



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTABILIDADE TÉRMICA DA
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

MARCOS MARIANO

Florianópolis, dezembro/2010

Marcos Mariano

Estabilidade Térmica da Proteína Isolada de Soja

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Valdir Soldi

Florianópolis

02/2010

Marcos Mariano

**ESTABILIDADE TÉRMICA DA
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Valdir Soldi
Orientador

Prof. GIOVANNI FINOTO CARAMORI

Profa. CRISTIANE LUISA JOST

Florianópolis, dezembro/2010

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelas oportunidades e conselhos sem os quais eu não teria condições de iniciar este trabalho.

Gostaria também de agradecer ao professor Valdir Soldi pela orientação e atenção, assim como Rodrigo Cercená pelo apoio.

Além de todos do POLIMAT que criam um ótimo ambiente e estão sempre dispostos a ajudar.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Polímeros.....	3
2.2 Proteínas	4
2.2.1 Proteína Isolada de Soja (PIS)	5
2.2.2 Filmes a partir da PIS.....	8
2.2.3 Estabilidade térmica da PIS	8
3 OBJETIVOS	11
4 METODOLOGIA.....	12
4.1 Instrumentação	12
4.2 Amostras e Reagentes	12
4.3 Procedimentos Experimentais	12
4.3.1 Formação de filmes.....	12
4.3.2 Exposição das amostras ao calor.....	13
4.3.3 Recolhimento dos voláteis	13
4.4 Análise das amostras.....	13
4.4.1 Sólidos	13
4.4.2 Voláteis	14
4.4.3 Cálculos Cinéticos.....	14
4.4.3.1 Método de ozawa	14
4.4.3.2 Método de Coats-Redfern.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1 Filmes	16
5.2 Exposição das amostras ao calor	16
5.3 Análise das amostras.....	18
5.3.1 Infravermelho dos Sólidos.....	18
5.3.2 Infravermelho dos Voláteis.....	20
5.3.3 Análise de CNHS	21
5.3.4 Termogravimetria	22
6 CONCLUSÕES	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Classificações estruturais das proteínas	5
Figura 2: Estrutura do aglomerado 11S.....	7
Figura 3: Estruturas dos aminoácidos mais comuns na proteína isolada de soja	7
Figura 4: Espectro de infravermelho do filme de PIS exposto ao calor por 3 horas.	18
Figura 5: Espectro de infravermelho da PIS em pó exposto ao calor por 3 horas.....	19
Figura 6: Espectros de infravermelho dos voláteis recolhidos da PIS.....	20
Figura 7: Espectro da PIS aquecida até 400°C.....	21
Figura 8: Espectro da proteína não aquecida	21
Figura 9: Curvas de TGA das amostras de PIS.	23
Figura 10: Variação da Ea em função da perda de massa para a PIS.....	24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Energia e distância de ligações comuns em polímeros	9
Tabela 2: Variação de massa das amostras de PIS em pó.	17
Tabela 3: Variação de massa das amostras de PIS na forma de filmes (1%).	17
Tabela 4: Análise de CHN de algumas amostras estudadas.....	22
Tabela 5: Energias de ativação calculadas pelo método de Coats-Redfern	23

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

TGA – Análise Termogravimétrica.

IV – Infravermelho.

CHNS – Análise elementar da composição da amostra para Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio e Enxofre.

PIS – Proteína Isolada de Soja.

PCS – Proteína Concentrada de Soja.

PDI – Índice de polidispersidade.

RESUMO

Atualmente se buscam materiais que possam substituir com qualidade os produtos plásticos, que não são ecologicamente corretos e oferecem grande dificuldade em sua degradação e reciclagem, além de serem provenientes de fontes não renováveis. Dentro deste contexto os biopolímeros, como a proteína isolada de soja, vem sendo estudados para se desenvolver técnicas cada vez melhores e mais apropriadas para se obter suas melhores características e torná-las aplicáveis as necessidades específicas das mais diversas áreas.

Assim, um estudo da sua degradação diante de processos térmicos é essencial para se conhecer todas as suas propriedades perante uma condição comum em sua manipulação industrial: o aquecimento.

