeza. A autora utilizou um mesmo alginato de sódio em diferentes pHs e verificou que o aumento do pH não causa efeitos significativos no fenômeno de *salting out*.

Além da diferença na proporção de grupos M e G, os alginatos de sódio utilizados diferem significativamente em relação à sua viscosidade e massa molar, que são maiores no alginato-G. É possível que, por possuir uma cadeia maior, o alginato-G tenha um maior volume molar, necessitando de mais moléculas de água para solvatá-lo e, por isso, o efeito de *salting out* seja mais pronunciado quando este é utilizado.

Franco e Pessoa Filho (2013) estabeleceram uma relação entre o segundo coeficiente virial osmótico e a Equação de Cohn, dada pela Equação 46. Por meio dela é possível determinar os valores do segundo coeficiente virial osmótico a partir da constante de *salting out*. Essa equação foi escolhida por utilizar parâmetros facilmente ajustáveis e por ela apresentar uma boa correlação em sistemas com diferentes tipos de proteínas (FRANCO, 2012).

$$\ln\left(\frac{B}{B^*}\right) = K_s(m_{sal} - m_{sal}^*) \quad \text{equação 46}$$

Onde B e B^* são coeficientes virial osmótico e coeficiente virial osmótico em um estado de referência, respectivamente; K_s é a constante de *salting out* obtida a partir da Equação de Cohn e m_{sal} e m_{sal}^* são as concentrações de sal em uma determinada condição e em um estado de referência.

A partir dessa relação, gráficos relacionando o coeficiente virial osmótico e a concentração de alginato de sódio foram obtidos, como mostrado na Figura 45. Esses gráficos podem ser utilizados para se analisar qualitativamente a tendência de mudança do coeficiente do virial com a mudança do alginato utilizado, visto que esse parâmetro não foi determinado experimentalmente.

Figura 44: Solubilidade da fibroína de seda em soluções de alginato-M (a) e alginato-G (b) a 25 °C (1). Linearização dos dados experimentais para obtenção dos parâmetros da Equação de Cohn (2).

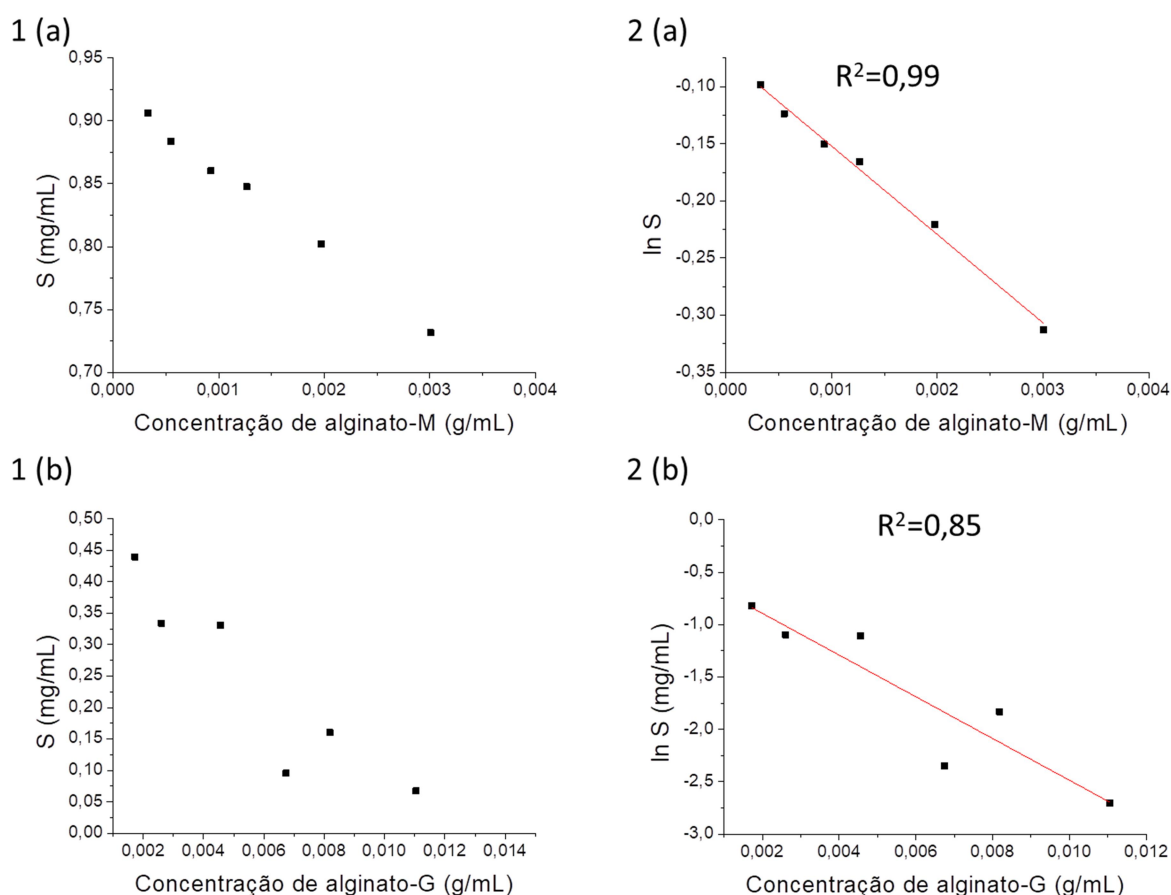
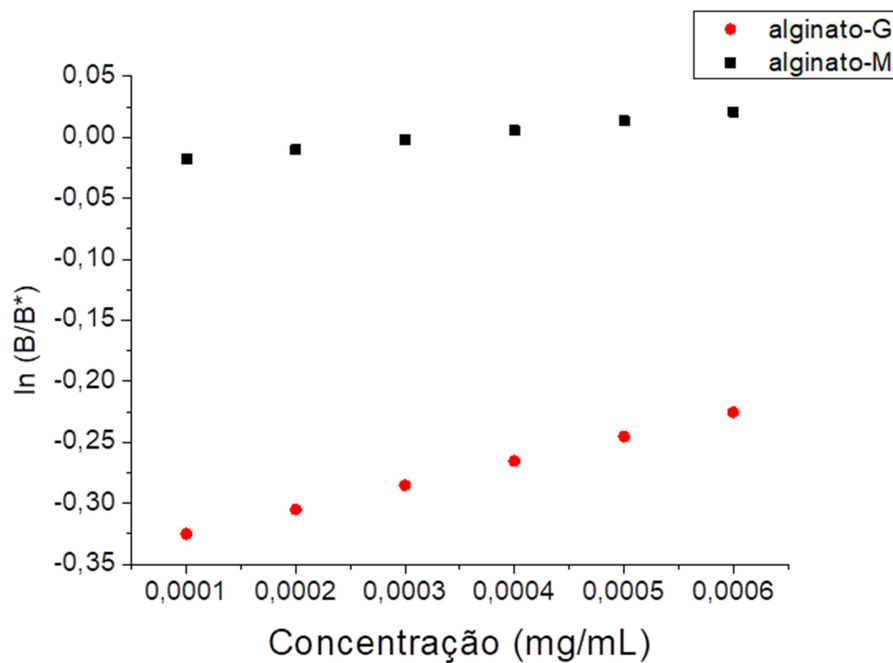


Tabela 16: Constante de solubilidade (K_s) e constante β obtidos por meio da linearização dos dados experimentais e ajuste à equação de Cohn.

Tipo de alginato	β	K_s (mL/g)	R^2
Alginato-M	-0,0746	77,4	0,99
Alginato-G	-0,4936	199,3	0,85

Figura 45: Segundo coeficiente virial osmótico teórico da fibroína de seda em soluções de alginato-M (■) e alginato-G (●) calculado utilizando a Equação 46, a partir dos dados obtidos da equação de Cohn.



CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Foi possível identificar diferenças entre a composição dos alginatos de sódio utilizados e que a proporção entre grupos M e G tem influência significativa no mecanismo de separação de fases tanto em solução como no estado sólido (membranas) e no equilíbrio termodinâmico das blendas de fibroína de seda e alginato de sódio.

Alginato-M, proveniente de algas marinhas da espécie *Macrocystis pyrifera*, apresentaram maior quantidade de grupos manurônicos (M) e menor massa molar quando comparados ao alginato-G, proveniente de algas marinhas da espécie *Laminaria hyperborea*, que apresentou maior quantidade de grupos gulurônicos (G). Além da diferença na proporção de grupos M e G e massa molar, os alginatos de sódio apresentaram mudanças na quantidade de grupos carboxílicos desprotonados, o que pôde ser verificado por DLS e XPS. Para a fibroína de seda, foi possível verificar que, após a diálise, ainda há traços de íons Ca^{2+} em sua solução.

Com auxílio da técnica de espalhamento de luz estático foi possível acompanhar a mudança do perfil de espalhamento de luz com a evolução cinética da separação de fases e formação da fase sólida. Diferenças entre as blendas preparadas com alginato-M e alginato-G foram identificadas, tanto para as blendas em solução quanto para as membranas. As blendas em solução preparadas com alginato-M apresentaram uma maior região em que o espalhamento de luz do tipo halo foi identificado, quando comparado com as blendas preparadas utilizando alginato-G, sugerindo a presença de fases mais organizadas, com domínios de fase periódicos. Já para as membranas, o perfil de espalhamento foi modificado e as blendas preparadas com alginato-G apresentaram espalhamento de luz com a presença de halo, sugerindo que a remoção do solvente pode alterar a organização das fases. Visto que o alginato-G possui mais grupos gulurônicos, capazes de formar estruturas auto-organizadas do tipo caixa de ovos, é possível que um aumento na concentração local de íons Ca^{+2} (presente na solução de fibroína de seda) favoreça a formação de fases com domínios periódicos.

Capítulo 6: Conclusão

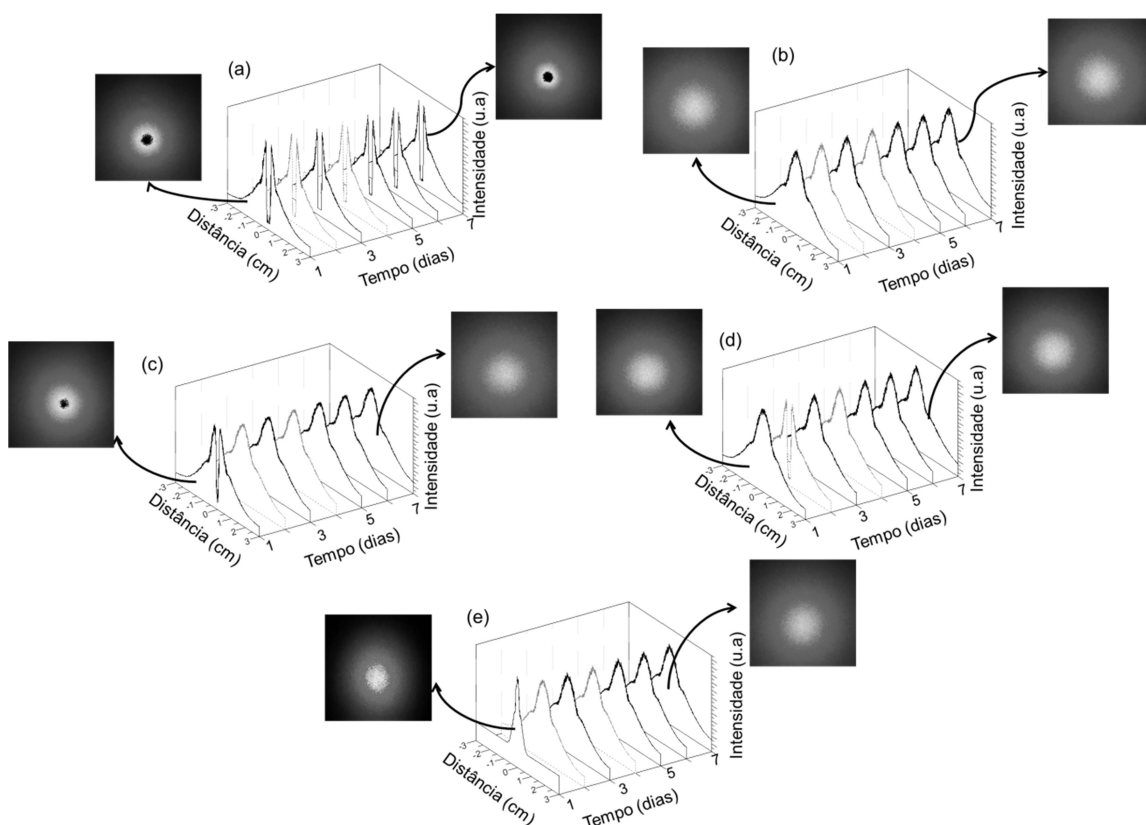
Com os dados de equilíbrio foi possível obter diagramas de fases e realizar ajustes aos modelos termodinâmicos de Flory-Huggins, RPA, NRTL e UNIQUAC, além de verificar o efeito *salting out* de cada alginato de sódio a partir da equação de Cohn. O modelo termodinâmico que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais de equilíbrio foi o UNIQUAC, com menor valor de desvio médio quadrático. Para os modelos NRTL e UNIQUAC foi possível observar diferenças nos parâmetros de interação entre os sistemas que utilizaram alginato-M e alginato-G, indicando que esses modelos termodinâmicos foram mais sensíveis às variações dos alginatos de sódio utilizados em cada sistema. Em relação aos parâmetros de solubilidade, o alginato-G apresentou constante K_s maior, sendo mais eficiente em precipitar a fibroína de seda.

Os resultados obtidos representam um avanço no estudo termodinâmico de blendas utilizando fibroína de seda e alginato de sódio, polímeros naturais que têm alto potencial de aplicação em diversos biomateriais. Eles corroboram estudos sobre a importância da fonte dos polímeros naturais e suas consequências sob os biomateriais obtidos a partir deles. Espera-se que os dados apresentados sejam utilizados como base e guia para outros estudos, sejam eles voltados para aplicação da fibroína em biomateriais ou estudos teóricos de interação dessa proteína com outras macromoléculas.

Considerando o que foi abordado nessa tese, sugere-se que os próximos trabalhos sobre as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio explorem a influência da massa molar, da temperatura e do pH no equilíbrio de fases. Além disso, devido aos biopolímeros apresentarem carga em solução, a introdução de polieletrólitos, como dextran sulfato de sódio (DSS), nesse sistema pode ser interessante. É possível que ocorra mudanças nas interações polímero-polímero, trazendo maior complexidade ao estudo e alterando o equilíbrio termodinâmico. A utilização de algumas técnicas também podem trazer mais informações a este sistema, por exemplo, o uso do método de gota suspensa para explorar o mecanismo de separação de fases e a utilização de um microscópio de luz polarizada para explorar a separação líquido-líquido que foi observada.

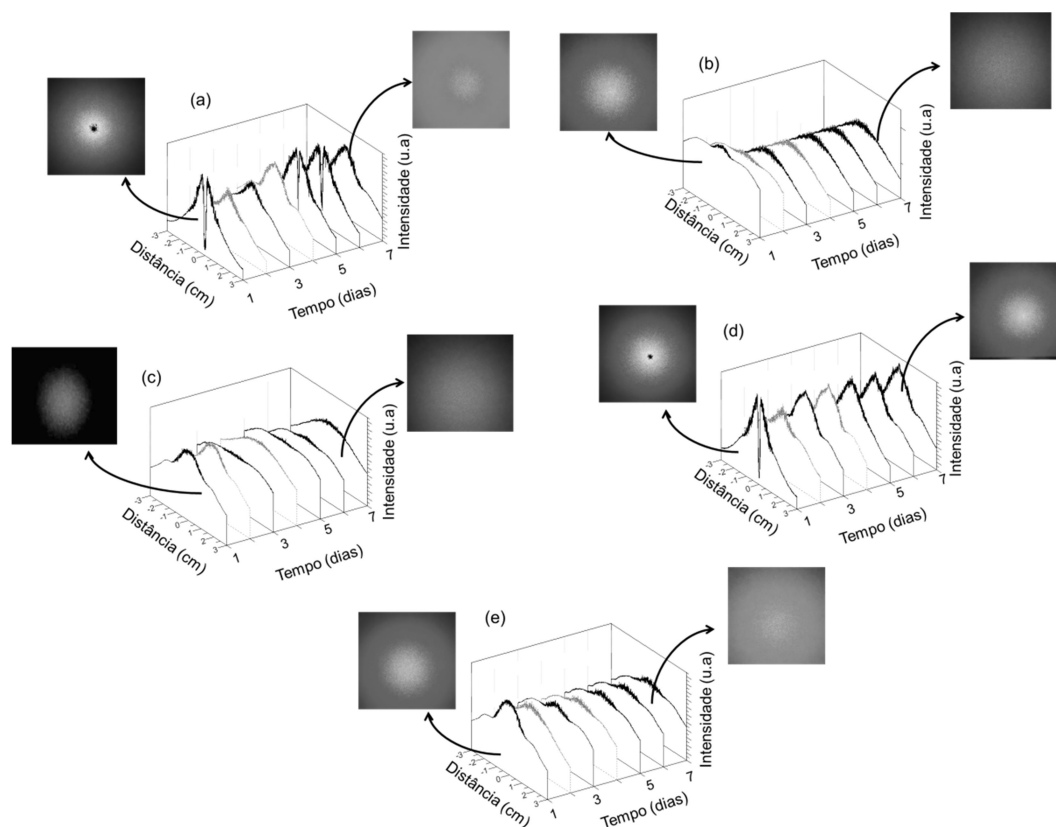
CAPÍTULO 7: APÊNDICE A – Informações suplementares para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio

Figura A 1: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas SF_{1,0}SA_{0,5}WA_{98,5} (a), SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈ (b), SF_{0,5}SA_{1,0}WA_{98,5} (c), SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈ (d), SF_{1,5}SA_{1,0}WA_{97,5} (e) preparadas com alginato-M. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.



