

LEDILEGE CUCCO PORTO

**FILMES FORMADOS POR GELATINA E POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO
ACRÍLICO): EFEITO DA COMPOSIÇÃO, DO PLASTIFICANTE E AGENTE
RETICULANTE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, MECÂNICAS E ABSORÇÃO
DE ÁGUA**

Florianópolis

2007

LEDILEGE CUCCO PORTO

**FILMES FORMADOS POR GELATINA E POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO
ACRÍLICO): EFEITO DA COMPOSIÇÃO, DO PLASTIFICANTE E AGENTE
RETICULANTE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, MECÂMICAS E ABSORÇÃO
DE ÁGUA**

Dissertação submetida à Universidade
Federal de Santa Catarina como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de Mestre
em Química.

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2007

Ledilege Cucco Porto

**FILMES FORMADOS POR GELATINA E POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO
ACRÍLICO): EFEITO DA COMPOSIÇÃO, DO PLASTIFICANTE E AGENTE
RETICULANTE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, MECÂNICAS E ABSORÇÃO
DE ÁGUA**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

Banca Examinadora

Prof. Dr. Edson Minatti
(UFSC)

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
(UFSC)

Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher
(UFSC)

Dedico este trabalho aos meus pais Valmarino e Berluze, que me completam com carinho e palavras. Ao meu irmão Ledinério pelo afeto e ao Renan, pelo companheirismo, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

Ao professor Valdir Soldi, pela orientação, paciência e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

À Marly pela ajuda e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, prof. Dr. Edson Minatti, prof. Dr. Nito Ângelo Debacher e prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto.

Aos amigos do POLIMAT, especialmente à Cláudia, Aline Lima, Rosane, Cris, Luana, Carol, Adriana, Larissa, Aline Oliveira e Samira que sempre se mostraram prestativos, dedicando tempo às discussões deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos R. F. Grosso (UNICAMP) pela gentileza em nos doar o TNBS.

À minha família e aos meus amigos que mesmo estando longe, souberam se fazer presentes.

À minha amiga Marlici que nestes últimos anos esteve ao meu lado, me incentivando.

Ao Renan pelo companheirismo, confiança e principalmente seu amor.

Ao Departamento de Química e aos professores que ajudaram na minha formação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVOS GERAIS	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 POLÍMEROS NATURAIS	4
3.1.1 PROTEÍNAS.....	5
3.1.2 GELATINA.....	7
3.2 POLÍMEROS SINTÉTICOS.....	11
3.2.1 COPOLÍMEROS	13
3.2.2 POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO ACRÍLICO)	13
3.3 BLENDA POLIMÉRICAS.....	14
3.4 PLASTIFICANTES.....	16
3.5 AGENTE RETICULANTE.....	18
4 PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	24
4.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES	24
4.2.1 FILMES COM PLASTIFICANTE.....	24
4.2.2 FILMES RETICULADOS	25
4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA GELATINA	25
4.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO	26
4.5 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO.....	27
4.6 ANÁLISE TÉRMICA.....	27
4.6.1 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	27

4.6.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	28
4.6.3 ANÁLISE TERMOMECÂNICA (TMA)	28
4.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR).....	28
4.8 MORFOLOGIA	29
4.9 ANÁLISE MECÂNICA.....	29
4.10 ADSORÇÃO DE VAPORES DE ÁGUA	29
4.11 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA GELATINA	31
5.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO	31
5.3 ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO	33
5.4 ANÁLISE TÉRMICA.....	36
5.4.1 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	36
5.4.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTRICA	42
5.4.2.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	42
5.4.2.2 ANÁLISE TERMOMECÂNICA (TMA)	47
5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR).....	50
5.6 MORFOLOGIA	57
5.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	60
5.8 ADSORÇÃO DE VAPORES DE ÁGUA.....	67
5.9 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO	70
6 CONCLUSÕES.....	72
7 BIBLIOGRAFIA.....	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a	Constante específica para cada polímero
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTG	Derivada da curva termogravimétrica
EDC	Hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
K	Constante específica para cada polímero
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MY	Módulo de Young
[η]	Viscosidade Intrínseca
η_{sp}	Viscosidade Específica
η_{red}	Viscosidade Reduzida
P(AAm-co-AA)	Poli(acrilamida-co-ácido acrílico)
%E	Porcentagem de Máxima Elongação
PGA	Poli(ácido glicólico)
PHA	Poli(hidroxiálcanoato)
PHB	polihidroxibutirato
PHV	Poli(hidroxiálvalerato)
PLA	Poli(ácido láctico)
RI	Razão de intumescimento
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TMA	Análise termomecânica
T_{max}	Temperatura de máxima velocidade de degradação
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TR	Tensão de Ruptura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura primária, secundária e terciária do colágeno.....	08
Figura 2. Processo para a preparação de gelatina por hidrólise ácida e básica do colágeno.....	09
Figura 3. Estrutura química do poli(acrilamida-co-ácido acrílico).....	14
Figura 4. Estrutura química do sorbitol.....	18
Figura 5. Estrutura química do hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	20
Figura 6. Reação da formação de amida entre grupos carboxílicos e grupos amino em meio aquoso na presença de EDC.....	21
Figura 7. Esquema ilustrativo do processo de reticulação intermediado pelo EDC.....	23
Figura 8. Reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com grupos amino primários da proteína em pH alcalino para formar um derivado trinitrofenil e um íon sulfito.....	31
Figura 9. Razão de intumescimento <i>versus</i> tempo para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC.....	34
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das fraturas dos filmes de gelatina (A), G/P(AAm-co-AA) 70/30 (B), G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C) e G/P(AAm-co-AA) 30/70 (D) reticulados, após intumescimento e liofilização.....	35
Figura 11. Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) para os filmes G/P(AAm-co-AA) na taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min ⁻¹).	39

Figura 12. Curvas termogravimétricas para: (A) G/P(AAm-co-AA)_sorbitol e (B) G/P(AAm-co-AA)_EDC.....	41
Figura 13. Valores de T_{\max} referente à maior porcentagem de perda de massa, como uma função da concentração de gelatina nas blendas para os três sistemas estudados.....	42
Figura 14. Curvas de DSC (A) e valores de T_g experimentais e teóricos, determinados pela equação de Fox (B) para filmes compostos por G/P(AAm-co-AA)	45
Figura 15. Curvas de DSC obtidas a partir dos filmes de G/P(AAm-co-AA) em presença de sorbitol (A) e EDC (B)	46
Figura 16. Temperaturas de transição vítrea dos filmes de G/P(AAm-co-AA): puro (■), com sorbitol (●), reticulado com EDC (▲), e de acordo com a equação de Fox (▼).....	48
Figura 17. Curvas termomecânicas obtidas para os sistema puro (A) e para os filmes de gelatina e P(AAm-co-AA) (B)	49
Figura 18. Sobreposição dos espectros de infravermelho dos filmes de G/P(AAm-co-AA)	51
Figura 19. Espectros de infravermelho do sistema puro (A), na presença de sorbitol (B) e de EDC (C) na região de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$	54
Figura 20. Espectros de infravermelho do sistema puro (A), na presença de sorbitol (B) e de EDC (C) na região de $1800-1000\text{ cm}^{-1}$	56
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura para o os filmes de gelatina (A e B), G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C e D) e P(AAm-co-AA) (E e F), das superfícies e fraturas, respectivamente.....	58

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das superfícies e das fraturas para os filmes de gelatina (A e B), de P(AAm-co-AA) (C e D) e da blenda G/P(AAm-co-AA) 50/50 (E e F), respectivamente, em presença de sorbitol.....	59
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura da superfície e das fraturas dos filmes compostos por gelatina (A e B) e pela blenda G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C e D) em presença de agente reticulante.....	60
Figura 24. Curvas representativas de tensão <i>versus</i> deformação, obtidas para o filme de gelatina puro, com sorbitol e reticulado.....	61
Figura 25. Valores médios e desvios padrão para as medidas de tensão de ruptura (A), alongação máxima (%) (B) e módulo de Young (C) como função da % de gelatina para o sistema G/P(AAm-co-AA) puro (■), na presença de sorbitol (●) e reticulado (▲).....	64
Figura 26. Modelo proposto para o filme de gelatina não reticulado (A e B) e reticulado (C e D) antes e após tração, respectivamente.....	66
Figura 27. Curvas de adsorção de vapores de água a 25 °C e umidade relativa de 98% para: G/P(AAm-co-AA) (A), G/P(AAm-co-AA)_sorbitol (B) e G/P(AAm-co-AA)_EDC (C).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de aminoácidos em gelatinas do Tipo A e B.....	10
Tabela 2. Valores de porcentagem de reticulação para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC.....	32
Tabela 3. Parâmetros termogravimétricos para os três sistemas estudados.....	37
Tabela 4. Análises de DSC para o sistema G/P(AAm-co-AA) na presença ou ausência de sorbitol ou agente de reticulação.....	44
Tabela 5. Temperatura de transição vítrea determinada para os três sistemas por análise de DSC e TMA.....	50
Tabela 6. Propriedades mecânicas para os diferentes sistemas estudados.....	62
Tabela 7. Valores de porcentagem de perda de massa para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC imersos em solução ácida (pH 3,0), aquosa (pH 6,0) e básica (pH 10,0)	71

RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver e caracterizar filmes formados por blendas de gelatina, um polímero natural e poli(acrilamida-co-ácido acrílico), um polímero sintético, em diferentes proporções, combinando a biodegradabilidade da proteína e as propriedades mecânicas do componente sintético. Para promover uma melhora em algumas de suas propriedades, foi adicionado sorbitol como agente plastificante e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente de reticulação. Estes filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades térmicas (através de análise termogravimétrica - TGA, calorimetria diferencial de varredura - DSC e análise termomecânica - TMA), estruturais por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR e morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura - MEV. As propriedades mecânicas (tensão de ruptura - TR, porcentagem de alongação - %E e módulo de Young - MY) foram também investigadas, assim como ensaios de absorção de vapores de água na umidade relativa de 98%. As análises de DSC e TMA indicaram miscibilidade entre os componentes, comprovada pela presença de uma única temperatura de transição vítrea e pela homogeneidade dos filmes formados. A adição de sorbitol nas blendas provocou uma pequena diminuição na estabilidade térmica dos filmes, na temperatura de transição vítrea, na tensão de ruptura e no módulo de Young, acompanhada de um aumento na alongação e na absorção de vapores de água. Os filmes reticulados apresentaram um grau máximo de reticulação de 70%. Este processo alterou também algumas das propriedades dos filmes, como temperatura de transição vítrea, tensão de ruptura e módulo de Young, para valores menores e aumentou consideravelmente a alongação dos filmes e a absorção a vapores de água, sugerindo que o processo de reticulação causou uma desestabilização na estrutura da gelatina. Características como baixa solubilidade em água e alta porcentagem de alongação são favoráveis a aplicação destes materiais como embalagens.

ABSTRACT

The main objective of this study was to obtain and characterize films formed by the mixture of gelatin, a natural polymer, and poly(acrylamide-co-acrylic acid), a synthetic polymer, in different compositions, combining the biodegradability of the protein and the mechanical properties of the synthetic component. In order to improve the thermal and mechanical properties, sorbitol as a plasticizer and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride as crosslinked, were added. The thermal properties (thermogravimetric – TGA, differential scanning calorimetry – DSC and thermomechanical analysis - TMA), structural properties (infrared spectroscopy – FTIR), morphological, mechanical properties (tensile strength – TS, percentage of elongation - %E, and Young's modulus) and absorption of water at 98% relative humidity were characterized. The analysis of DSC and TMA suggest miscibility between the components confirmed by the presence of only one temperature of glass transition by the homogeneous morphology of the formed films. The addition of sorbitol in the blends slightly decreased the thermal stability of the films, the temperature of glass transition; the tensile strength and the Young's modulus increased; the percentage of elongation and the absorption of water vapors. The films showed 70% a maximum degree of crosslinking. This process decreased the glass transition temperature, tensile strength and Young's modulus, increasing, however, the elongation and absorption of water vapors of the films. The crosslinking process decreased the stability of the protein structure. Characteristics, such as, low solubility and high percentage of elongation favor the application as packing material.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Como consequência do impacto ambiental causado pelo uso de embalagens formadas por materiais sintéticos, tem sido crescente o interesse em substituí-los por materiais biodegradáveis. Uma alternativa bastante viável é a utilização de macromoléculas obtidas de fontes naturais e renováveis como proteínas, polissacarídeos e lipídios.

A preparação de filmes a partir de polímeros naturais tem sido uma opção para produzir embalagens com alta biodegradabilidade. Uma desvantagem, no entanto, é o baixo desempenho mecânico destes materiais, razão pela qual se torna interessante a mistura com polímeros sintéticos que são mais resistentes mecanicamente. A preparação de blendas poliméricas tem por finalidade modificar as propriedades de seus componentes individuais, de modo a alcançar uma propriedade específica, sem a necessidade de realizar a síntese de novas macromoléculas. No caso da mistura de polímeros naturais com polímeros sintéticos, as propriedades do novo material formado combinam a biodegradabilidade do componente natural com as propriedades mecânicas do componente sintético.

Dentre as proteínas mais estudadas destaca-se a gelatina que tem sido utilizada devido a sua abundância, baixo custo e por possuir excelentes propriedades formadoras de filmes, sendo aplicada em diversas áreas, como alimentos, embalagens e coberturas comestíveis, indústria farmacêutica, fotográfica, entre outras. Possui boas propriedades de barreira a oxigênio, porém alta permeabilidade a vapores de água e propriedades mecânicas não adequadas a muitas aplicações tecnológicas.

Existem poucos estudos relacionados às propriedades de filmes formados por poli(acrilamida-co-ácido acrílico), que experimentalmente exibem excelentes propriedades formadoras de filmes. Assim como seus monômeros, este polímero exibe vantagens como afinidade pela água e viabilidade comercial.

O uso de técnicas que promovam a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas é uma alternativa para contornar uma outra desvantagem de filmes protéticos, que é a solubilidade em água. A diminuição da solubilidade do material viabiliza a sua aplicação. Neste sentido, vários agentes de reticulação química e física vêm sendo empregados.

Dentro deste contexto, este trabalho visa à formação e caracterização de filmes formados por gelatina, um polímero natural de origem animal, e poli(acrilamida-co-ácido acrílico), um polímero sintético, em diferentes proporções combinando suas propriedades físicas e químicas.

A relevância deste trabalho está na tentativa de produzir um novo material com características e propriedades adequadas e que forneça uma nova alternativa para a substituição de materiais que são essencialmente de origem sintética. Além disso, algumas modificações, como a adição de plastificantes e a reticulação química, podem aumentar significativamente a possibilidade de aplicar este novo material, em áreas que predominam os materiais sintéticos como embalagens, sistemas de liberação de princípios ativos, entre outras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Preparação e caracterização de filmes formados a partir de gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico) em diferentes proporções, analisando a influência do sorbitol como plastificante e do processo de reticulação quanto às suas propriedades térmicas, mecânicas, absorção de água, entre outras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparação dos filmes em diferentes proporções tendo como matéria prima gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico), bem como em presença de sorbitol como plastificante ou de hidrócloro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente reticulante.
- ✓ Avaliar o grau de reticulação dos filmes através de ensaio com o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).
- ✓ Avaliar o grau de intumescimento dos filmes reticulados em solução aquosa.
- ✓ Analisar as propriedades térmicas dos filmes através de análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termomecânica (TMA).
- ✓ Caracterizar os filmes por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- ✓ Avaliar as propriedades mecânicas através de medidas de tensão de ruptura, máxima alongação e módulo de Young (elasticidade).
- ✓ Avaliar a adsorção de vapores de água nos filmes em ambiente de umidade relativa controlada.
- ✓ Determinar a porcentagem de degradação dos filmes em soluções aquosas ácida, básica e neutra.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLÍMEROS NATURAIS

A palavra polímero (do grego: poli-muitos e mero-partes) é utilizada para designar moléculas formadas por um grande número de unidades moleculares repetidas (monômeros), ligadas entre si por ligações covalentes, formando compostos com cadeias longas e alta massa molecular [1].

Polímeros naturais, ou biopolímeros, são estruturas formadas durante o ciclo de crescimento dos organismos vivos e sua síntese envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos [2, 3].

São materiais biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos e com alta versatilidade química e um alto potencial para serem usados em uma grande faixa de aplicações. Entre as muitas aplicações, podem ser utilizados em fibras, adesivos, embalagens, géis, suportes, filmes, materiais e resinas termoplásticas [4, 5].

Os polímeros de ocorrência natural podem ser classificados principalmente em poliésteres naturais, polissacarídeos e polipeptídeos.

Poliésteres naturais, os polihidroxialcanoatos (PHAs), são produzidos por bactérias, uma fonte de recursos renováveis, são biodegradáveis e biocompatíveis. Os mais conhecidos são polihidroxibutirato (PHB) (semelhante ao polímero sintético polipropileno em suas propriedades físicas e mecânicas) e polihidroxivalerato (PHV) [2, 5].

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas por milhares de unidades monossacarídicas ligadas entre si por ligações glicosídicas, unidas em longas cadeias lineares ou ramificadas. Funcionam como reserva de carboidratos e como elementos estruturais para os sistemas vivos, destacando-se a celulose, amido, quitosana, quitinas e xantanas [2, 4].

Porém a maior variedade de macromoléculas biológicas encontra-se nas proteínas, que de uma maneira mais geral, são copolímeros formados por diferentes tipos de aminoácidos e sua biossíntese é um processo extremamente complexo envolvendo diferentes tipos de enzimas [3]. Dentre as mais utilizadas encontram-se o colágeno, gelatina, caseína, glúten e proteína isolada de soja [6].

Os polímeros biodegradáveis, cuja degradação resulta em dióxido e monóxido de carbono (CO_2 , CO), gás metano (CH_4), água e biomassa, resultante da ação de microorganismos vivos e enzimas [2], podem ainda ser agrupados em duas classes principais, naturais e sintéticos. Os polímeros biodegradáveis sintéticos mais usados têm sido poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) [2, 4, 5].

As principais aplicações dos polímeros biodegradáveis têm sido nas áreas médicas [7], na engenharia de tecidos [8] e para o consumo de embalagens [9].

O desenvolvimento de filmes e embalagens tendo polímeros naturais como matéria prima, tem se intensificado em diversos setores da sociedade, principalmente porque podem oferecer uma possível alternativa para a substituição dos tradicionais polímeros não biodegradáveis [10].

Filmes biodegradáveis são materiais finos, transparentes e flexíveis obtidos de biopolímeros naturais e sintéticos [11]. São geralmente preparados por dissolução do polímero em solvente apropriado com posterior evaporação. Muitos polímeros naturais não podem ser processados por fusão, devido primeiramente à degradação ou porque são projetados para incorporar substâncias que perdem suas propriedades com a temperatura. Por este motivo a formação de filmes em meio aquoso é a tecnologia preferida [12, 13].

Muitos pesquisadores dedicam-se ao estudo de filmes produzidos por polímeros de origem natural, principalmente polissacarídeos e proteínas que são conhecidos por apresentarem boas propriedades formadoras de filmes, exibirem barreira a gases satisfatória e os valores de permeabilidade a vapores de água são frequentemente altos [6].

Entre os polissacarídeos, destaca-se o estudo e aplicações em filmes de amido (termoplástico), alginato de sódio, dextrinas e derivados de celulose (metilcelulose, hidroxipropilcelulose, acetato de celulose) [13, 14, 15].

Em relação às proteínas para a produção de filmes poliméricos, tem sido utilizado principalmente a proteína de soja [16], o glúten [17], caseinato [18] e gelatina [19].

3.1.1 PROTEÍNAS

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas e constituem metade ou mais de seu peso seco em muitos organismos. As proteínas são construídas por um conjunto de 22 aminoácidos, unidos covalentemente em seqüências características que diferem um do outro por suas cadeias laterais, as quais variam em estrutura, tamanho, carga

elétrica e solubilidade em água. Devido a cada um desses aminoácidos ter uma cadeia lateral que lhes confere individualidade química, e às diversas sequências de aminoácidos que podem ser formadas, as proteínas são extremamente versáteis em suas funções. São importantes nos seres vivos devido a funções como: estrutural, enzimática, hormonal, de defesa, nutritivo, coagulação sanguínea e transporte [4, 20].

Podem ser divididas em duas grandes classes com base em sua forma e certas características físicas: proteínas globulares, onde as cadeias polipeptídicas estão fortemente enoveladas em uma forma esférica, são solúveis em sistemas aquosos e se difundem facilmente; a maioria tem função móvel ou dinâmica; e proteínas fibrosas, que são moléculas insolúveis em água, alongadas e filamentosas, com a cadeia polipeptídica estendida ao longo de um eixo. A maioria das proteínas fibrosas tem função estrutural ou protetiva, como a α -queratina do cabelo e da lã, a fibroína da seda e o colágeno dos tendões [20].

As proteínas assumem diferentes estruturas ao longo da cadeia polimérica e comumente se diferenciam quatro níveis na estrutura das proteínas: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos que forma uma cadeia unida por ligações peptídicas. A sequência linear de aminoácidos de uma proteína determina o nível mais importante na estrutura da molécula. A estrutura secundária é a organização espacial de aminoácidos que se encontram próximos entre si na cadeia peptídica. Algumas regiões podem apresentar uma estrutura α -hélice, onde a conformação da cadeia peptídica é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o grupo amino de um aminoácido e um grupo carboxila situado quatro resíduos à frente, na mesma cadeia polipeptídica. Na estrutura em folha pregueada β , os aminoácidos assumem a configuração de uma folha de papel pregueada, e a estrutura está estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos amino e carboxila de diferentes cadeias polipeptídicas [20].

Outros segmentos da proteína não apresentam estas ligações transversais e assumem, por sua vez, uma configuração ao acaso (*random coil*); isto se deve, em parte, ao fato de certos aminoácidos, como a prolina, romperem a estrutura helicoidal. A estrutura terciária é a forma pela qual as regiões helicoidais e de *random coil* se dispõem entre si. Além disso, a estrutura terciária é a responsável pela maior estabilidade da conformação, como consequência de um vasto número de ligações de hidrogênio intramoleculares, ligações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações covalentes (ponte dissulfeto) e forças de van der Waals. Já a estrutura quaternária é a disposição de subunidades protéicas em proteínas complexas formadas por duas ou mais destas subunidades [20].

As estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas podem ser modificadas por vários agentes químicos e físicos, como aquecimento, tratamento mecânico, ácidos ou bases, irradiação, etc [6].

As proteínas têm sido largamente aplicadas, isoladamente ou em misturas, para a obtenção de filmes biodegradáveis ou comestíveis, desde que apresentem boas propriedades mecânicas e de barreira a gases [21]. Filmes biodegradáveis e embalagens podem funcionar como barreiras a umidade, oxigênio e aroma protegendo a qualidade dos produtos, e também substituir filmes sintéticos convencionais, reduzindo o uso de recursos não renováveis e os resíduos por eles formados [6].

Devido ao seu caráter hidrofílico inerente, estes filmes protéicos não apresentam barreiras adequadas aos vapores de água. Assim modificações nas propriedades destes filmes tem sido o objetivo de vários trabalhos de pesquisa [21].

Dentre as proteínas utilizadas para o estudo e produção de filmes biodegradáveis ou comestíveis, além de outras aplicações, destaca-se a gelatina.

3.1.2 GELATINA

Gelatina é um polímero natural, uma mistura de polipeptídeos de alta massa molecular, obtido pela hidrólise controlada das fibras de colágeno. O colágeno é uma proteína largamente encontrada na natureza e é o maior constituinte de peles, ossos e tecidos conectivos [22], correspondendo a mais de 30% da base protéica do organismo humano, representando uma típica fonte de material renovável de recursos naturais de origem animal [10, 23]. Sua macromolécula consiste de resíduos de aminoácidos de proporções e distribuição variáveis ao longo da cadeia macromolecular [24].

As cadeias de colágeno apresentam uma conformação em tripla hélice, com conformação helicoidal (Figura 1). Já a rede tridimensional dos géis de gelatina é composta de microcristais interconectados com regiões amorfas de segmentos randômicos [23].

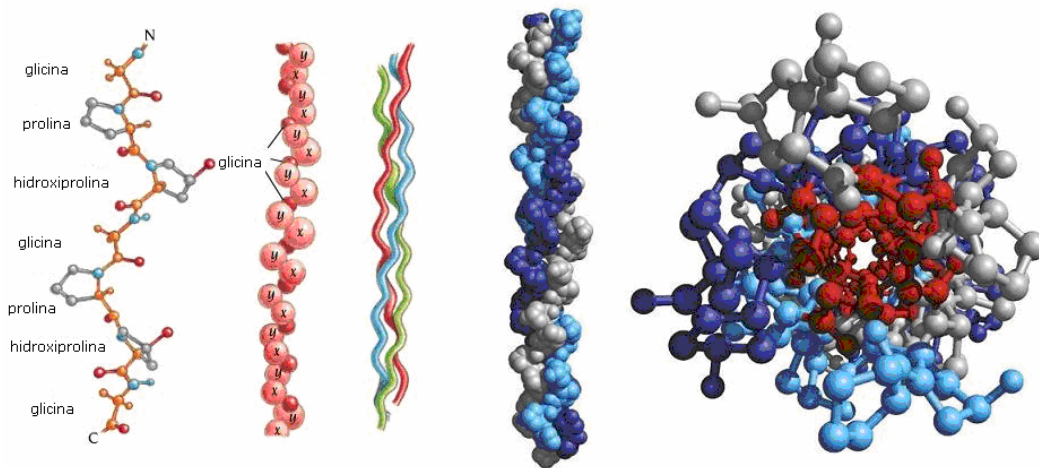


Figura 1. Estrutura primária, secundária e terciária do colágeno.