Este trabalho tentou elucidar o comportamento da proteína isolada de soja e como varia sua estabilidade diante de ciclos de aquecimento utilizando de técnicas como a análise termogravimétrica (TGA) não isotérmica, o infravermelho e a análise elementar (CNH-S).

As amostras foram aquecidas em forno tubular por períodos de tempo variando entre uma e três horas e temperaturas entre 100 e 400°C. Em seguida, foram feitas análises de infravermelho e TGA dos sólidos, energias de ativação foram obtidas por métodos diferentes, os voláteis foram recolhidos e tiveram seus espectros de infravermelho avaliados, a análise de CNHS foi utilizada para se ter uma visão geral da diferença de composição em varias etapas da degradação mostrando o aumento da quantidade de carbono em amostras mais aquecidas.

As análises indicam que as amostras que sofreram maior modificação foram as expostas a degradação térmica em temperaturas superiores a 150° por períodos maiores que duas horas. Os parâmetros cinéticos como a energia de ativação foram relacionados a perda de massa e mostraram que a degradação da proteína tem seu mecanismo modificado durante o processo e com a mudança de temperatura de pré-aquecimento.

Palavras-chave: Degradação térmica, proteína, soja, biopolímeros

1 INTRODUÇÃO

Após passadas décadas da revolução trazida pelos plásticos sintéticos (principalmente os derivados do petróleo), tem sido comum os questionamentos sobre sua utilização e vantagens, considerando o fato de serem obtidos de fontes não renováveis e a sua dificuldade de biodegradação. Cada vez mais se buscam materiais e técnicas que possam gerar materiais capazes de executar as mesmas funções sendo mais ecologicamente corretos do que os atuais.

Os polímeros encontrados na natureza parecem ser uma boa opção para suprir as necessidades encontradas na indústria, uma vez que tais polímeros naturais mostram uma série de vantagens nessa área. Sua fácil obtenção e baixo custo os tornam materiais ecologicamente corretos e financeiramente competitivos. As proteínas tem sido uma boa alternativa para tais fins, sendo assim amplamente estudadas e utilizadas na indústria alimentícia, de construção civil e farmacêutica, entre outras.

A proteína isolada de soja (PIS) ganha destaque por ser proveniente de uma fonte abundante e ter boas propriedades mecânicas, em comparação com outras proteínas de origem natural, além de barata. Isto faz com que ela seja aplicada como material de partida para fabricação de diversos produtos como adesivos e plásticos, substituindo assim os derivados sintéticos. A proteína de soja pode ser encontrada na forma de proteína concentrada e isolada, que é a mais usada devido a sua maior polidispersidade.

Para sua aplicação industrial, a proteína isolada de soja não apresenta as características necessárias diante de algumas situações de processamento realizadas visando atingir o produto esperado. Tal limitação pode ser superada pelo uso de aditivos, como polímeros orgânicos e até mesmo solventes adequados, além de controlar apropriadamente outros parâmetros do meio, como pressão, força iônica e temperatura. Esta última em especial pode inferir modificações estruturais à proteína durante seu processamento a diferentes temperaturas e a diferentes tempos de submissão do material. Entretanto, esta relação temperatura-tempo deve ser otimizada buscando evitar mudanças nos

aspectos físicos da proteína como coloração e solubilidade, esta última sendo de vital importância principalmente na indústria de alimentos.

Com tantos parâmetros podendo ser adequados a situação conveniente, todas as variáveis envolvidas no processamento da proteína isolada de soja são importantes para se alcançar o resultado final desejado e para isto é necessário conhecer as suas propriedades, em especial sua estabilidade e como esta varia de acordo com as condições as quais poderá ser exposta. Devido a este fato, um estudo de estabilidade térmica se mostra importante e útil considerando: i) a sua utilização e qualidade necessária para diferentes processos e aplicações, ii) a relação com o meio ambiente já que sob aquecimento a proteína tende à degradação, e ainda, iii) a sua importância sob o aspecto econômico. Neste contexto o completo entendimento dos mecanismos e parâmetros associados com a degradação térmica da proteína isolada de soja, parecem importantes e fundamentais para aplicações nas quais a temperatura seja uma das variáveis do processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polímeros