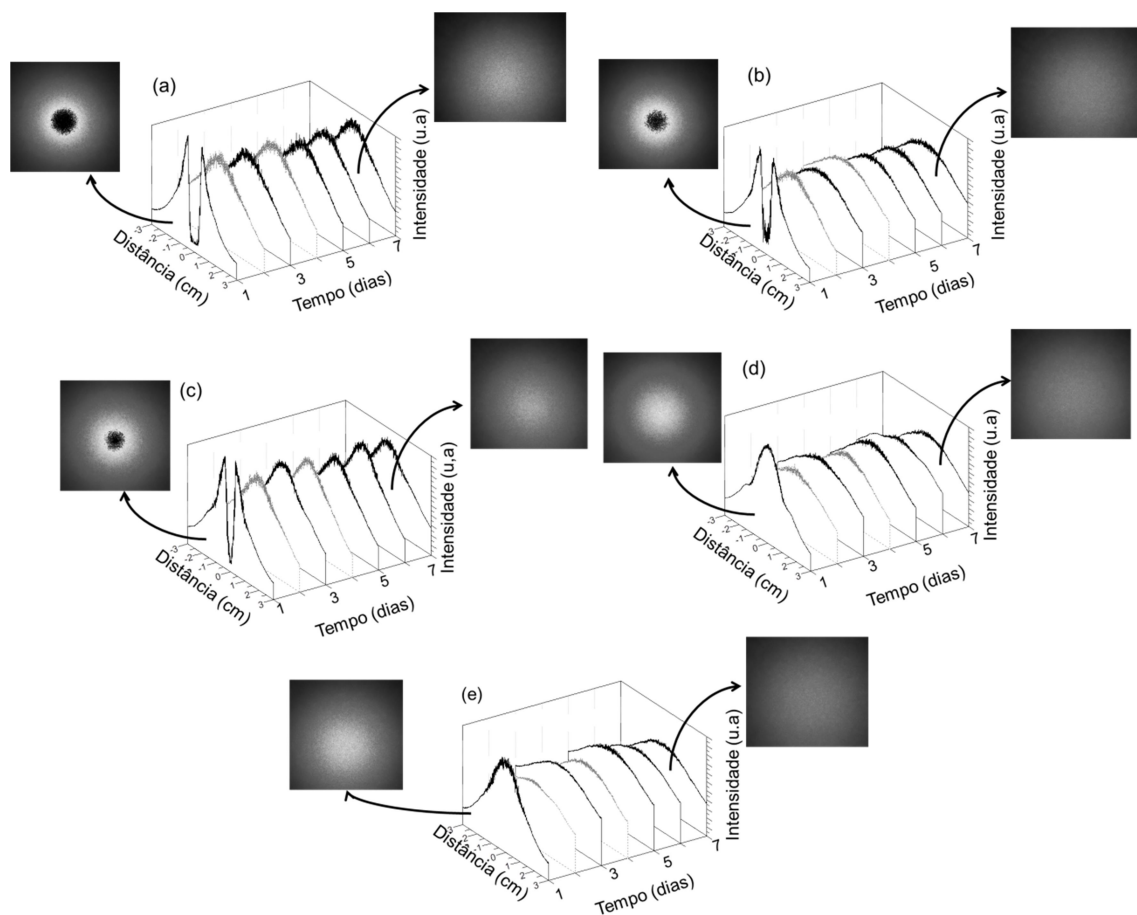
Capítulo 7: Apêndice A

Figura A 2 Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas $SF_{0,5}SA_{1,5}WA_{98}$ (a), $SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5}$ (b), $SF_{1,5}SA_{1,5}WA_{97}$ (c), $SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5}$ (d), $SF_{1,0}SA_{2,0}WA_{97}$ (e) preparadas com alginato-M. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.



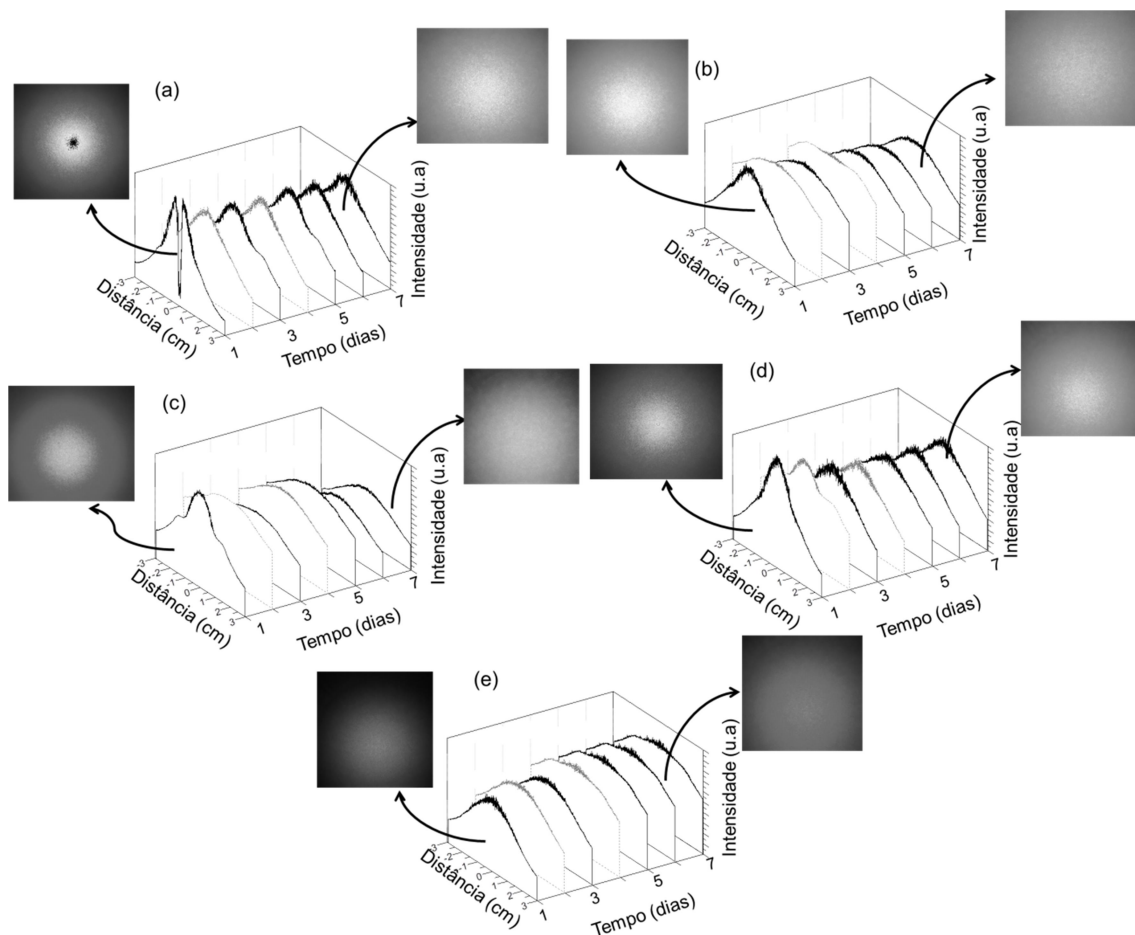
Capítulo 7: Apêndice A

Figura A 3: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas SF_{1,0}SA_{0,5}WA_{98,5} (a), SF_{1,5}SA_{0,5}WA₉₈ (b), SF_{0,5}SA_{1,0}WA_{98,5} (c), SF_{1,0}SA_{1,0}WA₉₈ (d), SF_{1,5}SA_{1,0}WA_{97,5} (e) preparadas com alginato-G. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.



Capítulo 7: Apêndice A

Figura A 4: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas SF_{0,5}SA_{1,5}WA₉₈ (a), SF_{1,0}SA_{1,5}WA_{97,5} (b), SF_{1,5}SA_{1,5}WA₉₇ (c), SF_{0,5}SA_{2,0}WA_{97,5} (d), SF_{1,0}SA_{2,0}WA₉₇ (e) preparadas com alginato-G. As imagens apresentadas foram obtidas nos dias 1 e 7.



Capítulo 7: Apêndice A

Tabela A 1: Média e erro médio das frações mássicas de fibroína de seda, alginato-M e água das fases líquida e sólida obtidas experimentalmente (n=3).

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$1,77 \times 10^{-4} \pm 1,13 \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-3} \pm 1,49 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 2,24 \times 10^{-3}$	$2,51 \times 10^{-2} \pm 8,54 \times 10^{-3}$	$1,79 \times 10^{-2} \pm 4,75 \times 10^{-3}$	$0,96 \pm 1,72 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$1,38 \times 10^{-4} \pm 9,85 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-3} \pm 1,73 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 1,63 \times 10^{-3}$	$3,68 \times 10^{-2} \pm 5,39 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-2} \pm 2,97 \times 10^{-3}$	$0,95 \pm 3,30 \times 10^{-3}$
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$6,31 \times 10^{-4} \pm 7,76 \times 10^{-4}$	$4,81 \times 10^{-4} \pm 1,76 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 4,85 \times 10^{-4}$	$7,25 \times 10^{-2} \pm 4,16 \times 10^{-2}$	$2,21 \times 10^{-2} \pm 9,19 \times 10^{-3}$	$0,91 \pm 3,24 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$2,09 \times 10^{-4} \pm 1,91 \times 10^{-4}$	$2,34 \times 10^{-3} \pm 5,39 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 7,25 \times 10^{-4}$	$4,06 \times 10^{-2} \pm 2,19 \times 10^{-3}$	$6,61 \times 10^{-2} \pm 5,18 \times 10^{-3}$	$0,89 \pm 2,99 \times 10^{-3}$
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$1,67 \times 10^{-4} \pm 5,08 \times 10^{-5}$	$1,74 \times 10^{-3} \pm 1,54 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 2,09 \times 10^{-3}$	$4,78 \times 10^{-2} \pm 3,86 \times 10^{-2}$	$3,98 \times 10^{-2} \pm 2,80 \times 10^{-2}$	$0,91 \pm 6,66 \times 10^{-2}$
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$2,42 \times 10^{-4} \pm 3,67 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^{-3} \pm 1,29 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 1,76 \times 10^{-3}$	$5,84 \times 10^{-2} \pm 3,79 \times 10^{-2}$	$3,39 \times 10^{-2} \pm 1,87 \times 10^{-2}$	$0,91 \pm 5,66 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$6,55 \times 10^{-4} \pm 6,11 \times 10^{-4}$	$7,92 \times 10^{-3} \pm 4,27 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 3,66 \times 10^{-3}$	$4,61 \times 10^{-2} \pm 5,64 \times 10^{-3}$	$9,04 \times 10^{-2} \pm 3,17 \times 10^{-2}$	$0,86 \pm 2,60 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$2,08 \times 10^{-4} \pm 2,01 \times 10^{-4}$	$7,23 \times 10^{-3} \pm 6,15 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 5,93 \times 10^{-3}$	$5,94 \times 10^{-2} \pm 1,82 \times 10^{-2}$	$6,36 \times 10^{-2} \pm 4,41 \times 10^{-2}$	$0,88 \pm 6,24 \times 10^{-2}$
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$6,46 \times 10^{-4} \pm 6,44 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-2} \pm 2,09 \times 10^{-3}$	$0,98 \pm 2,73 \times 10^{-3}$	$7,74 \times 10^{-2} \pm 1,60 \times 10^{-2}$	$2,73 \times 10^{-2} \pm 4,29 \times 10^{-3}$	$0,89 \pm 1,17 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$3,29 \times 10^{-4} \pm 2,89 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-2} \pm 6,32 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 6,03 \times 10^{-3}$	$3,92 \times 10^{-2} \pm 2,69 \times 10^{-3}$	$9,03 \times 10^{-2} \pm 4,77 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 5,04 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$3,59 \times 10^{-4} \pm 1,49 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-2} \pm 6,30 \times 10^{-3}$	$0,98 \pm 6,32 \times 10^{-3}$	$7,05 \times 10^{-2} \pm 2,65 \times 10^{-2}$	$5,58 \times 10^{-2} \pm 6,96 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 4,32 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$3,18 \times 10^{-4} \pm 3,77 \times 10^{-4}$	$1,58 \times 10^{-2} \pm 4,72 \times 10^{-3}$	$0,98 \pm 1,01 \times 10^{-2}$	$4,88 \times 10^{-2} \pm 6,37 \times 10^{-3}$	$1,08 \times 10^{-1} \pm 4,50 \times 10^{-2}$	$0,84 \pm 5,14 \times 10^{-2}$

Capítulo 7: Apêndice A

Tabela A 2: Média e erro médio das frações mássicas de fibroína de seda, alginato-G e água das fases líquida e sólida obtidas experimentalmente (n=3).

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$5,45 \times 10^{-4} \pm 3,92 \times 10^{-4}$	$9,70 \times 10^{-4} \pm 5,30 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 8,48 \times 10^{-4}$	$4,06 \times 10^{-2} \pm 7,90 \times 10^{-3}$	$3,77 \times 10^{-2} \pm 5,53 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 1,34 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$6,33 \times 10^{-4} \pm 4,71 \times 10^{-4}$	$5,44 \times 10^{-4} \pm 3,07 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 7,68 \times 10^{-4}$	$5,68 \times 10^{-2} \pm 1,19 \times 10^{-2}$	$2,74 \times 10^{-2} \pm 5,49 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 1,74 \times 10^{-3}$
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$9,38 \times 10^{-4} \pm 1,12 \times 10^{-3}$	$7,37 \times 10^{-4} \pm 4,96 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 1,59 \times 10^{-3}$	$7,23 \times 10^{-2} \pm 2,37 \times 10^{-2}$	$2,23 \times 10^{-2} \pm 6,79 \times 10^{-3}$	$0,91 \pm 3,04 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$1,34 \times 10^{-3} \pm 1,86 \times 10^{-3}$	$7,84 \times 10^{-3} \pm 5,97 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 6,52 \times 10^{-4}$	$5,84 \times 10^{-2} \pm 5,03 \times 10^{-2}$	$6,26 \times 10^{-2} \pm 1,73 \times 10^{-2}$	$0,88 \pm 6,25 \times 10^{-3}$
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$1,75 \times 10^{-3} \pm 1,49 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-3} \pm 8,57 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 8,19 \times 10^{-4}$	$6,42 \times 10^{-2} \pm 1,39 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-2} \pm 4,59 \times 10^{-3}$	$0,89 \pm 1,44 \times 10^{-2}$
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$1,77 \times 10^{-3} \pm 2,30 \times 10^{-3}$	$3,39 \times 10^{-3} \pm 1,53 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 2,00 \times 10^{-3}$	$7,20 \times 10^{-2} \pm 1,13 \times 10^{-2}$	$3,87 \times 10^{-2} \pm 6,30 \times 10^{-3}$	$0,89 \pm 1,08 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$1,69 \times 10^{-3} \pm 2,13 \times 10^{-3}$	$1,21 \times 10^{-2} \pm 6,26 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 8,39 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-2} \pm 1,32 \times 10^{-2}$	$5,73 \times 10^{-2} \pm 5,03 \times 10^{-2}$	$0,90 \pm 6,35 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$1,12 \times 10^{-3} \pm 1,33 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-2} \pm 2,67 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 4,00 \times 10^{-3}$	$7,34 \times 10^{-2} \pm 6,21 \times 10^{-3}$	$4,58 \times 10^{-2} \pm 1,63 \times 10^{-2}$	$0,88 \pm 2,25 \times 10^{-2}$
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$1,08 \times 10^{-3} \pm 8,77 \times 10^{-4}$	$6,09 \times 10^{-3} \pm 4,37 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 3,50 \times 10^{-3}$	$8,02 \times 10^{-2} \pm 3,55 \times 10^{-2}$	$5,51 \times 10^{-2} \pm 5,14 \times 10^{-3}$	$0,86 \pm 4,07 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$3,62 \times 10^{-4} \pm 2,74 \times 10^{-4}$	$1,13 \times 10^{-2} \pm 7,42 \times 10^{-4}$	$0,99 \pm 1,02 \times 10^{-3}$	$4,02 \times 10^{-2} \pm 6,91 \times 10^{-3}$	$8,69 \times 10^{-2} \pm 3,20 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 3,89 \times 10^{-2}$
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$9,20 \times 10^{-4} \pm 7,10 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-2} \pm 6,58 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 7,29 \times 10^{-3}$	$5,97 \times 10^{-2} \pm 2,46 \times 10^{-3}$	$7,05 \times 10^{-2} \pm 2,31 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 2,06 \times 10^{-2}$
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$2,69 \times 10^{-3} \pm 2,25 \times 10^{-3}$	$2,19 \times 10^{-2} \pm 5,93 \times 10^{-3}$	$0,97 \pm 3,68 \times 10^{-3}$	$3,49 \times 10^{-2} \pm 2,33 \times 10^{-2}$	$9,52 \times 10^{-1} \pm 3,44 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 1,11 \times 10^{-2}$

Tabela A 3: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	4,48 x10 ⁻³	7,82 x10 ⁻³	0,99	3,00 x10 ⁻²	2,67 x10 ⁻²	0,94
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	5,02 x10 ⁻³	4,30 x10 ⁻³	0,99	4,51 x10 ⁻²	1,97 x10 ⁻²	0,93
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	6,47 x10 ⁻³	1,10 x10 ⁻³	0,99	6,65 x10 ⁻²	3,79 x10 ⁻²	0,89
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	2,63 x10 ⁻³	7,42 x10 ⁻³	0,99	5,59 x10 ⁻²	4,75 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	2,93 x10 ⁻³	4,96 x10 ⁻³	0,99	6,03 x10 ⁻²	4,51 x10 ⁻²	0,89
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	4,62 x10 ⁻³	2,63 x10 ⁻³	0,99	6,37 x10 ⁻²	4,20 x10 ⁻²	0,89
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	2,38 x10 ⁻³	1,27 x10 ⁻²	0,98	5,06 x10 ⁻²	5,19 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	3,37 x10 ⁻³	4,30 x10 ⁻³	0,99	8,51 x10 ⁻²	6,06 x10 ⁻²	0,85
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	2,03 x10 ⁻³	3,50 x10 ⁻³	0,99	8,42 x10 ⁻²	6,06 x10 ⁻²	0,85
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	1,65 x10 ⁻³	1,74 x10 ⁻²	0,98	4,14 x10 ⁻²	5,63 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	2,22 x10 ⁻³	6,60 x10 ⁻³	0,99	6,81 x10 ⁻²	8,68 x10 ⁻²	0,84
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	1,96 x10 ⁻³	2,14 x10 ⁻²	0,98	3,31 x10 ⁻²	5,90 x10 ⁻²	0,91

Tabela A 4: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	4,48 x10 ⁻³	7,82 x10 ⁻³	0,99	3,00 x10 ⁻²	2,67 x10 ⁻²	0,94
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	5,02 x10 ⁻³	4,30 x10 ⁻³	0,99	4,51 x10 ⁻²	1,97 x10 ⁻²	0,93
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	6,47 x10 ⁻³	1,10 x10 ⁻³	0,99	6,65 x10 ⁻²	3,79 x10 ⁻²	0,89
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	2,63 x10 ⁻³	7,42 x10 ⁻³	0,99	5,59 x10 ⁻²	4,75 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	2,93 x10 ⁻³	4,96 x10 ⁻³	0,99	6,03 x10 ⁻²	4,51 x10 ⁻²	0,89
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	4,62 x10 ⁻³	2,63 x10 ⁻³	0,99	6,37 x10 ⁻²	4,20 x10 ⁻²	0,89
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	2,38 x10 ⁻³	1,27 x10 ⁻²	0,98	5,06 x10 ⁻²	5,19 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	3,37 x10 ⁻³	4,30 x10 ⁻³	0,99	8,51 x10 ⁻²	6,06 x10 ⁻²	0,85
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	2,03 x10 ⁻³	3,50 x10 ⁻³	0,99	8,42 x10 ⁻²	6,06 x10 ⁻²	0,85
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	1,65 x10 ⁻³	1,74 x10 ⁻²	0,98	4,14 x10 ⁻²	5,63 x10 ⁻²	0,90
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	2,22 x10 ⁻³	6,60 x10 ⁻³	0,99	6,81 x10 ⁻²	8,68 x10 ⁻²	0,84
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	1,96 x10 ⁻³	2,14 x10 ⁻²	0,98	3,31 x10 ⁻²	5,90 x10 ⁻²	0,91