Para converter colágeno insolúvel em gelatina solúvel, pré-tratamentos ácidos e alcalinos são usados para clivar um número suficiente de ligações covalentes no colágeno originando respectivamente, a gelatina do tipo A e gelatina do tipo B (Figura 2) [24, 25]. No processo alcalino os grupos amino são hidrolisados em grupos carboxílicos, diminuindo assim o ponto isoelétrico, ou seja, o pH onde as moléculas são neutras, como resultado do aumento do número de grupos carboxílicos da gelatina. Em contraste, o pré-tratamento ácido pouco afeta os grupos amino presentes [23, 26].

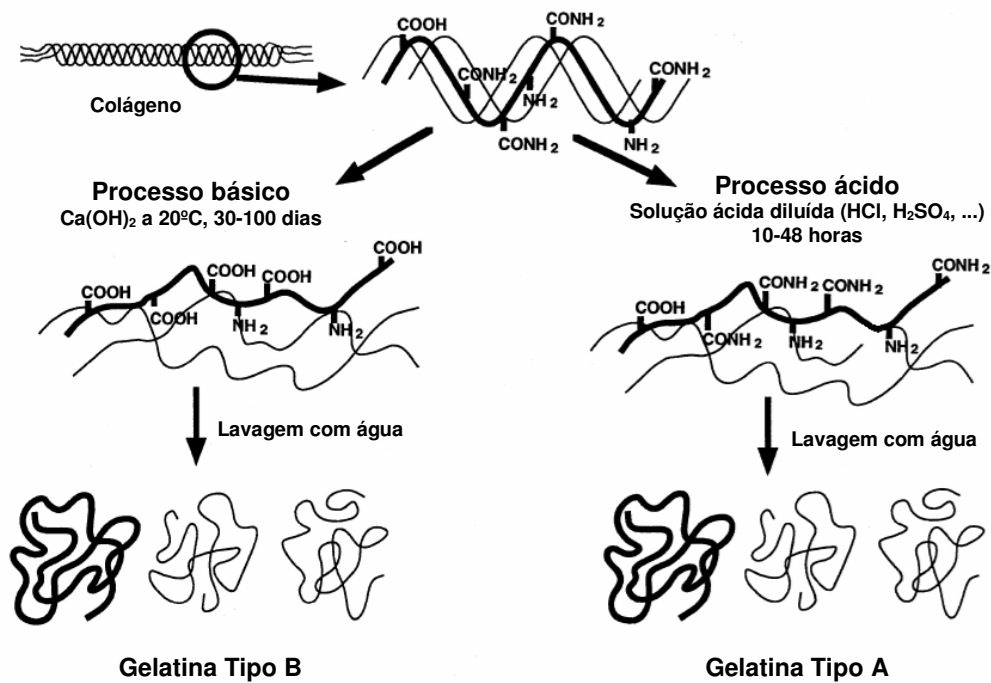


Figura 2. Processo para a preparação de gelatina por hidrólise ácida (gelatina tipo A) e básica (gelatina tipo B) do colágeno. [12]

A manufatura da gelatina envolve a destruição da estrutura terciária e também, em algum grau, da estrutura primária do colágeno [27]. A estrutura primária da gelatina é composta pela seqüência $(-\text{glicina}-\text{X}-\text{Y}-)_n$, onde X e Y são frequentemente prolina e hidroxiprolina, respectivamente, sendo estes três os aminoácidos mais abundantes nas moléculas de gelatina. Cerca de um terço dos aminoácidos da gelatina, é formado por glicina e 22%, por prolina e hidroxiprolina [28]. É uma das poucas proteínas que contém hidroxilisina e é isenta de triptofano [6] (Tabela 1).

Tabela 1. Composição de aminoácidos em gelatinas do Tipo A e B [28].

Composição de aminoácidos (números por 1000 resíduos)	Gelatina do Tipo A	Gelatina do Tipo B
Alanina	112	117
Arginina	49	48
Asparagina	16	-
Ácido aspártico	29	46
Cisteína	-	-
Ácido glutâmico	48	72
Fenilalanina	14	14
Glutamina	48	-
Glicina	330	335
Histidina	4	4,2
Hidroxiprolina	91	93
Hidroxilisina	6,4	4,3
Isoleucina	10	11
Leucina	24	24,3
Lisina	27	28
Metionina	3,6	3,9
Prolina	132	124
Serina	35	33
Treonina	18	18
Triptofano	-	-
Tirosina	2,6	1,2
Valina	26	22

Estudos relacionados à preparação de sistemas tendo a gelatina como produto tem sido alvo de muitos cientistas devido a sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos e propriedades, como a capacidade de formar géis termorreversíveis (propriedades que são também dependentes do processo de obtenção e da matéria prima). O vasto número de aplicações comerciais inclui a preparação de filmes e coberturas comestíveis [29], aplicações na indústria farmacêutica [22, 26] e fotográfica [30].

Os filmes com base em gelatina são obtidos da solubilização, aquecimento e desidratação da solução filmogênica, como resultado da desnaturação da estrutura tripla hélice presente no colágeno [31].

Na ausência de aditivos os filmes de gelatina podem ser quebradiços, sendo assim, a combinação de gelatina com outros polímeros para formar blendas (mistura física de dois ou mais polímeros) é um método conveniente para melhorar o desempenho desses materiais. Por exemplo, a gelatina tem sido utilizada com a quitosana para aplicações na área de engenharia de tecidos [32], ou ligada a álcool polivinílico para melhorar suas propriedades mecânicas [33], e também combinada com amilopectina, para outras aplicações [34].

Dong e colaboradores [35] avaliaram as propriedades de blendas de alginato e gelatina com aplicação direcionada a sistemas de liberação de drogas, concluindo que a mistura tem potencial para esta aplicação.

Bertan e colaboradores [36] introduziram uma resina hidrofóbica em filmes de gelatina e avaliaram as suas propriedades físico-químicas. Filmes produzidos pela mistura de proteínas com lipídios podem ser uma alternativa para melhorar as propriedades de barreira a gases. Entretanto os resultados mostraram uma piora nas propriedades mecânicas, com a diminuição da resistência do filme.

Apesar da sua vantagem no critério ambiental, os polímeros naturais são normalmente mais caros que os sintéticos e são menos flexíveis tendo, portanto, aplicações mais limitadas [3]. Como uma das principais desvantagens de polímeros naturais são propriedades mecânicas inadequadas, uma alternativa tem sido a mistura com polímeros sintéticos, visando a melhoria nas propriedades importantes e necessárias para a aplicação de filmes poliméricos [5].

3.2 POLÍMEROS SINTÉTICOS

Os primeiros polímeros sintéticos surgiram devido a busca de substâncias que reproduzissem as propriedades encontradas em polímeros naturais. Por exemplo, uma das primeiras tentativas foi a utilização do nylon, na substituição da seda. Após a II Guerra Mundial houve uma enorme aceleração em busca dos polímeros sintéticos, e o exemplo mais importante foi o desenvolvimento da borracha sintética. Na seqüência surgiram vários outros polímeros que estão até hoje presentes em nosso cotidiano [1].

A síntese dos polímeros sintéticos envolve um processo de polimerização, que pode ser classificado quanto ao número de monômeros, tipo de reação e cinética de polimerização.

Os processos de polimerização podem ser em etapas, em cadeia, em cadeia via radicais livres, iônica ou com abertura de anel [1].

De acordo com a estrutura química do monômero, do tipo de ligação covalente e do tamanho da cadeia, os polímeros podem ser divididos em: termoplásticos, que fundem por aquecimento, se solidificam por resfriamento e são moldáveis; em termorrígidos, que por aquecimento ou outra forma de tratamento, assume estrutura tridimensional, com ligações cruzadas, tornando-se insolúveis e infusíveis; e em elastômeros, que possuem elevada elasticidade, como as borrachas; e as fibras, um termoplástico orientado e que possui alta resistência mecânica. Podem ser classificados ainda em amorfos, caracterizados pela temperatura de transição vítrea, ou cristalinos e semicristalinos (com domínios amorfos e cristalinos) caracterizados pela temperatura de fusão [1].

Podem apresentar diferentes tipos de organização: em cadeias lineares ou ramificadas e em cadeias com ligações cruzadas. Cada modo de organização produz propriedades especiais, que permite o uso de polímeros para diversas finalidades [1].

Em princípio, conhecer a estrutura e propriedades químicas e físicas de um polímero é essencial para definir a utilização em alguma aplicação tecnológica. Contudo, as propriedades dos polímeros podem ser melhoradas por transformações químicas ou adição de aditivos específicos que conferem novas propriedades ao material polimérico produzido [37].

Possuem como principais propriedades, alta flexibilidade, alta resistência ao impacto, baixas temperaturas de processamento. O uso de fibras aumenta a resistência mecânica; e aditivos como plastificantes podem alterar as características dos plásticos, tornando-os mais flexíveis. Além disso, possuem baixa condutividade elétrica, baixa condutividade térmica e maior resistência à corrosão [37].

Por esses motivos os polímeros sintéticos têm sido largamente empregados em diversos setores e aplicações, como na fabricação de filmes poliméricos e embalagens [37].

Apesar de todas as vantagens, o uso crescente de polímeros sintéticos tem resultado em vários problemas do ponto de vista ambiental, devido a grande quantidade de resíduos gerados. Primeiramente porque estes materiais não são biodegradáveis e são derivados de recursos não renováveis (petróleo), e também porque a síntese de alguns polímeros sintéticos envolve o uso de compostos tóxicos [4].

Polímeros baseados em produtos petroquímicos como poliolefinas, poliésteres e poliamidas, são os materiais mais frequentemente utilizados para a produção de embalagens, devido as suas apropriadas propriedades mecânicas, propriedades de barreira a oxigênio,

estabilidade térmica e baixo custo, porém conduzem a sérios problemas ambientais devido a sua total não biodegradabilidade [13].

Neste sentido, várias pesquisas têm se intensificado, no sentido de produzir novos materiais que possam estar substituindo os filmes poliméricos e embalagens convencionais, ou mesmo diminuindo a quantidade de resíduos por eles gerados, como consequência da sua não biodegradabilidade. Procura-se por novos materiais cujas propriedades, principalmente mecânicas, dos polímeros sintéticos possam ser mantidas, mas que ao mesmo tempo, possuam certo grau de degradação.

3.2.1 COPOLÍMEROS

Um copolímero é formado quando duas ou mais unidades monoméricas diferentes unidas covalentemente, de maneira randômica ou em blocos, podendo-se obter diferentes propriedades baseados nas estruturas obtidas. As características distintas de um polímero são determinadas pelas propriedades químicas das unidades monoméricas, pela maneira como elas estão ligadas e pelo tamanho ou massa molecular do polímero. Cada um destes parâmetros contribui para as propriedades físicas do produto polimérico [1, 4].

Em função do modo e distribuição dos diferentes monômeros, os copolímeros podem ser divididos em diferentes tipos: aleatório, onde não há uma seqüência definida da disposição dos monômeros; alternado, cuja disposição dos monômeros é de maneira alternada; em bloco, com a formação de grandes seqüências de um monômero, alternando a grandes seqüências do outro; e dibloco, onde uma cadeia de um homopolímero liga-se covalentemente a outra cadeia polimérica [1].

A copolimerização é utilizada para mudar as propriedades dos polímeros e conduz a um ilimitado número de diferentes produtos por variações na natureza e quantidade relativa das unidades monoméricas [37].

3.2.2 POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO ACRÍLICO)

O copolímero sintético poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (P(AAm-co-AA)), utilizado no presente trabalho, é composto por 90% de acrilamida e 10% de ácido acrílico dispostos de maneira aleatória ao longo da cadeia principal (Figura 3). As duas unidades monoméricas são

conhecidas por seu alto caráter hidrofílico [38] e têm sido empregadas em diferentes aplicações.

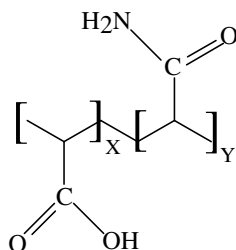


Figura 3. Estrutura química do poli(acrilamida-co-ácido acrílico).

O ácido poliacrílico tem sido usado em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (fármacos, fertilizantes) na maioria das vezes combinado a outras macromoléculas, como a gelatina, em estudos de redes poliméricas interpenetrantes [39], voltada para a liberação controlada de antibióticos [40, 41], bem como na formação de hidrogéis com aplicação na área de engenharia de tecidos [42]. Foi utilizado também em estudos de preparação de filmes cerâmicos com caráter supercondutor, complexado a metais [43].

A poliacrilamida tem sido extensivamente estudada, isoladamente ou combinada na forma de blendas ou hidrogéis para diversas aplicações. Por exemplo, foi misturada a gelatina para formar redes poliméricas interpenetrantes [44] e blendas [45].

O P(AAm-co-AA) pela sua afinidade com a água [46], tem sido estudado principalmente na formação de hidrogéis [46-49], em misturas com polímeros naturais para suporte e imobilização de enzimas [50, 51], na formação de microesferas para sistemas de liberação de princípios ativos [52, 53], em nanocompósitos combinado com componentes inorgânicos [54], em hidrogéis para a absorção de corantes [55, 56] mostrando ser uma alternativa para o tratamento de poluentes em água. Apresenta também boas propriedades formadoras de filmes, embora não sejam encontrados na literatura associados a filmes poliméricos obtidos a partir deste copolímero.

3.3 BLENDA POLIMÉRICAS

Blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros, sem que haja reação química entre os componentes. O estudo de blendas poliméricas tem recebido considerável

atenção devido a uma variedade de propriedades que podem potencialmente ser obtidas a um menor custo comparado com a produção de novos homopolímeros ou copolímeros [5]. Como consequência, parâmetros como miscibilidade e interações polímero-polímero, têm sido permanentemente avaliadas em blendas poliméricas devido ao grande interesse científico. Para análise e determinação desses parâmetros, técnicas como calorimetria diferencial de varredura, ressonância magnética nuclear e outras, têm sido utilizadas. [12, 57]

As blendas poliméricas podem ser caracterizadas como miscíveis imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Uma blenda miscível é homogênea e apresenta apenas uma fase; blendas imiscíveis apresentam separação de fases em todas as faixas de composição, e blendas parcialmente miscíveis são definidas como aquelas que apresentam miscibilidade somente para determinadas composições na mistura [58]. Por suas características as blendas miscíveis têm sido mais utilizadas comercialmente. Suas propriedades são frequentemente dependentes da composição, bem como de detalhes da estrutura química e massa molar de cada componente [59]. Muitos produtos comerciais têm como base blendas miscíveis. São exemplos, as blendas poliestireno-poli(óxido de fenileno), poli(fluoreto de vinilideno)-poli(metacrilato de etila) e poli(fluoreto de vinilideno)-poli(metacrilato de metila) [60].

Visando a obtenção de materiais poliméricos com propriedades mecânicas e biodegradabilidade satisfatória, foi introduzido o conceito de materiais poliméricos bioartificiais, proposto por Giusti e colaboradores [61] que representa uma classe de materiais poliméricos baseados em blendas de polímeros sintéticos e naturais. A proposta é produzir novos materiais com propriedades combinadas dos dois componentes, visto que as propriedades dos polímeros naturais podem ser significativamente melhoradas na mistura com polímeros sintéticos [62]. Estas blendas podem ser usadas para o desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis, para a manufatura de filmes, com potencial para ser aplicado nas áreas de bioengenharia, biomateriais e biotecnologias [63].

Se um componente biodegradável está presente em quantidade suficiente e se é removido por microorganismos em resíduos ambientais, o filme contendo o componente inerte pode perder a sua integridade e desintegrar. A taxa de biodegradação da blenda pode variar de acordo com a biocompatibilidade dos componentes na mistura e com o processo de formação das blendas [3].

No estudo de misturas formadas a partir de polímeros naturais e polímeros sintéticos, Cascone e colaboradores [64] avaliaram a mistura dos polímeros sintéticos, álcool polivinílico e ácido poliacrílico com os polímeros naturais, colágeno e ácido hialurônico. Os autores investigaram o potencial para utilização dessas blendas em sistemas de liberação do hormônio

do crescimento, mostrando que algumas destas misturas têm potencial para ser aplicados em reparação de ossos e cartilagem.

Caykara e colaboradores [59] caracterizaram blendas tendo como matéria prima poli(óxido de etileno) e alginato de sódio, e demonstraram que as propriedades mecânicas das blendas foram melhores comparadas às propriedades dos polímeros individuais, devido a interações intermoleculares específicas entre os componentes.

Sionkowska e colaboradores [65] estudaram blendas de colágeno e polivinilpirrolidona, investigando as propriedades antes e após a modificação da superfície por irradiação UV. Os resultados demonstraram que a blenda é mais fotorresistente do que o colágeno puro.

A gelatina também tem sido largamente utilizada para a preparação de blendas com polímeros sintéticos. Exemplos incluem a mistura gelatina/poli(amida-imida) com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e a durabilidade [66]. Com o mesmo objetivo, foram estudadas blendas de gelatina com poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) para aplicações biomédicas [67] e com poli(acrilamida) [68].

Li e colaboradores [68] estudaram esponjas compostas por blendas de material sintético (poli(ácido lático-co-ácido glicólico)), com duas proteínas naturais (gelatina e elastina) com propriedades físico-químicas apropriadas para aplicações em engenharia de tecidos. Os resultados sugeriram que o material formado pode ser útil para esta aplicação, mais especificamente em tecidos macios, tais como coração, pulmão e vasos sanguíneos.

Por outro lado, filmes e blendas poliméricas tendo como base a gelatina podem ser quebradiços e em alguns casos a alternativa tem sido o uso de aditivos como plastificantes, para promover uma melhora na flexibilidade dos novos materiais.

3.4 PLASTIFICANTES

Plastificantes são normalmente moléculas de baixa massa molar, que podem ser adicionados a sistemas poliméricos para diminuir as interações intra e intermoleculares (ligações de hidrogênio) entre as cadeias poliméricas, promovendo uma maior flexibilidade, por exemplo, em filmes [69]. Os plastificantes podem também atuar como lubrificantes da cadeia polimérica [70]. Este comportamento ocorre porque o plastificante ao enfraquecer as forças intermoleculares entre as cadeias aumenta o volume livre do sistema [71].

O uso de plastificantes na formulação dos filmes tem a vantagem de melhorar a maleabilidade e assim, a aplicabilidade do material, e uma das características necessárias é de que este seja solúvel e compatível com o polímero [13, 72]. Outra característica dos plastificantes é a capacidade de diminuir a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão, e aumentar a permeabilidade a gases, proporcionalmente ao seu conteúdo. Os mais utilizados em filmes protéicos são: glicerol, sorbitol, propilenoglicol, polietilenoglicol, monoglicerídeos, etc [6].

Na literatura são encontrados diversos trabalhos, que descrevem os efeitos sobre as propriedades químicas, físicas e funcionais de filmes poliméricos em presença de plastificantes. Como exemplo, os plastificantes podem modificar a permeação de drogas através de uma membrana, como verificado por Meier e colaboradores [71], ou participar do processo de reticulação, como no trabalho publicado por Lima e colaboradores [73]. Destacam-se ainda as interações via ligações de hidrogênio, das soluções de caseinato de sódio e sorbitol, como discutido por Barreto e colaboradores [74].

O efeito de plastificantes sobre os filmes com base em gelatina foi estudado por Vanin e colaboradores [75]. Utilizando diferentes polióis (glicerol, propileno glicol, dietileno glicol e etileno glicol), observaram que todos os plastificantes foram compatíveis com o filme de gelatina e que podem ser escolhidos dependendo das propriedades desejadas. A presença do plastificante influenciou diretamente a temperatura de transição vítrea, diminuindo seu valor, assim como as propriedades mecânicas, aumentando a porcentagem de alongação dos filmes.

De acordo com Jongjareonrak e colaboradores [76], quando plastificantes hidrofílicos são incorporados na estrutura dos filmes de gelatina, as interações e a proximidade entre as cadeias da proteína são reduzidas, afetando as suas propriedades.

Bergo e Sobral [11] estudaram os efeitos causados pela adição de plastificantes sobre as propriedades físicas de filmes de gelatina de origem suína. A presença de glicerol, em diferentes proporções alterou propriedades físicas como flexibilidade, interações entre as cadeias macromoleculares e suscetibilidade à umidade. Estes efeitos também foram verificados por Thomazine e colaboradores [77] em estudos de filmes de gelatina plastificados com sorbitol e glicerol.

Veiga-Santos e colaboradores [56] investigaram sacarose e açúcar invertido com plastificante sobre filmes de amido e gelatina em função das propriedades mecânicas, hidrofóbicas e de atividade da água, mostrando que a adição destes plastificantes aumentou a alongação e a cinética de absorção de água.

Arvanitoyannis et al [78] avaliaram as propriedades térmicas e mecânicas de filmes comestíveis baseados em blendas de gelatina com amido solúvel, plastificadas com água, glicerol ou açúcares e observaram que a presença destes causou uma diminuição na temperatura de fusão e de transição vítrea e também da tensão na ruptura, e aumentou a elongação dos filmes.

O sorbitol é um plastificante frequentemente utilizado na preparação de filmes que têm proteínas como matéria prima, por ser uma molécula de baixa massa molar composta por seis hidroxilas (Figura 4). É derivado de frutas como pêras, maçãs, entre outras, e industrialmente através da hidrogenação catalítica da glicose. [69, 72, 73, 76].

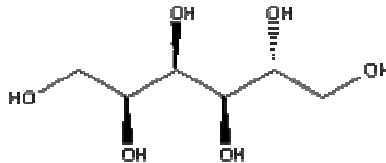


Figura 4. Estrutura química do sorbitol.

A adição de plastificantes é uma alternativa para eliminar a fragilidade de filmes protéicos, porém a deterioração do filme plastificado é causada pelo aumento na solubilidade e permeabilidade aos vapores de água ou decréscimo na tensão de ruptura [79]. Sendo assim, os filmes produzidos por proteínas são normalmente empregados após modificações por reticulação.

3.5 AGENTE RETICULANTE

A solubilidade em água de filmes formados por polímeros de origem natural pode ser uma desvantagem, dependendo da aplicação do material. A afinidade pela água aumenta a velocidade de degradação; contudo, esta sensibilidade à umidade pode limitar a sua aplicação [5]. Uma forma de contornar este problema é a inserção de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Estas ligações podem ser formadas através de um processo de reticulação,

através do qual, propriedades como estabilidade térmica e mecânica, e taxa de degradação, inerentes ao material, podem ser alteradas [26].

Dois métodos fundamentais de reticulação têm sido descritos para proteínas como a gelatina, a reticulação física e a reticulação química. Embora não permitam um total controle de densidade de reticulação da matriz polimérica, os métodos físicos mais utilizados são: radiação UV e tratamento térmico. Agentes reticulantes químicos atuam na ligação covalente de resíduos de ácidos carboxílicos livres ou grupos amina entre moléculas de proteínas adjacentes. Exemplos incluem aldeídos (formaldeído, glutaraldeído, gliceraldeído), poliepóxidos e isocianatos [26, 80], genipin [81] e carbodiimidas [82].

Produtos com base em gelatina reticulada são largamente usados em muitas aplicações incluindo as áreas de engenharia de tecidos [83, 84], farmacêutica [85] e embalagens [36].

A reticulação química melhora principalmente as propriedades mecânicas e térmicas e, em parte, a resistência à água através da introdução de ligações covalentes estáveis entre os grupos reativos presentes nas cadeias de gelatina. A introdução de ligações cruzadas dentro e entre as cadeias de gelatina por modificação química, pode ser uma alternativa para uma melhor estruturação da matriz polimérica podendo resultar em melhores propriedades funcionais do filme [86].

Bagi e colaboradores [87] introduziram modificações químicas em filmes de gelatina com o intuito de melhorar as propriedades térmicas e mecânicas. A presença de glutaraldeído em pequenas quantidades, para evitar a toxicidade do produto formado, mostrou uma variação significativa nas propriedades dos filmes resultantes.

Carvalho e Grosso [86] estudaram as propriedades de filmes de gelatina reticulados com transglutaminase, glioxal e glutaraldeído. As modificações químicas foram confirmadas pela diminuição no número de grupos amino livres e pelo decréscimo na porcentagem de renaturação, que é a recuperação da sua conformação nativa, assim como a perda da orientação característica dos filmes não modificados. As modificações químicas também foram eficientes na diminuição da permeabilidade a vapores de água.

O mais importante a ser considerado em relação à aplicação do polímero reticulado é a toxicidade do agente reticulante utilizado. Carbodiimidas, como o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Figura 5), utilizado neste trabalho, são muito efetivas na reticulação de proteínas e polissacarídeos. A vantagem de seu uso é porque este não é incorporado na estrutura da proteína reticulada, mas simplesmente forma um derivado de uréia solúvel em água, que pode ser removido por lavagem. Além disso, apresenta a

vantagem de não toxicidade, quando comparado a reticulantes como formaldeído e glutaraldeído [88].