Polímeros são macromoléculas compostas por unidades químicas menores, chamadas de meros, ligados por ligações covalentes. Estas moléculas podem ter cadeias compostas de apenas uma variação do mero sendo chamada de homopolímero, ou dois ou mais co-mônômeros recebendo o nome de copolímero. As cadeias ainda podem ser lineares ou ramificados trazendo uma grande gama de estruturas e combinações possíveis¹. Esta capacidade de formar cadeias extremamente longas é uma consequência importante das propriedades de valência do carbono².

Em relação a regularidade da estrutura polimérica alguns polímeros podem mostrar cristalinidade, outros não. Normalmente uma cadeia formada por unidades idênticas que se repetem perfeitamente podem se organizar em um retículo cristalino cujos aspectos morfológicos são apenas parcialmente conhecidos. Estes polímeros cristalinos são muito menos solúveis do que polímeros amorfos².

Muitas propriedades físicas são dependentes do comprimento da molécula e sua massa molecular. Como os polímeros podem ter uma grande faixa de massa molecular, podemos esperar que ocorra uma grande variação de suas propriedades em função de suas cadeias laterais. Com o aumento da molécula essas modificações em suas propriedades físicas tendem a ser diminuídas, o que é fundamental comercialmente para a produção de polímeros que atendam a certos padrões de qualidade³.

A utilidade dos polímeros depende exatamente das propriedades específicas da sua cadeia. Eles podem ser bons condutores, ter propriedades ópticas interessantes, compatibilidade bioquímica adequada, etc².

Uma das fontes de polímeros mais abundantes são as fontes naturais, que foram as primeiras a oferecer ao homem matérias-primas para produção de monômeros e polímeros. Quando um polímero é obtido de uma fonte natural é denominado de biopolímero.³

2.2 Proteínas

As proteínas, cujo nome significa “primeiro” ou “mais importante”, são as macromoléculas mais importantes das células sendo constituintes de mais da metade do peso seco de muitos organismos, além de serem os instrumentos pelos quais são expressas as informações genéticas. Elas são polímeros naturais (biopolímeros) formados pela condensação de alfa aminoácidos através de ligações pelos átomos de N e C em sua composição. Esta ligação é chamada de ligação peptídica e a seqüência de aminoácidos unidos por ela são conhecidos como polipeptídeos. Este termo “polipeptídio” muitas vezes pode ser compreendido como sinônimo de “proteína” embora em geral, polipeptídio se refira a uma molécula com peso molecular menor do que 10 mil ⁴. Estes átomos de N e C são provenientes de um grupo amina e uma carbonila presentes em cada aminoácido ², que são os monômeros formadores destes polímeros.

A estrutura das proteínas nos leva a classificá-las em estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de acordo com sua complexidade⁴.

A estrutura primária é dada pelas ligações covalentes que unem a seqüência de aminoácidos que a forma, sendo o nível estrutural mais simples da proteína⁴.

A estrutura secundária é definida pela conformação local da cadeia do polipeptídio. Estas conformações locais definem os padrões chamados de hélices e folhas ⁵.

A estrutura terciária nasce dos dobramentos tridimensionais da cadeia polipeptídica. Estas estruturas não acontecem ao acaso, elas podem acontecer de maneira particular de acordo com o ambiente, conferindo às proteínas sua especificidade. Essas estruturas são estabilizadas por forças intermoleculares, como ligações de hidrogênio e dissulfeto^{4,5}.

Quando uma proteína é formada por mais de um polipeptídio, estes podem assumir estruturas distintas, a associação destas subunidades em um determinado arranjo espacial é chamado de estrutura quaternária^{4,5}.

A figura 1 apresenta uma ilustração de como seriam esses níveis estruturais⁴.