Tabela A 5: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins/RPA.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$1,18 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-3}$	0,99	$3,11 \times 10^{-2}$	$6,73 \times 10^{-3}$	0,96
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$8,83 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,99	$4,36 \times 10^{-2}$	$8,89 \times 10^{-2}$	0,95
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$8,89 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$	0,99	$4,57 \times 10^{-2}$	$6,71 \times 10^{-3}$	0,95
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$1,64 \times 10^{-3}$	$8,36 \times 10^{-5}$	0,99	$2,92 \times 10^{-2}$	$1,42 \times 10^{-1}$	0,83
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$3,27 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-3}$	0,99	$4,24 \times 10^{-2}$	$4,35 \times 10^{-2}$	0,91
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$2,61 \times 10^{-3}$	$1,46 \times 10^{-3}$	0,99	$9,92 \times 10^{-3}$	$8,62 \times 10^{-2}$	0,90
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$4,06 \times 10^{-3}$	$5,71 \times 10^{-4}$	0,99	$3,49 \times 10^{-2}$	$9,46 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$5,23 \times 10^{-3}$	$5,01 \times 10^{-4}$	0,99	$5,94 \times 10^{-2}$	$6,36 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$6,92 \times 10^{-3}$	$7,12 \times 10^{-4}$	0,99	$7,74 \times 10^{-2}$	$2,73 \times 10^{-2}$	0,86
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$5,23 \times 10^{-3}$	$6,24 \times 10^{-4}$	0,99	$3,92 \times 10^{-2}$	$9,03 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$5,89 \times 10^{-3}$	$4,83 \times 10^{-4}$	0,99	$7,05 \times 10^{-2}$	$5,58 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$1,96 \times 10^{-3}$	$3,52 \times 10^{-4}$	0,99	$6,26 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-1}$	0,85

Tabela A 6: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo de Flory-Huggins/RPA.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$1,18 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-3}$	0,99	$3,11 \times 10^{-2}$	$6,73 \times 10^{-3}$	0,96
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$8,83 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,99	$4,36 \times 10^{-2}$	$8,89 \times 10^{-2}$	0,95
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$8,89 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$	0,99	$4,57 \times 10^{-2}$	$6,71 \times 10^{-3}$	0,95
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$1,72 \times 10^{-3}$	$3,08 \times 10^{-5}$	0,99	$2,92 \times 10^{-2}$	$1,42 \times 10^{-1}$	0,83
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$3,27 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-3}$	0,99	$4,24 \times 10^{-2}$	$4,35 \times 10^{-2}$	0,91
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$2,61 \times 10^{-3}$	$1,46 \times 10^{-3}$	0,99	$9,92 \times 10^{-3}$	$8,62 \times 10^{-2}$	0,90
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$4,06 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^{-4}$	0,99	$3,49 \times 10^{-2}$	$9,46 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$5,23 \times 10^{-3}$	$3,25 \times 10^{-4}$	0,99	$5,94 \times 10^{-2}$	$6,36 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$6,92 \times 10^{-3}$	$3,25 \times 10^{-4}$	0,99	$7,74 \times 10^{-2}$	$2,73 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$5,23 \times 10^{-3}$	$1,93 \times 10^{-4}$	0,99	$3,92 \times 10^{-2}$	$9,03 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$5,89 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-4}$	0,99	$7,05 \times 10^{-2}$	$5,58 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$1,96 \times 10^{-3}$	$9,24 \times 10^{-5}$	0,99	$6,26 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-1}$	0,85

Tabela A 7: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo NRTL.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$1,44 \times 10^{-5}$	$4,60 \times 10^{-3}$	0,99	$3,11 \times 10^{-2}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,95
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$5,70 \times 10^{-6}$	$2,35 \times 10^{-3}$	0,99	$4,19 \times 10^{-2}$	$1,48 \times 10^{-2}$	0,95
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$1,45 \times 10^{-6}$	$3,01 \times 10^{-3}$	0,99	$4,92 \times 10^{-2}$	$2,95 \times 10^{-2}$	0,92
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$4,83 \times 10^{-9}$	$1,42 \times 10^{-2}$	0,98	$5,83 \times 10^{-2}$	$7,13 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$5,48 \times 10^{-8}$	$4,69 \times 10^{-3}$	0,99	$5,82 \times 10^{-2}$	$4,37 \times 10^{-2}$	0,90
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$7,84 \times 10^{-8}$	$2,25 \times 10^{-3}$	0,99	$6,88 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$1,12 \times 10^{-9}$	$2,32 \times 10^{-2}$	0,98	$6,66 \times 10^{-2}$	$9,72 \times 10^{-2}$	0,84
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$6,09 \times 10^{-9}$	$1,55 \times 10^{-2}$	0,98	$7,75 \times 10^{-2}$	$6,72 \times 10^{-2}$	0,85
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$1,26 \times 10^{-8}$	$3,91 \times 10^{-2}$	0,99	$7,47 \times 10^{-2}$	$3,56 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$4,36 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-2}$	0,97	$5,89 \times 10^{-2}$	$9,67 \times 10^{-2}$	0,84
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$9,78 \times 10^{-9}$	$1,43 \times 10^{-2}$	0,98	$7,20 \times 10^{-2}$	$4,39 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$1,66 \times 10^{-9}$	$3,33 \times 10^{-2}$	0,97	$6,71 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-1}$	0,82

Tabela A 8: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo NRTL.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{0,5} SA _{0,5} WA ₉₉	$2,42 \times 10^{-6}$	$4,34 \times 10^{-2}$	0,99	$4,94 \times 10^{-2}$	$4,03 \times 10^{-2}$	0,91
SF _{1,0} SA _{0,5} WA _{98,5}	$2,27 \times 10^{-6}$	$3,91 \times 10^{-4}$	0,99	$6,39 \times 10^{-2}$	$1,34 \times 10^{-2}$	0,92
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$8,94 \times 10^{-8}$	$4,49 \times 10^{-4}$	0,99	$8,45 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$1,54 \times 10^{-10}$	$3,17 \times 10^{-3}$	0,99	$9,76 \times 10^{-2}$	$7,39 \times 10^{-2}$	0,83
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$6,66 \times 10^{-9}$	$3,32 \times 10^{-3}$	0,99	$7,30 \times 10^{-2}$	$5,55 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$9,05 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-2}$	0,99	$8,33 \times 10^{-2}$	$4,45 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$2,70 \times 10^{-8}$	$7,58 \times 10^{-2}$	0,99	$5,50 \times 10^{-2}$	$6,08 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{1,0} SA _{1,5} WA _{97,5}	$1,31 \times 10^{-6}$	$2,14 \times 10^{-4}$	0,99	$7,25 \times 10^{-2}$	$1,18 \times 10^{-2}$	0,91
SF _{1,5} SA _{1,5} WA ₉₇	$2,04 \times 10^{-10}$	$2,20 \times 10^{-3}$	0,99	$9,80 \times 10^{-2}$	$6,44 \times 10^{-2}$	0,84
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$2,51 \times 10^{-9}$	$1,70 \times 10^{-2}$	0,98	$5,96 \times 10^{-2}$	$9,51 \times 10^{-2}$	0,84
SF _{1,0} SA _{2,0} WA ₉₇	$5,12 \times 10^{-10}$	$6,96 \times 10^{-3}$	0,99	$7,56 \times 10^{-2}$	$7,85 \times 10^{-2}$	0,84
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$3,78 \times 10^{-8}$	$2,83 \times 10^{-2}$	0,97	$4,33 \times 10^{-2}$	$9,81 \times 10^{-2}$	0,86

Tabela A 9: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-M e água calculados pelo modelo Uniquac.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$2,26 \times 10^{-3}$	$2,14 \times 10^{-3}$	0,99	$4,94 \times 10^{-2}$	$3,31 \times 10^{-2}$	0,92
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$7,80 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-3}$	0,99	$4,45 \times 10^{-2}$	$6,80 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$1,63 \times 10^{-3}$	$2,78 \times 10^{-3}$	0,99	$4,89 \times 10^{-2}$	$4,06 \times 10^{-2}$	0,91
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$2,66 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-3}$	0,99	$4,96 \times 10^{-2}$	$2,98 \times 10^{-2}$	0,92
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$6,26 \times 10^{-4}$	$8,91 \times 10^{-3}$	0,99	$4,31 \times 10^{-2}$	$8,42 \times 10^{-2}$	0,87
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$5,47 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-2}$	0,99	$4,30 \times 10^{-2}$	$9,88 \times 10^{-2}$	0,86
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$5,29 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-2}$	0,99	$4,31 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-1}$	0,85

Tabela A 10: Valores teóricos de fração mássica de fibroína de seda, alginato-G e água calculados pelo modelo Uniquac.

Blendas	Fase líquida			Fase sólida		
	SF	SA	WA	SF	SA	WA
SF _{1,5} SA _{0,5} WA ₉₈	$1,33 \times 10^{-3}$	$5,11 \times 10^{-4}$	0,99	$7,26 \times 10^{-2}$	$2,28 \times 10^{-2}$	0,90
SF _{0,5} SA _{1,0} WA _{98,5}	$4,35 \times 10^{-4}$	$6,16 \times 10^{-3}$	0,99	$5,54 \times 10^{-2}$	$6,05 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{1,0} SA _{1,0} WA ₉₈	$5,23 \times 10^{-4}$	$3,21 \times 10^{-3}$	0,99	$6,24 \times 10^{-2}$	$4,83 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{1,5} SA _{1,0} WA _{97,5}	$7,22 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-3}$	0,99	$6,77 \times 10^{-2}$	$3,76 \times 10^{-2}$	0,89
SF _{0,5} SA _{1,5} WA ₉₈	$4,34 \times 10^{-4}$	$9,10 \times 10^{-3}$	0,99	$5,03 \times 10^{-2}$	$6,87 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{0,5} SA _{2,0} WA _{97,5}	$5,44 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-2}$	0,98	$4,10 \times 10^{-2}$	$8,32 \times 10^{-2}$	0,88
SF _{0,5} SA _{2,5} WA ₉₇	$6,91 \times 10^{-4}$	$2,28 \times 10^{-2}$	0,98	$3,56 \times 10^{-2}$	$9,17 \times 10^{-2}$	0,87

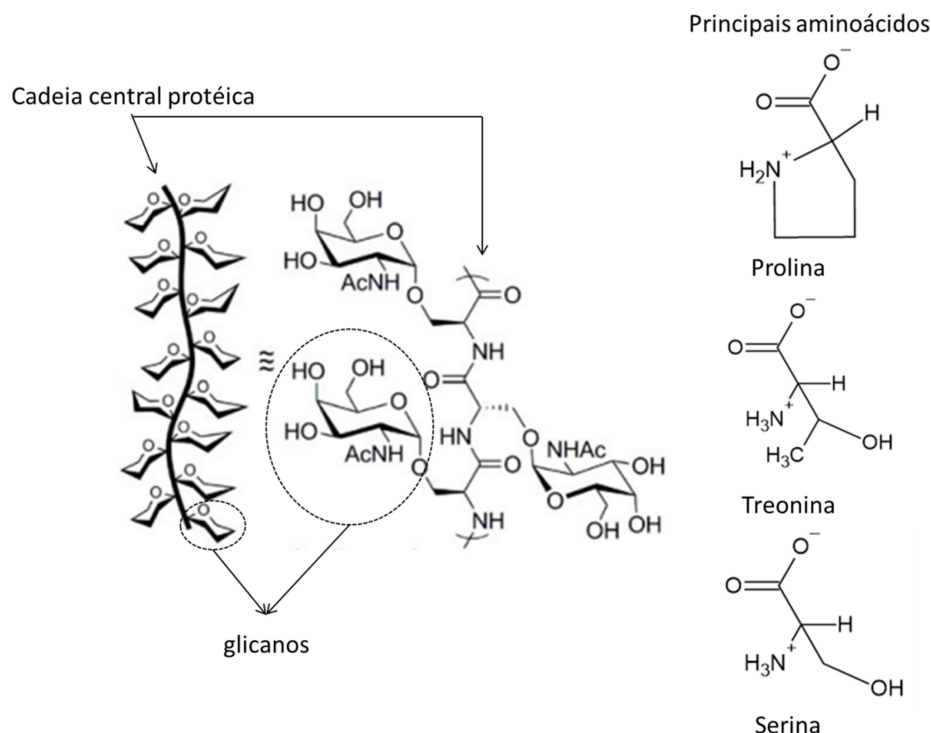
CAPÍTULO 8: APÊNDICE B – Blendas de fibroína de seda e mucina

Nesse apêndice serão discutidos os resultados obtidos para as membranas das blendas de fibroína de seda e mucina. Essa etapa foi desenvolvida, em parte, durante o período de doutorado sanduíche, em um projeto de cooperação científica do Brasil com a Suécia (CAPES/STINT). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Glicociências do Royal Institute of Technology (KTH, Estocolmo) e foi supervisionado pelo Doutor Thomas Crouzier.

Mucinas são glicoproteínas formadas por carboidratos - entre 65-85% - e proteínas - entre 20-30% - elas são um dos principais componentes da mucosa encontrada no sistema gastrointestinal, respiratório e reprodutor feminino (SATCHITHANANDAM *et al.*, 1996). Devido à natureza viscoelástica da mucina, ela é a maior barreira físico-química do corpo humano, capaz de lubrificar e proteger nossos órgãos internos da degradação enzimática, de medicamentos (DUFFY; DAVID; CROUZIER, 2015; SATCHITHANANDAM *et al.*, 1996), microrganismos patogênicos, ácido gástrico e toxinas (PETROU; CROUZIER, 2018). Além disso, ela é um dos substratos para as bactérias presentes no intestino (SATCHITHANANDAM *et al.*, 1996). A Figura B 1: *Representação esquemática da estrutura química da mucina formada por uma cadeia central protéica, com os principais aminoácidos, e glicanos em sua ramificação.* representa um esquema da estrutura química da mucina, na qual é possível observar uma cadeia principal, proteica, e ramificações formadas por polissacarídeos.

Os aminoácidos que formam a cadeia principal são a prolina, serina e treonina, que se organizam em sequência chamada de PTS (LOUSINIAN *et al.*, 2018). Os glicanos presentes na sua estrutura permitem interações intra e intermoleculares por meio de ligações de hidrogênio, alta hidratação e hidrofilicidade. Além disso, os grupos carboxila e sulfato deixam a molécula com carga negativa em pH neutro (BANSIL; TURNER, 2006). Ela pode ser extraída de animais como porcos, vacas, ovo de galinha e água-viva, sendo que a fonte de mucina vai influenciar na massa molar, que pode variar entre 0,5 e 20 MDa (BANSIL; TURNER, 2006), na região rica em cisteína e na presença de domínios específicos da molécula (PETROU; CROUZIER, 2018).

Figura B 1: Representação esquemática da estrutura química da mucina formada por uma cadeia central protéica, com os principais aminoácidos, e glicanos em sua ramificação.



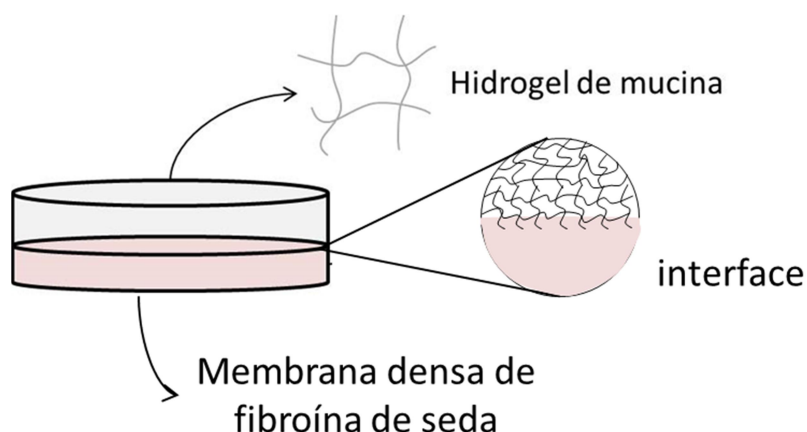
Fonte: Modificado de KRAMER et al. (2015).

Há poucos trabalhos na literatura explorando blendas de fibroína de seda e mucina. Apesar disso, a compreensão das interações entre essas duas proteínas têm sido exploradas, principalmente, no desenvolvimento de biomateriais mucoadesivos que utilizam fibroína de seda em sua composição (KUNDU; PATRA; KUNDU, 2008; PETROU *et al.*, 2018; SERBAN; PANILAITIS; KAPLAN, 2012). O principal objetivo do projeto desenvolvido durante o doutorado sanduíche foi desenvolver uma membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina para aplicação como curativo de alto desempenho para feridas crônicas. A membrana proposta no projeto era formada de uma camada densa de fibroína de seda e uma porosa de hidrogel de mucina, como mostra o esquema da Figura B 2. Para a formação desse material, é necessário que ocorra interação entre as camadas na interface, região em que uma blenda de fibroína de seda e mucina é formada. Por isso, as interações entre as proteínas e sua miscibilidade utilizando três blendas com diferentes

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

proporções volumétricas foram exploradas. Para isso, foram realizadas análises morfológicas, térmicas, de infravermelho e de espalhamento de luz estático. Além disso, a incorporação e liberação de fator de crescimento epitelial (EGF) foram estudadas, visto que essa molécula pode ajudar na cicatrização das feridas crônicas.

Figura B 2: Esquema para exemplificar a membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina.



8.1 Materiais e Métodos

8.1.1. Blendas de fibroína de seda e mucina

Antes do desenvolvimento das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina, blendas dos polímeros foram estudadas com o objetivo de simular a região de interface e estudar sua miscibilidade.

8.1.1.1 Preparo da solução de mucina e fibroína de seda

Mucina (MU) extraída das glândulas submaxilares bovina (BSM, Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em água deionizada com concentração de 1% (m/v) e mantida sob agitação por 24 h para completa dissolução. A fibroína de seda foi extraída de casulos do bicho-da-seda, da espécie *Bombyx mori* doados pela Bratac (Brasil). O preparo da sua solução foi feito seguindo a metodologia apresentada anteriormente.

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

8.1.1.2 Preparo das membranas das blendas de fibroína de seda e mucina

Três blendas de fibroína de seda e mucina foram preparadas utilizando soluções de mesma concentração (1% m/v) e variando a fração volumétrica dos polímeros, conforme mostrado na Tabela B 1.

Para o preparo das membranas das blendas, a solução de fibroína foi adicionada à solução de mucina sob agitação lenta. Após homogeneização, as blendas foram dispostas em placas de Petri e secas a 25 °C até a completa evaporação do solvente.

Tabela B 1: Frações volumétricas de fibroína de seda e mucina utilizadas para o preparo das blendas de mucina e fibroína de seda.

Blenda	Fibroína de seda	Mucina
SF ₂₅ /MU ₇₅	0,25	0,75
SF ₅₀ /MU ₅₀	0,5	0,5
SF ₇₅ /MU ₂₅	0,75	0,25

8.1.1.3 Caracterização das blendas de fibroína de seda e mucina

As membranas das blendas de fibroína de seda e mucina e as membranas assimétricas foram caracterizadas quanto a morfologia, degradação térmica e interação química. As técnicas utilizadas foram potencial zeta, microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espalhamento de luz estático.

8.1.1.3.1 Microscopia Óptica

A microscopia óptica foi utilizada para analisar a morfologia da mistura entre solução de fibroína de seda e mucina após o preparo da blenda. Para isso, a solução de mucina foi colocada em uma lâmina de vidro, então a solução de fibroína de seda foi adicionada à solução de mucina e misturada gentilmente com auxílio de uma espátula. Imagens foram coletadas utilizando microscópio óptico da marca Nikon (Tóquio, Japão) modelo Eclipse E200.

8.1.1.3.2 Potencial zeta

Soluções de fibroína de seda e mucina de concentração igual a 10 g.L^{-1} e as blendas SF₂₅/MU₇₅, SF₅₀/MU₅₀ e SF₇₅/MU₂₅ foram analisadas quanto ao potencial zeta utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico. O equipamento utilizado foi o ZetaSizer Nanoseries, as medidas foram feitas utilizando cubeta capilar zeta, ambos da marca Malvern (Worcestershire, Inglaterra).