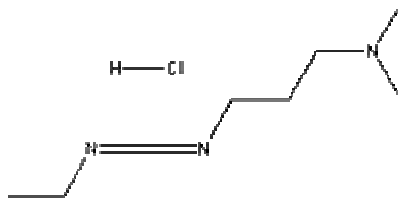


Figura 5. Estrutura química do hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

O EDC é conhecido por intermediar ligações amida entre os grupos amino, mais frequentemente grupo ϵ -NH₂ de um resíduo de lisina e grupos carboxílicos dos resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico das cadeias de proteína. Alguns autores citam também a possibilidade de formação de ligação éster entre grupos carboxílicos e grupos hidroxilas [84, 89]. O mecanismo de reticulação com a carbodiimida em meio aquoso segundo Nakagima et al [90] (Figura 6) é descrito a seguir.

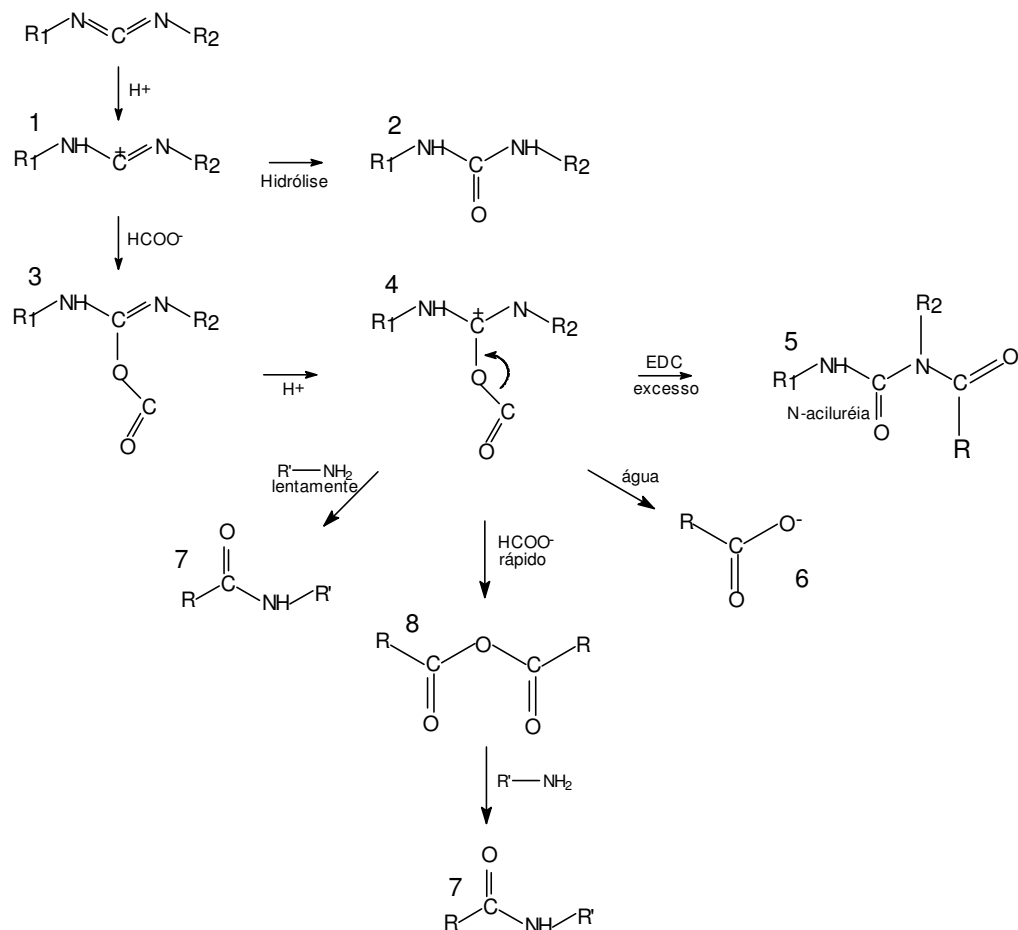


Figura 6. Reação da formação de amida entre grupos carboxílicos e grupos amino em meio aquoso na presença de EDC [90].

Em presença de ácido carboxílico a carbodiimida (1) é hidrolisada originando um derivado de uréia (2). Porém (1) pode também reagir com grupos carboxílicos ionizados para formar um composto *o*-acilisoureia (3), que posteriormente formará um carbocátion (4). Este poderá transformar-se num derivado de uréia (2) pela reação com a água. Visto que um grupo carboxílico ionizado é uma base forte, sua reação com (4) pode produzir um anidrido carboxílico (8) no caso de grupos carboxílicos ciclizáveis, que rapidamente formam uma correspondente amida (7) em presença de grupo amino. Por outro lado, no caso de grupos carboxílicos não ciclizáveis, (4) reagirá com uma molécula de água ou uma amina não ionizada para produzir um grupo carboxilato (6) ou uma amida (7), respectivamente. Algumas moléculas de amina também podem reagir diretamente com o carbocátion (4) para formar a

amida (7) sem a formação de anidrido. Com excesso de EDC, a reação com o carbocátion (4) pode formar como subproduto a n-aciluréia (5) [90].

De acordo com o esquema da Figura 6, considerando o presente trabalho, o EDC pode reagir com grupos carboxílicos da gelatina ou do P(AAm-co-AA) para formar um derivado que reagirá com grupos amino livres da gelatina, formando ligações amida.

Liang e colaboradores [89] estudaram hidrogéis de gelatina reticulados com EDC e genipin e observaram que a carbodiimida pode formar ligações intramoleculares na gelatina, assim como ligações intermoleculares curtas entre moléculas de gelatina adjacentes (Figura 7).

Tomihata e colaboradores [88] utilizaram vários agentes reticulantes para avaliar o processo e reticulação e biodegradação de colágeno e gelatina. Dentre todos os agentes químicos utilizados o EDC mostrou ser o mais interessante por apresentar as vantagens já mencionadas.

O uso de carbodiimida como agente reticulante foi também sugerido por Cascone e colaboradores [64] ao constatar que blendas de colágeno e álcool polivinílico reticuladas com glutaraldeído não foram apropriadas para liberação do hormônio de crescimento.

Kołodziejska e Piotrowska [91] avaliaram a permeabilidade a vapores de água, propriedades mecânicas e solubilidade de filmes de gelatina e quitosana modificados quimicamente com EDC e plastificados com glicerol. Os resultados mostraram que as modificações químicas em presença de sorbitol não aumentaram as propriedades de barreiras a vapores de água, contudo as propriedades mecânicas foram alteradas.

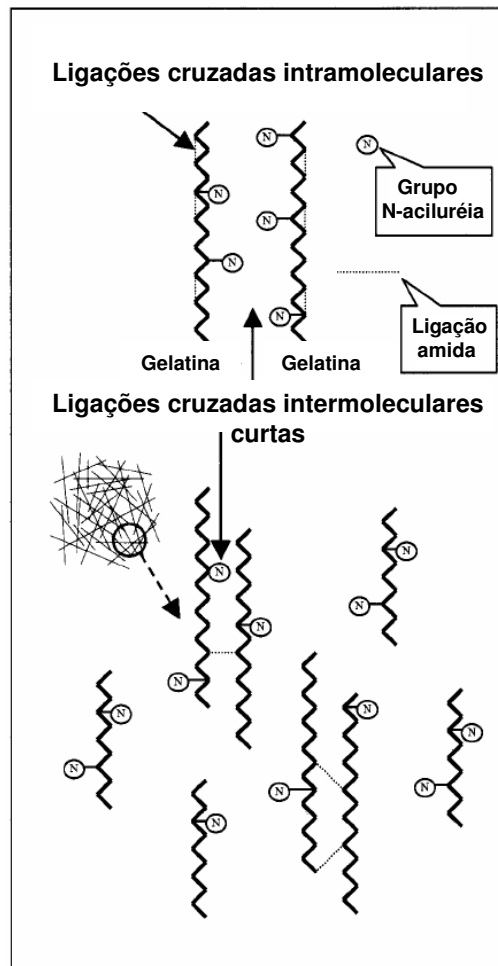


Figura 7. Esquema ilustrativo do processo de reticulação intermediado pelo EDC [89].

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Gelatina do tipo B extraída de pele bovina (225 Bloom) com $M_w \approx 18,2 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ (determinada através de viscosidade intrínseca), poli(acrilamida-co-ácido acrílico) com $M_w = 200.000 \text{ g mol}^{-1}$ e 10% de ácido acrílico (determinados pelo fabricante) e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Sorbitol e sulfato de sódio anidro foram obtidos da Nuclear. O ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) foi gentilmente doado pelo professor Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso (Universidade Estadual de Campinas). Todos os materiais foram usados como recebidos.

4.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES

Cada solução filmogênica foi preparada a diferentes proporções de gelatina (G) e poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (P(AAm-co-AA)) em água destilada e deionizada, de modo a formar blendas nas composições de G/P(AAm-co-AA): 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 a 2% (m/v). A solução foi inicialmente mantida a aproximadamente 55 °C por 30 minutos, para a dissolução dos polímeros. Após este tempo, a mistura foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 24 horas, sendo então espalhadas em placas de poliestireno e o solvente evaporado em capela de exaustão. Após a remoção da água residual em estufa a vácuo por 24 horas, os filmes foram acondicionados em dessecadores para análises posteriores.

4.2.1 FILMES COM PLASTIFICANTE

Na presença de plastificante, a preparação dos filmes consistiu da adição de 20% de sorbitol (m/m) juntamente com as quantidades apropriadas dos polímeros puros em água destilada e deionizada. Para a obtenção dos filmes o procedimento foi análogo ao descrito no item 4.2.

4.2.2 FILMES RETICULADOS

Para a formação de filmes reticulados com hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), primeiramente as soluções dos filmes puros e das blendas foram preparadas, e após 24 horas de agitação uma quantidade fixa de agente reticulante foi adicionada de modo a obter-se soluções na concentração de 25 mM de reticulante. Após a adição de agente reticulante as soluções foram agitadas por poucos segundos e então espalhadas em placas de poliestireno. Os filmes foram deixados secar a temperatura ambiente por 24 horas, sendo em seguida colocados em capela de exaustão. Para a retirada de água adsorvida os filmes foram deixados em estufa à vácuo por 24 horas e então armazenados em dessecadores.

4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA GELATINA

A massa molar da gelatina foi determinada através de medidas de viscosidade intrínseca, utilizando um viscosímetro Cannon-Fenske conectado a um leitor ótico SCHOTT. Foram preparadas soluções de diferentes concentrações na faixa de 0,050 - 0,500 g mL⁻¹. A viscosidade intrínseca foi calculada através da equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada (equação 1), onde η é a viscosidade intrínseca, K e a são constantes, cujos respectivos valores são 1,66.10⁻⁵ mL g⁻¹ e 0,885 e foram obtidos da literatura [28] e M a massa molar.

$$[\eta] = K.M^a \quad (1)$$

Utilizando-se o tempo de escoamento de cada amostra obteve-se a viscosidade específica η_{sp} (equação 2) onde t_0 é o tempo de escoamento do solvente e t_s é o tempo de escoamento da amostra.

$$[\eta_{sp}] = \frac{t_s - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Dividindo-se a viscosidade específica pela concentração da solução (c), em g mL⁻¹, obtém-se a viscosidade reduzida (η_{red}), como descrito na equação 3:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (3)$$

Para a determinação da viscosidade intrínseca é necessário determinar a viscosidade reduzida a várias concentrações e extrapolar a concentração zero, conforme a equação 4:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} \quad (4)$$

4.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO

A reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com grupos amino primários da gelatina e das blendas foi usada para detectar quimicamente a reticulação dos grupos em relação aos filmes não reticulados. O número de grupos amino livres foi determinado usando-se o procedimento descrito por Bubnis e Ofner [92], com pequenas modificações. Foram pesados 5,5 mg de amostra em um tubo de ensaio e adicionados 0,5 mL de solução de NaHCO₃ 4% e 0,5 mL de solução 0,5% de TNBS, sendo aquecidos à 40 °C por 4 horas. Após este período 1,5 mL de HCl 6 M foi adicionado e a mistura autoclavada por 1 hora a 120 °C e 15-17 psi. O produto hidrolisado foi diluído com água (2,5 mL) e extraído com 10 mL de éter etílico para remover o excesso de TNBS. Uma alíquota de 2,5 mL da fase aquosa foi aquecida por 30 minutos em um banho quente para remover o éter residual, deixada resfriar a temperatura ambiente e novamente diluída com 7,5 mL de água destilada e deionizada. A absorvância da solução foi medida a 346 nm usando um espectrômetro Perkin Elmer Lambda 11/Bio. O branco foi preparado como descrito acima, mas adicionando-se HCl 6 M antes da adição de TNBS para inibir a reação deste com grupos amino. Todos os dados foram avaliados após 3 determinações. Os resultados foram obtidos convertendo-se os valores de absorvância para número de grupos ε-amino presentes por gramas de amostra através da equação 5.

$$\text{moles de grupos } \varepsilon\text{-amino/g amostra} = \frac{2(\text{absorvância})(0,0010 \text{ L})}{(1,46 \cdot 10^{-4} \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})(b)(x)} \quad (5)$$

Nesta equação $1,46 \cdot 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ corresponde a absorvância molar do TNBS-lisina [35] b é o caminho óptico em cm, e x é a massa da amostra em gramas. A porcentagem

de reticulação (% R) foi calculada em relação ao número de grupos ϵ -amino perdidos com a reticulação, conforme equação 6, onde ϵ -amino(N) e ϵ -amino(R) são o número de grupos ϵ -amino livres nos filmes não reticulados e reticulados respectivamente.

$$\%R = \frac{(\epsilon - \text{amino}(N) - \epsilon - \text{amino}(R)) \cdot 100}{\epsilon - \text{amino}(N)} \quad (6)$$

4.5 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

Amostras dos filmes de gelatina e das blendas reticuladas com EDC nas dimensões de 2 cm x 2 cm e massas variando de 200-300 mg, foram previamente secas em estufa à vácuo e pesadas até massa constante. Os filmes foram imersos em 30 mL de água destilada e deionizada e pesados em intervalos de tempos definidos até que o equilíbrio fosse atingido. A pesagem dos filmes intumescidos foi realizada após leve secagem da superfície com um papel absorvente para retirar o excesso de água. O procedimento foi realizado em triplicata e a razão de intumescimento (RI) foi calculada através da equação 7, onde W_0 e W_t são as massas dos filmes antes e após a imersão no tempo definido, respectivamente.

$$RI = \frac{W_t}{W_0} \quad (7)$$

4.6 ANÁLISE TÉRMICA

4.6.1 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica foi usada para estudar o comportamento de decomposição dos filmes, bem como em presença de plastificante e reticulante. Foi realizada em um analisador termogravimétrico modelo TGA-50 Shimadzu. As medidas foram conduzidas da temperatura ambiente até 600 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 ml min⁻¹ e 10 °C min⁻¹ de taxa de aquecimento, utilizando-se de 2 a 6 mg de amostra.

4.6.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As temperaturas de transição vítrea (T_g) dos filmes puros e das blendas, bem como na presença de plastificante ou de agente reticulante, foram determinadas utilizando-se um equipamento modelo DSC-50 da Shimadzu. Aproximadamente 6 mg de amostra foram inicialmente aquecidos a $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, (fluxo nitrogênio de 50 ml min^{-1}) da temperatura ambiente até próximo da temperatura de decomposição (aproximadamente $230\text{ }^\circ\text{C}$). Após a primeira varredura as amostras foram resfriadas com nitrogênio líquido e então uma segunda varredura foi realizada na velocidade de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ da temperatura ambiente até $230\text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura de transição vítrea foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico da amostra.

4.6.3 ANÁLISE TERMOMECÂNICA (TMA)

Esta técnica foi também utilizada para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes. Amostras dos mesmos nas dimensões de $10\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ e espessura de aproximadamente $0,6\text{ mm}$, após fixação entre as hastes do aparelho TMA-50 Shimadzu, foram submetidas a um programa de temperatura que consiste de duas varreduras, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}). Primeiramente, para a eliminação da água adsorvida, a amostra foi aquecida a $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até aproximadamente $120\text{ }^\circ\text{C}$ permanecendo nesta temperatura por 10 minutos, e após resfriamento foi realizada a segunda varredura, da temperatura ambiente até $250\text{ }^\circ\text{C}$ numa taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A temperatura de transição vítrea foi determinada pelo ponto de inflexão da curva dimensão *versus* temperatura. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e a média aritmética dos valores foi considerada.

4.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR foi realizada para avaliar as possíveis interações entre os polímeros. Para a análise de FTIR as soluções para os filmes dos polímeros puros e das blendas na ausência e presença de plastificante ou de agente reticulante foram preparadas na concentração de $0,2\%$. As mesmas

condições descritas anteriormente foram empregadas, porém os mesmos foram deixados em estufa à vácuo por um período de tempo maior, aproximadamente 72 horas.

As análises foram feitas em um instrumento Perkin-Elmer PC-16 com transformada de Fourier, com resolução de 4 cm^{-1} e alcance de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.8 MORFOLOGIA

A análise das superfícies superiores e das fraturas (amostras fraturadas em nitrogênio líquido) dos filmes foi feita para todas as composições e proporções. As amostras foram fixadas em um suporte e recobertas com uma fina camada de ouro, para tornar a superfície condutora, e posteriormente observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), Philips XL30. Parte das análises foi conduzida em um equipamento JEOL JSM 5610LV (Universidade Estadual de Campinas). A morfologia dos filmes reticulados, intumescidos e liofilizados também foi analisada.

4.9 ANÁLISE MECÂNICA

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas por teste de tração usando uma máquina de Ensaio Universal (EMIC-DL-2000). Parâmetros como tensão de ruptura (TS), alongação máxima (%E) e do módulo de Young (MY) (região elástica das curvas de tensão *versus* deformação) dos filmes foram determinados. As amostras foram mantidas por 15 dias em ambiente com temperatura e umidade relativa controlada ($47 \pm 5\%$ e $20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) antes dos ensaios. Para os testes, conduzidos de acordo com as normas ASTM D882-95a (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting) [93], foram utilizadas aproximadamente 12 amostras de cada composição.

4.10 ADSORÇÃO DE VAPORES DE ÁGUA

Filmes nas dimensões de 3 cm x 3 cm foram submetidos a um ambiente de umidade relativa de 98%, obtido com solução saturada de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). As amostras (em triplicata) foram previamente secas em estufa à vácuo até massa constante,

pesadas e acondicionadas em sistema vedado na umidade desejada. Em períodos de tempos específicos as amostras foram pesadas e o conteúdo de água adsorvida em porcentagem (%W) determinada. O cálculo foi feito considerando-se a massa da amostra submetida à umidade no tempo t (W_t) e a massa da amostra seca (W_0) de acordo com a equação 8.

$$\%W = \frac{(W_t - W_0).100}{W_0} \quad (8)$$

4.11 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO

Filmes de gelatina e das blendas reticulados, com massas de aproximadamente 200 mg foram imersos em 5 mL de soluções ácida (pH 3,0), de solução básica (pH 10,0) e de água destilada e deionizada (pH 6,0) em tubos de ensaio. Os mesmos ficaram imersos por períodos de 7, 14 e 30 dias. As amostras foram secas em estufa à vácuo antes da análise e após o período de tempo estabelecido. A porcentagem de degradação (%D) foi determinada através da equação 9, considerando-se a massa da amostra antes (W_0) e após o período de tempo em solução (W_t). Para o cálculo, a média aritmética de três determinações foi utilizada.

$$\%D = \frac{(W_t - W_0).100}{W_0} \quad (9)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA GELATINA

A massa molar média da gelatina foi determinada através da técnica de viscosimetria. Primeiramente encontrou-se o valor de viscosidade intrínseca, que corresponde ao coeficiente linear do gráfico de viscosidade reduzida (η_{red}) *versus* concentração, quando a concentração da solução de gelatina tende à zero. Aplicando-se o valor de viscosidade intrínseca encontrado, $44,14 \text{ mL g}^{-1}$ e os valores para as constantes K e a que são $1,66 \cdot 10^{-5} \text{ mL g}^{-1}$ e 0,885 respectivamente [28], na equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada (equação 1) determinou-se a massa molar média para a gelatina cujo valor foi $18,2 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$.

5.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO

Com a finalidade de avaliar o grau de reticulação dos filmes, foi realizada a quantificação dos grupos amino livres, determinados pelo ensaio com o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) de acordo com o método proposto por Bubnis e colaboradores [92], com pequenas modificações (equação 5). A reação do TNBS com grupos amino é mostrada na Figura 8.

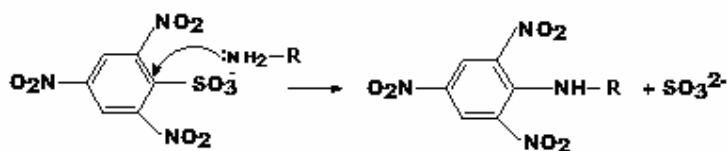


Figura 8. Reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com grupos amino primários da proteína em pH alcalino para formar um derivado trinitrofenil e um íon sulfito.

O grau de reticulação em porcentagem, calculado através do número de grupos amino perdidos com a formação de ligações cruzadas (equação 6), para os filmes de gelatina e para as blendas com P(AAm-co-AA) está resumido na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de porcentagem de reticulação para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC.

G/P(AAm-co-AA) (%wt)	ϵ -amino livres (Puro). 10^3	ϵ -amino livres (Reticulado). 10^3	Grau de reticulação (%)
100/0	$26,3 \pm 2,6$	$8,7 \pm 3,2$	$67,8 \pm 9,0$
70/30	$34,0 \pm 6,2$	$14,4 \pm 4,3$	$58,6 \pm 5,1$
50/50	$17,2 \pm 1,2$	$5,1 \pm 1,0$	$70,6 \pm 3,8$
30/70	$9,7 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,5$	$57,9 \pm 3,0$

A presença de EDC mostrou uma significativa diminuição no número de grupos ϵ -amino livres em relação aos filmes não reticulados. A maior quantidade de grupos amino livres foi encontrada para a blenda com 70% de gelatina, neste caso a presença do P(AAm-co-AA) na matriz polimérica composta pelo biopolímero, pode estar favorecendo a dispersão dos grupos amino, presente nos monômeros de aminoácidos, deixando-os mais disponíveis.

Por outro lado, as maiores porcentagens de reticulação foram encontradas para o filme de gelatina e para a blenda com 50 % de cada polímero. No caso da blenda deve estar ocorrendo também a participação dos grupos carboxílicos do copolímero na indução do processo de reticulação. Esta pode ser alcançada por meio de ligações intramoleculares das cadeias de gelatina e por ligações intermoleculares entre as cadeias de gelatina e do copolímero, para formar ligações amida.

No caso das blendas de composições 30/70 e 70/30, o EDC que é responsável pela ativação de grupos carboxílicos pode estar agindo de maneira competitiva, ativando os grupos nos dois polímeros ao mesmo tempo, resultando em uma diminuição na eficiência de reticulação. Pode-se também supor que as ligações entre as cadeias de gelatina e P(AAm-co-AA) impedem a formação de uma estrutura organizada da gelatina, diminuindo o efeito da reticulação física, ou seja, a recuperação da estrutura tripla hélice do colágeno pela formação de ligações de hidrogênio quando uma solução quente de gelatina é resfriada [24, 94].

A formação de ligações cruzadas através da ativação dos grupos carboxílicos pelo EDC não foi efetiva para o copolímero, provavelmente pelo fato deste não apresentar grupos amino livres e possivelmente também devido à distribuição dos grupos carboxílicos ao longo da cadeia polimérica não estarem em uma conformação espacial que seja favorável à ligação covalente entre grupos hidroxilas e grupos carboxílicos, que seria responsável pela formação de ligação éster.

A determinação do grau de reticulação com EDC é considerada quantitativa porque cada grupo amino perdido participa de uma ligação.

5.3 ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO

Mesmo em filmes onde existe a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, as moléculas de baixo peso molecular (solvente), podem penetrar na fase de polímero e desta forma o filme pode sofrer um intumescimento limitado. Aumentando a densidade de reticulação, a capacidade de absorção de solvente diminui [58]. Desta maneira o teste de intumescimento pode também ser usado como uma medida da extensão de reticulação [95] considerando que os filmes não reticulados solubilizam totalmente em água. As propriedades de intumescimento são principalmente afetadas pela composição, pela hidrofobicidade e também pelo grau de reticulação química e física da cadeia polimérica.

O efeito do agente reticulante sobre o comportamento de intumescimento tem sido extensivamente utilizado em estudos de sistemas macromoleculares. Como exemplo, a densidade de reticulação diminui a razão de intumescimento em sistemas como micropartículas de alginato de sódio reticuladas com glutaraldeído [96], em filmes de alginato de sódio/sorbitol reticulados com formaldeído [73] e em hidrogéis de gelatina reticulados com diferentes taxas molares de EDC [97]. De maneira geral, com a presença de um agente reticulante ocorre uma maior sobreposição das cadeias, favorecendo a formação de pontos de reticulação.

A Figura 9 mostra a razão de intumescimento (RI) dos filmes reticulados, em diferentes composições, imersos em água destilada e deionizada, calculada através da equação 7. As medidas de intumescimento foram avaliadas como uma função do tempo de imersão, bem como da composição das blendas. Os filmes mantiveram a sua integridade na presença de água diferentemente dos filmes não reticulados, que se dissolveram rapidamente.

O equilíbrio de intumescimento foi alcançado em 40 horas de imersão, para a blenda G/P(AAm-co-AA) (30/70), e em aproximadamente 20 horas para os demais sistemas. Praticamente após 24 horas todas as curvas apresentam um platô, não sendo observadas diferenças significativas nas propriedades de intumescimento, sugerindo que o solvente já saturou os filmes de G/P(AAm-co-AA). Todas as amostras absorveram uma quantidade de água muito maior que sua massa seca, chegando a uma razão máxima de aproximadamente oito vezes o seu peso para a amostra 30/70.