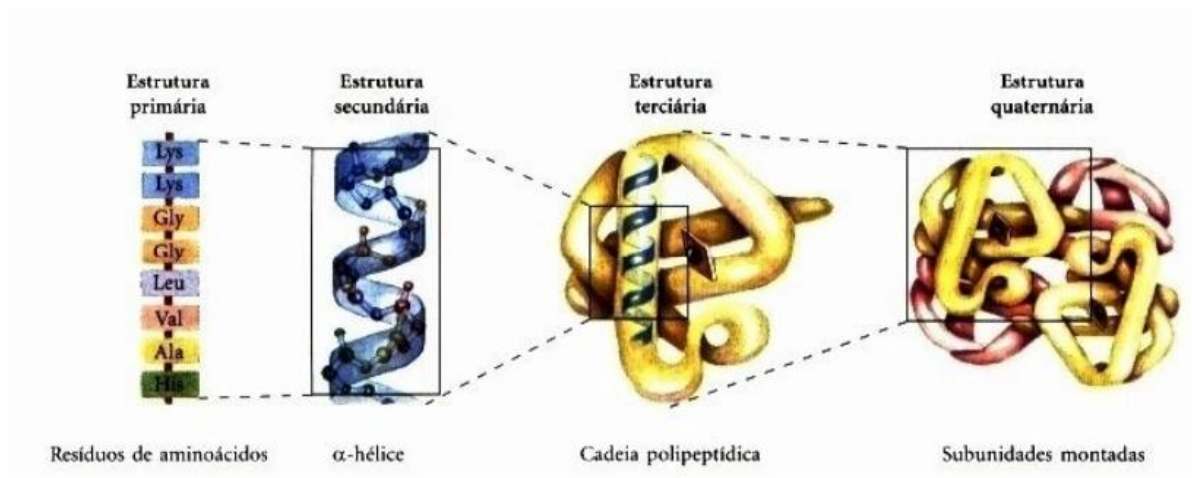


Figura 1: Classificações estruturais das proteínas

As proteínas contém centenas de ligações individuais. Sendo possível a rotação em torno de muitas destas. Isto confere a estas moléculas a possibilidade de assumir um numero ilimitado de configurações. Entretanto o fato de que cada proteína tenha uma função química ou estrutural específica sugere que cada uma tenha uma estrutura tridimensional singular⁴.

Em soluções as interações fracas, como pontes de hidrogênio, entre os aminoácidos com o solvente (no caso da água por exemplo) e diversos outros grupos funcionais da própria cadeia polipeptídica tendem a manter a estrutura da macromolécula desenovelada⁴.

Em geral a proporção de aminoácidos presentes na proteína é conhecida, mas sua ordenação só é conhecida em casos relativamente simples².

2.2.1 Proteína Isolada de Soja (PIS)

A PIS é um dos produtos do processamento do grão de soja. A composição do grão de soja é de (18–20%) de óleo, (40–45%) de proteína, (25–30%) de carboidratos e (3%) de outros componentes. As proteínas da soja podem ser extraídas por métodos de produção distintos, que resultam na proteína concentrada de soja (PCS), e na proteína isolada de soja (PIS).⁶

A PIS é o produto de soja mais aperfeiçoado disponível comercialmente, ela é muito usada na indústria alimentícia devido à sua capacidade de estabilizar emulsões e formar géis que retém umidade. A PIS é um conjunto de macromoléculas complexas, sendo as proteínas globulares suas principais componentes.⁷

As globulinas componentes do isolado de soja consistem em uma seqüência de vários aminoácidos onde, ao longo da cadeia principal, existem cadeias laterais anexadas. Qualquer mudança química, física, ou tratamento enzimático pode causar mudanças na estrutura molecular, resultando em propriedades físicas diferentes⁸. Esta questão pode ser bem representado pela solubilidade da proteína de soja, que depende do ponto isoelétrico das duas principais proteínas globulares presentes: a 7S e a 11S, que neste pH tornam a proteína insolúvel.⁹