8.1.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para investigar a morfologia das membranas das blendas de fibroína de seda e mucina as quais foram recobertas com uma fina camada de ouro antes da obtenção das imagens pelo microscópio eletrônico de varredura modelo FE-SEM S-4800 da marca Hitach (Japão). As amostras foram imersas em nitrogênio líquido para obtenção das imagens de fratura. As imagens obtidas foram analisadas com o software ImageJ (EUA).

8.1.1.3.4 Ensaios térmicos

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada com objetivo de identificar a temperatura de transição vítrea (T_g) de cada material e avaliar a miscibilidade das blendas de fibroína de seda e mucina. Os materiais foram aquecidos de temperatura ambiente até $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ e mantidas nessa temperatura por 10 min. Após o primeiro aquecimento, as amostras foram resfriadas até $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ e então o segundo aquecimento foi feito até $220 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $5 \text{ }^\circ\text{C/min}$. A análise foi feita utilizando calorímetro exploratório diferencial modelo DSC1 da marca Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suíça).

A temperatura de degradação e estabilidade térmica dos materiais foi avaliada por termogravimetria (TGA). As amostras foram aquecidas de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ em atmosfera de N_2 com vazão igual a 50 mL/min .

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

8.1.1.3.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

A análise de FTIR teve como objetivo investigar as interações entre a fibroína de seda e mucina bem como as mudanças na estrutura secundária das proteínas. Para isso, as membranas foram analisadas em um espectrômetro modelo Nicolet 6700 da marca Thermo Scientific (EUA) utilizando o modo de refletância com microscópio FT-IR Imaging Microscope modelo Nicolet Continuum da marca Thermo Scientific (EUA). As medidas foram realizadas entre 4000 e 650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans.

8.1.1.3.6 Espalhamento de luz estático

O espalhamento de luz estático foi feito utilizando laser de He-Ne de comprimento de onda igual a 632,8 nm com o aparato apresentado no Capítulo 4. A técnica foi utilizada para as blendas em solução e membranas com o objetivo de acompanhar as mudanças no espalhamento de luz, identificar o mecanismo de separação de fases, possíveis anisotropias e obter informações sobre a microestrutura das blendas. Imagens de espalhamento de luz das blendas de fibroína de seda e mucina em solução foram adquiridas logo após o seu preparo e a cada 24 h por 7 dias, de modo a acompanhar ao longo do tempo as mudanças no espalhamentos de luz, que podem ser relacionadas ao equilíbrio de fases. As blendas foram mantidas em banho termostático a 25 °C. As imagens foram analisadas utilizando software Image J (EUA).

8.1.2 Desenvolvimento das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina

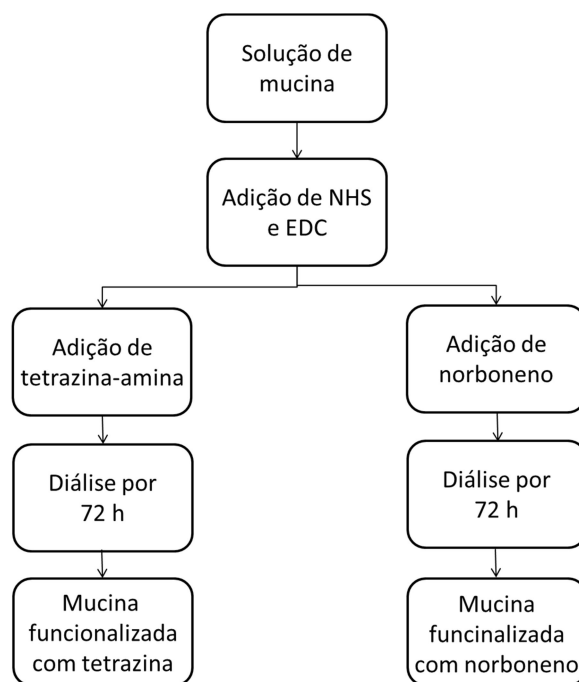
8.1.2.1 Preparo da solução de mucina funcionalizada com grupos tetrazina e norboneno para obtenção do hidrogel

Para preparar o hidrogel de mucina é necessário funcionalizar a proteína com grupos tetrazina e norboneno. A Figura B 3 mostra um fluxograma com as etapas necessárias para a funcionalização da mucina. Brevemente, a mucina foi dissolvida em solução de 0,1 mol/L de tampão MES (Merk, Alemanha) e 0,3 mol/L de NaCl, pH 6,5, a 4 °C por 24 h. Após dissolução, a funcionalização foi realizada. Para isso, N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-aldich, EUA) e N-(3-dimetilaminopropil)-n'-etilcarboimida (EDC, Sigma-aldich, EUA) foram

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

adicionados na proporção de 4 mmol por grama de mucina em béqueres diferentes. Em um deles, tetrazina-amina (Click Chemistry Tools, EUA) foi adicionada na proporção de 1 mmol de tetrazina por grama de mucina e no outro foi adicionado 5-norborneno-2-metilamina (TCI Europe N.V., Bélgica) na proporção de 2 mmol por grama de mucina. Ambos béqueres foram mantidos sob agitação *overnight* a 4 °C. Após este tempo, as soluções foram dialisadas utilizando tubos de diálise de 100 kDa a 4 °C por 3 dias, com 3 trocas diárias. Nos primeiros dois dias utilizou-se solução de 0,3 mol/L de NaCl e no último a diálise foi feita com água ultrapura. Após diálise, as soluções foram congeladas e liofilizadas por 48 h.

Figura B 3: Fluxograma com as etapas necessárias para a funcionalização da mucina com grupos tetrazina e norboneno.



8.1.2.2 Preparo do hidrogel de mucina

Para o preparo dos hidrogéis, mucina funcionalizada com tetrazina e norborneno foi dissolvida em tampão fosfato salino (PBS) em diferentes béckeres na concentração desejada (25 mg/mL ou 50 mg/mL) e misturadas em volumes iguais. A formação completa do hidrogel ocorreu após cerca de 1 h.

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

8.1.2.3 Funcionalização da fibroína de seda com grupos tetrazina-amina

A funcionalização da fibroína de seda foi necessária para formação da membrana híbrida. O preparo da solução de fibroína de seda foi feito conforme descrito anteriormente na seção de Materiais e Métodos do Capítulo 4. Após a diálise e quantificação por gravimetria, NHS e EDC foram adicionados, respectivamente, nas proporções de 10% e 20% da massa de fibroína em solução. O sistema foi mantido a 4 °C por 15 min sob baixa agitação, após dissolução dos reagentes, tetrazina-amina foi adicionada na proporção de 1 mmol de tetrazina por g de de fibroína de seda em solução. O sistema foi mantido a 4 °C por 2 h sem agitação para evitar a formação de hidrogel de fibroína de seda. Após reação, a solução de fibroína funcionalizada foi dialisada em membrana de diálise utilizando água ultrapura a 10 °C e trocada a cada 24 h por 3 dias. Para preparar a membrana de fibroína de seda, a solução foi ajustada para uma concentração de 1% e colocada em uma placa de Petri para secagem a 25 °C. Após formação da membrana, ela foi reticulada utilizando o método de *water annealing*, que consiste em colocar a membrana em um dessecador substituindo a sílica por água destilada e aplicando vácuo no sistema por 5 horas.

8.1.2.4 Preparo da membrana assimétrica de fibroína de seda e hidrogel de mucina

Para a formação da membrana assimétrica, o hidrogel de mucina foi preparado e colocado acima da membrana de fibroína de seda funcionalizada. O sistema foi deixado em repouso por 1 hora para formação completa do hidrogel.

8.1.2.5 Caracterização das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina

As membranas assimétricas e hidrogel de mucina foram caracterizados quanto a sua morfologia, utilizando MEV, e estrutura química, por meio de FTIR. Para o MEV, as amostras foram preparadas utilizando a técnica de secagem no ponto crítico de CO₂. Os hidrogéis e as membranas foram imersas em solução de etanol em proporções crescentes: etanol 43%, etanol 96%,

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

etanol 98% e etanol 100%. Essa técnica é, geralmente, utilizada para preservar a morfologia de materiais porosos, fornecendo um resultado mais fidedigno do tamanho dos poros. As análises foram feitas no Departamento de Tecnologia em Fibras e Polímeros (KTH, Suécia). As imagens obtidas foram analisadas com o software ImageJ., a média e o desvio padrão do tamanho dos poros foi calculado utilizando uma área de cerca de $7 \mu\text{m}^2$.

Já o FTIR foi utilizado para investigar a estrutura química da fibroína de seda após a sua funcionalização com tetrazina e também explorar as possíveis mudanças provocadas pela adição do fator de crescimento epitelial (EGF) nas membranas de fibroína de seda e no hidrogel de mucina. Um espectrômetro modelo Nicolet 6700 da marca Thermo Scientific (EUA) com modo de refletância e microscópio FT-IR Imaging Microscope modelo Nicolet Continuum da marca Thermo Scientific (EUA) foi utilizado. As medidas foram realizadas entre 4000 e 650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans.

8.1.2.6 Incorporação e liberação do fator de crescimento epitelial

O fator de crescimento epitelial foi incorporado em membranas de fibroína de seda, membrana de fibroína de seda funcionalizada, hidrogel de mucina e membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina. Nas membranas de fibroína de seda e membranas assimétricas, o EGF foi adicionado à solução de fibroína de seda antes do *casting*. Já para os hidrogéis de mucina, ele foi adicionado nas soluções de mucina funcionalizada com tetrazina e norborneno. A concentração de EGF em todos os materiais foi a mesma e igual a 100 ng/mL .

Após a formação das membranas e hidrogéis, os materiais foram lavados com $200 \mu\text{L}$ de PBS duas vezes por 1 min. O EGF que foi liberado nas lavagens foi considerado o ponto zero da cinética de liberação. Após, o mesmo volume de PBS foi utilizado para realizar o estudo de liberação. Nas primeiras 7 h, as alíquotas foram retiradas a cada 1 h. Após isso, as amostras foram retiradas uma vez por dia durante 7 dias. Esses tempos foram baseados em estudos anteriores sobre a liberação de EGF em hidrogéis de mucina, em que se constatou que cerca de 80% do composto era liberado no primeiro dia do

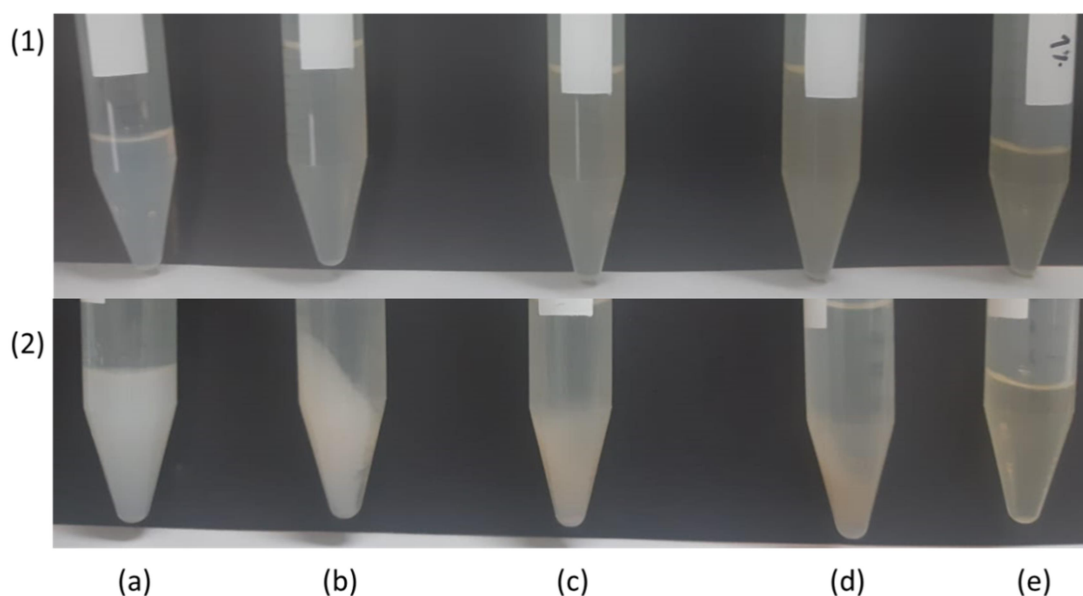
experimento. A quantificação de EGF em cada alíquota foi feita pelo método ELISA.

8.2 Resultados e Discussão

8.2.1 Aspectos físicos das blendas de fibroína de seda e mucina

Antes do preparo das membranas das blendas de fibroína de seda e mucina, as blendas foram observadas em solução a fim de verificar se haveria separação de fases. A Figura B 4 mostra imagens das blendas logo após o preparo e após oito dias. É possível notar a formação de um precipitado marrom, que se assemelha ao observado para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio, indicando separação líquido-sólido entre os polímeros. A fim de verificar a formação das pseudo-micelas, observadas no sistema fibroína-alginato, as blendas de fibroína e mucina foram analisadas em microscópio óptico e, diferente do observado para as blendas de fibroína-alginato, as estruturas não foram identificadas (Figura B 5).

Figura B 4: Fotos das soluções de fibroína de seda (a) e mucina (e) e de suas blendas: SF₇₅/MU₂₅ (b), SF₅₀/MU₅₀ (c), SF₂₅/MU₇₅ (d) logo após o preparo (1) e após 8 dias (2).

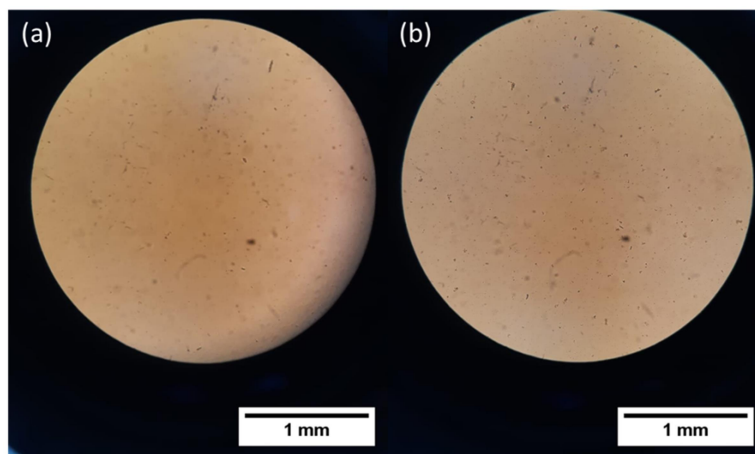


As interações típicas entre proteínas incluem pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo, eletrostáticas e hidrofóbicas-hidrofílicas (HU *et al.*, 2010). A miscibilidade entre polímeros é governada pela energia livre de mistura, que é um balanço entre as contribuições entrópicas e entálpicas. No caso das

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

macromoléculas, a entropia de mistura é baixa e a entalpia de mistura tem uma maior influência nesse balanço e, conseqüentemente, na miscibilidade ou não de um sistema. Então, as interações químicas são bastante importantes para que o sistema formado pelas macromoléculas seja miscível ou não. Por exemplo, em sistemas formados por colágeno e fibroína de seda a formação de complexos polieletrólíticos (PEC) é observada devido às interações eletrostáticas, o colágeno apresenta carga positiva e a fibroína de seda carga negativa (GHAELI *et al.*, 2017), o que torna a blenda mais estável e miscível.

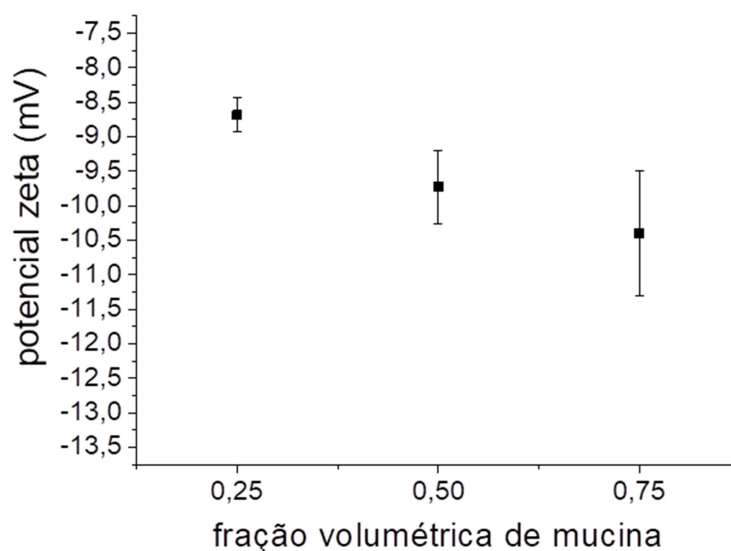
Figura B 5: Imagem de microscopia óptica da solução de mucina (a) e após a adição da solução de fibroína de seda (b).



8.2.2 Potencial zeta

Os valores de potencial zeta das soluções de fibroína de seda e mucina foram iguais a $-2,32 \pm 0,28$ e $-15,4 \pm 0,89$, respectivamente. Em pH neutro, a mucina se encontra acima do seu pKa (2,6) e apresenta carga negativa, devido à ionização dos grupos carboxílicos presentes na estrutura da glicoproteína (SRIAMORNSAK; WATTANAKORN; TAKEUCHI, 2010). A Figura B 6 mostra a variação do potencial zeta em relação à fração volumétrica de mucina nas blendas, as quais apresentaram valores de potencial zeta intermediários aos das proteínas, o que pode indicar que ocorre interação por ponte de hidrogênio entre os grupos ionizados amino (positivos) da fibroína de seda e carboxílico (negativos) da mucina.

Figura B 6: Valores médios do potencial zeta das três blendas de fibroína de seda e mucina estudadas nesse trabalho em relação à fração volumétrica de mucina (n=3).



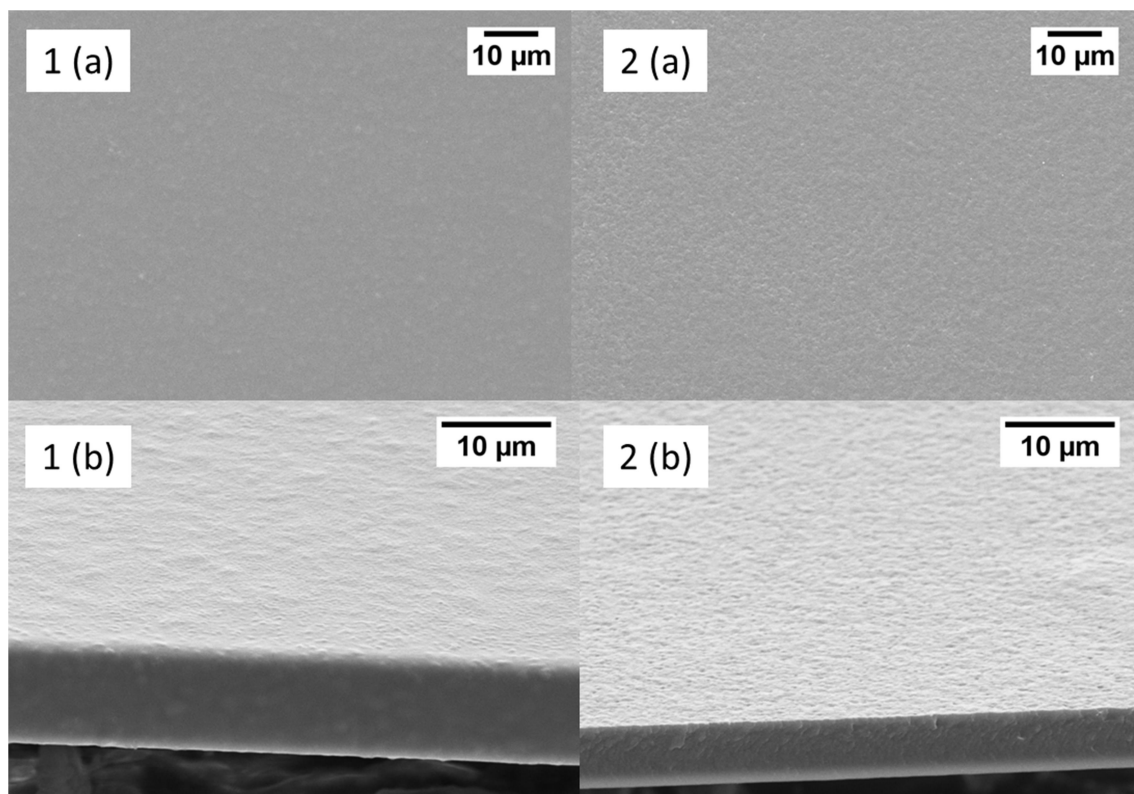
8.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de mucina e fibroína de seda estão mostradas na Figura B 7. É possível observar que ambas membranas são lisas e homogêneas, sem a presença de fibrilas ou aglomerados. Após a formação da blenda, a morfologia é alterada, como mostrado na Figura B 8.