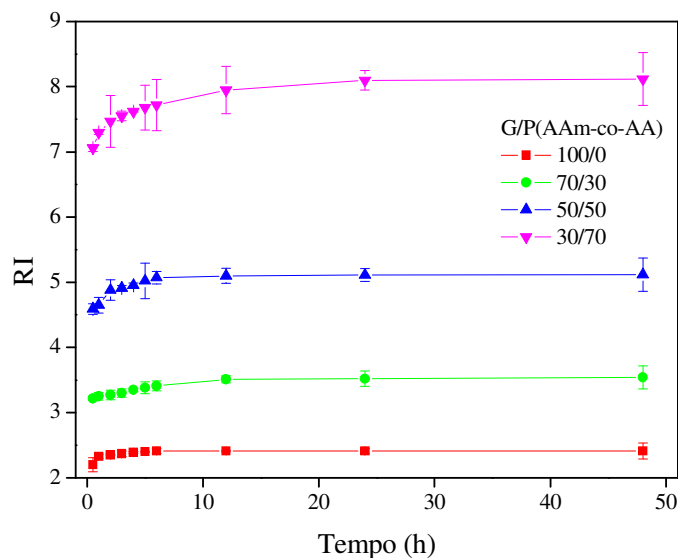


Figura 9. Razão de intumescimento *versus* tempo para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC.

O equilíbrio de intumescimento muda significativamente de acordo com a composição da amostra. Os ensaios mostram que a habilidade de absorver água dos filmes decresce com o aumento do conteúdo de gelatina nas blendas, sugerindo que o processo de reticulação foi mais efetivo para o filme de gelatina e que a amostra G/P(AAm-co-AA) 30/70, que intumescer mais e apresenta um menor grau de reticulação. Estes resultados concordam com o ensaio realizado para a determinação da extensão de reticulação.

A dependência da composição sobre o comportamento de intumescimento pode ter sido causada principalmente pela capacidade de intumescimento dos componentes poliméricos individualmente. Como o copolímero apresenta uma maior afinidade pela água do que na gelatina, a razão de intumescimento aumenta com o aumento da sua proporção nas blendas. Outra possibilidade é o fato do processo de reticulação não ter sido eficiente para o filme de P(AAm-co-AA), aumentando neste caso a presença de grupos hidrofílicos não reticulados, e conseqüentemente, a razão de intumescimento, com o aumento da quantidade de P(AAm-co-AA) nos filmes. Comportamento similar foi encontrado para redes poliméricas interpenetrantes com base em ácido poliacrílico e gelatina [39].

Amostras dos filmes reticulados, após 24 horas de intumescimento, foram submetidas ao congelamento gradativo e em seguida liofilizadas. Na Figura 10 são mostradas as micrografias das seções transversais para estas amostras.

Analisando primeiramente as micrografias obtidas para os filmes de gelatina (A) e para a blenda 30/70 (D) liofilizados, podemos observar que no primeiro caso a água retida ocupa pequenos espaços, enquanto que no segundo, podemos observar a formação de grandes canais, onde estariam inseridas as moléculas de água. De fato, o filme de gelatina (A) apresenta a absorção de uma menor quantidade de água, devido ao seu maior grau de reticulação comparado ao filme de menor proporção de gelatina (D), que intumescce mais e que comprovadamente possui um menor grau de reticulação. A blenda de composição 70/30 (B) também apresenta grandes canais, porém pode-se observar também a formação de estruturas de reticulação. Já a blenda composta por 50% de cada polímero (C) apresenta um perfil um pouco diferente dos demais, porém podem-se observar também pequenos espaços entre a matriz polimérica.

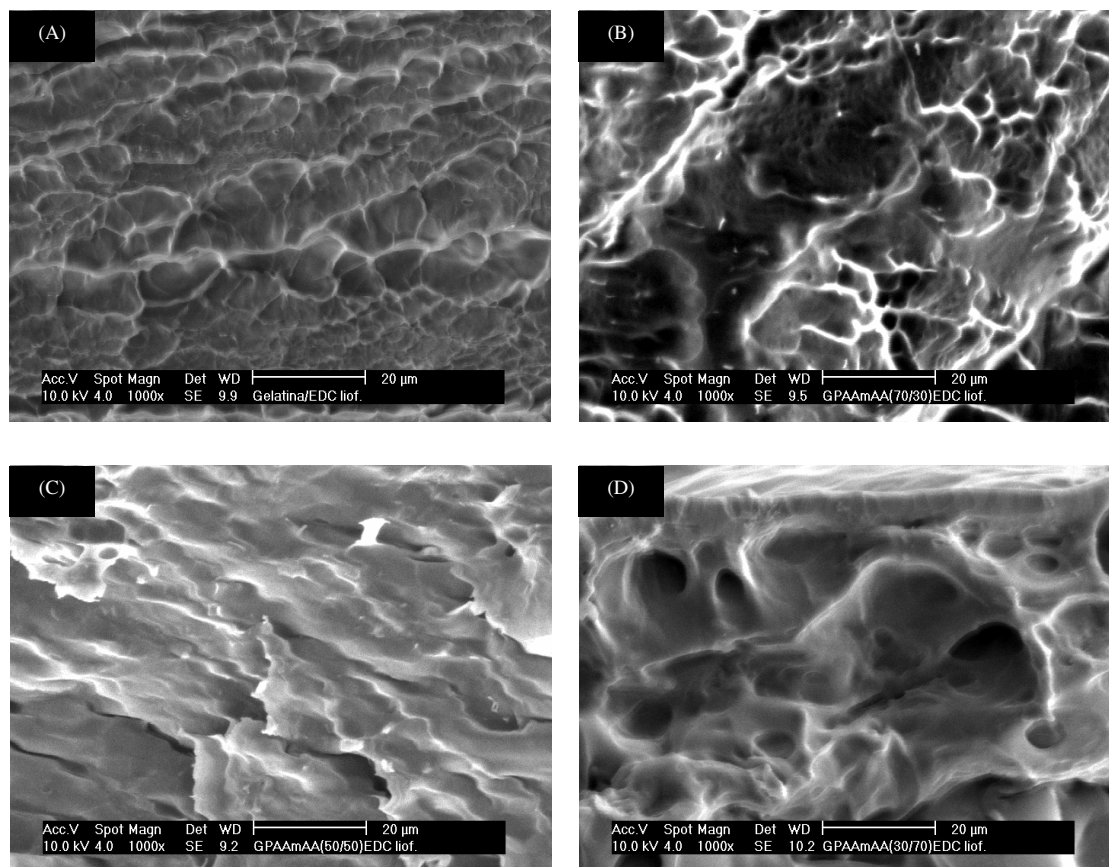


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das fraturas dos filmes de gelatina (A), G/P(AAm-co-AA) 70/30 (B), G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C) e G/P(AAm-co-AA) 30/70 (D) reticulados, após intumescimento e liofilização.

5.4 ANÁLISE TÉRMICA

5.4.1 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica envolve a medida da variação de massa de uma amostra, sob a forma de produtos voláteis, como função da temperatura ou do tempo. Quando os materiais poliméricos são submetidos a um tratamento térmico podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e laterais [58]. Desta forma esta técnica foi utilizada para avaliar o comportamento dos filmes, de todas as composições, submetidos a um tratamento térmico com respeito a sua estabilidade.

Parâmetros como temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima (T_{max}), porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação e porcentagem de resíduos sólidos a 600 °C para o sistema G/P(AAm-co-AA) denominado puro (sem sorbitol ou agente reticulante), para o sistema com sorbitol como agente plastificante, e reticulado com EDC, estão resumidos na Tabela 3.

É observado, de maneira geral, que o filme de gelatina apresenta dois estágios principais de perda de massa enquanto que os filmes de P(AAm-co-AA) e as blendas correspondentes apresentam três ou quatro estágios. O primeiro estágio de perda de massa até cerca de 190 °C foi atribuído à perda de água adsorvida ou água ligada, com um conteúdo de umidade residual variando de 5 - 10%, considerando que o acondicionamento dos filmes não deve ter garantido amostras completamente isentas de água. A porcentagem de massa residual a 600 °C foi de 31 % em média para o sistema puro (filmes sem sorbitol ou EDC), 26 % para os filmes com sorbitol e 23 % para os filmes reticulados. Esta pequena diminuição na porcentagem de resíduos pode estar associada a uma maior desestabilização da rede proteica, pela diminuição de ligações de hidrogênio intermoleculares, com a presença de elementos aditivos como o sorbitol e o agente reticulante, fazendo com que a degradação seja mais efetiva na presença destes.

Tabela 3. Parâmetros termogravimétricos para os três sistemas estudados.

G/P(AAm-co-AA) (% wt)	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Massa residual ^c (%)	
	T ₁ ^a	P ₁ ^b	T ₂ ^a	P ₂ ^b	T ₃ ^a	P ₃ ^b	T ₄ ^a	P ₄ ^b		
	Puro	100/0	67	7,8	350	62,2	-	-		-
	70/30	86	10,0	357	58,3	-	-	-	-	31,7
	50/50	75	9,3	285	7,9	360	45,1	583	3,8	33,9
	30/70	108	9,0	287	9,5	367	40,2	575	9,3	32,0
	0/100	188	7,5	282	13,6	367	48,7	578	1,6	28,6
	100/0	112	5,6	316	71,4	-	-	-	-	23,0
	70/30	116	6,2	307	36,3	377	27,1	545	6,5	23,9
Sorbitol	50/50	121	7,0	-	-	372	58,6	575	7,8	26,6
	30/70	137	6,4	261	8,2	374	56,1	-	-	29,3
	0/100	140	7,0	257	14,0	369	41,9	454	11,4	25,7
	100/0	90	5,2	340	74,2	-	-	-	-	20,6
EDC	70/30	80	7,0	338	67,7	-	-	583	1,2	24,1
	50/50	109	5,2	341	52,5	410	17,0	-	-	25,0
	30/70	99	7,7	337	30,1	413	40,0	-	-	22,2

^a Temperaturas de máxima velocidade de degradação (°C).

^b Porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação.

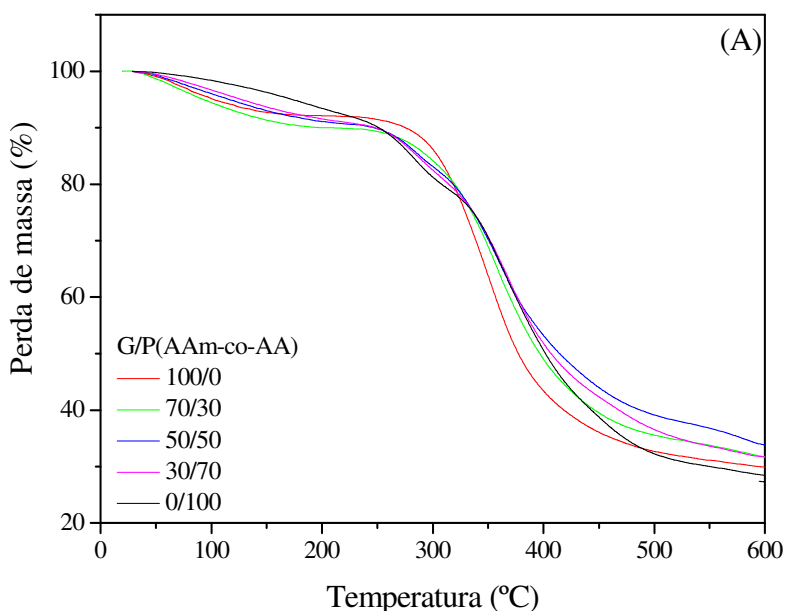
^c Massa residual a 600 °C.

Os subsequentes estágios de perda de massa representam a seqüência de reações pirolíticas. Nos filmes de gelatina o segundo estágio de degradação, com T_{max} em 350 °C e 62,2 % de perda de massa foi associado com a degradação da proteína. Com o aquecimento a estrutura ordenada da gelatina é lentamente destruída quebrando as ligações intra e intermoleculares que são responsáveis pela formação das cadeias poliméricas (α - hélice e estrutura β) [98]. O filme de P(AAm-co-AA) puro mostrou quatro estágios de degradação, sendo que as principais perdas de massa ocorrem à 282 °C e 367 °C (estágios 2 e 3, Tabela 2) correspondendo à degradação do ácido acrílico (13,6 %) e das unidades de acrilamida (48,7 %), respectivamente. De acordo com a literatura, a degradação térmica destes homopolímeros

em atmosfera inerte é um processo complexo. O ácido poliacrílico pode perder água devido à formação e posterior decomposição do anidrido formado. Já a poliacrilamida perde amônia devido à formação de imida e sua subsequente decomposição [99].

Como observado para o filme de gelatina, no sistema G/P(AAm-co-AA) puro, a blenda com 70 % deste polímero mostrou dois estágios de degradação, com perda principal (58,3 %) a 357 °C (estágio 2 da Tabela 3), devido provavelmente a degradação da proteína e das unidades de acrilamida. Por outro lado, as blends com 50 e 30 % de gelatina apresentaram quatro estágios de degradação, com perdas principais (45,1 – 40,2 % a 360 - 367 °C) no estágio 3, respectivamente, onde existe a contribuição da degradação da proteína com a degradação das unidades de acrilamida, presentes no copolímero em maior proporção. O quarto estágio de degradação, presente nos filmes com 50, 30 e 0 % de gelatina está relacionado a degradação dos compostos formados no estágio anterior. De acordo com o segundo estágio de perda de massa, a adição de P(AAm-co-AA) reduz a temperatura de degradação em relação ao filme de gelatina, indicando um decréscimo na estabilidade térmica, com temperaturas de degradação iniciais na faixa de 245 - 306 °C. Observou-se também que a blenda de composição G/P(AAm-co-AA) 70/30 apresentou uma maior estabilidade térmica em relação aos demais filmes.

As curvas termogravimétricas sobrepostas dos filmes de gelatina e das blends com P(AAm-co-AA), bem como as suas derivadas (DTG) estão mostradas na Figura 11 (A e B).



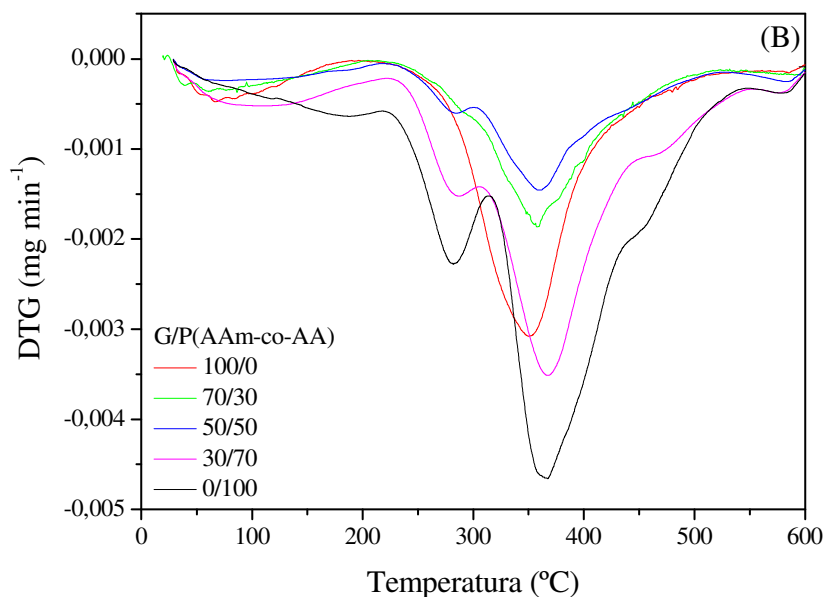


Figura 11. Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) para os filmes G/P(AAm-co-AA) na taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min^{-1}).

Com a presença de sorbitol nas blendas, ocorreu um leve decréscimo na estabilidade térmica do sistema, com temperaturas iniciais de degradação na faixa de $235 - 289\text{ }^{\circ}\text{C}$, devido à presença de plastificante. Analisando-se a temperatura de máxima velocidade de degradação no principal estágio de perda de massa podemos observar que para o filme de gelatina e para a blenda composta por 70% da proteína em presença de plastificante, a T_{max} ocorre no segundo estágio de degradação e com temperaturas de 307 e $316\text{ }^{\circ}\text{C}$, estando novamente associada com a degradação da proteína, e no caso da blenda, existe a contribuição da degradação das unidades de acrilamida. Já para os filmes de composição G/P(AAm-co-AA) 50/50, 30/70 e 0/100, a principal perda de massa ocorre no terceiro estágio, (58,6, 56,1 e 41,9%) com temperaturas de 372 , 374 e $369\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, associados principalmente com a degradação das unidades de acrilamida e pequena contribuição da proteína no caso das blendas 50/50 e 30/70. Para os filmes onde a composição de copolímero é predominante (30/70 e 0/100) o estágio anterior (estágio 2 da Tabela 3) refere-se provavelmente à degradação do ácido poliacrílico. De maneira geral, a diminuição na estabilidade térmica dos filmes em presença de plastificante, analisando o segundo estágio de perda de massa, pode ser explicada pelo fato do sorbitol estar aumentando o volume livre entre as cadeias poliméricas, diminuindo assim as interações existentes, como por exemplo, ligações de hidrogênio entre as

cadeias de proteína, favorecendo então a quebra das ligações a uma temperatura inferior. Neste sistema o filme que apresentou a maior estabilidade térmica foi a blenda composta por 50% de cada polímero.

Para os filmes reticulados com EDC, no segundo estágio de perda de massa, as T_{max} são muito próximas (faixa de 337 – 341 °C). Fazendo uma analogia com o processo de degradação dos filmes no sistema puro, podemos supor que no segundo estágio o que está ocorrendo é a degradação da rede proteica, sendo que para as blends G/P(AAm-co-AA) 100/0 e 70/30 a degradação ocorre em uma temperatura um pouco inferior, comparado ao sistema puro, podendo estar associada a uma pequena diminuição da estabilidade da proteína após a reticulação. Observando também o comportamento de degradação para as blends 50/50 e 30/70 reticuladas, e mais precisamente, o terceiro estágio de degradação, que possivelmente está associado à quebra das unidades de acrilamida, podemos supor neste caso, que a presença de EDC promove um aumento na estabilidade térmica deste polímero, pois no sistema puro sua degradação está por volta de 367 °C. Observa-se ainda que a T_{max} relacionada a degradação das unidades de ácido poliacrílico, que no sistema não reticulado ocorreu em 282 °C teve sua estabilidade térmica aumentada, degradando agora na temperatura próxima a da gelatina. Assim, podemos concluir que a reticulação com EDC promove um aumento na estabilidade térmica do copolímero, fazendo com que os seus monômeros degradem em temperaturas mais elevadas quando comparados ao sistema não reticulado e ao mesmo tempo promove uma pequena desestabilização da rede proteica. As temperaturas iniciais de degradação foram na faixa de 262 - 296 °C e em relação ao sistema não reticulado e de maneira geral ocorreu um leve aumento na estabilidade térmica deste sistema.

As curvas termogravimétricas para os filmes de gelatina e P(AAm-co-AA) em presença de plastificante e reticulados com EDC estão mostradas na (Figura 12 A e 12 B).

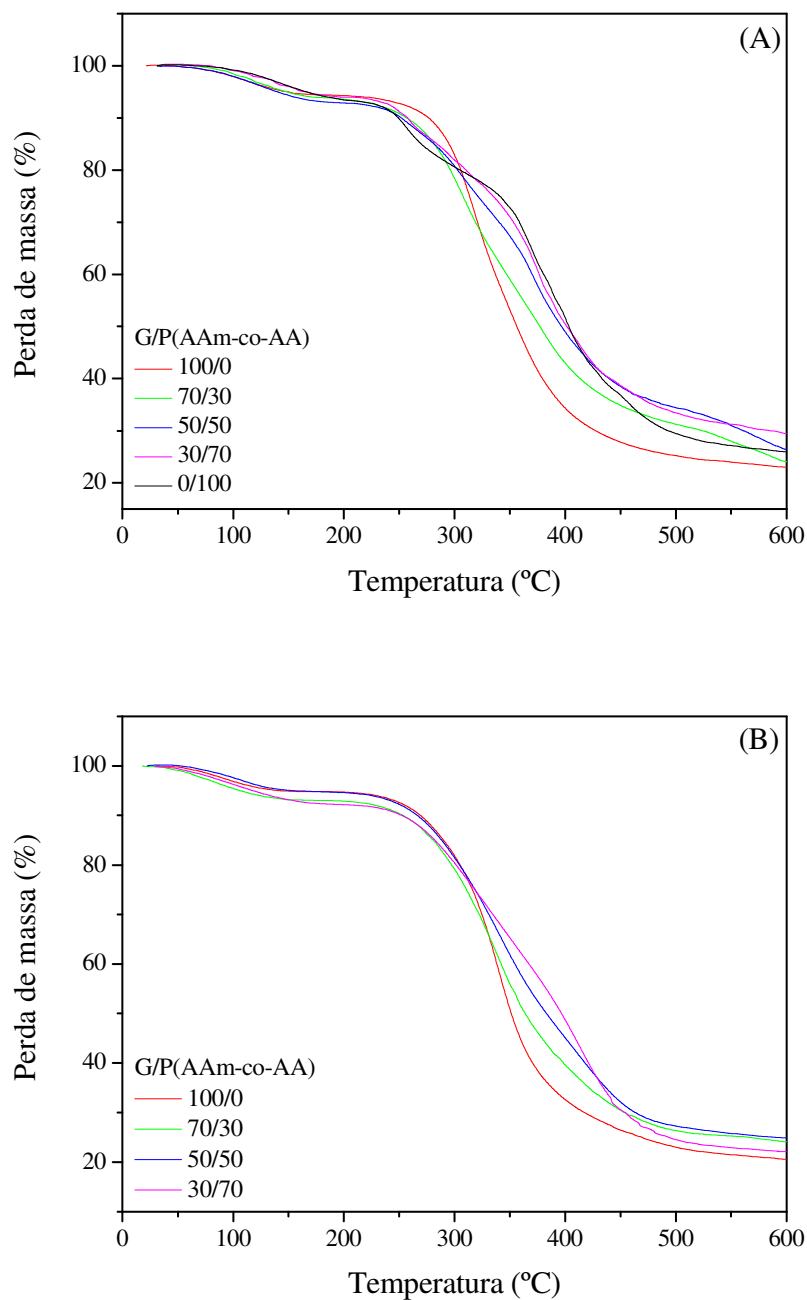


Figura 12. Curvas termogravimétricas para: (A) G/P(AAm-co-AA)_sorbitol e (B) G/P(AAm-co-AA)_EDC.

Já a Figura 13 faz um comparativo entre os valores de T_{max} no estágio onde ocorre uma maior porcentagem de perda de massa (estágios 2 e 3 da Tabela 3), para os três sistemas estudados. Podemos observar que a maior variação encontrada foi para a blenda de composição 30/70, onde o filme reticulado apresenta maior temperatura de degradação. Já

para os filmes em presença de sorbitol a blenda 50/50 com plastificante apresenta uma maior velocidade de degradação, porém as diferenças não são muito significativas.

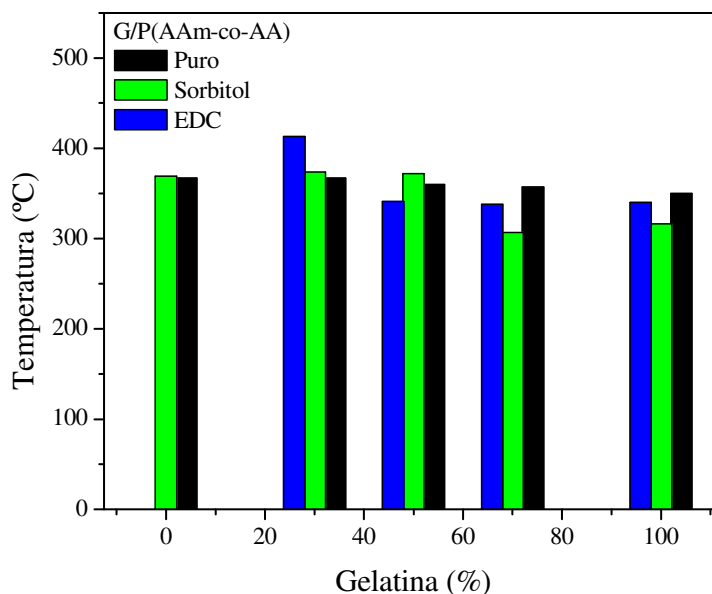


Figura 13. Valores de T_{max} referente à maior porcentagem de perda de massa, como uma função da concentração de gelatina nas blends para os três sistemas estudados.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA

5.4.2.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Um dos critérios adotados para a avaliação da miscibilidade em sistemas poliméricos baseia-se na determinação da temperatura de transição vítrea (T_g). Em processos termodinâmicos a T_g é definida como uma transição de segunda ordem, e é característica de um material amorfo, ou semicristalino. Uma blenda é considerada miscível quando apresenta uma única transição vítrea situada em uma faixa de temperatura intermediária às transições dos componentes puros [63]. Vários tipos de interações específicas são responsáveis pela miscibilidade, como por exemplo, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, entre outras [100], e são forças que atuam entre moléculas ou entre segmentos de cadeias.