Estas proteínas globulares 11S e 7S são os componentes da PIS presentes em maior quantidade. A variedade da faixa de composição de acordo com a literatura é grande, mas segundo estimativas elas juntas representam quase 60-70% da composição da proteína. A estrutura secundária da PIS consiste em 23,8% de α -helice, 43,6% de β -folha, 19,7% de curvas e 13,0% de estruturas desordenadas.¹⁰

Na proteína nativa a maioria dos grupos polares e apolares não estão disponíveis devido a ligações internas resultantes das forças de van der Waals intramolecular e ligações de hidrogênio. A dispersão e o desdobramento da proteína podem ser feitos por hidrólise ou aumento de pH, sendo que acima do pH 10 há um desdobramento da estrutura da proteína que expõe os grupos funcionais¹¹. De fato, o tratamento até este pH aumenta a solubilidade da proteína devido a dissociação da estrutura quaternária 11S e 7S.¹⁰ A PIS contém muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, sendo que fica fisicamente impossível alcançar uma conformação que os esconda da água quando esta é o solvente. Com estes grupos apolares expostos ela tende a formar dímeros entre as partes apolares expostas em solução¹², viabilizando, por exemplo, a formação de filmes e aumentando suas propriedades elásticas (sistema mais maleável).¹³

Uma representação da estrutura 11S é representada na figura 2¹⁶.

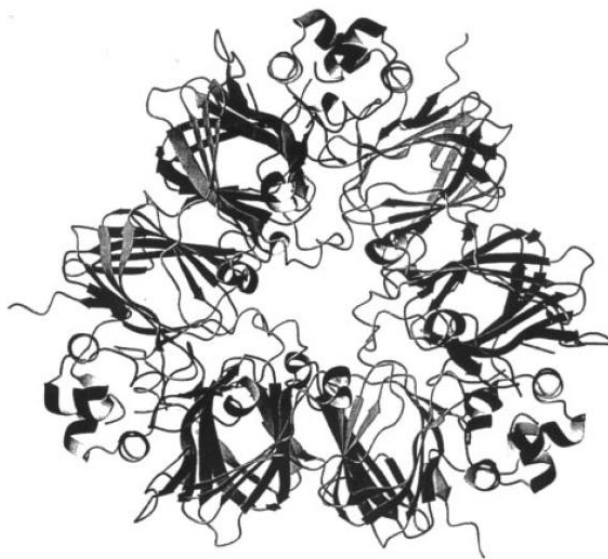


Figura 2: Estrutura do aglomerado 11S.

Em proteínas globulares os grupos mais polares são orientados para a superfície¹⁴. Interações eletrostáticas entre grupos carregados tem um papel importante na estrutura da PIS, especialmente em sistemas aquosos. Interações hidrofóbicas entre polipeptídios são forças importantes de estabilização na estrutura nativa da PIS.¹⁰

Com relação aos aminoácidos formadores das cadeias da proteína de soja a composição dos grãos de soja contém aproximadamente 18 aminoácidos, sendo basicamente composta de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina¹⁵, suas estruturas estão na figura 3.

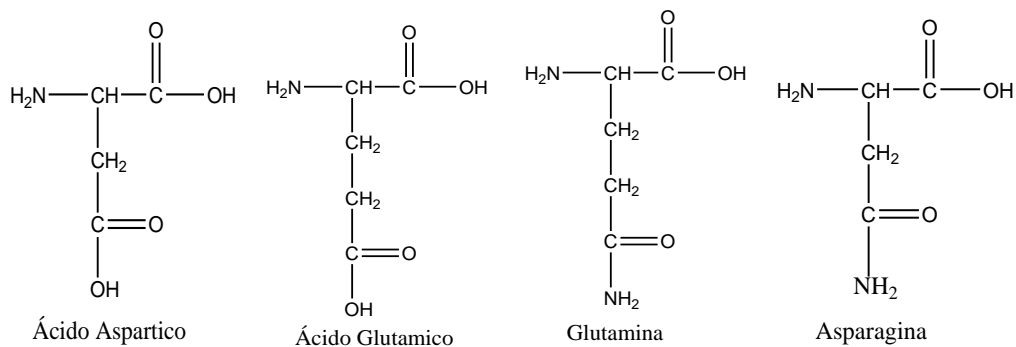


Figura 3: Estruturas dos aminoácidos mais comuns na proteína isolada de soja

2.2.2 Filmes a partir da PIS

Os filmes de proteína isolada de soja são considerados mais malháveis com relação a filmes obtidos de outras proteínas naturais. Estes filmes tem sido particularmente mais usados em comparação aos filmes da proteína concentrada de soja, uma vez que a primeira facilita a formação de filmes devido a seu alto Índice de polidispersidade(PDI).^{13,11}