É possível observar aglomerados tanto na superfície quanto na fratura que têm aproximadamente $5,8 \pm 1,9 \mu\text{m}$ de diâmetro. Eles se encontram homogeneamente distribuídos na matriz da membrana. As imagens de fratura mostram a presença de duas fases, sugerindo que ocorre separação de fases entre os polímeros no estado sólido.

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

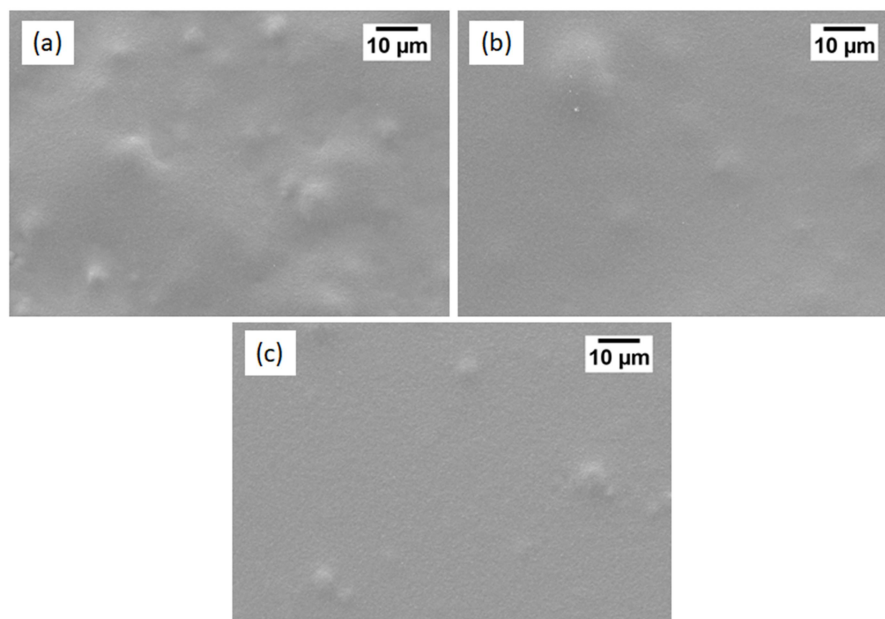
Figura B 7: Imagens de micrografia da superfície (a) e da fratura (b) membranas de mucina (1) e fibroína de seda (2).



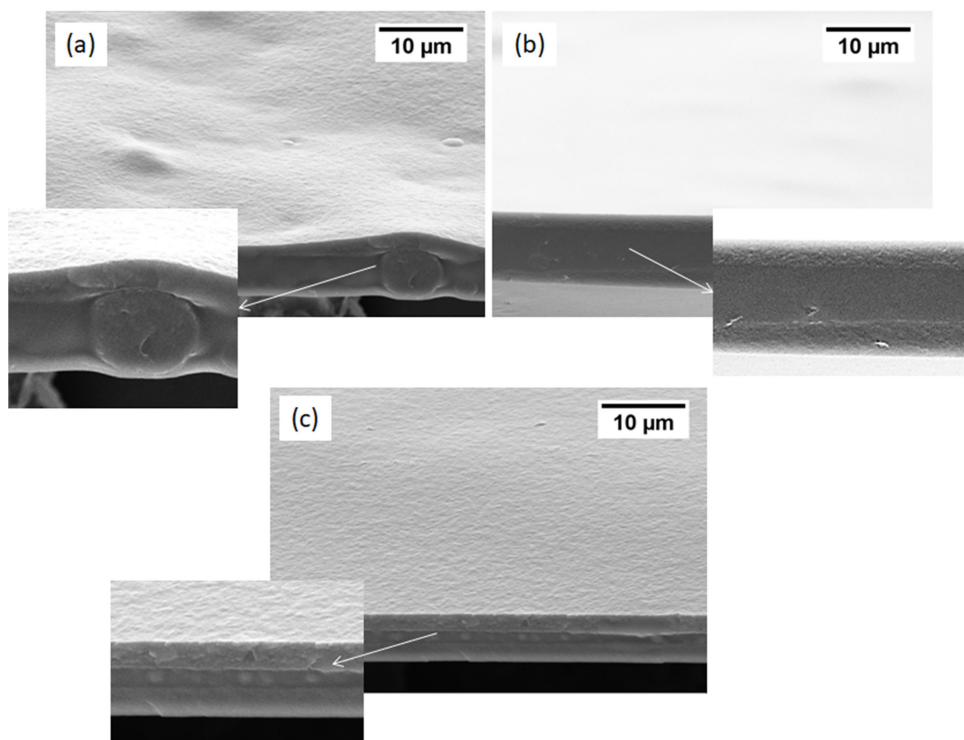
Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

Figura B 8: Imagens de micrografia da superfície (1) e da fratura (2) membranas das blendas SF₂₅/MU₇₅ (a), SF₅₀/MU₅₀ (b) e SF₇₅/MU₂₅ (c).

(1)



(2)



8.2.3 Análises térmicas das blendas de fibroína de seda e mucina

8.2.3.1 Termogravimetria

A Figura B 9 apresenta as curvas termogravimétricas e de massa residual diferencial em função da temperatura para as membranas de fibroína de seda e mucina, assim como para as blendas estudadas.

A partir das curvas termogravimétricas foi possível determinar as temperaturas de degradação dos polímeros isolados e das blendas. Para a fibroína de seda, esse valor foi igual a 278 °C e para a mucina foi igual a 251 °C, os quais foram determinados utilizando o valor de temperatura equivalente ao início da degradação dos polímeros (5% de perda de massa), a qual é representada pelo segundo pico da curva termogravimétrica. Os valores encontrados para os polímeros isoladamente foram próximos aos reportados na literatura (BUILDERS; KUNLE; ADIKWU, 2008; MORAES *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2011). As blendas de mucina e fibroína de seda apresentaram temperatura de degradação com valores intermediários às observadas nos polímeros puros, mostrados na Tabela B 2. Apenas um pico referente à degradação polimérica foi observado, que varia em relação à composição das blendas, quanto maior a fração mássica de fibroína de seda, maior a temperatura de degradação. Portanto, a fibroína de seda aumenta a estabilidade térmica das blendas, fenômeno observado em blendas compostas pela proteína e outros polímeros (DE MORAES *et al.*, 2014; KWEON; UM; PARK, 2001; SHANG; ZHU; FAN, 2011).

Os picos observados em torno de 50 °C estão relacionados à perda de umidade residual, que é maior nas membranas de mucina devido à hidrofilicidade da macromolécula.

Uma das maneiras de avaliar a miscibilidade de uma blenda é observando o deslocamento das temperaturas em que ocorrem eventos térmicos importantes como degradação, transição vítrea e cristalização. No caso das blendas de fibroína de seda e mucina, os valores de temperatura de degradação são bastante próximos, o que pode dificultar a avaliação da miscibilidade. Por isso, curvas termogravimétricas de aditivação foram feitas utilizando os dados obtidos para os polímeros isoladamente, as quais foram

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

comparadas com as obtidas experimentalmente (Figura B 10). É possível observar diferenças entre as curvas, principalmente no início da degradação, o que pode indicar a parcial miscibilidade das blendas de fibroína de seda e mucina.

Figura B 9: Curva termogravimétrica (a) e de massa residual diferencial (b) para as membranas de fibroína de seda, mucina e suas blendas.

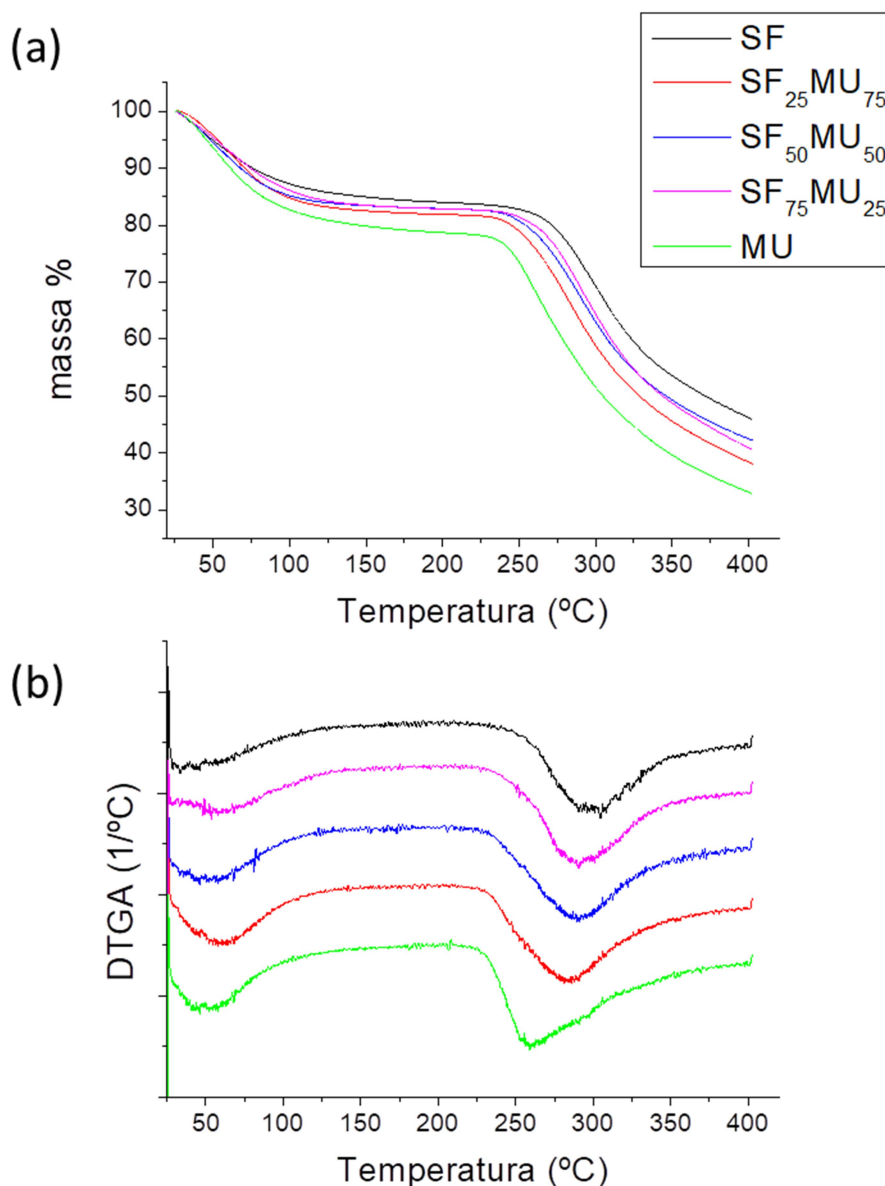
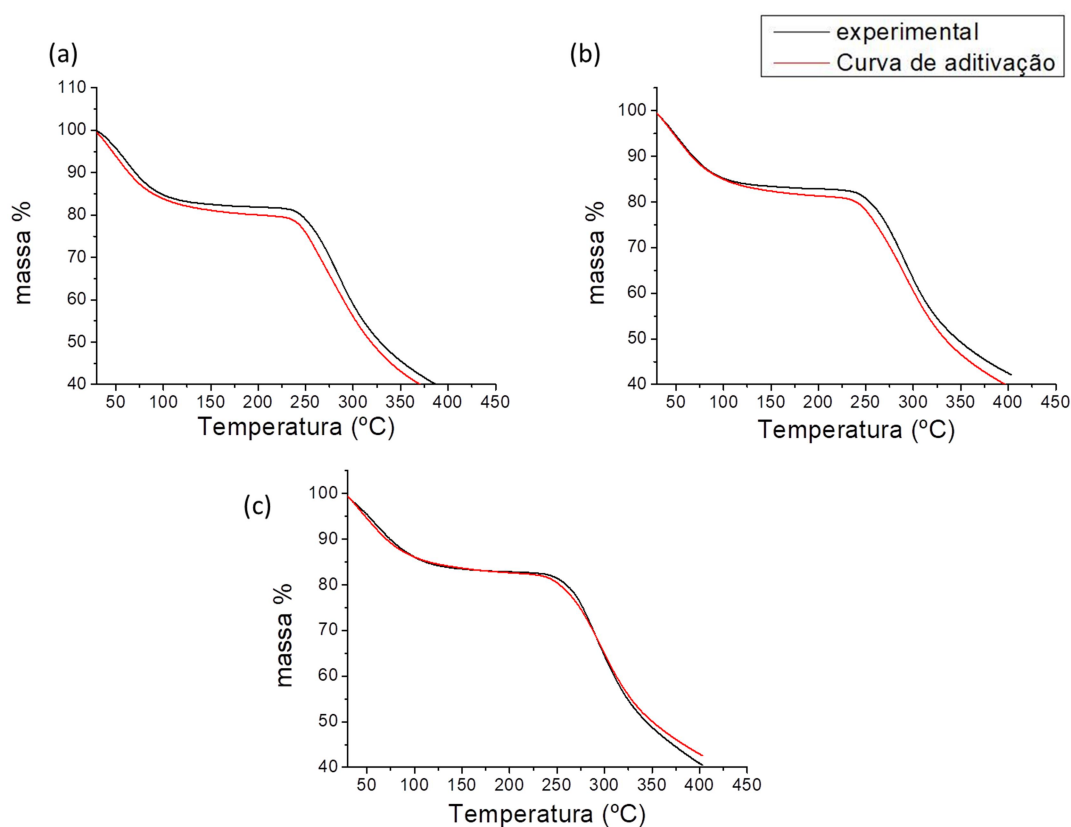


Tabela B 2: Valores de temperatura de degradação para as blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes frações mássicas.

Amostra	Temperatura de degradação (°C)
Mucina	251
SF ₂₅ /MU ₇₅	259
SF ₅₀ /MU ₅₀	264
SF ₇₅ /MU ₂₅	271
Fibroína de seda	278

Figura B 10: Curva termogravimétrica de aditivção e experimental para as membranas das blendas SF₂₅/MU₇₅ (a), SF₅₀/MU₅₀ (b) e SF₇₅/MU₂₅ (c).



8.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A miscibilidade das blendas de fibroína de seda e mucina foi investigada por meio da análise de temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros isolados e das suas blendas. Os termogramas de DSC e os valores de T_g para as membranas de fibroína de seda, mucina e suas blendas estão mostrados na Figura B 11 e na Tabela B 3, respectivamente.

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

Para a mucina, o valor de Tg encontrado foi de 82 °C, acima do reportado na literatura, entre -15 °C e 68,6 °C (BUILDERS; KUNLE; ADIKWU, 2008; ZNAMENSKAYA *et al.*, 2012). Estudos conduzidos por Znamenskaya e colaboradores (2012) mostraram que o valor de Tg depende da concentração de mucina na amostra, que pode variar de -15 °C, para materiais com até 67% (m/m), até 40,5 °C, para materiais com 81% (m/m). Esse pode ser um dos fatores que levaram ao aumento da Tg. Já a membrana de fibroína de seda apresentou Tg com valor igual a 79 °C, valor próximo ao encontrado em estudos anteriores (LOPES; MORAES; BEPPU, 2018).

As blendas de fibroína de seda e mucina apresentaram valores de Tg intermediárias às dos polímeros isolados. Não foi possível detectar duas Tgs, como era esperado, visto que as membranas apresentam separação de fases e, possivelmente, são parcialmente miscíveis, tendo em vista que as imagens de MEV e o estudo das blendas em solução indicam que não há miscibilidade total entre os polímeros. Os polímeros isolados apresentaram Tgs com valores muito próximos, o que dificulta a análise de miscibilidade pela técnica de DSC. Apesar disso, é possível observar claramente que as curvas de DSC das blendas apresentam mudança de inclinação, que está evidenciada pelas setas pretas na Figura B 11, como se as duas curvas estivessem tão próximas que se sobrepõem.

Um comportamento semelhante foi observado nas blendas de fibroína de seda e tromboelastina (HU *et al.*, 2010). A diferença entre o valor da Tg dos polímeros isolados encontrada pelos autores foi de 12°C e as blendas apresentaram apenas uma Tg, intermediária a dos polímeros isolados, indicando a miscibilidade total entre os polímeros. No entanto, ao analisar as imagens de microscopia de força atômica, eles identificaram duas fases caracterizadas pela presença de nanoporos interconectados em uma matriz polimérica, indicando que a separação de fases ocorre a nível microscópico. Por isso, é importante que a miscibilidade de blendas poliméricas seja investigada por meio de diferentes técnicas e as conclusões sejam baseadas na análise do conjunto de dados.

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

Figura B 11: Termograma de DSC das membranas de fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes proporções mássicas. A curva mostrada refere-se ao segundo aquecimento. As setas pretas evidenciam a mudança de inclinação das Tgs das blendas de fibroína de seda e mucina.

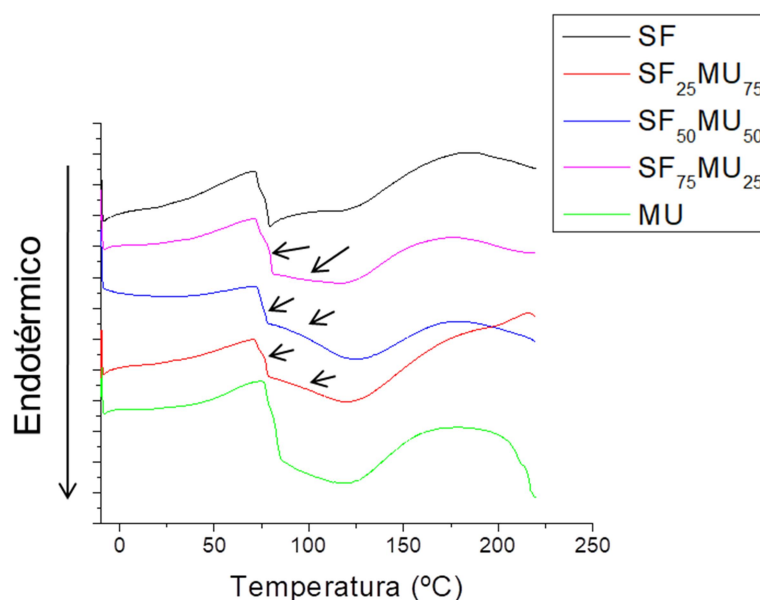


Tabela B 3: Valores de temperatura de transição vítrea (Tg) para a fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina em diferentes proporções mássicas.