Para eliminar a umidade, que pode promover um efeito plastificante diminuindo os valores da T_g dos filmes, duas varreduras foram adotadas considerando a região de temperatura antes do início da degradação térmica. Na primeira varredura, a qual foi obtida com a finalidade de apagar a história térmica do material, o filme de gelatina apresenta uma estrutura parcialmente cristalina, com temperatura de fusão em 230 °C, estando de acordo com a literatura [6, 28], enquanto que no segundo aquecimento apresenta-se em estado essencialmente amorfo. As blendas na primeira varredura também apresentam temperatura de fusão com deslocamento para valores menores à medida que a proporção de gelatina vai diminuindo na mistura. Valores de T_g bem definidos foram observados somente na segunda varredura de aquecimento. As temperaturas de transição vítrea para as blendas de diferentes composições para os três sistemas estudados e os valores estimados para o sistema denominado puro através da equação de Fox (equação 10) estão na Tabela 4.

A equação de Fox, que é uma equação empírica para sistemas miscíveis, foi utilizada para comparar os valores teóricos aos experimentais da T_g como uma função da composição da amostra. De acordo com a equação 10, T_{AB} é a temperatura de transição vítrea da blenda, T_A e T_B são aquelas dos polímeros puros e w_A e w_B são as frações em massa dos dois componentes.

$$\frac{1}{T_{AB}} = \frac{w_A}{T_A} + \frac{w_B}{T_B} \quad (10)$$

As mudanças na linha base associadas com a T_g foram observadas à aproximadamente 131,8 °C para o filme de P(AAm-co-AA) e 214,1 °C para o filme de gelatina (valor similar ao obtido por Bhaskar e colaboradores [101]). As curvas de DSC para as blendas evidenciaram uma única temperatura de transição vítrea, cujos valores decrescem com a diminuição de gelatina nas blendas e foram intermediários aos valores de T_g encontrados para os polímeros puros. De acordo com a equação de Fox, pode-se observar que os pontos experimentais de T_g para as blendas são maiores que os valores preditos para os filmes (Figura 14 B), mostrando um desvio positivo com respeito à linearidade, indicando interação entre os polímeros. Os valores experimentais aumentam na faixa de 21,8 – 43,7 °C em relação aos valores calculados, sendo esta diferença maior para a blenda G/P(AAm-co-AA) 30/70 (Tabela 4). Uma única temperatura de transição vítrea pode ser observada para todas as amostras, sugerindo miscibilidade dentro dos limites de detecção pela técnica de DSC.

Tabela 4. Análises de DSC para o sistema G/P(AAm-co-AA) na presença ou ausência de sorbitol ou agente de reticulação.

G/P(AAm-co-AA) (%wt)	T _g (°C)	T _g (°C) (Equação de Fox)	Efeito (°C) ^a	
Puro	100/0	214,1	214,1	-
	70/30	202,1	180,3	-21,8
	50/50	199,6	163,2	-36,4
	30/70	192,7	149,0	-43,7
	0/100	131,8	131,8	-
Sorbitol	100/0	132,1	-	-82,0
	70/30	134,6	-	-67,5
	50/50	123,5	-	-76,1
	30/70	119,1	-	-73,6
	0/100	122,2	-	-9,6
EDC	100/0	131,2	-	-82,9
	70/30	133,3	-	-68,8
	50/50	132,2	-	-67,4
	30/70	123,5	-	-69,2

^a Em relação ao sistema puro

A Figura 14 mostra as curvas de DSC para o sistema puro (A) e os valores de T_g experimentais comparados aos determinados teoricamente pela equação de Fox (B).

O plastificante normalmente é incorporado nas cadeias poliméricas para promover a sua flexibilidade. A plastificação, a nível molecular, leva a um aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local e aumentando a mobilidade [102]. A presença de sorbitol nos filmes promoveu uma diminuição nos valores de T_g, como esperado, e foi observado que o efeito plastificante (observado pela variação na temperatura de transição vítrea) aumenta em função do conteúdo de gelatina nos filmes (Tabela 4 e figura 15 A). Em comparação ao sistema puro os valores de T_g decrescem entre 9,6 e 82,0 °C, e o filme de P(AAm-co-AA) é o menos influenciado pelo plastificante. Esta alteração será posteriormente estudada por espectroscopia de infravermelho.

Os filmes reticulados também apresentaram uma diminuição nos valores de T_g na faixa de 67,4 a 82,9 °C em relação ao sistema puro, e apresentaram valores de T_g próximos entre si (Tabela 4 e Figura 15 B).

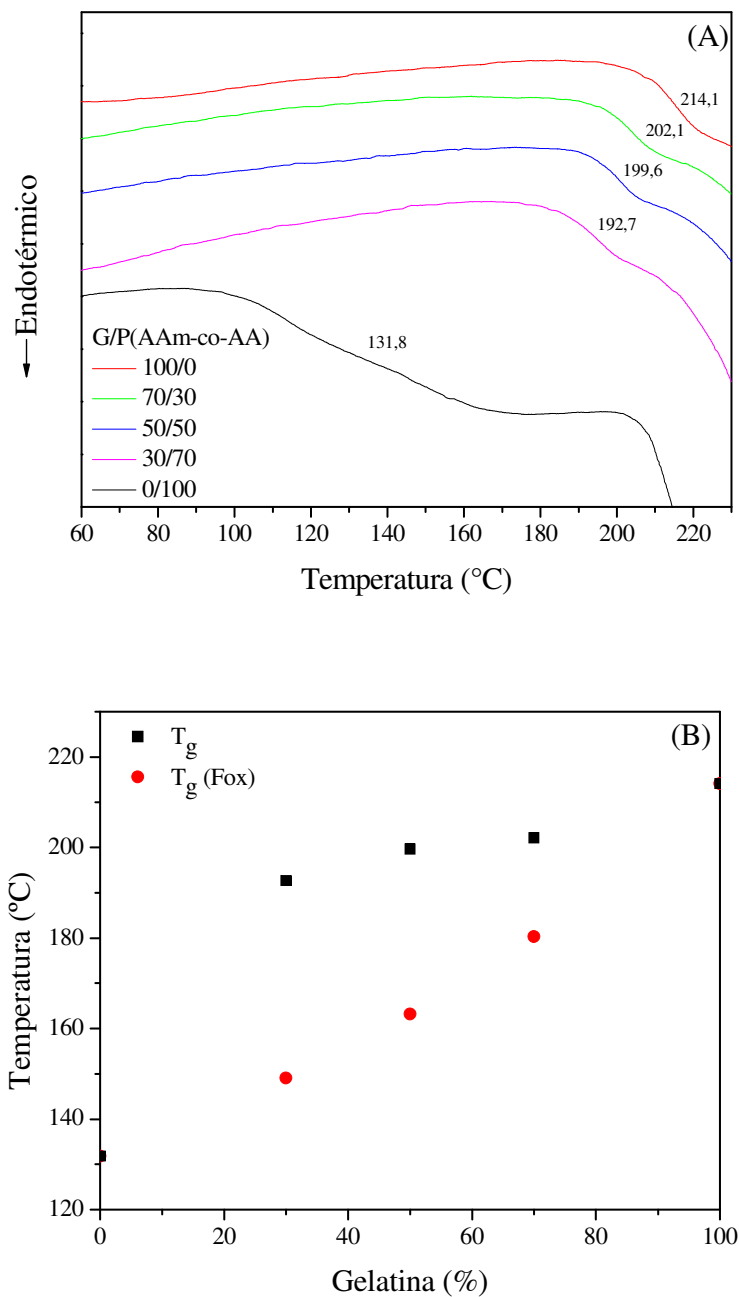


Figura 14. Curvas de DSC (A) e valores de temperatura de transição vítrea experimental (T_g) e teórica (T_g (Fox)) (B) para filmes compostos por G/P(AAm-co-AA).

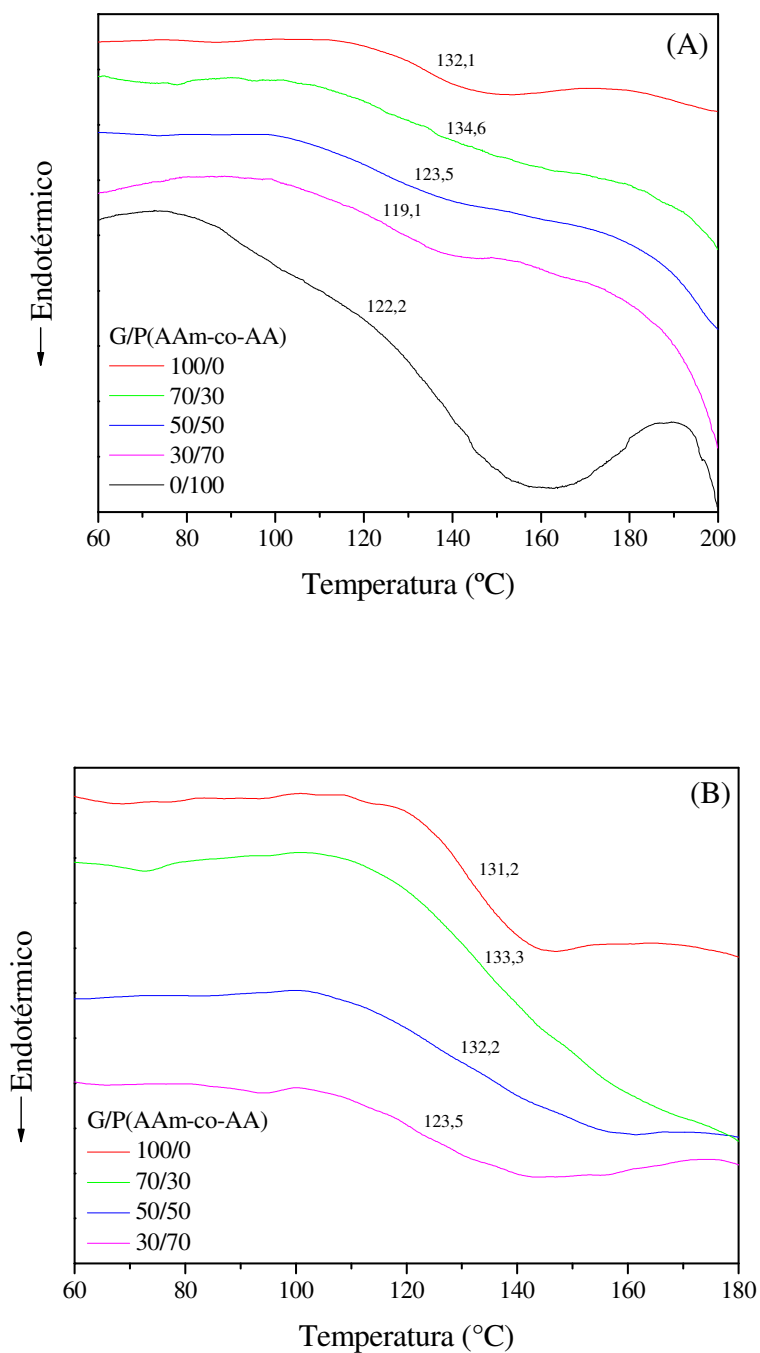


Figura 15. Curvas de DSC obtidas a partir dos filmes de G/P(AAm-co-AA) em presença de sorbitol (A) e EDC (B).

Comparando os valores de T_g encontrados para os filmes com plastificante e reticulados de mesma composição (Tabela 4), pode-se observar que os filmes de gelatina e a blenda 70/30 apresentam valores semelhantes de T_g , enquanto os filmes de composição 50/50

e 30/70 mostram uma diferença de menos de 10 °C. Estes valores similares para os filmes com plastificante ou reticulante, podem estar relacionados com a desestabilização ou distorção da conformação tripla hélice das moléculas de gelatina. Além disso, o efeito sobre as propriedades mecânicas (a ser discutido posteriormente) dos filmes reticulados mostram um comportamento similar, quando comparado com o efeito plastificante dos filmes com sorbitol.

5.4.2.2 ANÁLISE TERMOMECAÂNICA (TMA)

A temperatura de transição vítrea foi avaliada ainda por análise termomecânica. Esta técnica mede o coeficiente de expansividade térmica e a variação de volume de uma amostra em função da temperatura, e o valor de T_g é determinado considerando-se a temperatura na qual ocorrem mudanças no coeficiente de expansão térmica.

Para as blendas G/P(AAm-co-AA) (sistema puro), as curvas de TMA evidenciaram uma única temperatura de transição vítrea e seus valores aumentam proporcionalmente com o conteúdo de gelatina. Os valores de T_g para cada composição de G/P(AAm-co-AA) (70/30, 50/50 e 30/70) foram intermediários aos valores encontrados para com o filmes de gelatina (215,9 °C) e P(AAm-co-AA) (181,1 °C) (Tabela 5). A equação de Fox (equação 8) foi também utilizada para a estimativa dos valores de T_g , cujos resultados estão em concordância com os valores experimentais obtidos via TMA (Figura 16).

Em presença de sorbitol ocorreu um decréscimo nos valores de T_g para todas as blendas e para o filme de gelatina puro, e esta diminuição encontra-se na faixa de 36,2 – 53,8 °C. Por outro lado, um aumento de 10,6 °C foi observado para o filme de P(AAm-co-AA) puro em presença de plastificante. Este aumento na T_g encontrado para o copolímero pode estar associado a algum tipo de interação existente entre este e o sorbitol, como ligações de hidrogênio.

Já os filmes reticulados apresentaram valores de T_g próximos entre si e foram menores comparados aos valores encontrados para o sistema puro (com diferenças entre 41,7 – 71,9 °C). Estes valores de variação de temperatura aumentam com a adição de gelatina nas blendas, indicando uma tendência para uma maior mobilidade do sistema.

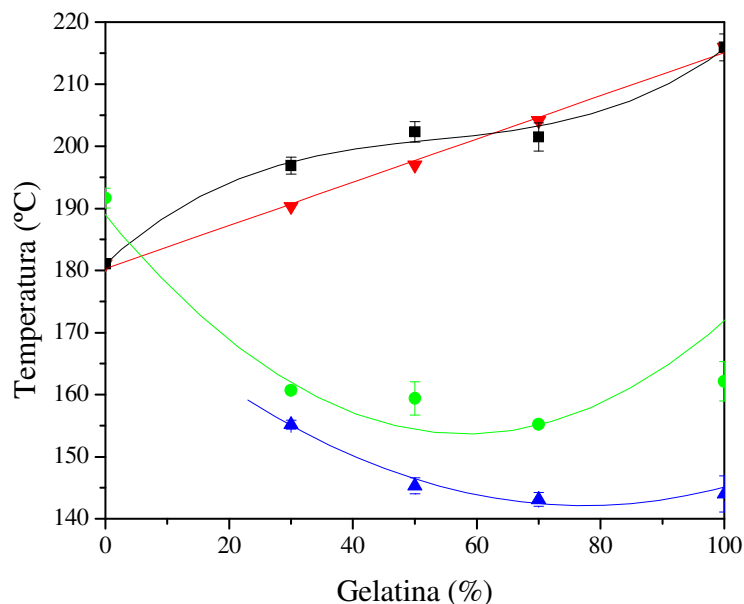


Figura 16. Temperaturas de transição vítrea dos filmes de G/P(AAm-co-AA): puro (■), com sorbitol (●), reticulado com EDC (▲), e de acordo com a equação de Fox (▼).

A Figura 17 apresenta as curvas termomecânicas obtidas para o sistema puro (A) e também compara as curvas e os valores de T_g encontrados para a gelatina e o P(AAm-co-AA) (B).

As curvas de TMA obtidas apresentam um comportamento típico de compressão principalmente para o filme de gelatina e para as blendas. No caso do copolímero, a contração do filme se mostra de uma forma menos acentuada, similar ao comportamento verificado em estudos com filmes de acetato de celulose [104]. Possivelmente, próximo à temperatura de transição vítrea, ainda ocorre a perda de água oclusa na estrutura da proteína, ocasionando assim uma contração do filme. Em amostras sólidas, na forma de grãos, o comportamento de compressão pode ser causado por um colapso dos microporos, devido ao amolecimento e empacotamento das partículas e deformação [105].

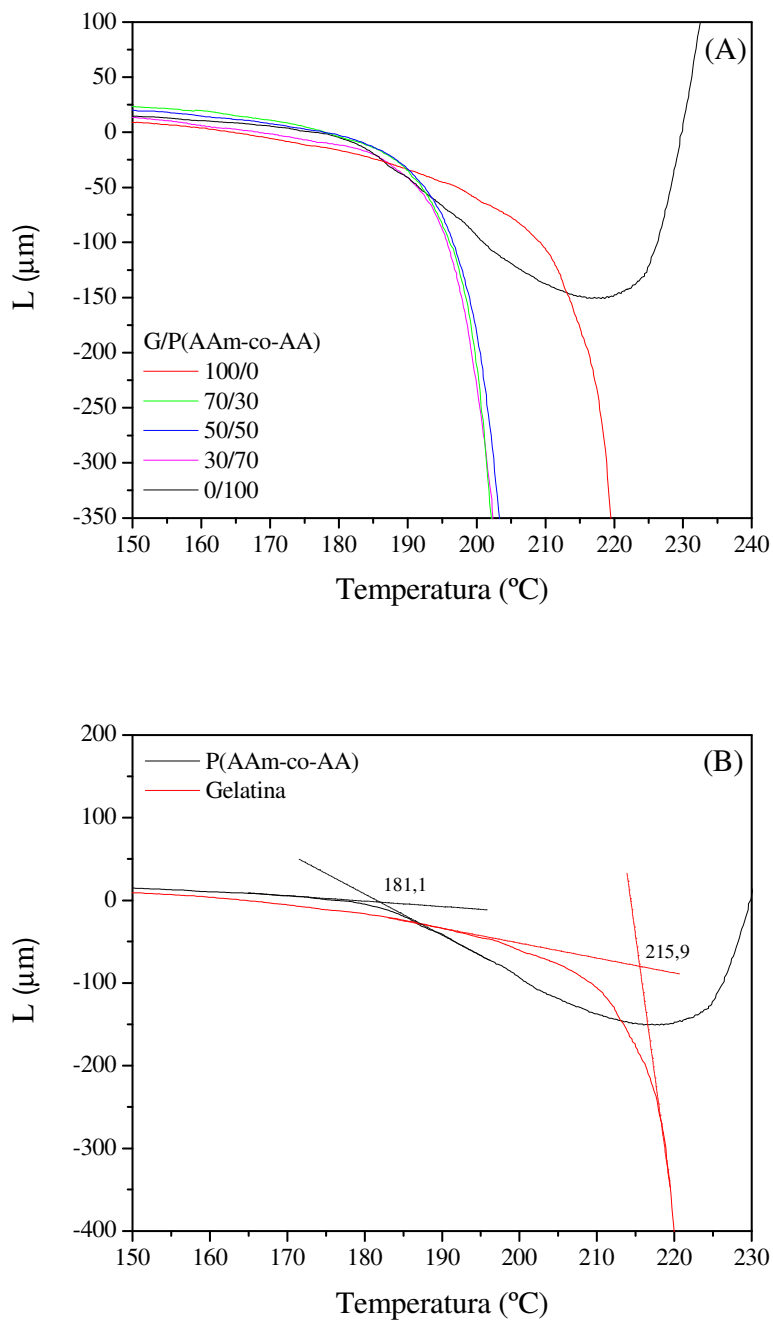


Figura 17. Curvas termomecânicas obtidas para os sistema puro (A) e para os filmes de gelatina e P(AAm-co-AA) (B).

Fazendo um comparativo entre as duas técnicas utilizadas para a determinação da temperatura de transição vítrea (DSC e TMA, Tabela 5), os valores de T_g obtidos para o sistema puro através de TMA, foram próximos aos determinados através da técnica de DSC,

com pequena variação de temperatura para as blendas e para o filme de gelatina e uma variação de 49,3 °C maior para o filme do copolímero puro.

Esta diferença de valores entre as duas técnicas se tornou maior com a adição de sorbitol nas blendas, estando entre 20,6 - 69,5 °C. E em relação ao sistema reticulado, as diferenças ficaram na faixa de 9,8 - 31,7 °C maiores que os valores encontrados por DSC. De acordo com Boonyai e colaboradores [103] a técnica de TMA fornece valores maiores de T_g quando comparados a outras técnicas.

Tabela 5. Temperatura de transição vítrea determinada para os três sistemas por análise de DSC e TMA.

G/P(AAm-co-AA) (%wt)	T_g (°C) (DSC)	T_g (°C) (TMA)	$T_{g(DSC)} - T_{g(TMA)}$	
Puro	100/0	214,1	215,9 ± 2,2	-1,8
	70/30	202,1	201,5 ± 2,3	0,6
	50/50	199,6	202,3 ± 1,7	-2,7
	30/70	192,7	196,9 ± 1,4	-4,2
	0/100	131,8	181,1 ± 0,7	-49,3
Sorbitol	100/0	132,1	162,1 ± 3,2	-30,0
	70/30	134,6	155,2 ± 0,2	-20,6
	50/50	123,5	159,4 ± 2,7	-35,9
	30/70	119,1	160,7 ± 0,6	-41,6
	0/100	122,2	191,7 ± 1,6	-69,5
EDC	100/0	131,2	144,0 ± 2,9	-12,8
	70/30	133,3	143,1 ± 1,1	-9,8
	50/50	132,2	145,3 ± 1,3	-13,1
	30/70	123,5	155,2 ± 0,7	-31,7

5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é frequentemente utilizada em estudos de modificações poliméricas a nível molecular. Com esta técnica podemos verificar as possíveis

interações existentes entre os polímeros na blenda, bem como as mudanças a nível molecular causadas pela adição de plastificante, ou do processo de reticulação. A Figura 18 mostra as mudanças nos espectros de FTIR para o sistema G/P(AAm-co-AA).

O espectro de infravermelho para o filme de gelatina mostra bandas de absorção em 3320 cm^{-1} (associada com a frequência de estiramento NH e OH), 1656 cm^{-1} (amida I, estiramento C=O e CN), 1554 cm^{-1} (amida II, deformação NH e estiramento CN) e 1239 cm^{-1} (amida III) [106].

A banda de amida I é a mais frequentemente utilizada para analisar a estrutura secundária de proteínas como a gelatina e está relacionada principalmente à estrutura α -hélice [107]. As diferenças encontradas na região ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) podem sugerir diferenças na estrutura secundária da proteína. O P(AAm-co-AA) tem como principais bandas de absorção: 3363 cm^{-1} , 3203 cm^{-1} e 1666 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento OH combinado com NH, vibração CH_2 e estiramento C=O, respectivamente.

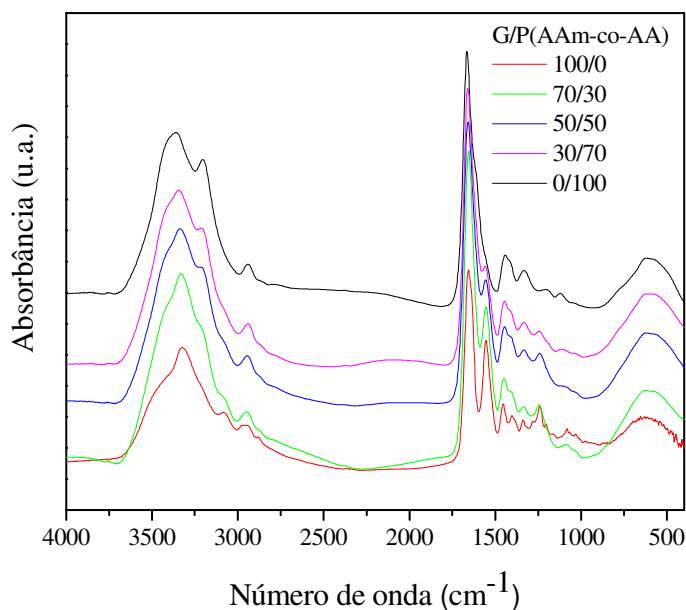


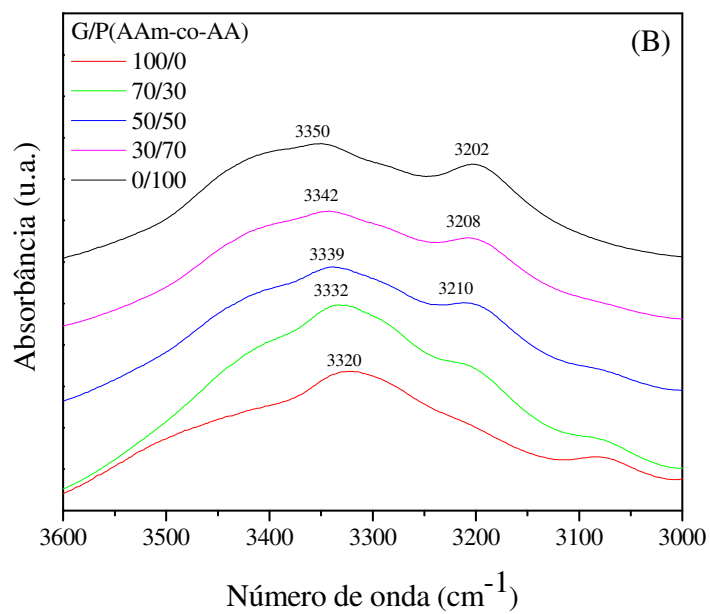
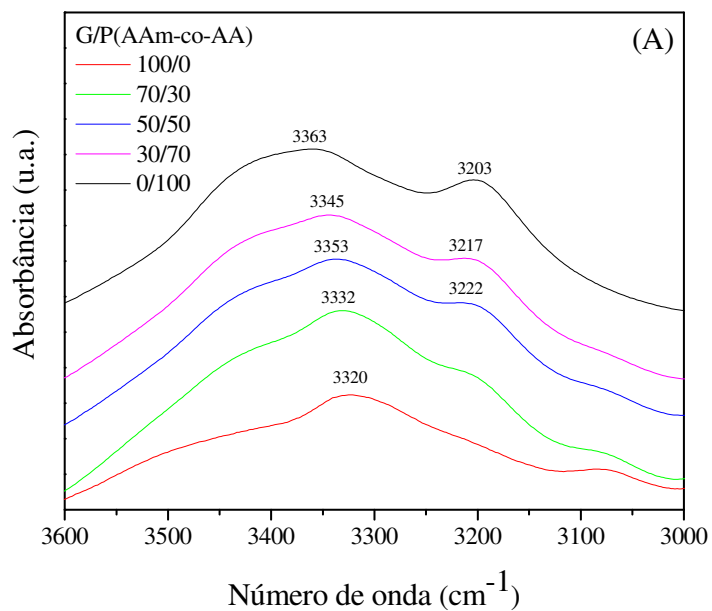
Figura 18. Sobreposição dos espectros de infravermelho dos filmes de G/P(AAm-co-AA).

Na região espectral de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (Figura 19 A, B e C) a gelatina apresenta uma banda intensa em aproximadamente 3320 cm^{-1} relacionada ao estiramento NH e um ombro em 3445 cm^{-1} associado aos estiramentos OH e NH livres. Com a adição do copolímero a banda em 3445 cm^{-1} desloca-se para valores menores sugerindo interação via ligações de hidrogênio

entre os componentes. O copolímero puro apresenta bandas em 3363 cm^{-1} e 3203 cm^{-1} relacionadas ao estiramento OH da cadeia e formando ligações de hidrogênio, respectivamente.

Analisando primeiramente a sobreposição de espectros na região ($3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) para o sistema puro (Figura 19 A), podemos observar que em geral, com o aumento do conteúdo de gelatina nos filmes, a banda relacionada ao estiramento OH diminui em intensidade. Este comportamento sugere que a miscibilidade do sistema está associada à formação de ligações de hidrogênio entre os componentes.

A adição de sorbitol e o processo de reticulação (Figura 19 B e C) mostram algumas diferenças em relação ao sistema puro, principalmente para o copolímero e para a blenda 50/50. Comparando-se o filme de P(AAm-co-AA) na presença e ausência de plastificante, observou-se que a banda em 3363 cm^{-1} (estiramento OH) desloca-se para 3350 cm^{-1} na presença de sorbitol, devido a formação de ligações de hidrogênio entre os componentes. Esta observação pode explicar o fato do efeito plastificante ter sido menor para o filme de P(AAm-co-AA) de acordo com a variação na temperatura de transição vítrea. Outra diferença importante foi no espectro de G/P(AAm-co-AA) 50/50. A banda inicialmente em 3353 cm^{-1} desloca-se para 3339 cm^{-1} no filme com sorbitol e para 3342 cm^{-1} no filme reticulado. Este deslocamento pode estar relacionado também à formação das ligações de hidrogênio. No caso do filme de composição 50/50 com sorbitol, a formação de ligações de hidrogênio entre os polímeros na presença de plastificante justifica o aumento na estabilidade térmica deste filme, de acordo com os dados termogravimétricos. Já para a blenda reticulada, este resultado está relacionado ao grau de reticulação com EDC, discutido anteriormente.



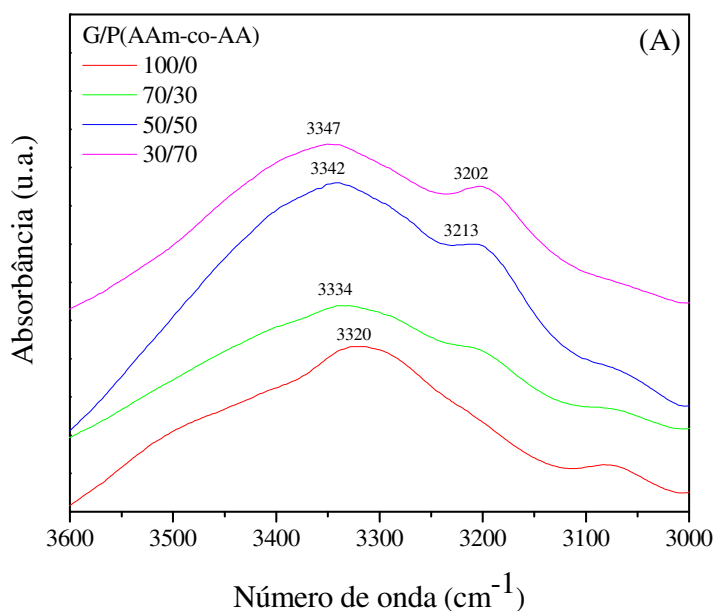
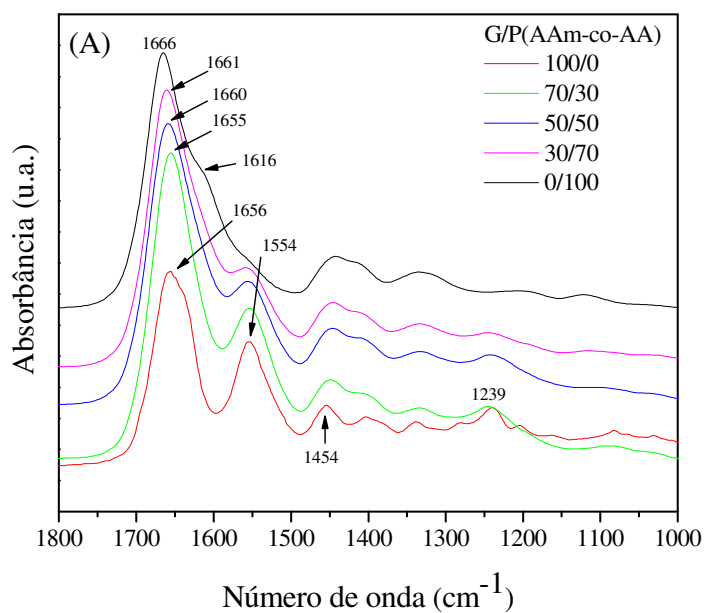


Figura 19. Espectros de infravermelho do sistema puro (A), na presença de sorbitol (B) e de EDC (C) na região de 3600-3000 cm^{-1} .

Analisando também a sobreposição dos espectros na região de 1800-1000 cm^{-1} , e mais precisamente a banda relacionada com a carbonila, na faixa de 1655 – 1666 cm^{-1} para o sistema puro (Figura 20 A), pode-se observar um pequeno deslocamento, para valores menores, à medida que o conteúdo de gelatina nas blendas aumenta. Este comportamento sugere que as interações existentes entre os dois polímeros na blenda, estejam relacionadas às ligações de hidrogênio.

As diferenças nesta região espectral encontradas para o sistema com sorbitol (Figura 20 B) estão relacionadas principalmente a uma diminuição na intensidade da banda de amida II em 1556 cm^{-1} em relação ao sistema puro. Segundo Muyonga et al [108] um deslocamento para menor número de onda ou uma diminuição na intensidade da banda relacionada à estrutura α -hélice pode ser um indicativo de um maior grau de desordem molecular. Para o filme do copolímero observa-se uma maior resolução da banda em 1616 cm^{-1} que no sistema puro aparece apenas como um ombro. Para os filmes reticulados (Figura 20 C) as diferenças encontradas são pequenas, estando principalmente relacionadas ao filme de gelatina, onde a banda em 1656 cm^{-1} desloca-se para 1652 cm^{-1} . Esta diferença sugere um maior grau de desordem interna causado pelo processo de reticulação.

O processo de reticulação com EDC é responsável pela formação de ligações amida entre grupos carboxílicos e grupos amino. Nos espectros de FTIR não foram encontrados deslocamentos significativos relacionados à banda de amida, porém foi observado que com a reticulação ocorre um aumento na intensidade da banda de amida I em relação à banda de amida II, que é mais visível para o filme de gelatina. Isto ocorre porque os grupos $-NH_2$ livres mudam para grupos $-NH$, formando ligações amida [109], possivelmente através de ligações intramoleculares na gelatina e ligações intermoleculares entre as moléculas de gelatina e do P(AAm-co-AA).



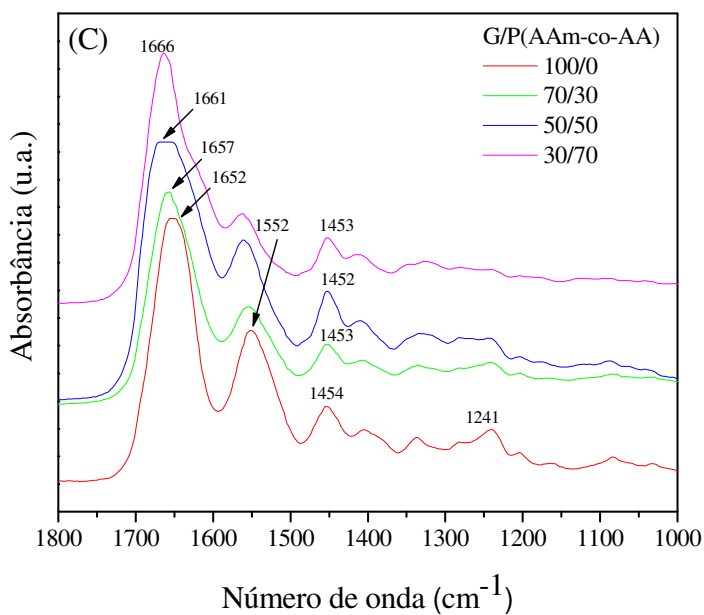
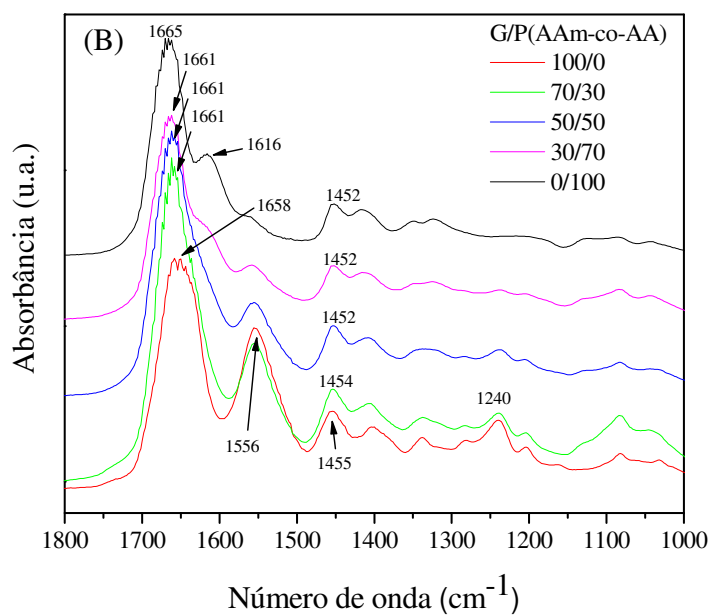


Figura 20. Espectros de infravermelho do sistema puro (A), na presença de sorbitol (B) e de EDC (C) na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

5.6 MORFOLOGIA

O estudo da morfologia é importante por vários aspectos e neste caso foi usado para fins de conhecimento da miscibilidade entre os polímeros usados para a formação dos filmes, bem como interações existentes entre os constituintes adicionais dos sistemas formados. O estudo da miscibilidade entre dois ou mais polímeros em uma mistura se torna necessário, pois pode afetar as características morfológicas do material formado e de forma indireta, outras propriedades.

A morfologia dos filmes obtidos foi primeiramente investigada por aspectos visuais, e para todos os sistemas estudados, os filmes foram transparentes a temperatura ambiente, homogêneos e maleáveis, sugerindo que nenhuma separação de fases ocorreu nas blendas.

A Figura 21 mostra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), para os filmes de gelatina (A e B), para a blenda G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C e D) e P(AAm-co-AA) (E e F), das superfícies e sessões transversais, respectivamente. A morfologia das blendas de outras composições não foi mostrada por ser similar. Todas as micrografias mostram uma superfície lisa, compacta e com ausência de poros. No caso das blendas, a composição uniforme confirma a boa miscibilidade entre os polímeros, não mostrando nenhuma alteração em relação aos filmes puros.

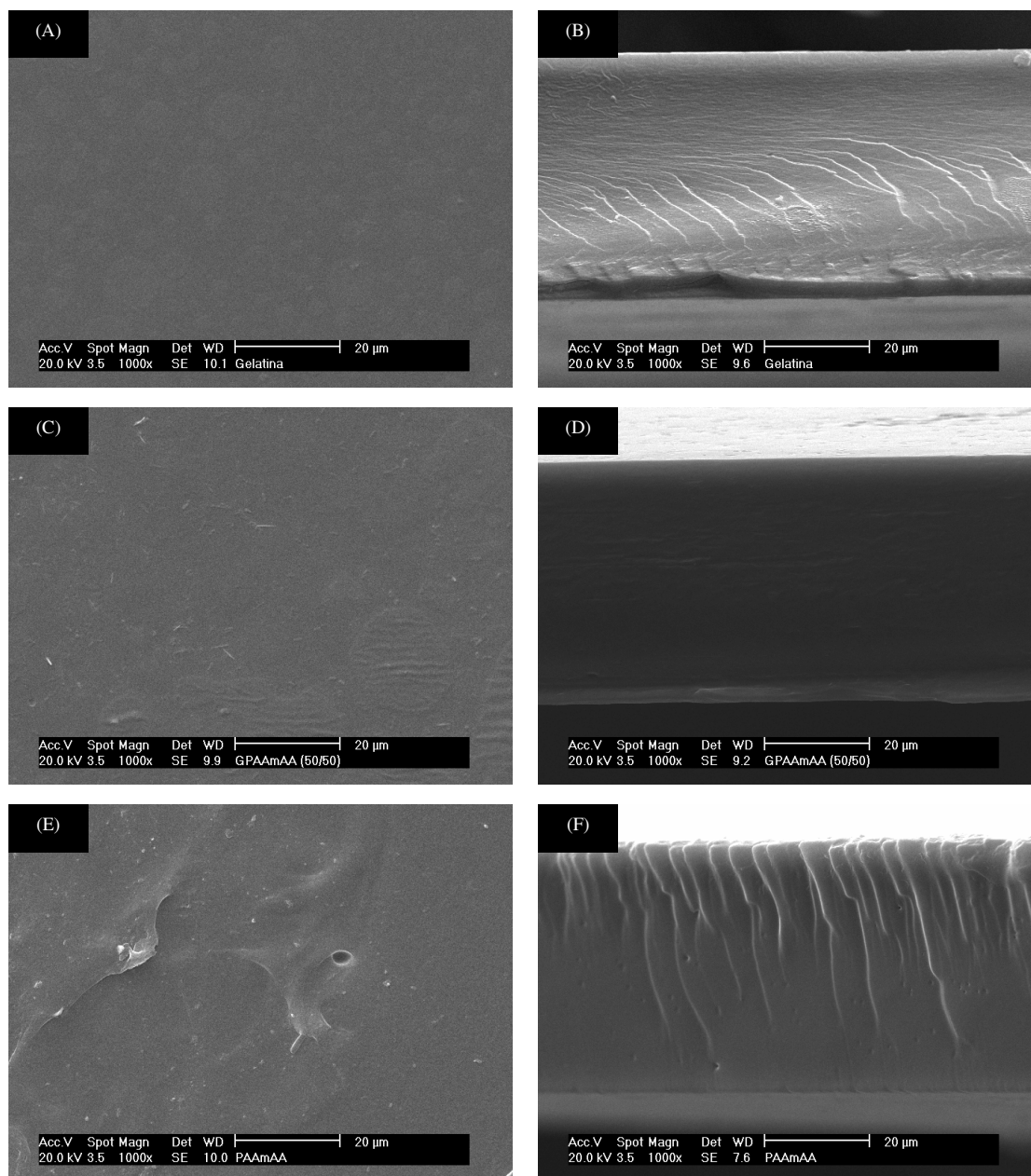


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura para os filmes de gelatina (A e B), G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C e D) e P(AAm-co-AA) (E e F), das superfícies e fraturas, respectivamente.

Em presença de plastificante também não foram encontradas diferenças significativas. As micrografias dos polímeros e da blenda formada de composição 50/50 são mostradas na Figura 22. Apenas a fratura para a blenda 50/50 com sorbitol parece apresentar um aumento de rugosidade.

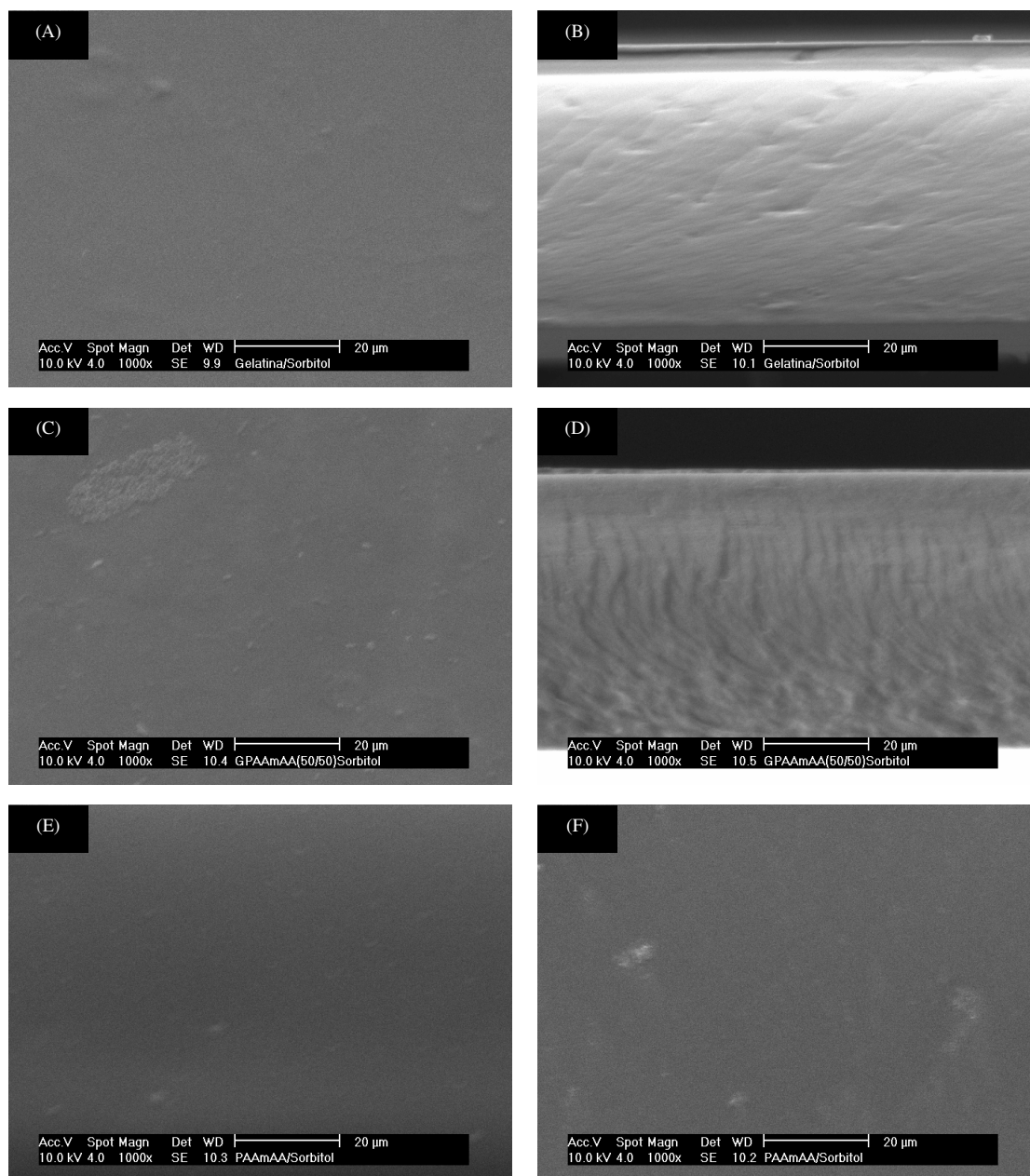


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das superfícies e das fraturas para os filmes de gelatina (A e B), de P(AAm-co-AA) (C e D) e da blenda G/P(AAm-co-AA) 50/50 (E e F), respectivamente, em presença de sorbitol.

O filme de gelatina reticulado apresenta pequenas diferenças observadas na seção transversal, como um aumento na rugosidade próximo à superfície do filme (Figura 23). Por outro lado a superfície mostra-se homogênea e compacta. Nas micrografias da blenda 50/50

reticulada podemos observar pequenos cristais na superfície e na fratura, que apresenta também um aspecto mais denso. Estes cristais podem ser possivelmente formados pelo excesso de EDC ou do derivado de uréia, resultante do processo de reticulação, na superfície dos filmes.

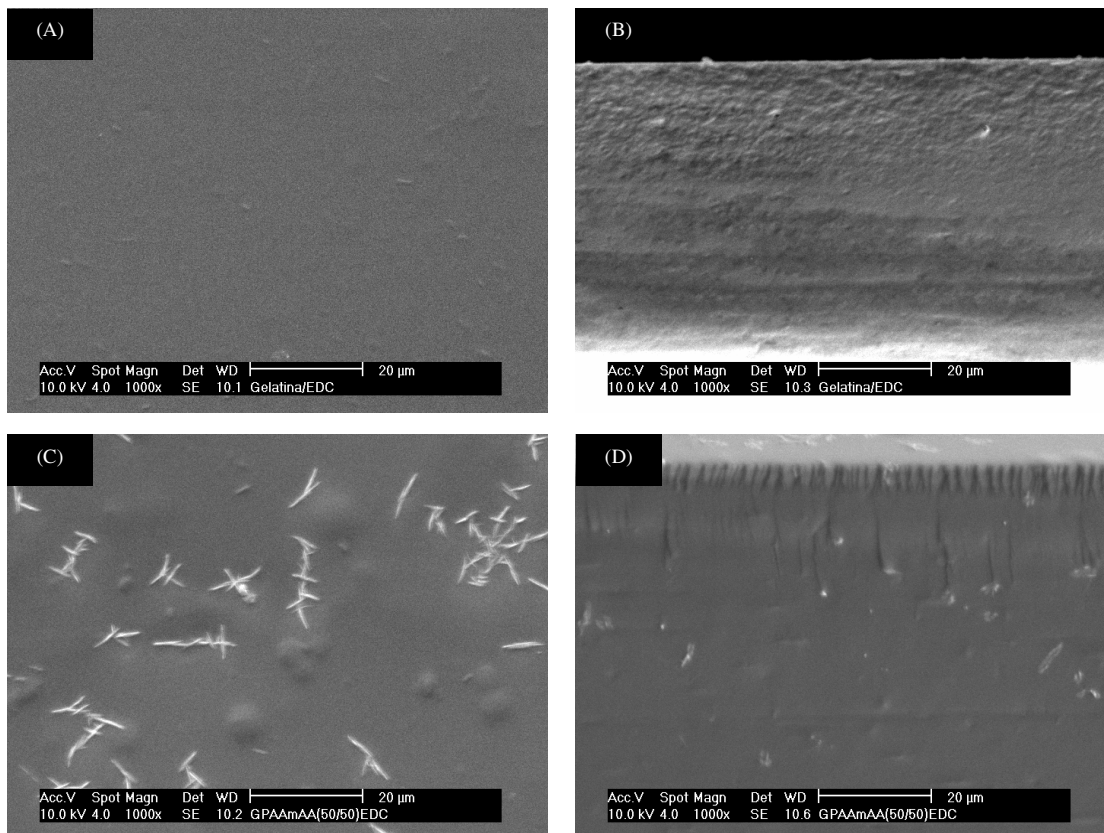


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura da superfície e das fraturas dos filmes compostos por gelatina (A e B) e pela blenda G/P(AAm-co-AA) 50/50 (C e D) em presença de agente reticulante.

5.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas dos filmes obtidos foram avaliadas através de medidas de tensão de ruptura (TR), alongação máxima (%E) e módulo de Young (MY) (calculado pela curva de tensão *versus* deformação, dentro do limite elástico). Estes parâmetros podem ser usados para descrever como as propriedades mecânicas dos filmes se correlacionam com as suas estruturas [110]. Filmes poliméricos podem estar sujeitos a uma variedade de tensões

durante o período de uso e sabe-se que as interações entre polímeros podem influenciar e modificar as propriedades de misturas (blendas) em relação aos polímeros puros [111, 112]. Assim o conhecimento das propriedades mecânicas do material é muito importante para uma determinada aplicação tecnológica.

Na Figura 24 são mostradas as curvas de tensão *versus* deformação para filmes de gelatina pura, na presença de sorbitol e após a reticulação. O filme de gelatina, assim como os demais filmes do sistema puro, apresenta somente uma região de deformação elástica (onde a deformação varia linearmente com a tensão até o ponto de ruptura), já em presença de plastificante apresenta uma pequena deformação plástica que precede a fratura, enquanto que o filme reticulado apresenta um platô de deformação plástica. A região plástica é aquela onde a força aplicada excede o limite de resistência do material e após a deformação este não retorna mais ao seu comprimento inicial.