Amostra	Tg (°C)
Mucina	82
SF ₂₅ /MU ₇₅	77
SF ₅₀ /MU ₅₀	75
SF ₇₅ /MU ₂₅	78
Fibroína de seda	79

8.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para as membranas de fibroína de seda, mucina e suas blendas

A análise de FTIR foi feita para investigar se havia modificação química da estrutura da fibroína de seda ou da mucina após a formação das blendas. As principais mudanças observadas são nas bandas relativas às amidas I (C=O e C-N), II (N-H) e III (C-N) que podem assumir três tipos de conformação, α -hélice, folha- β e conformação aleatória.

Para a amida I, as bandas de absorção referentes à conformação α -hélice estão centradas em torno de 1656 cm^{-1} , para a folha- β as bandas se encontram entre 1624 e 1642 cm^{-1} (CHIRGADZE; NEVSKAYA, 1976a, 1976b). As estruturas folha- β retorcida apresentam bandas de absorção entre 1660 e 1690 cm^{-1} , 1691 cm^{-1} e 1696 cm^{-1} e a conformação aleatória apresenta banda em torno de 1650 cm^{-1} (DONG; HUANG; CAUGHEY, 1990).

Para a amida II, as bandas de absorção entre 1531 e 1542 cm^{-1} representam conformações α -hélice, bandas entre 1515 e 1530 cm^{-1} correspondem a folha- β e bandas entre 1535 e 1545 cm^{-1} , a conformações aleatórias (GHAELI *et al.*, 2017; HU; KAPLAN; CEBE, 2006). Por fim, para a amida III, as bandas de absorção referentes a conformação α -hélice, folha- β e conformação aleatória são em torno de 1230 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} e 1235 cm^{-1} , respectivamente (GHAELI *et al.*, 2017; HU; KAPLAN; CEBE, 2006).

Os espectros de infravermelho e as principais bandas de absorção para a membrana de fibroína, membrana de mucina e blendas de fibroína de seda e mucina estão mostrados na Figura B 12 e Tabela B 4, respectivamente. A fibroína de seda apresenta bandas de absorção características em 1643 cm^{-1} , 1532 cm^{-1} e 1238 cm^{-1} referentes à amida I, amida II e amida III, respectivamente. Já para a membrana de mucina, observa-se a presença das amidas I, II e III, representadas pelas bandas de absorção de 1650 cm^{-1} (enovelamento aleatório), 1558 cm^{-1} (α -hélice) e 1242 cm^{-1} (folha- β), respectivamente. Além das amidas, o espectro de infravermelho exibiu bandas características relativas à vibração CH_2 , em torno de 1445 cm^{-1} e região de

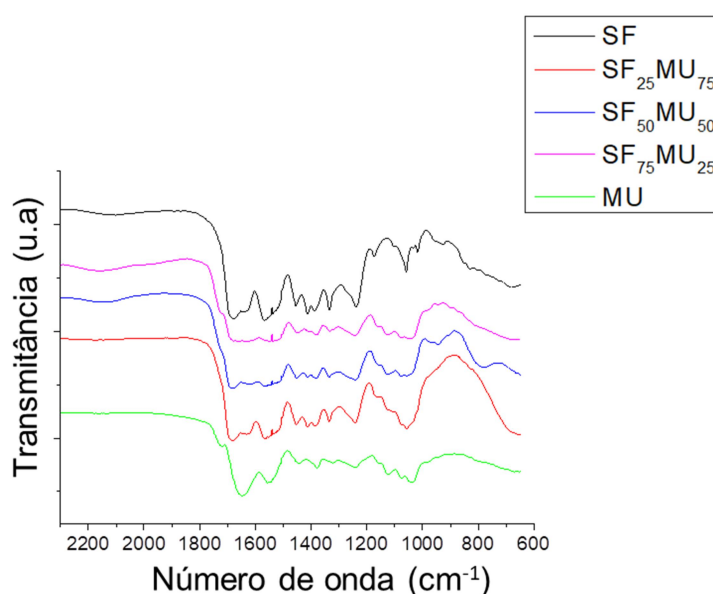
Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

carboidratos/açúcares em torno de 1040 cm^{-1} (CASTILLO *et al.*, 1985; LEWIS; LEWIS; LEWIS, 2013)

Tabela B 4: Principais bandas de absorção das membranas de fibroína de seda, mucina e blendas de fibroína de seda e mucina.

Amostra	Número de onda (cm^{-1})					
Mucina	1650	1558	1445	1242	1074	1040
SF ₂₅ /MU ₇₅	1649	1547	1449	1242	1078	1046
SF ₅₀ /MU ₅₀	1686	1562	1454	1242	1077	1054
SF ₂₅ /MU ₂₅	1681	1563	1454	1242	-	1057
Fibroína de seda	1643	1626	1532	1238	-	-

Figura B 12: Espectro de infravermelho das membranas de fibroína de seda, mucina e de suas blendas.



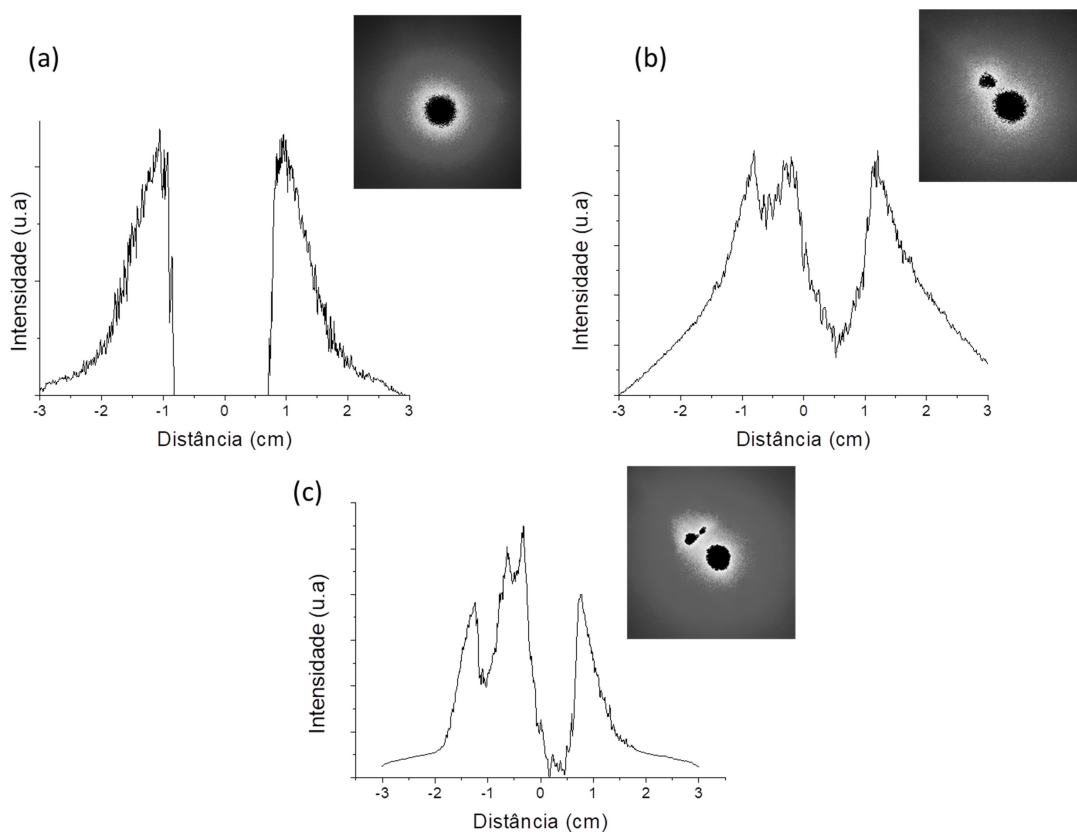
Para as blendas de fibroína de seda e mucina são observados deslocamentos nas bandas de absorção para as aminas I, II e para região dos açúcares. O aumento de fibroína de seda na composição das membranas das blendas parece tornar sua estrutura mais organizada, visto que a amida I das membranas SF₅₀/MU₅₀ e SF₇₅/MU₂₅ encontra-se em conformação folha- β . As mudanças observadas podem indicar os grupos químicos envolvidos na ligação entre a fibroína de seda e a mucina, que nesse caso, pode estar ocorrendo

entre os grupos amina da fibroína de seda e os grupos carboxila e hidroxila da mucina.

8.2.5 Espalhamento de luz estático

Os perfis de espalhamento de luz e imagens obtidas na análise de espalhamento de luz estática com laser de He-Ne para as membranas das blendas de fibroína de seda e mucina estão mostrados na Figura B 13. Para a blenda SF_{25}/MU_{75} o espalhamento observado é isotrópico, um halo é observado, sugerindo que a distância entre as fases é periódica.

Figura B 13: Perfil de espalhamento de luz estática (intensidade *versus* distância) e imagens obtidas a partir dos experimentos com laser de He-Ne para as blendas SF_{25}/MU_{75} (a), SF_{50}/MU_{50} (b) e SF_{75}/MU_{25} (c).



Para as blendas SF_{50}/MU_{50} e SF_{75}/MU_{25} , o espalhamento de luz é anisotrópico, o que pode ser observado tanto nas imagens obtidas como nos gráficos intensidade *versus* distância, em que o perfil de espalhamento não é simétrico. No estado sólido, que é o caso das membranas, as cadeias poliméricas têm menor mobilidade e se organizam formando uma estrutura,

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

que pode ser amorfa, cristalina ou semi-cristalina. A interação entre as moléculas e, consequentemente, a geometria resultante dessas interações irão interferir de maneira diferente no espalhamento de luz (ENOKI, 2010). A anisotropia em sistemas poliméricos fornece informações sobre o grau relativo de alinhamento médio da estrutura dispersa na matriz polimérica, que pode apresentar partículas alongadas ou diferença na orientação cristalina do polímero (GASPARINI, 2019). No caso das blendas de fibroína de seda e mucina, a anisotropia é observada nas blendas com maior quantidade de fibroína de seda, nas quais foi verificada a presença de estruturas cristalinas (folha- β retorcida) que apresentam maior grau de organização e podem formar padrões de espalhamento diferentes.

A anisotropia é uma característica explorada em vários materiais, que interfere em propriedades morfológicas e mecânicas. Ela pode ser ajustada e propositalmente criada para desenvolver materiais, como filmes finos, *scaffolds* e hidrogéis, que se aproximem das estruturas biológicas de tecidos que possuem morfologia anisotrópica altamente diferenciada e singular (ASUNCION; GOH; TOH, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2010; YETISKIN; OKAY, 2017).

O espalhamento de luz estático também foi utilizado nas blendas em solução. A Figura B 14 mostra o perfil de espalhamento de luz e as imagens obtidas após o preparo das blendas e após 7 dias. É possível observar que o espalhamento de luz se modifica ao longo dos dias. No início, ele é anisotrópico para todas as blendas e se assemelha a um halo; após cerca de três dias, ele passa a ser isotrópico e em formato de disco. Essa mudança coincide com a formação da fase sólida, a qual pode interferir no espalhamento de luz. Após o terceiro dia, não há diferença significativa no perfil nem na intensidade de espalhamento, então, é possível que o equilíbrio de fase seja atingido após esse tempo.

A anisotropia foi observada após o preparo da blenda e pode indicar a formação de uma microestrutura heterogênea com diferentes conformações, conforme discutido anteriormente. Dessa forma, é possível que a separação de fases ocorra rapidamente após o preparo da blenda, assim como foi observado

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

para as blendas de fibroína de seda e alginato de sódio. As imagens de espalhamento, indicam a presença de um halo de espalhamento, sugerindo que há uma periodicidade entre as fases. As distâncias entre os domínios de fase foram calculadas utilizando as equações 1 e 2 e estão mostradas na Tabela B 5.

Figura B 14: Curvas de espalhamento de luz *versus* distância das blendas SF₂₅MU₇₅ (a), SF₅₀MU₅₀ (b) e SF₇₅MU₂₅ (c). As imagens foram obtidas nos dias 1 e 7 e mostram a diferença entre os espalhamentos de luz. No início, todas as blendas apresentaram espalhamento anisotrópico que evoluiu para um espalhamento do tipo disco.

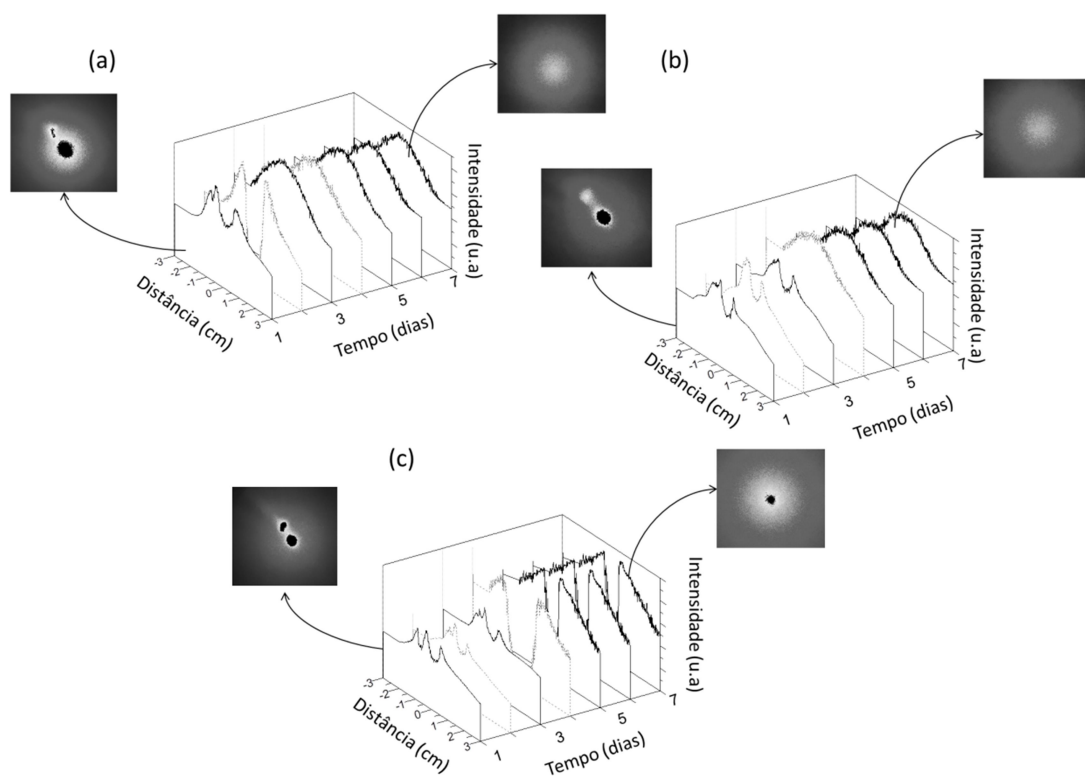


Tabela B 5: Valores de número de onda máximo (q_m) e distância periódica entre os domínios das fases (D). Os valores com subscrito 1 correspondem ao primeiro pico e com subscrito 2 ao segundo pico do centro para as bordas.

Blenda	q_{m1}	D_1 (μm)	q_{m2}	D_2 (μm)
SF ₂₅ MU ₇₅	0,012	0,52	0,013	0,48
SF ₅₀ MU ₅₀	0,011	0,57	0,013	0,48
SF ₇₅ MU ₂₅	0,012	0,52	0,013	0,48

8.2.6 Desenvolvimento das membranas híbridas de fibroína de seda e mucina

A funcionalização da fibroína de seda com grupos tetrazina se mostrou uma boa estratégia para formação do material híbrido, uma vez que esses grupos se ligam covalentemente aos grupos norboneno, presentes no hidrogel de mucina. Uma outra vantagem dessa funcionalização é a mudança de cor da membrana, de transparente para rosa, o que torna mais fácil a confirmação de que houve reação, como mostrado na *Figura B 15*. Após a formação da membrana híbrida, é possível distinguir os dois materiais (*Figura B 16*).

Figura B 15: Fotos das membranas de fibroína de seda antes (a) e após (b) a funcionalização com tetrazina e da solução de fibroína de seda após a funcionalização com tetrazina (c).

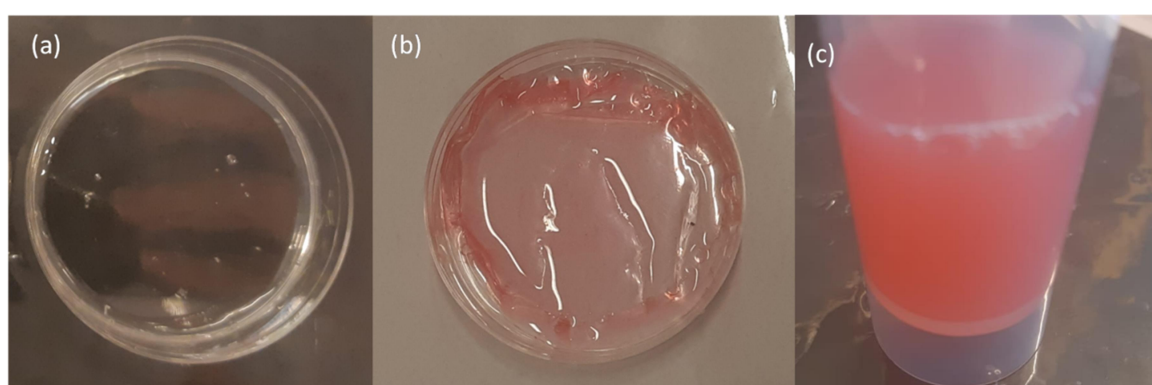
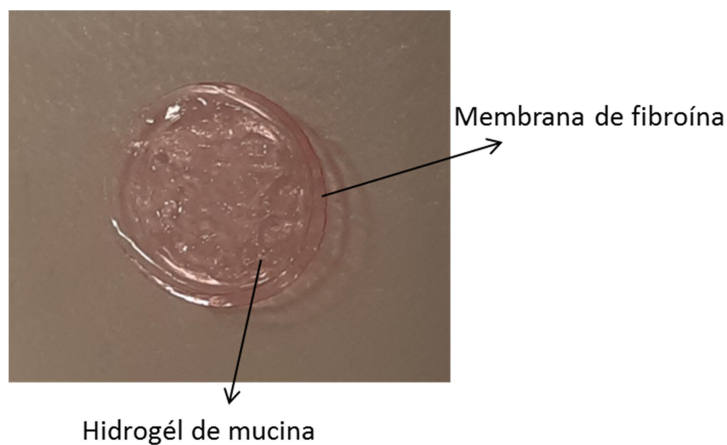


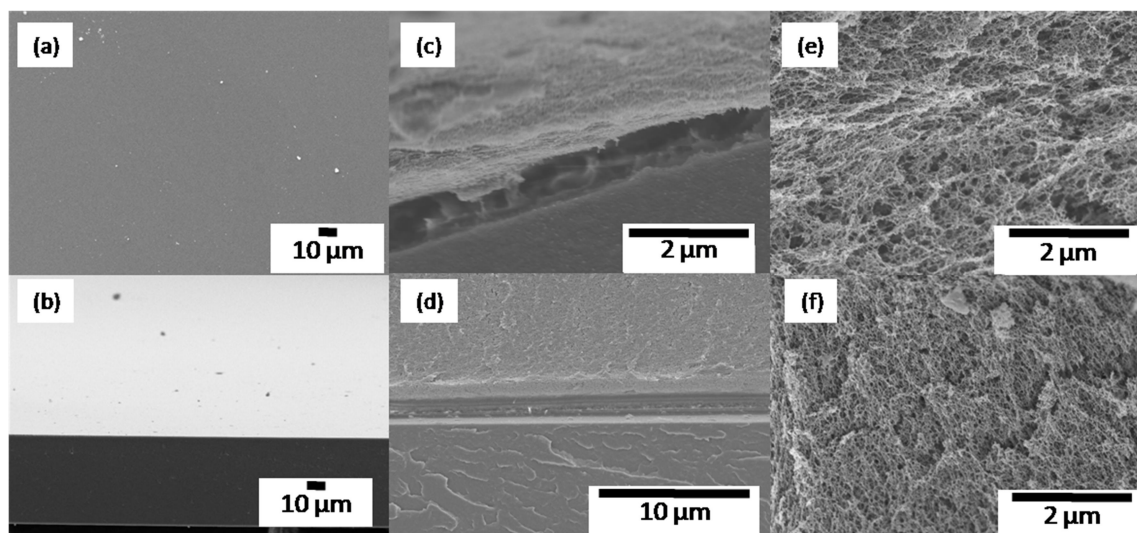
Figura B 16: Foto da membrana híbrida de fibroína de seda e hidrogel de mucina.