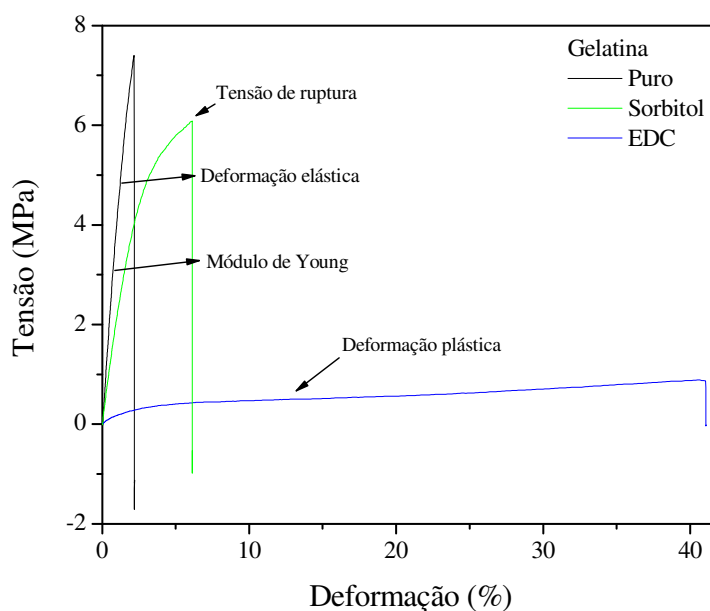


Figura 24. Curvas representativas de tensão *versus* deformação, obtidas para o filme de gelatina puro, com sorbitol e reticulado.

A Tabela 6 resume os resultados para TR, % E e MY para os três sistemas estudados. O comportamento em função da porcentagem de gelatina nos filmes está representado graficamente na Figura 25.

Tabela 6. Propriedades mecânicas para os diferentes sistemas estudados.

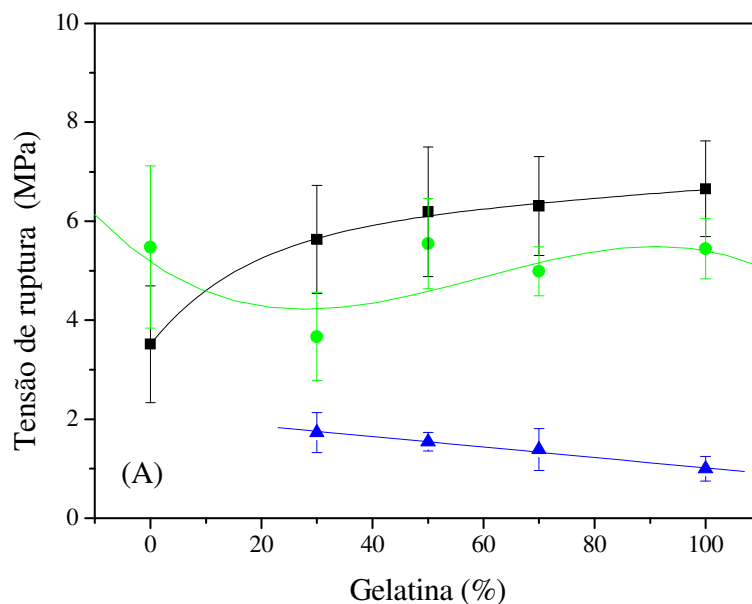
G/P(AAm-co-AA) (%wt)	Tensão de ruptura (MPa)	Elongação máxima (%)	Módulo de Young (MPa)	
Puro	100/0	6,6 ± 1,0	1,9 ± 0,3	442,1 ± 35,9
	70/30	6,3 ± 1,0	1,7 ± 0,4	464,4 ± 37,1
	50/50	6,2 ± 1,3	1,7 ± 0,3	456,3 ± 36,9
	30/70	5,6 ± 1,1	1,3 ± 0,3	549,5 ± 69,8
	0/100	3,5 ± 1,2	0,9 ± 0,4	514,5 ± 100,2
Sorbitol	100/0	5,4 ± 0,6	4,7 ± 1,3	231,9 ± 10,1
	70/30	5,0 ± 0,5	4,4 ± 1,7	250,2 ± 32,5
	50/50	5,6 ± 0,9	2,8 ± 0,8	392,3 ± 37,3
	30/70	3,7 ± 0,9	1,1 ± 0,6	528,9 ± 76,9
	0/100	5,5 ± 1,6	1,1 ± 0,3	648,4 ± 104,1
EDC	100/0	1,0 ± 0,2	37,9 ± 10,3	24,1 ± 10,6
	70/30	1,4 ± 0,4	15,6 ± 9,0	83,9 ± 24,7
	50/50	1,5 ± 0,2	9,8 ± 5,3	125,5 ± 10,8
	30/70	1,7 ± 0,4	2,6 ± 1,4	165,9 ± 25,4

Os resultados para a TR, caracterizada pela maior tensão que o filme é capaz de suportar, mostram valores para o sistema puro na faixa de 3,5 – 6,6 MPa. O filme de gelatina apresenta maior resistência à deformação que os demais filmes (6,6 MPa), provavelmente devido à contribuição de uma estrutura organizada pré-existente. Esta resistência diminui com a presença de P(AAm-co-AA) devido a uma diminuição nas interações intramoleculares da gelatina. Aparentemente a presença do copolímero nas blendas retarda o processo de renaturação da estrutura tripla hélice, diminuindo os valores de TR. Para o filme de P(AAm-co-AA) encontrou-se um valor de 3,5 MPa (o valor de TR para o ácido poliacrílico na literatura é de aproximadamente 5,0 MPa [112]), sendo o filme que apresentou menor resistência à ruptura no sistema puro. Para as blendas os valores foram intermediários aos da gelatina e copolímero.

Com a adição de sorbitol, os valores de TR foram ligeiramente menores na faixa de 3,7 a 5,6 MPa, sendo que o filme que apresenta menor resistência à ruptura é a blenda 30/70, enquanto que a blenda 50/50 é a mais resistente. É interessante observar que diferentemente

das demais composições, o filme do copolímero em presença de plastificante apresenta uma maior resistência à ruptura quando comparado ao mesmo filme no sistema puro. Este resultado concorda com o fato deste mesmo filme ter apresentado um comportamento diferente dos demais em relação à temperatura de transição vítrea, pois a formação de ligações de hidrogênio entre P(AAm-co-AA) e o sorbitol (confirmada por espectroscopia de infravermelho) aumenta a resistência do material.

Para os filmes reticulados, os valores de TR foram menores e próximos entre si e estão na faixa de 1,0 – 1,7 MPa, quando comparados aos outros sistemas. Este sistema apresenta um comportamento inverso aos filmes do sistema puro, ou seja, com o aumento da proporção de gelatina nas blendas ocorre uma diminuição na resistência do material. De acordo com a análise termogravimétrica foi comprovado que com a reticulação ocorreu uma pequena diminuição da estabilidade térmica com respeito à degradação da gelatina, bem como uma diminuição na T_g (Tabela 4). Segundo a literatura a T_g pode ter efeito sobre as propriedades mecânicas do material, de modo que a sua diminuição provoca uma diminuição na resistência do material [113]. Os valores de TR podem estar relacionados com o grau de organização da cadeia de proteína, bem como da cristalinidade [6], sendo assim, o fato dos filmes reticulados terem apresentado valores menores de TR sugerem que o processo de reticulação contribui para a desestabilização da rede proteica. Aparentemente, a reticulação provoca uma diminuição nas interações intramoleculares da gelatina, diminuindo a resistência do material.



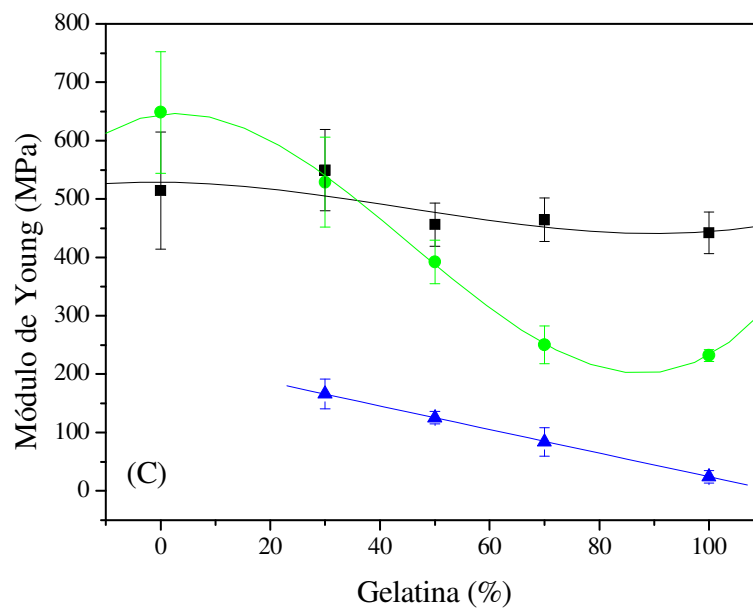
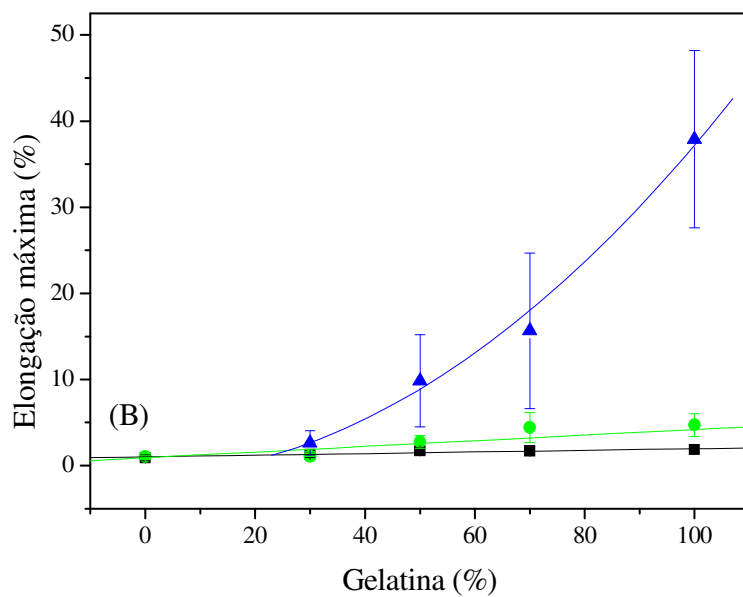


Figura 25. Valores médios e desvios padrão para as medidas de tensão de ruptura (A), elongação máxima (%) (B) e módulo de Young (C) como função da % de gelatina para o sistema G/P(AAm-co-AA) puro (■), na presença de sorbitol (●) e reticulado (▲).

Quanto à porcentagem de alongação máxima do filme até a ruptura (%E), observa-se que o filme de gelatina mostra maior alongação que nas demais composições, nos três sistemas estudados. Por outro lado, foi possível comprovar também o aumento na flexibilidade dos filmes na presença de sorbitol. Um comportamento similar foi observado Méier e colaboradores [104] no estudo do efeito de poli (caprolactona triol) sobre as propriedades mecânicas dos filmes de acetato de celulose e por Lima e colaboradores [73] em filmes de alginato em presença de sorbitol. A presença de plastificante causa uma redução das interações intramoleculares e aumento do volume livre do sistema, conduzindo a um aumento na alongação dos filmes [76]. A presença de plastificante pode ainda aumentar o conteúdo de umidade devido ao maior caráter hidrofílico e os grupos hidroxilas do sorbitol favorecem a ligação com moléculas de água, que contribuem com o efeito plastificante, diminuindo a tensão de ruptura e aumentando a porcentagem de alongação nos filmes.

No entanto a % E foi mais fortemente afetada pela reticulação do filme do que pelo efeito plastificante do sorbitol, exibindo uma dependência exponencial em função da proporção de gelatina nas blendas. A % E (Figura 25 B) para o sistema puro esteve na faixa de 0,9 – 1,9 %, para os filmes com sorbitol entre 1,1 – 4,7 %, enquanto que para os filmes reticulados os valores encontram-se entre 2,6 e 37,9 %. Isto sugere que o processo de reticulação contribui para a formação de um material com característica predominantemente amorfa (confirmada pela diminuição de valores da temperatura de transição vítrea), com o significativo aumento da mobilidade molecular devido à redução das interações intra e intermoleculares (presença de ligações fracas).

Um aumento na porcentagem de alongação também foi observado por Chambi e Grosso [114] em filmes de gelatina e caseína reticulados com transglutaminase, os autores observaram também uma pequena diminuição na orientação do material, confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Segundo a literatura, para filmes reticulados a porcentagem de alongação pode ser maior do que para filmes não reticulados desde que existam muitas ligações fracas do tipo van der Waals, intercaladas com pequenos sítios de ligações fortes [114].

A Figura 26 ilustra o possível comportamento do filme de gelatina segundo as suas propriedades mecânicas antes e após reticulação. Em (A) tem-se a estrutura da proteína não reticulada, com a presença de interações intermoleculares, seguida de tração (B). Já a Figura 26 (C) representa a cadeia reticulada, onde os pontos indicam a presença de ligações covalentes. Em (D) esta mesma cadeia sofre tração, e apesar de apresentar uma alta porcentagem de alongação, permanece fortemente ligada.

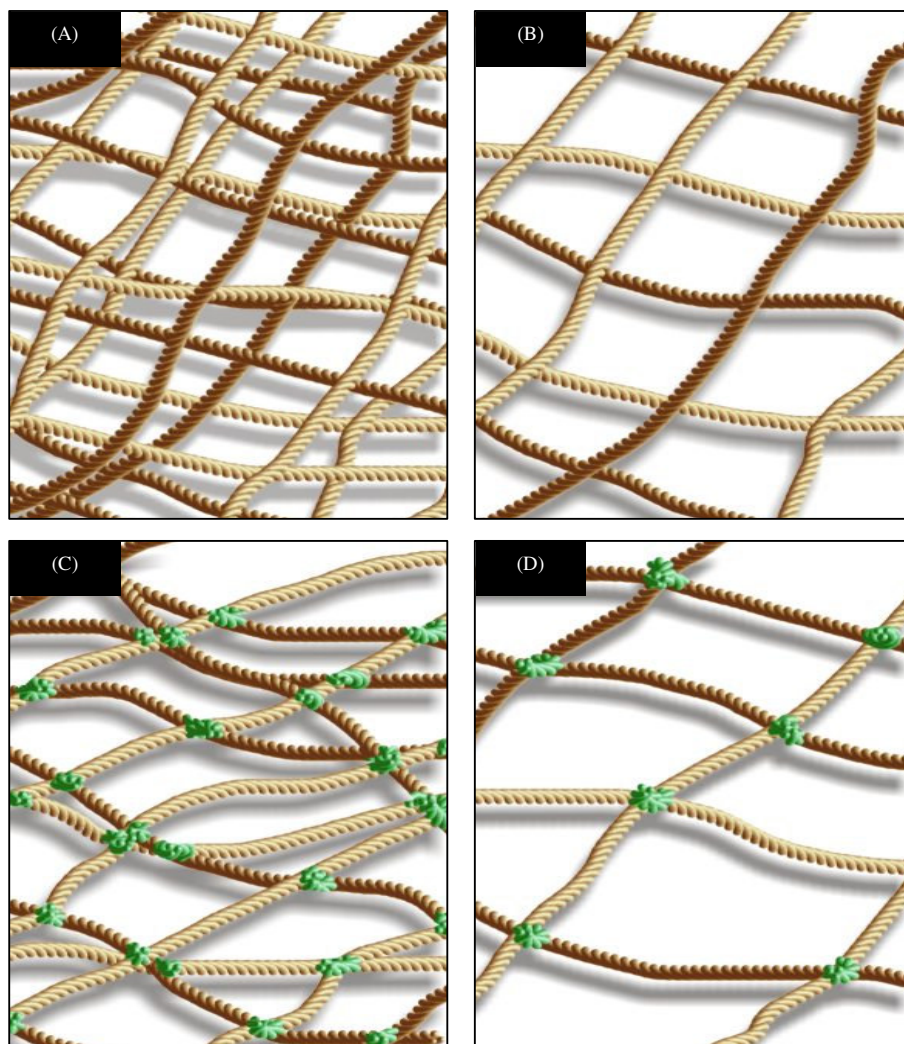


Figura 26. Modelo proposto para o filme de gelatina não reticulado (A e B) e reticulado (C e D) antes e após tração, respectivamente.

O módulo de Young é um parâmetro que caracteriza a rigidez do filme [115], possibilitando informações a respeito da dureza ou da resistência que este apresenta à deformação elástica. Quanto maior o módulo maior é a resistência à deformação e rigidez do material, ou seja, o filme apresenta menor flexibilidade. Para misturas poliméricas o MY é fortemente dependente da composição.

Os resultados de MY para o sistema puro encontram-se na faixa de 442,1 – 549,5 MPa, sendo maior para o filme de composição 30/70. O valor encontrado para a gelatina foi de 442,1 MPa e está próximo ao descrito na literatura (473 Mpa) [28]. De maneira geral, os

valores encontrados para os filmes deste sistema não apresentam uma variação significativa com relação ao módulo de elasticidade (Figura 25 C). Já para o sistema com sorbitol, o MY diminui à medida que a proporção de gelatina nas blendas aumenta. O maior valor encontrado (648,4 MPa) para o copolímero foi coerente com a baixa porcentagem de alongação e a característica quebradiça do filme. Os filmes reticulados, por outro lado, apresentam valores menores de MY que os outros dois sistemas, e uma dependência linear ao conteúdo de gelatina, com valores entre 24,1 – 165,9 MPa. Nos três sistemas estudados o filme de gelatina mostrou ser o mais flexível. Segundo Bigi e colaboradores [116], o módulo de Young é diretamente proporcional ao nível de renaturação da gelatina.

Uma diferença significativa nas propriedades mecânicas dos filmes reticulados em comparação aos filmes não reticulados sugerem modificações na rede polimérica. As propriedades mecânicas são dependentes da estrutura polimérica e especialmente de seu comprimento molecular, geometria, distribuição de massa molecular, tipo e posição dos grupos laterais, da habilidade dos polímeros de formar fortes interações entre as cadeias poliméricas, concentração e distribuição das interações intra e intermoleculares, bem como do arranjo espacial das cadeias [82]. A reticulação da gelatina é o resultado de dois processos, um processo de reticulação física, e um processo de reticulação química [117]. No sistema gelatina/copolímero, a probabilidade de recuperação da tripla hélice é reduzida, impedindo a formação da estrutura organizada da gelatina e a estrutura reticulada será como a de uma cadeia polimérica randômica, promovendo assim uma diminuição do efeito de reticulação física.

Um aumento na alongação até a ruptura e um decréscimo no módulo de Young também foram observados por Chielline et al [24], quando a concentração de glutaraldeído aumenta sobre o filme de gelatina. Este comportamento também foi observado por Kołodziejaska e Piotrowska [91] em estudos das propriedades mecânicas de filmes de gelatina-quitosana modificados quimicamente com transglutaminase e EDC. O decréscimo na TR foi também observado com matrizes de colágeno [117] e com filmes de glúten [82] reticulados com EDC e *N*-hidroxisuccinimida.

5.8 ADSORÇÃO DE VAPORES DE ÁGUA

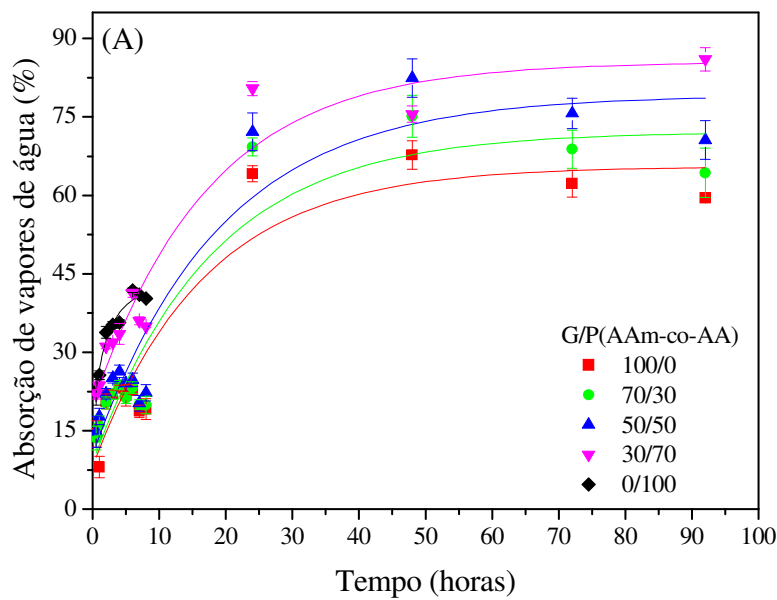
A Figura 27 (A, B e C) mostra a porcentagem de adsorção de vapores de água adsorvida a 98% de umidade relativa, cujo comportamento foi investigado em função da

proporção de gelatina nas blendas G/P(AAm-co-AA) (com ou sem aditivos) e pelo tempo de exposição dos filmes nesta umidade. A adsorção de vapores de água foi expressa como uma porcentagem em relação ao peso inicial da amostra, sendo seus valores calculados através da equação 8.

Sob condições de maior umidade relativa (98%), mesmo os filmes não reticulados permaneceram intactos na presença de água, durante o tempo em que foram expostos (72 horas), exceção para o filme do copolímero puro que dissolveu completamente antes de 24 horas de exposição.

Para os filmes não reticulados (Figura 27 A), a adsorção de vapores de água aumenta com o conteúdo de P(AAm-co-AA) na mistura. Por exemplo, a adsorção de vapores de água para o filme de composição 50/50 é de 22 % após 8 horas, enquanto que para o filme de P(AAm-co-AA) a porcentagem de adsorção passa para 40% no mesmo período. Este resultado reflete em parte a natureza hidrofílica do copolímero.

Observou-se ainda que os filmes de gelatina adsorvam menor quantidade de água do que as blendas e o P(AAm-co-AA) nos três sistemas estudados, possivelmente devido ao grau de organização da rede proteica. A gelatina pode formar estruturas mais organizadas que o copolímero, sendo possível recuperar parte da estrutura tripla hélice do colágeno durante o processo de formação do filme. O maior grau de organização otimiza o empacotamento molecular resultando em filmes com melhores propriedades mecânicas e de barreiras a gases [114].



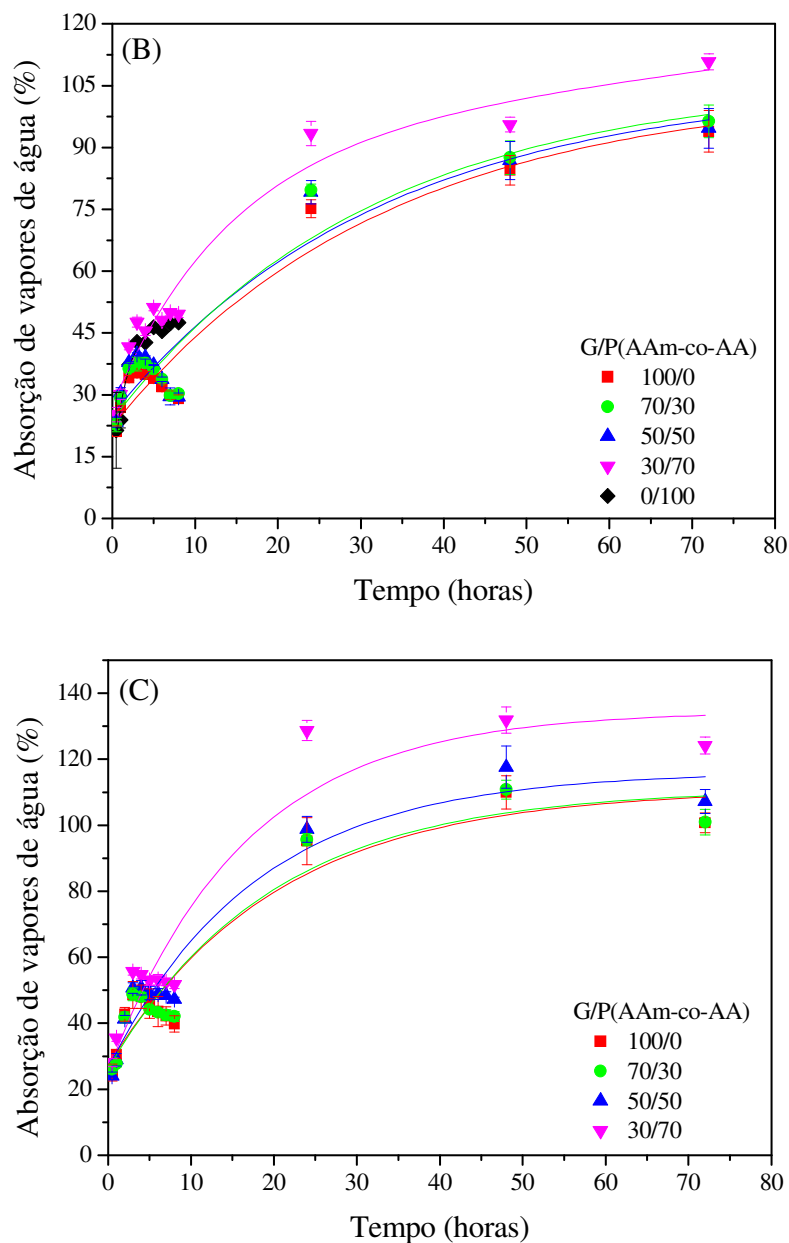


Figura 27. Curvas de adsorção de vapores de água a 25 °C e umidade relativa de 98% para: G/P(AAm-co-AA) (A), G/P(AAm-co-AA)_sorbitol (B) e G/P(AAm-co-AA)_EDC (C).

Na presença de sorbitol (Figura 27 B), ocorreu um aumento na porcentagem de água adsorvida, pelo fato do plastificante possuir uma grande afinidade por água devido à presença de grupos hidroxilas que facilitam a formação de ligações de hidrogênio. A inserção de sorbitol entre as cadeias poliméricas também aumenta o volume livre, que pode promover uma maior adsorção de água pelos filmes. Estes resultados concordam com o comportamento

do material segundo suas propriedades mecânicas e também com a diminuição da temperatura de transição vítrea.

A adsorção de água nos filmes reticulados (Figura 27 C) apresenta comportamento similar observando-se que a amostra que mais adsorveu foi a de composição 30/70. Porém se compararmos os filmes de mesma composição na mistura, reticulados e não reticulados, a habilidade na adsorção de água é maior para os filmes reticulados. Por exemplo, a adsorção de 22% para o filme de composição 50/50 aumenta para 45% após a reticulação, com 8 horas de exposição. Em geral, a adsorção de água em sistemas reticulados decresce como observado em membranas de quitosana/proteína isolada de soja [118] e em géis à base de quitosana parcialmente acetilada e glutaraldeído [119].

Neste caso particular, a reticulação parece promover uma mudança na estrutura da gelatina e transformá-la em uma estrutura polimérica randômica. As ligações entre a gelatina e P(AAm-co-AA) podem também ter afetado a orientação interna do filme de proteína e aumentado a proporção de segmentos hidrofílicos sobre a superfície do filme [114], facilitando a adsorção de umidade e, em consequência aumentando a porcentagem de adsorção de água, em concordância com o aumento da porcentagem de alongação até a ruptura discutida anteriormente.

5.9 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO

A porcentagem de perda de massa (equação 9) dos filmes reticulados em solução ácida (pH 3,0) e básica (pH 10,0), bem como em solução de água destilada e deionizada (pH 6,0) foram avaliadas como função do tempo de degradação e da composição das amostras (Tabela 7).

Basicamente, degradação significa a quebra da estrutura polimérica e a consequente perda de propriedades. No caso de materiais poliméricos, esta perda de propriedades pode ocorrer por causa de mudanças na conformação das macromoléculas que formam o material, ou devido à quebra das macromoléculas, ou ambas. A estrutura do polímero contribui para a sua biodegradabilidade, enquanto que as propriedades físicas afetam a taxa de degradação [116].

Em pH ácido possivelmente ocorre a protonação dos grupos amino primários e em pH alcalino os grupos amino podem ser hidrolisados a ácidos carboxílicos.

Aparentemente a porcentagem de perda de massa tende a ser maior em função do tempo de imersão das amostras. O filme que apresenta maior porcentagem de degradação nos três diferentes pHs é o filme de gelatina e a blenda de composição 30/70 aparentemente a que apresenta a menor degradação. A taxa de degradação mostrou-se mais afetada pelo pH ácido. Porém neste pH algumas determinações apresentam desvios padrões relativamente altos, dificultando uma análise conclusiva.

Tabela 7. Valores de porcentagem de perda de massa para os filmes G/P(AAm-co-AA) reticulados com EDC imersos em solução ácida (pH 3,0), aquosa (pH 6,0) e básica (pH 10,0).

G/P(AAm-co-AA) (%wt)	Perda de massa	Perda de massa	Perda de massa	
	(%) (7 dias)	(%) (15 dias)	(%) (30 dias)	
pH 3,0	100/0	27,8 ± 1,9	64,9 ± 7,9	65,9 ± 15,7
	70/30	34,2 ± 5,5	41,7 ± 16,8	46,8 ± 0,5
	50/50	38,6 ± 8,1	47,7 ± 1,8	49,9 ± 20,0
	30/70	27,4 ± 3,8	34,4 ± 16,9	44,8 ± 0,9
pH 6,0	100/0	30,6 ± 2,2	28,2 ± 1,8	49,4 ± 4,2
	70/30	27,2 ± 2,5	33,3 ± 8,1	35,5 ± 4,2
	50/50	30,8 ± 2,8	26,7 ± 1,6	27,9 ± 3,7
	30/70	26,8 ± 0,1	28,3 ± 0,1	36,4 ± 0,9
pH 10,0	100/0	31,9 ± 2,9	34,3 ± 0,7	39,9 ± 5,1
	70/30	33,0 ± 2,2	33,2 ± 1,6	39,2 ± 7,0
	50/50	30,5 ± 7,5	37,5 ± 7,9	35,6 ± 0,2
	30/70	28,7 ± 0,1	30,6 ± 7,9	31,2 ± 0,8

Por outro lado, parece evidente que independente do pH, a gelatina pura apresenta a maior degradação, não se observando, no entanto, uma relação direta da porcentagem de perda de massa com o conteúdo de proteína nas blends. Esta característica sugere que a gelatina induz a degradação de parte do polímero sintético. Esta degradação é favorecida pela interação gelatina/copolímero que desestabiliza a estrutura desta por redução das forças intermoleculares, mudanças conformacionais e estruturais do novo material formado.

6 CONCLUSÕES

Os filmes formados pela mistura de gelatina com poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (P(AAm-co-AA)) foram transparentes e maleáveis em todas as faixas de composições sugerindo que nenhuma separação de fases ocorreu. Através das técnicas de DSC e TMA, pode-se confirmar a miscibilidade das blendas pela presença de uma única temperatura de transição vítrea. As interações existentes entre os componentes da mistura foram confirmadas por espectroscopia de infravermelho e por microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os parâmetros termogravimétricos a estabilidade térmica do sistema diminui inversamente proporcional ao conteúdo de gelatina nas blendas.

A presença de sorbitol como plastificante causou uma leve diminuição na estabilidade térmica do sistema. Ocorreu também uma diminuição na temperatura de transição vítrea, e o efeito plastificante (variação na temperatura de transição vítrea) foi mais pronunciado para o filme de gelatina. De acordo com as propriedades mecânicas os filmes com plastificante apresentaram maior alongação e uma diminuição na tensão de ruptura e módulo de Young. Estes filmes também apresentaram maiores porcentagens de absorção de vapores de água, na umidade relativa de 98% comparados aos filmes sem plastificantes. Os filmes reticulados com EDC apresentaram um grau máximo de reticulação de 70%. O processo de reticulação provocou diminuição na temperatura de transição vítrea e acordo com as propriedades mecânicas ocorreu uma diminuição na tensão de ruptura e no módulo de Young, acompanhado de um significativo aumento na porcentagem de alongação dos filmes. A absorção de vapores de água na umidade relativa de 98%, foi maior comparada aos filmes de mesma composição não reticulados. Por outro lado, houve uma diminuição na solubilidade dos filmes reticulados em água, e a porcentagem de perda de massa a diferentes pHs mostrou-se maior para filmes imersos em solução ácida.

Propriedades como a baixa solubilidade em água e a alta porcentagem de alongação dos filmes reticulados com EDC, sugerem que estes podem ser utilizados na preparação de embalagens e coberturas para diferentes materiais.

7 BIBLIOGRAFIA

- [1] Canevarolo Jr. S V. **Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2002.
- [2] Franchetti S M M, Marconato J C. Polímeros Biodegradáveis – Uma solução para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova** 2006; 29(4): 811-816.
- [3] Chandra R, Rustgi R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science** 1998; 23: 1273-1335.
- [4] U.S. Congress, Office of Technology Assessment, **Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper**, OTA-BP-E-102 (Washington, DC: Government Printing Office, 1993).
- [5] Yu L, Dean K, Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science** 2006; 31: 576-602.
- [6] Gennadios A. (Ed.).**Protein-Based Films and Coatings**. Florida: CRC Press, 2002.
- [7] Hasırcı V, Lewandrowski K, Gresser J D, Wise D L, Trantolo D J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology** 2001; 86: 135-150.
- [8] Dang J M, Leong K W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2006; 58: 487-499.
- [9] Davis G, Song J H. Biodegradable packing based on raw materials from crops and their impact on waste management. **Industrial Crops and Products** 2006; 23: 147-161.
- [10] Martucci J F, Ruseckaite R A, Vásquez A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. **Materials Science and Engineering A**. 2006; 435-436: 681-686.
- [11] Bergo P, Sobral P J A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids** 2006; *In press*.
- [12] Yu L, Dean K, Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science** 2006; 31: 576-602.
- [13] Tharanathan R N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology** 2003; 14: 71-78.
- [14] Giesse R. O futuro dos plásticos: Biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2003; 13 (4): E4-5.
- [15] Vaessen D M, McCormick A V, Francis L F. Effects of Phase separation on stress development in polymeric coatings. **Polymer** 2002; 43: 2267-2277.

- [16] Cho S Y, Park J W, Batt H P, Thomas R L. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. **LWT** 2007; 40: 418-423.
- [17] Tanada-Palmu P S, Grosso C R F. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. **Postharvest Biology and Technology** 2005; 36: 199-208.
- [18] Longares A, Monahan F J, O’Riordan E D, O’Sullivan M. Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. **International Dairy Journal** 2005; 15: 1255-1260.
- [19] Yao C H, Liu B S, Chang C J, Hsu S H, Chen Y S. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. **Materials Chemistry and Physics** 2004; 83: 204-208.
- [20] Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. **Principles of Biochemistry**. USA: Worth, 1993.
- [21] Tang C, Jiang Y. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. **Food Research International** 2006; *In press*.
- [22] Dong Z, Wang O, Du Y. Alginate/Gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science** 2006; 280: 37-44.
- [23] Arvanitoyannis I S, Nakayama A, Aiba S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers** 1998; 37: 371-382.
- [24] Chiellini E, Cinelli P, Fernabdes E G, Kenawy E R S, Lazzeri A. Gelatin-Based Blends and Composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. **Biomacromolecules** 2001; 2: 806-811.
- [25] Yakimets I, Wellner N, Smith A C, Wilson R H, Farhad I, Mitchell J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer** 2005; 46: 12577-12585.
- [26] Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release** 2005; 109: 256-274.
- [27] van den Bosch E, Gielens C. Gelatin degradation at elevated temperature. **International Journal of Biological Macromolecules** 2003; 32: 129-138.
- [28] Zhao W B. **Polymer Data Handbook**. Oxford University Press, USA, 1999:121-129.
- [29] Arvanitoyannis I, Psomiadou E, Nakayama A, Aiba S, Yamamoto N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part 3. **Food Chemistry** 1997; 60 (4): 593-604.
- [30] Abrusci A, Martín-González A, Del Amo A, Catalina F, Bosch P, Corrales T. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. **Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry** 2004; 163: 537-546.

- [31] Bergo P, Sobral P J A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**; *In press*.
- [32] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally S V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials** 2005; 26: 7616-7627.
- [33] Chielline E, Cinelli P, Fernandes E G, Kenawy E S, Lazzeri A. Gelatin-Based Blends and composites. Morphological and thermal mechanical characterization. **Biomacromolecules** 2001; 2: 806-811.
- [34] Farhat I A, Mousia Z, Mitchell J R. Water redistribution during the recrystallisation of amylopectin in amylopectin/gelatin blends. **Polymer** 2001; 42: 4763-4766.
- [35] Dong Z, Wang Q, Du Y. Alginate/gelatin blend and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science** 2006; 280: 37-44.
- [36] Bertan L C, Tanata-Palmu P S, Siani A C, Grosso C R F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids** 2005; 19: 73-82.
- [37] Akelah A, Moet A. **Functionalized Polymers and Their Applications**; India: Chapman and Hall, 1990.
- [38] Molyneux P. **Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior**. England: CRC Press, Inc., 1982.
- [39] Burugapalli K, Bhatia D, Koul V, Choudhary V. Interpenetrating polymer networks based on poly(acrylic acid) and gelatin. I: Swelling and thermal behaviour. **Journal of Applied Polymer Science** 2001; 82 (1): 217-227.
- [40] Changez M, Koul V, Dinda A K. Efficacy of antibiotics-loaded interpenetrating network (IPNs) hydrogel based on poly (acrylic acid) and gelatin for treatment of experimental osteomyelitis; in vivo study. **Biomaterials** 2005; 26: 2095-2104.
- [41] Changez M, Koul V, Krishma B, Dinda A K, Choudhary V. Studies on biodegradation and release of gentamicin sulphate from interpenetrating network hydrogels based on poly(acrylic acid) and gelatin: in vitro and in vivo. **Biomaterials** 2004; 25: 139-146.
- [42] Ghavamzadeh R, Haddadi-Ast V, Mirzadeh H. Bioadhesion and biocompatibility evaluations of gelatin and poly(acrylic acid) as a crosslinked hydrogel in vitro. **Journal of Biomaterials Science-Polymer edition** 2004; 15 (8): 1019-1031.
- [43] Dubinsky S, Grader G S, Shter G E, Silverstein M S. Thermal degradation of poly(acrylic acid) containing copper nitrate. **Polymer Degradation and Stability** 2004; 86: 171-178.
- [44] Shin H S, Kim S Y, Lee K H, Kim S J, Lee Y M. synthesis and properties of poly (acrylamide)-gelatin interpenetrating polymer networks. **Polymer-Korea** 1998; 22 (5): 683-690.

- [45] Xiao C B, Lu Y S, Jing Z Z, Zhang L. Study on physical properties of blend films from gelatin and polyacrylamide solutions. **Journal of Applied Polymer Science** 2002; 83 (5): 949-955.
- [46] Kim D, Park K. Swelling and mechanical properties of superporous hydrogels of poly(acrylamide-co-acrylic acid)/polyethylenimine interpenetrating polymer networks. **Polymer** 2004; 45: 189-196.
- [47] Zhang Y, Wu F P, Li M Z, Wang E. pH switching on-off semi-IPN hydrogel based on cross-linked poly(acrylamide-co-acrylic acid) and linear polyallylamine. **Polymer** 2005; 46: 7695-7700.
- [48] Samchenko Y M, Ul'berg Z R, Komarskii S A, Kovzun I G, Protsenko I T. Rheological properties of poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. **Colloid Journal** 2003; 65 (1): 78-83.
- [49] Isk B, Kis M. Preparation and determination of swelling behavior of poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels in water. **Journal of Applied Polymer Science** 2004; 94 (4): 1526-1531.
- [50] Kara F, Demirel G, Tümtürk H. Immobilization of urease by using chitosan–alginate and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/ χ -carrageenan supports. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2006; 29: 207-211.
- [51] Yanş A, Şahin F, Demirel G, Tümtürk H. Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules** 2005; 36: 253-258.
- [52] Nagashima S, Koide M, Ando S, Makino K, Tsukamoto T, Ohshima H. Surface properties of monodisperse / poly acrylamide-co-acrylic acid hydrogel microspheres prepared by a membrane emulsification technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 1999; 153: 221-227.
- [53] Nagashima S, Ando S, Makino K, Tsukamoto T, Ohshima H. Size Dependence of polymer composition in the surface layer of poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogel microspheres. **Journal of Colloid and Interface Science** 1998; 197: 377-382.
- [54] Nia Y, Ge X, Zhang Z. Preparation and characterization of ZnS/poly (acrylamide-co-acrylic acid) dendritical nanocomposites by γ -irradiation. **Materials Science and Engineering B** 2005; 119: 51-54.
- [55] Şolpan D, Duran S, Saraydin D, Güven O. Adsorption of methyl violet in aqueous solutions by poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. **Radiation Physics and Chemistry** 2003; 66: 117-127.
- [56] Duran S, Şolpan D, Güven O. Synthesis and characterization of acrylamide-acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 1999; 151: 196-199.

- [57] Han C D. (Ed.). **Polymer Blends and Composites in Multiphase Systems**. Washington: American Chemical Society, 1984.
- [58] Lucas, E. F., Soares, B.G. e Monteiro E. **Caracterização de Polímeros-Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**, 1 ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2001.
- [59] Caykara T, Demirci S, Eroğlu M S, Güven O. Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate. **Polymer** 2005; 46: 10750-10757.
- [60] Paul D R, Newman S. **Polymer Blends**. V.1, Califórnia: Academic Press, Inc, 1978.
- [61] Giusti P, Ciardelli F, Pracella M, Mercogliano N, Barbani N. **New Bioartificial Polymeric Materials**. In: Proceedings of 1st Pacific Polymer Conference, 12-15 December 1989, Pacific Polymer Federation, Maui, Hawaii, 137.
- [62] Cascone M G. Dynamic-mechanical properties of bioartificial polymeric materials. **Polymer International** 1997; 43 (1): 55-69.
- [63] Barbani N, Bertoni F, Ciardelli G, Cristallini C, Silvestri D, Coluccio M L, Giusti P. Bioartificial materials based on blends of dextran and poly(vinyl alcohol-co-acrylic acid). **European Polymer Journal** 2005; 41: 3004–3010.
- [64] Cascone M G, Sim B, Downes S. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. **Biomaterials** 1995; 16: 569-574.
- [65] Sionkowska A, Wisniewski M, Kaczmarek H, Skopinska J, Chevallier P, Mantovani D, Lazare S, Tokarev V. The influence of UV irradiation on surface composition of collagen/PVP blended films. **Applied Surface Science** 2006; *In press*.
- [66] Yoshikawa M, Higuchi A, Ishikawa M, Guiver M D, Robertson G P. Vapor permeation of aqueous 2-propanol solutions through gelatin/Torlon[®] poly(amide imide) blended membranes. **Journal of Membrane Science** 2004; 243: 89–95.
- [67] Wang Y M, Wu Q, Chen G Q. Gelatin blending improves the performance of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films for biomedical application. **Biomacromolecules** 2005; 6 (2): 566-571.
- [68] Li M, Mondrinos M J, Chen X, Gandhi M R, Ko F K, Lelkes P I. Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 2006; 79A (4): 963-973.
- [69] Sothornvit R, Krochta J M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering** 2001; 50: 149-155.
- [70] Debeaufort F, Voilley A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: 2. Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1997; 45: 685-689.

- [71] Meier M M, Kanis L A, Soldi V. Characterization and drug-permeation profiles of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore forming agent. **International Journal of Pharmaceutics** 2004; 278: 99-110.
- [72] Sobral P J A, Menegalli F C, Hubinger M D, Roques M A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids** 2001; 15: 423-432.
- [73] Lima A M F, Andreani L, Borsali R, Soldi V. Influencia do agente plastificante e do processo de reticulação sobre a morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas dos filmes de alginato de sodio. **Química Nova, In Press**.
- [74] Barreto P L M, Roeder J, Crespo J S, Maciel G R, Terenzi H, Pires A T N, Soldi V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. **Food Chemistry** 2003; 82: 425-431.
- [75] Vanin F M, Sobral P J A, Menegalli F C, Carvalho R A, Habitante A M Q B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal properties and functional properties gelatin-based films. **Food Hydrocolloids** 2005; 19: 899-907.
- [76] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skim gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. **European Food Research and Technology** 2006; 222: 229-235.
- [77] Thomazine M, Carvalho R A, Sobral P J A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science** 2005; 70: 172-176.
- [78] Arvanitoyannis I, Psomiadou E, Nakayama A, Aiba S, Yamamoto N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part 3. **Food Chemistry** 1997; 60 (4): 593-604.
- [79] Kolodziejska I, Piotrowska B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry** 2006; *In press*.
- [80] Dalev P G, Patil R D, Vassileve E, Fakirov S. Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. **Journal of Applied Polymer Science** 2000; 78 (7): 1341-1347.
- [81] Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials** 2002; 23: 4827-4832.
- [82] Tropini V, Lens J P, Mulder W L, Silvestre F. Wheat gluten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. **Industrial Crops and Products** 2004; 20: 281-289.
- [83] Choi Y S, Hong S R, Lee Y M, Song K W, Park M H, Nam Y S. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. **Biomaterials** 1999; 20: 409-417.

- [84] Choi Y S, Hong S R, Lee Y M, Song K W, Park M H, Nam Y S. Study on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. **Journal of Biomedical Materials Research** 1999; 48: 631-639.
- [85] Kuijpers A J, Wachem P B van, Luyn M J A van, Engbers G H M, Krijgsveld J, Zaat S A J, Dankert J, Feijen J. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. **Journal of Controlled Release** 2000; 67: 323-336.
- [86] Carvalho R A, Grosso C R F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids** 2004; 18: 717-726.
- [87] Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials** 2001; 22: 763-768.
- [88] Tomihata K, Burczak K, Shiraki K, Ikada Y. Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. **Polymers of Biological and Biomedical Significance** 1993; 24: 275-286.
- [89] Liang H C, Chang W H, Liang H F, Lee M H, Sung H W. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water soluble carbodiimide. **Journal of Applied Polymer Science** 2004; 91: 4017-4026.
- [90] Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry** 1995; 6: 123-130.
- [91] Kołodziejska I, Piotrowska B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry** 2006; *In press*.
- [92] Bubnis W A, Ofner III C M. The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. **Analytical Biochemistry** 1992; 207: 129-133.
- [93] ASTM D882-95a (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting).
- [94] Lopes C M A, Felisberti M I. Mechanical behavior and biocompatibility of poly (1-vinyl-2-pyrrolidone) – gelatin IPN hydrogels. **Biomaterials** 2003; 24: 1279-1284.
- [95] Weadock K, Olson R M, Silver F H. Evaluation of collagen crosslinking techniques. **Biomaterials Medical Devices and Artificial Organs**, 1984; 11 (4): 293-318.
- [96] Kulkarni A R, Soppimath K S, Aralaguppi M I, Aminabhabi T M, Rudzinski W E. Preparation of cross-linked sodium alginate microparticles using glutaraldehyde in methanol. **Drug Development and Industrial Pharmacy** 2000; 26(10): 1121-1124

- [97] Mwangi J W, Ofner III C M. Crosslinked gelatin matrices release of a random coil macromolecular solute. **International Journal Pharmaceutics**, 2004; 278: 319-327.
- [98] Barreto P L M, Pires A N T, Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability** 2003; 79: 147-152.
- [99] Maurer JJ, Harvey GD. Thermal degradation characteristics of poly(acrylamide-co-acrylic acid) and poly(acrylamide-co-sodium acrylate) copolymers. **Thermochemica Acta** 1987; 121: 295-306.
- [100] Lau C, Mi Y. A study of blending and complexation of poly(acrylic acid)/poly(vinyl pyrrolidone). **Polymer** 2002; 43: 823-829.
- [101] Bhaskar G, Ford JL, Hollingsbee DA. Thermal analysis of the water uptake by hydrocolloids. **Thermochemica Acta** 1998; 322: 153-165.
- [102] Collares F P, Kieckbusch T G e Finzer J R. A transição vítrea em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology** 2002; 5: 117-130.
- [103] Boonyai P, Howes T, Bhandari B. Instrumentation and testing of a thermal mechanical compression test for glass rubber transition analysis of food powders. **Journal of Food Engineering** 2007; 78: 1333-1342.
- [104] Meier M M, Kanis L A, de Lima J C, Pires A T N, Soldi V. Poly(ε-caprolactone triol) as plasticizer agent for cellulose acetate films: influence of the preparation procedure and plasticizer content on the physico-chemical properties. **Polymers for Advanced Technologies** 2004; 15(10): 593-600.
- [105] Schaumann G E, LeBoeuf E J, DeLapp R, Hurraß J. Thermomechanical analysis of air-dried whole soil samples. **Thermochemica Acta** 2005; 436: 83-89
- [106] Pranoto Y, Lee C M, Park H J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ-carrageenan. **LWT - Food Science and Technology** 2006, in press.
- [107] Gilbert V, Rouabhia M, Wang H X, Arnould A L, Remondetto G, Subirade M. Characterization and evaluation of whey protein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures. **Biomaterials** 2005; 26 (35): 7471-7480.
- [108] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry** 2004; 86: 325-332
- [109] Wang X H, Li D P, Wang W J, Cui F Z, Xu YX, Song X H, van der Werf M. Collagen/Chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials** 2003; 24: 3213-3220.
- [110] Debeaufort F, Voilley A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: 2. Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1997; 45: 685-689.

- [111] Li B, Kennedy JF, Jiang QG, Xie BJ. Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannan – Gelatin. **Food Research International** 2006; 39: 544–549.
- [112] Nam SY, Lee YM. Pervaporation and properties of chitosan-poly(acrylic acid) complex membranes. **Journal of Membrane Science** 1997; 135: 161-171.
- [113] Vanin F M, Sobral P J A, Menegalli F C, Carvalho R A, Habitante A M Q B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal properties and functional properties gelatin-based films. **Food Hydrocolloids** 2005; 19: 899-907.
- [114] Chambi H, Grosso C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International** 2006; 39 (4): 458-466.
- [115] Sothornvit R, Krochta J M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering** 2001; 50: 149-155.
- [116] Bigi A, Panzavolta S, Rubini K, Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials** 2004; 25: 5675-5680.
- [117] Olde D L H, Dijkstra P J, van Luyn M J, van Wachem P B, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials** 1996; 17: 765-773.
- [118] Silva S S, Santos M I, Courtinho O P, Mano J F, Reis R L J. Physical properties and biocompatibility of chitosan/soy blended membranes. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine** 2005; 16 (6): 575-579.
- [119] Crescenzi V, Francescangeli A, Taglienti A, Capitani D, Mannina L. Synthesis and partial characterization of hydrogels obtained via glutaraldehyde crosslinking of acetylated chitosan and of hyaluronan derivatives. **Biomacromolecules**, 2003; 4(4): 1045-1054.