8.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura B 17 mostra as imagens de MEV obtidas para a superfície e fratura das membranas de fibroína de seda, hidrogéis de mucina 2,5% e 5% e membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina. A membrana de fibroína de seda apresenta uma superfície lisa e homogênea, sem a presença de poros. Já nas micrografias dos hidrogéis de mucina e das membranas assimétricas é possível observar poros, os quais são maiores para os hidrogéis de mucina de composição 2,5%. O tamanho dos poros, medido pelo *software* ImageJ, foi igual a $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ e $6,4 \times 10^{-4} \mu\text{m}$ para os hidrogéis de mucina de 2,5% e 5%, respectivamente.

Figura B 17: Imagens de micrografia das membranas de fibroína de seda (superfície (a) e fratura (b)), fratura das membranas híbridas de fibroína de seda e mucina (hidrogel 2,5% (c) e hidrogel 5% (d)) e dos hidrogéis de mucina (2,5 % (e) e 5% (f)).



Nas micrografias das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina é possível observar duas camadas distintas dos polímeros, não sendo observada interpenetração do hidrogel de mucina na membrana de fibroína de seda. Fibrilas de fibroína de seda são observadas, as quais podem ter sido formadas durante a preparação da membrana para a análise, durante a secagem do ponto crítico, visto que, etanol é utilizado. O etanol é uma das substâncias químicas capaz de promover a mudança de conformação da fibroína de α -hélice para folha- β e formação das fibrilas observadas.

8.2.8 Liberação de fator de crescimento epitelial

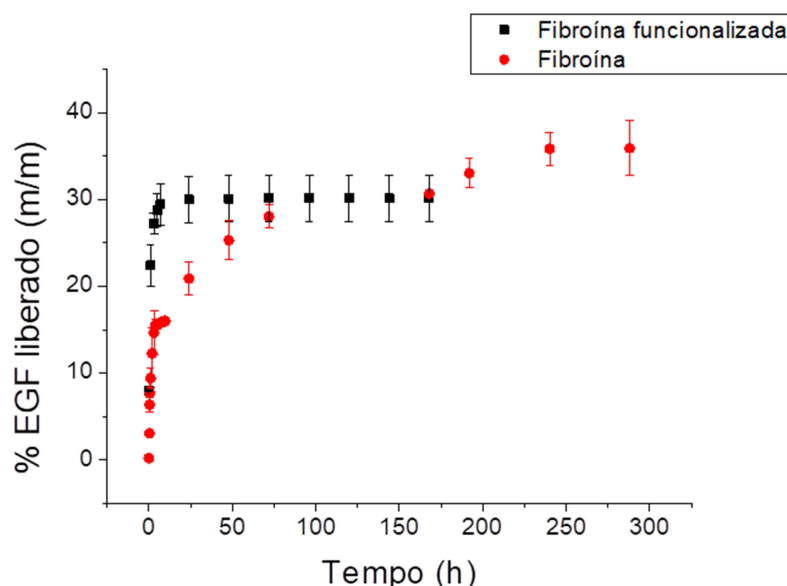
8.2.8.1 Membranas de fibroína de seda

A Figura B 18 mostra o perfil de liberação de EGF das membranas de fibroína de seda (a) e fibroína de seda funcionalizada com tetrazina (b). Para as membranas de fibroína, é possível observar que a liberação atingiu níveis constantes (platô) após, aproximadamente, 7 dias. Durante o ensaio cerca de 35% do EGF incorporado foi liberado, principalmente nas primeiras 24 h. No entanto, comparado com outros materiais, como os hidrogéis de mucina, a liberação foi satisfatória, visto que houve uma liberação continuada do fator de

crecimento por alguns dias. Isso pode ser interessante em casos que se deseja uma liberação lenta do ativo.

Para a membrana de fibroína de seda funcionalizada, observou-se que o percentual total liberado é similar ao da membrana de fibroína, próximo a 35%. No entanto, o perfil observado foi bastante diferente, pois a liberação inicial foi mais acentuada, sendo o equilíbrio atingido em cerca de 24 h. O fato de que menos de 50% foi liberado pode indicar que o EGF está interagindo quimicamente com a fibroína de seda e não apenas disperso na matriz da membrana.

Figura B 18: Perfil de liberação de EGF nas membranas de fibroína de seda e fibroína de seda funcionalizada.



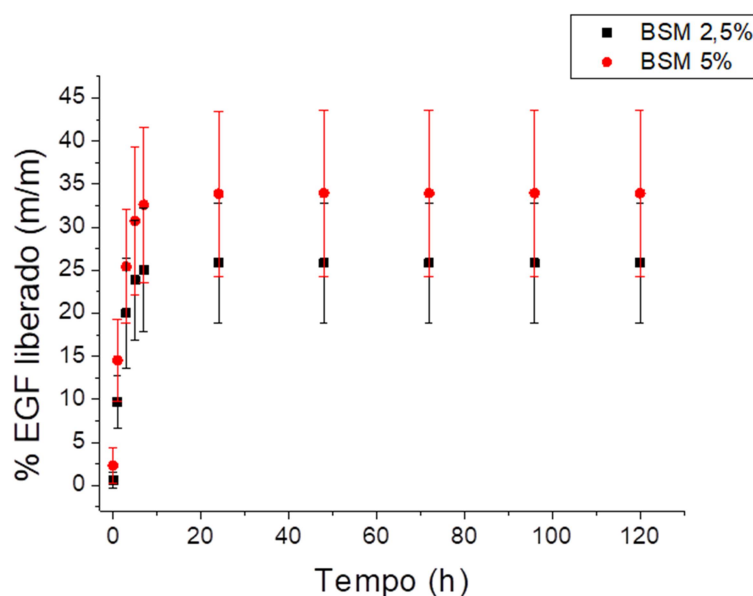
8.2.3.2 Hidrogéis de mucina

A Figura B 19 mostra o perfil de liberação do EGF em hidrogéis de mucina nas diferentes concentrações de mucina estudadas, 25 mg/mL e 50 mg/mL. De acordo com as imagens de microscopia dos hidrogéis de mucina, é possível notar que os hidrogéis com concentração 25 mg/mL têm poros ligeiramente maiores do que os de 50 mg/mL. Apesar disso, o perfil de liberação em ambos os hidrogéis é bastante semelhante, não havendo diferenças significativas entre os dois hidrogéis. Ambos sistemas atingem o equilíbrio nas primeiras 24 h. É possível observar que houve grande variação

Capítulo 8: Apêndice B – Blendas de fibroína de seda e mucina

entre as replicatas do experimento, o que se reflete no desvio padrão obtido. Ainda não está claro porque isso acontece, uma hipótese é que o hidrogel não se mantenha estável ao longo do experimento, influenciando a quantidade de EGF liberado.

Figura B 19: Perfil de liberação de EGF em hidrogéis de mucina em diferentes concentrações, 25 mg/mL e 5 mg/mL.

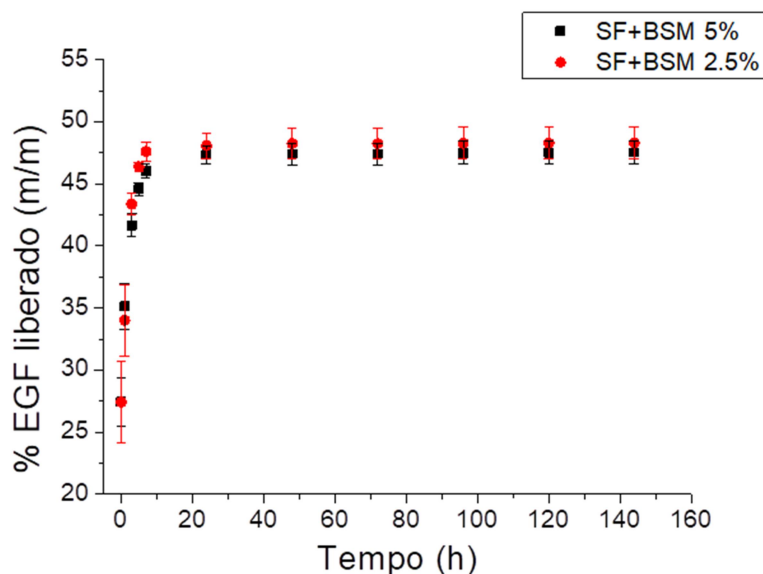


8.2.3.3 Membrana assimétrica de fibroína de seda e mucina

O perfil de liberação das membranas assimétricas de fibroína de seda e mucina está mostrado na Figura B 20. Não foi possível identificar uma diferença significativa entre as membranas híbridas com hidrogéis de concentrações distintas. Esse resultado sugere que a liberação, nesse caso, depende da interação entre fibroína de seda e EGF, que após ser liberado se difunde rapidamente através do hidrogel.

Nas primeiras horas, é possível notar uma pequena diferença entre as membranas híbridas, sendo a liberação nos hidrogéis de 2,5% mais rápida, o que pode ser uma consequência da diferença entre o tamanho dos poros. No entanto, isso não é decisivo para a liberação de EGF, visto que após 24 horas, ambos os sistemas já atingem o platô e a quantidade de EGF liberada é estatisticamente igual.

Figura B 20: Perfil de liberação de EGF nas membranas híbridas de fibroína de seda e hidrogel de mucina em diferentes concentrações – 2,5% e 5%.



8.2.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de FTIR foi feita para investigar se havia modificação química da estrutura da fibroína de seda e dos hidrogéis de mucina após a incorporação do fator de crescimento, visto que não há liberação completa da molécula nos materiais estudados. Os espectros de infravermelho para as membranas de fibroína de seda, membrana de fibroína de seda funcionalizada com tetrazina e membrana de fibroína funcionalizada com tetrazina com EGF incorporado estão mostrados na Figura B 21 e as principais bandas de absorção estão descritas na Tabela B 6.

O resultado para a membrana de fibroína de seda foi discutido na seção anterior. Para a membrana de fibroína de seda funcionalizada com tetrazina, as bandas relativas à amida I foram 1681 cm^{-1} (curva- β) e 1630 cm^{-1} (folha- β) para amida II foi 1566 cm^{-1} (α -hélice), e para amida III foi 1238 cm^{-1} (folha- β). A banda próxima a 2100 cm^{-1} é relativa à presença do anel aromático presente na estrutura da tetrazina. Por último, para as membranas de fibroína de seda funcionalizadas com tetrazina e com EGF incorporado, a banda relativa à amida I foi 1651 cm^{-1} (conformação aleatória), para amida II foi 1547 cm^{-1} (conformação aleatória), e para amida III (folha- β) foi 1242 cm^{-1} .

Figura B 21: Espectros de infravermelho das membranas de fibroína de seda (a), fibroína de seda funcionalizada com tetrazina (b) e fibroína de seda funcionalizada com tetrazina e EGF (100 ng/mL) (c).

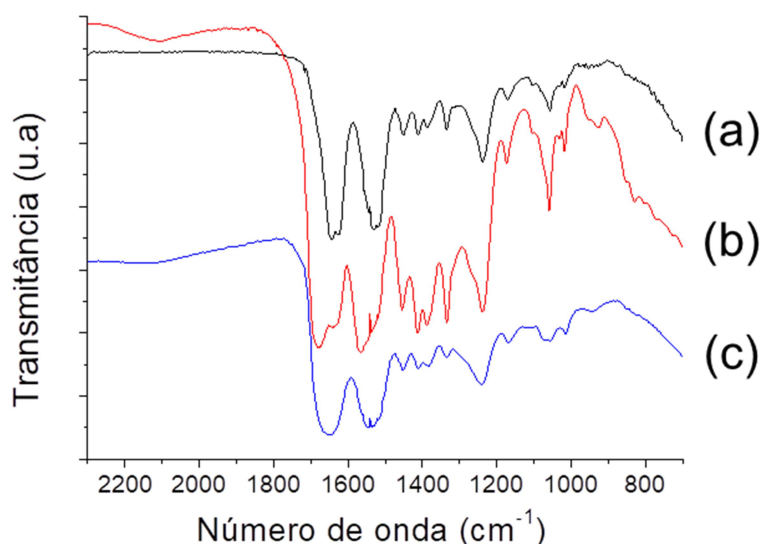


Tabela B 6: Principais bandas de absorção das membranas de fibroína de seda, membrana de fibroína de seda funcionalizada com Tz e fibroína de seda funcionalizada com Tz e com EGF incorporado.

Amostra	Número de onda (cm ⁻¹)			
Membrana de SF	1643	1626	1532	1238
Membrana de SF funcionalizada com Tz	1681	1630	1566	1238
Membrana de SF funcionalizada com EGF incorporado	1651	1547	1536	1242

Os espectros de FTIR para os hidrogéis de mucina e mucina com EGF incorporado estão mostrados na

Figura B 22. As principais bandas de absorção estão mostradas na Tabela B 7. Para os hidrogéis de mucina, é possível observar a presença das amidas I, II e III, representadas pelas bandas de absorção de 1643 cm⁻¹ (folha-β), 1544 cm⁻¹ (conformação aleatória) e 1245 cm⁻¹ (folha-β), respectivamente.

Figura B 22: Espectro de infravermelho do hidrogel de mucina (a) e hidrogel de mucina com EGF incorporado (b).

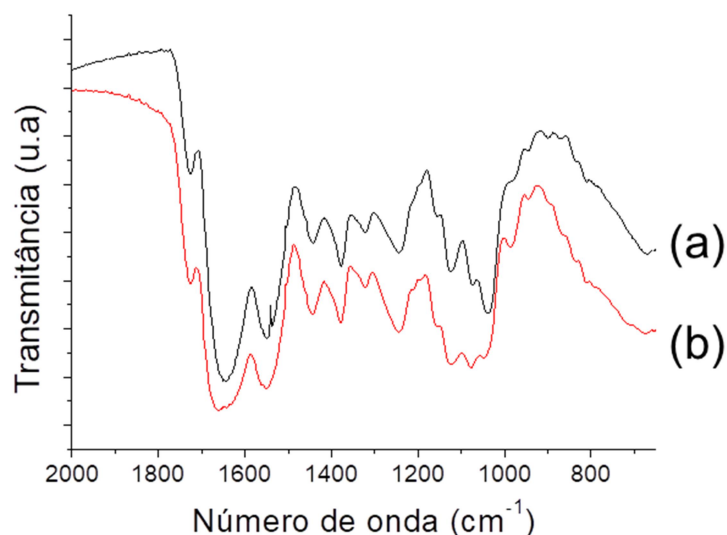


Tabela B 7: Principais bandas de absorção do hidrogel de mucina e hidrogel de mucina com EGF incorporado.

Amostra	Número de onda (cm^{-1})					
Hidrogel de mucina	1726	1643	1544	1443	1245	1038
Hidrogel de mucina com EGF incorporado	1726	1662	1551	1444	1245	1077

Para os hidrogéis de mucina com EGF, houve deslocamento das bandas de absorção para 1662 cm^{-1} (folha- β retorcida), 1551 cm^{-1} (conformação aleatória) e 1245 cm^{-1} (folha- β) para amida I, II e III, respectivamente. Além das aminas, o espectro de infravermelho exibiu bandas características relativas aos grupos carboxílicos do ácido siálico em torno 1726 cm^{-1} (DUFFY; DAVID; CROUZIER, 2015), vibração CH_2 , em torno de 1444 cm^{-1} e região de carboidratos/açúcares em torno de 1038 cm^{-1} (CASTILLO *et al.*, 1985; LEWIS; LEWIS; LEWIS, 2013).

O deslocamento e a mudança de conformação da cadeia polimérica, podem indicar a interação química entre os polímeros naturais e o EGF. Ela

pode estar ocorrendo por meio de ligações de hidrogênio entre grupos C=O e NH₃, visto que as mudanças mais significativas ocorrem na região de vibração desses grupos.

8.3 Conclusão

O estágio sanduíche feito durante essa tese de doutorado possibilitou o estudo sobre a miscibilidade das blendas de fibroína de seda e mucina e posterior desenvolvimento de uma membrana híbrida assimétrica.

Análises de caracterização físico-química indicaram a parcial miscibilidade entre os polímeros. Os ensaios de TGA e DSC evidenciaram essa característica pelo deslocamento das temperaturas de degradação e de transição vítrea, respectivamente. A separação de fases foi identificada pelas imagens de microscopia e nas blendas em solução, as quais formaram uma fase líquida e um precipitado após alguns dias.

Os espectros de FTIR das blendas apresentaram deslocamentos das bandas de absorção, o que pode indicar a interação entre as proteínas, que pode ocorrer entre os grupos amina, carboxila e hidroxila. As blendas em solução apresentaram espalhamento de luz anisotrópico com a presença de halo que evoluiu ao longo dos dias para um espalhamento do tipo disco. Os valores de intensidade de luz ao longo de tempo se ajustaram bem à equação de Cahn, sugerindo que a separação de fases ocorre por decomposição spinodal. Para as membranas das blendas, aquelas com composição de fibroína de seda acima de 50% (v/v) apresentaram espalhamento de luz estático anisotrópico, o que pode ser consequência de diferentes conformações da cadeia polimérica.

Durante o desenvolvimento da membrana assimétrica, as camadas de fibroína de seda e mucina não apresentaram compatibilidade, impossibilitando a formação do material. Por isso, a funcionalização da fibroína de seda com grupos tetrazina foi necessária. Esse é um resultado que abre possibilidades para outros tipos de funcionalização e para a ligação de outras moléculas de interesse, como fármacos, à fibroína de seda, aumentando sua versatilidade.

A interação entre os polímeros e o EGF foi investigada por FTIR. Os resultados mostraram deslocamento das bandas de absorção e mudança de conformação das proteínas quando comparados os materiais com e sem EGF, indicando uma provável interação entre as proteínas e o fator de crescimento.

Os resultados obtidos para as membranas assimétricas mostraram o potencial de aplicação delas como curativo e como plataforma para entrega de moléculas de interesse. No entanto, testes *in vitro* são necessários para verificar suas características citotóxicas e possíveis benefícios para as células epidérmicas.

CAPÍTULO 9: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, D. S.; PRAUSNITZ, J. M. Statistical thermodynamics of liquid mixtures: A new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems. **AIChE Journal**, v. 21, n. 1, p. 116–128, 1975.

AGUIAR, R. S. S. **Modelagem termodinâmica do equilíbrio líquido-líquido em sistemas envolvendo líquidos iônicos com modelos de composição local/contribuição de grupo e estruturas moleculares determinadas via química quântica**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

AGULHON, P. et al. Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels. **Carbohydrate polymers**, v. 112, p. 525–31, 2014.

ALTMAN, G. H. et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. **Biomaterials**, v. 23, n. 20, p. 4131–4141, out. 2002.

ANTONOV, Y. A.; MOLDENAERS, P. Structure formation and phase-separation behaviour of aqueous casein-alginate emulsions in the presence of strong polyelectrolyte. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 350–360, 2011.

ASUNCION, M. C. T.; GOH, J. C. H.; TOH, S. L. Anisotropic silk fibroin/gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016.

BANSIL, R.; TURNER, B. S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 11, n. 2–3, p. 164–170, 2006.

BHUTANI, U. et al. Sodium Alginate and Gelatin Hydrogels: Viscosity Effect on Hydrophobic Drug Release. **Materials Letters**, v. 164, p. 76–79, 2015.

BRACHKOVA, M. I. et al. Alginate films containing *Lactobacillus plantarum* as wound dressing for prevention of burn infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 4, p. 375–377, 2011.

BRADA, S. B. **Estudo do equilíbrio de fases em sistemas contendo**

polímeros naturais: fibroína de seda e alginato de sódio. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo, 2019.

BRYCE, T. A. et al. Chain conformations in the sol-gel transitions for polysaccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods. **Faraday Discussions Chemical Society**, v. 57, p. 221–229, 1974.

BUILDERS, P. F.; KUNLE, O. O.; ADIKWU, M. U. Preparation and characterization of mucinated agarose: A mucin-agarose physical crosslink. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 174–180, 2008.

CAHN, J. W. Phase Separation by Spinodal Decomposition in Isotropic Systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 42, p. 93, 1965.

CALAMAK, S. et al. Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials. **Materials science & engineering. C**, v. 43, p. 11–20, 2014.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artiiber Editora Ltda, 2006.

CASTILLO, E. J. et al. Protein adsorption on soft contact lenses. **Biomaterials**, v. 7, p. 9–16, 1985.

CHAN, A. W.; NEUFELD, R. J. Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6119–6129, 2009.

CHIRGADZE, Y. N.; NEVSKAYA, N. A. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheet. **Biopolymers**, v. 15, n. 4, p. 627–636, 1976a.

CHIRGADZE, Y. N.; NEVSKAYA, N. A. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet. **Biopolymers**, v. 15, n. 4, p. 607–627, 1976b.

COHN, E. J. The physical chemistry of the proteins. **Physiol. Rev.**, v. 5, p. 349–437, 1925.

DE GENNES, P. G. **Scaling Concepts in Polymer Physics**. 1º ed. New York:

Cornell University Press, 1979.

DE MORAES, M. . M. A. **Obtenção e Caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

DE MORAES, M. A. et al. Silk fibroin and sodium alginate blend: miscibility and physical characteristics. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 40, p. 85–91, 1 jul. 2014.

DE 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. 3451–3457, 5 dez. 2013.

DERJAGUIN, B. AND LANDAU, L. D. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. **Acta Physicochimica U.R.S.S.**, v. 14, p. 633–662, 1941.

DONG, A.; HUANG, P.; CAUGHEY, W. S. Protein Secondary Structures in Water from Second-Derivative Amide I Infrared Spectra. **Biochemistry**, v. 29, n. 13, p. 3303–3308, 1990.

DRAGET, K. I. et al. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1661–1668, 2003.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 1–2, p. 47–55, 1997.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; STOKKE, B. T. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2- 3 SPEC. ISS., p. 170–175, 2006.

DRAGET, K. I.; SKJÅK BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate**

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

Polymers, v. 25, n. 1, p. 31–38, 1994.

DUFFY, C. V.; DAVID, L.; CROUZIER, T. Covalently-crosslinked mucin biopolymer hydrogels for sustained drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 20, p. 51–59, 2015.

ENOKI, T. A. **Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos**. Dissertação de mestrado. Instituto de Física. Universidade de São Paulo, 2010.

FARÈ, S. et al. In vitro study on silk fibroin textile structure for Anterior Cruciate Ligament regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 3601–3608, 2013.

FENG, C. et al. Immobilization of Coacervate Microcapsules in Multilayer Sodium Alginate Beads for Efficient Oral Anticancer Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 985-996, 2014.

FRANCO, L. F. M. **Estudo do equilíbrio sólido-líquido de sistemas contendo aminoácidos e proteínas**. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo, 2012.

FRANCO, L. F. M.; DE PESSÔA FILHO, P. A. On the relationship between the solubility of proteins and the osmotic second virial coefficient. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 95–104, 2013.

GASPARINI, T. M. **Aprimoramento de um detector de espalhamento de luz laser em baixo ângulo e seu uso in-line na caracterização morfológica de misturas poliméricas bifásicas**. Tese de doutorado. Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos, 2019.

GEORG JENSEN, M. et al. Functionality of alginate based supplements for application in human appetite regulation. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 823–829, 2012.

GHAELI, I. et al. Phase behaviour and miscibility studies of collagen/silk fibroin macromolecular system in dilute solutions and solid state. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

GRASDALEN, H. High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, n. C, p. 255–260, 1983.

HAMMOUDA, B. Random phase approximation for compressible polymer blends. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 172–174, n. PART 2, p. 927–931, 1994.

HOSSAIN, K. S.; NEMOTO, N. . Dynamic and static light scattering of dilute aqueous solution of silk fibroin collected from Bombyx Mori silkworms. **Langmuir**, v. 15, p. 4114–4119, 1999.

HU, X. et al. Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. **Biomaterials**, v. 31, n. 32, p. 8121–8131, 2010.

HU, X.; KAPLAN, D.; CEBE, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. **Macromolecules**, v. 39, n. 18, p. 6161–6170, 2006.

INOUE, T. REACTION-INDUCED PHASE DECOMPOSITION IN POLYMER BLENDS. **Progress in polymer science**, v. 20, n. 94, 1995.

JASTRZEBSKA, K. et al. Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, p. 1–12, dez. 2014.

JIMENEZ, M. H. **Transições de fase em polímeros líquidos-cristalinos de cadeia lateral**. Tese de doutorado. Instituto de Física Gleb Wataghin. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

JOST, V. et al. Influence of plasticiser on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. **Carbohydrate polymers**, v. 110, p. 309–19, 22 set. 2014.

KHAMPIENG, T.; ARAMWIT, P.; SUPAPHOL, P. Silk sericin loaded alginate nanoparticles: Preparation and anti-inflammatory efficacy. **International journal**

of biological macromolecules, v. 80, p. 636–43, 2015.

KIKUCHI, Y. et al. Structure of the Bombyx mori fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. **Gene**, v. 110, p. 151–158, 1992.

KIM, J. H.; MIN, B. R.; KANG, Y. S. Thermodynamic model of the glass transition behavior for miscible polymer blends. **Macromolecules**, v. 39, n. 3, p. 1297–1299, 2006.

KIM, K. H. et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 3, p. 327–339, 2005a.

KIM, U.-J. et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2775–85, maio 2005b.

KIM, W. N.; BURNS, C. M. THERMAL BEHAVIOR, MORPHOLOGY, AND THE DETERMINATION OF THE FLORY-HUGGINS INTERACTION PARAMETER OF POLYCARBONATE-POLYSTYRENE BLENDS. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 34, n. 3, p. 945–967, 1987.

KOH, L. D. et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. **Progress in Polymer Science**, v. 46, p. 86–110, 2015.

KRAMER, J. R. et al. Chemically tunable mucin chimeras assembled on living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12574–12579, 2015.

KRUIF, C. G. DE; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 555–563, 2001.

KUNDU, B. et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 457–470, abr. 2013.

KUNDU, J.; PATRA, C.; KUNDU, S. C. Design, fabrication and characterization of silk fibroin-HPMC-PEG blended films as vehicle for transmucosal delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 8, p. 1376–1380, 2008.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

- KWEON, H.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin/chitosan blend film. **Polymer**, v. 42, n. 15, p. 6651–6656, 2001.
- LEE, K. Y. et al. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. **Macromolecules**, v. 33, n. 11, p. 4291–4294, 2000.
- LEUNG, V. et al. Postelectrospinning modifications for alginate nanofiber-based wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B**, v. 102, p. 508–515, 2014.
- LEWIS, S. P.; LEWIS, A. T.; LEWIS, P. D. Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR. **Vibrational Spectroscopy**, v. 69, p. 21–29, 2013.
- LI, G. et al. The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism? **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6600–6606, 2001.
- LI, X. et al. Phase behavior and microstructure of preheated soy proteins and κ -carrageenan mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 845–853, 2008.
- 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, 1992.
- LOPES, L. M. **Estudo termodinâmico de blendas de fibroína de seda e alginato de sódio**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2016.
- LOPES, L. M.; DE MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Phase Diagram and Estimation of Flory-Huggins Parameter of Interaction of Silk Fibroin/Sodium Alginate Blends. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. August, p. 1–10, 2020.
- LOPES, L. M.; MORAES, M. A. DE; BEPPU, M. M. Study of phase separation in blends of silk fibroin and sodium alginate in solution and in solid state. **Journal of Polymer Research**, v. 25, 2018.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

- LOUSINIAN, S. et al. Microcalorimetry of the intestinal mucus: Hydrogen bonding and self-assembly of mucin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 555–560, 2018.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e Análise Térmica**. 1 edição ed. [s.l: s.n.].
- MAGGIONI, J. F. **Separação de fases de sistemas multicomponentes para preparação de membranas microporosas**. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- MAHL, C. R. A. **Adsorção de íons cobre em esferas de quitosana modificada quimicamente e alginato na presença do peptídeo β -amilóide ou histidina**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2018.
- MANDAL, B. B.; KUNDU, S. C. Calcium alginate beads embedded in silk fibroin as 3D dual drug releasing scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5170–7, out. 2009.
- MANDAL, B. B.; MANN, J. K.; KUNDU, S. C. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 160–171, 2009.
- MANRICH, S.; ZANOTTO, E. D.; HAGE, E. J. **Aplicabilidade da teorica clássica de nucleação modificada (CD-CNT) à cristalização de polímeros** **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1992.
- MARIN, M. A.; MALLEPALLY, R. R.; MCHUGH, M. A. Silk fibroin aerogels for drug delivery applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 91, p. 84–89, jul. 2014.
- MATSUMOTO, A. et al. Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 43, p. 21630–21638, 2006.
- MENG, X. et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1751–1759, 2010.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

- MISSION, J. L. et al. Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins-sodium alginate-water ternary system. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 333–343, 2012.
- MING, J.; ZUO, B. A novel silk fibroin/sodium alginate hybrid scaffolds. **Polymer Engineering & Science**, v. 54, n. 1, p. 129–136, 25 jan. 2014.
- MINOURA, N.; TSUKADA, M.; NAGURA, M. Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol. **Polymer**, v. 31, n. 2, p. 265–269, 1990.
- MORAES, M. A. DE et al. Silk fibroin and sodium alginate blend: Miscibility and physical characteristics. **Materials Science & Engineering C**, v. 40, p. 85–91, 2014.
- MOTTA, V. T. Aminoácidos e proteínas. In: **Bioquímica básica**. [s.l.: s.n.]. v. Vp. 1203–1211.
- NAKAUMA, M. et al. Food Hydrocolloids Calcium binding and calcium-induced gelation of sodium alginate modified by low molecular-weight polyuronate. **Food hydrocolloids**, v. 55, p. 65–76, 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. In: **Princípios de Bioquímica**. 3^o ed. São Paulo: [s.n.]. p. 87–119.
- NIETO, M. . Structure and Function of Polysaccharide Gum-based Edible Films and Coatings. In: **Edible Films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer, 2009. p. 57–112.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Layer-by-layer deposited chitosan/silk fibroin thin films with anisotropic nanofiber alignment. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8953–8958, 2010.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Hydrogels from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial perspective. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 5, p. 997–1001, 2011.
- ONSØYEN, E. Alginates. In: **Thickening and gelling agents for food**. [s.l.: s.n.]. p. 22–26.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

PACEK, A W. et al. Phase separation and drop size distributions in “homogeneous” Na-alginate / Na-caseinate mixtures. v. 42, p. 401–409, 2000.

PARCHEN, G. P. **Efeito do potencial elétrico da superfície de lipossomas revestidos com biopolímeros sobre a liberação cutânea de EGF.** Dissertação de mestrado. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, 2001.

PESSOA FILHO, P. A. **Contribuições à modelagem do equilíbrio de fases e da partição de moléculas biológicas em sistemas aquosos bifásicos.** Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

PETROU, G. et al. Genetically Engineered Mucoadhesive Spider Silk. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 8, p. 3268–3279, 2018.

PETROU, G.; CROUZIER, T. Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 9, p. 2282–2297, 2018.

PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., DE AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria.** 3ª ed. [s.l.] Prentice Hall, 1998.

QURRAT-UL-AIN, A. et al. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: Pharmacokinetics and therapeutic effects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 931–938, 2003.

RAMÍREZ, S. M. V. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IDADE DA FIBROÍNA DE SEDA NAS SUAS PROPRIEDADES DURANTE O PROCESSAMENTO.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2016.

REICHART, G. C. et al. Measurement of thermodynamic interactions in ternary polymer blends by small-angle neutron scattering. **Macromolecules**, v. 30, n. 11, p. 3363–3368, 1997.

RENON, H.; PRUASNITZ, J. M. Local compositions in thermodynamics excess functions for liquids mixtures. **AIChE J.**, v. 14, n. 1, p. 116–128, 1968.

ROH, D. H. et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

full thickness skin defect of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 6, p. 547–552, 2006.

SAH, M. K.; PRAMANIK, K. Regenerated Silk Fibroin from B . mori Silk Cocoon for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 1, n. 5, p. 404–408, 2010.

SARKER, B. et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 72–8, 2015.

SARTORI, C. et al. Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy. **Polymer**, v. 38, n. 1, p. 43–51, 1997.

SATCHITHANANDAM, S. et al. Effects of dietary fibers on gastrointestinal mucin in rats. **Nutrition Research**, v. 16, n. 7, p. 1163–1177, 1996.

SCHMID, F. **Theory and Simulation of Multiphase Polymer Systems**. [s.l.: s.n.]. v. 1

SCHWAHN, D. **Phase behaviour of polymer blends**. German: Springer, 2005.

SERBAN, M. A.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L. Silk fibroin and polyethylene glycol-based biocompatible tissue adhesives. **J Biomed Mater Res A**, v. 98, n. 4, p. 567–575, 2012.

SHANG, S.; ZHU, L.; FAN, J. Physical properties of silk fibroin/cellulose blend films regenerated from the hydrophilic ionic liquid. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 462–468, 2011.

SHEN, T. et al. Dissolution behavior of silk fibroin in a low concentration CaCl₂-methanol solvent: From morphology to nanostructure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 458–463, 2018.

SKOOG, D. A. Espectroscopia de fluorescência molecular. In: **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2005. p. 782–795.

SLATER, G. W.; NOOLANDI, J. Static Structure Factor of Charged Reptating

Polymer Chains. **Macromolecules**, v. 19, n. 9, p. 2356–2366, 1986.

SMITH, J. M.; VAN NESS, G. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7^o edição ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOHN, S.; STREY, H. H.; GIDO, S. P. Phase behavior and hydration of silk fibroin. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 751–757, 2004.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 54–59, 2010.

SRISUWAN, Y.; BAIMARK, Y. Preparation of Biodegradable Silk Fibroin / Alginate Blend Films for Controlled Release of Antimicrobial Drugs. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, 2013.

STRAGEVITCH, L. **Equilíbrio Líquido-Líquido de Misturas de Não Eletrólitos**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 1997.

TAGER, A. A. THERMODYNAMIC STABILITY OF POLYMERIC COMPOSITES . **thermodynamics of polymer blending**, n. 8, p. 1659–1669, 1977.

TAKETA, T. B. **Recobrimentos Antimicrobianos E Nanoestruturados Contendo Quitosana Produzidos Pela Técnica De Automontagem (Layer-By-Layer) Para Substratos Têxteis Contendo Quitosana Produzidos Pela Técnica De Automontagem (Layer-By-Layer) Para Substratos Têxteis**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2017.

TAKETA, T. B. et al. Tracking Sulfonated Polystyrene Diffusion in a Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Layer-by-Layer Film: Exploring the Internal Architecture of Nanocoatings. **Langmuir**, v. 36, n. 18, p. 4985–4994, 2020.

TANAKA, K.; MORI, K.; MIZUNO, S. Immunological identification of the major disulfide-linked light component of silk fibroin. **JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**,

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

v. 114, p. 1–4, 1993.

TAVARES, F. W.; PRAUSNITZ, J. M. Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids or globular proteins. **Colloid and Polymer Science**, v. 282, n. 6, p. 620–632, 2004.

THU, H. E.; ZULFAKAR, M. H.; NG, S. F. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 375–383, 2012.

TIMASHEFF, S. N. The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These Processes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, n. 1, p. 67–97, 1993.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e Caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

UCHIDA, R. et al. Effect of plasma-irradiated silk fibroin in bone regeneration. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 333–40, set. 2014.

USTUNOL, Z. Edible films and Coatings for Food Applications. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (Eds.). . **Edible Films and Coatings for Food Applications**. [s.l.] Springer, 2009.

UTRACKI, L. A. **Polymer alloys and blends - thermodynamics and rheology**. New York: Hanser Publisher, 1989.

VAZ, J. M. **Preparação e caracterização de biofilme ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticulado com cálcio**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

WANG, Y. et al. A Biomimetic Silk Fibroin/Sodium Alginate Composite Scaffold for Soft Tissue Engineering. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 39477, 2016.

Capítulo 9: Referências Bibliográficas

- WENK, E.; MERKLE, H. P.; MEINEL, L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 2, p. 128–141, 2011.
- WHITTAKER, J. L. et al. Facile and rapid ruthenium mediated photo-crosslinking of Bombyx mori silk fibroin. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 37, p. 6259–6270, 2014.
- WIJMANS, J. G.; RUTTEN, H. J. J.; SMOLDERS, C. A. Phase Separation Phenomena in Solutions of Poly(2,6-Dimethyl-1,4-Phenyleneoxide) in Mixtures of Trichloroethylene, 1-Octanol, and Methanol: Relationship To Membrane Formation. **Journal of polymer science. Part A-2, Polymer physics**, v. 23, n. 9, p. 1941–1955, 1985.
- YANG, Y.; KWAK, H. W.; LEE, K. H. Effect of Residual Lithium Ions on the Structure and Cytotoxicity of Silk Fibroin Film. **Int. J. Indust. Entomol.**, v. 27, n. 2, p. 265–270, 2013.
- YANO, A. **Aplicação da Abordagem Diferencial ao Cálculo do Equilíbrio Osmótico em Sistemas de Múltiplos Solventes Aplicação da Abordagem Diferencial ao Cálculo do Equilíbrio Osmótico em Sistemas de Múltiplos Solventes**. Dissertação de mestrado Escola Politécnica. Universidade de São Paulo, 2007.
- YETISKIN, B.; OKAY, O. High-strength silk fibroin scaffolds with anisotropic mechanical properties. **Polymer**, v. 112, p. 61–70, 2017.
- YUCEL, T.; LOVETT, M. L.; KAPLAN, D. L. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 381–397, 2014.
- ZHANG, H. et al. Silk fibroin/sodium alginate composite nano-fibrous scaffold prepared through thermally induced phase-separation (TIPS) method for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 8–13, 2015.
- ZNAMENSKAYA, Y. et al. Effect of hydration on structural and thermodynamic properties of pig gastric and bovine submaxillary gland mucins. **Journal of**

Physical Chemistry B, v. 116, n. 16, p. 5047–5055, 2012.