O solvente geralmente utilizado para solubilizar proteínas é a água, porém, algumas propriedades específicas podem ser obtidas com a mistura da água com outros solventes.^{17,18} A formação de filmes a partir da proteína isolada de soja é favorecida em soluções a pH alcalino, evitando que este fique excessivamente quebradiço. Desta forma ficam melhoradas as características mecânicas dos filmes.¹⁷ Ainda, a formação do filme em meio básico melhora a aparência e homogeneidade sem afetar propriedades como permeabilidade a vapor de água, ao oxigênio e força de tensão.¹¹ A pH neutro a solubilidade não é total, sendo comum o aparecimento de partículas insolúveis na superfície do filme que o tornam mais quebradiço.¹³ A quantidade de massa da proteína isolada de soja utilizada na formação do filme é um fator importante que deve ser considerado quando da análise via termogravimetria e infravermelho.^{1,19}

2.2.3 Estabilidade térmica da PIS

A reação de degradação de polímeros pode ser iniciada de diversas formas independentes como: Térmica, Fotoquímica e Radiação de alta energia.¹

Os polímeros orgânicos tem temperaturas de utilização muito mais baixas do que compostos inorgânicos, sendo na faixa de 100 a 200°C. Essa sensibilidade provem do fato de que são formados por átomos ligados por ligações covalentes, cujas energias de dissociação estão entre 300 e 850kJ. ¹ A Tabela 1 contém alguns valores para comprimentos de ligações comumente presente em polímeros ³.

As propriedades térmicas da PIS são particularmente sensíveis a mudanças na força ionica¹⁹. Alguns parâmetros como força iônica, valor de pH e até afinidade química por alguns grupos podem ser modificados com a

escolha de parâmetros como o solvente, em geral esses fatores influenciam muito a estabilidade das proteínas¹⁷.

Tabela 1: Energia e distância de ligações comuns em polímeros

Ligação	Energia de ligação (Kcal/mol)	Distância de ligação (Å)
C=O	171	1,23
O-H	111	0,96
C-H	99	1,09
C-O	84	1,43
C-C	83	1,54
C-N	70	1,47
C-S	62	1,81
S-S	51	2,04

A desnaturação da proteína é dependente da temperatura, da pressão e do tempo. Esta desnaturação permite a abertura da estrutura globular e também permite o emaranhamento das cadeias protéicas, o que é fundamental para a modificação das propriedades do material.¹²

Em soluções aquosas durante indução da desnaturação por aumento da temperatura, as proteínas passam de uma forma bem organizada para uma estrutura aleatória em forma de hélices quando os aminoácidos hidrofóbicos entram em contato com a água.¹⁸

A proteína de soja é relativamente estável ao calor devido a capacidade de promover muitas ligações de enxofre entre as subunidades quando aquecida, essas ligações de enxofre geram agregados de alta massa molecular. Essa característica limita o uso de proteínas de soja em determinadas aplicações, e em geral, em função da composição torna-se difícil definir uma única temperatura de desnaturação para todo o agregado ao mesmo tempo.¹⁰

Como muitos polímeros, as proteínas de soja podem mudar de fase quando são expostos a altos gradientes de temperatura. A temperatura de transição de fase é afetada por fatores como estrutura molecular e composição.

Em geral, as propriedades de polímeros como as mecânicas e reológicas estão fortemente ligadas a temperatura de transição e condições de processamento.⁸

A proteína de soja pode ser processada de tal modo a atingir um resultado específico pelo aquecimento rápido e elevado por um curto período de tempo, ou com aquecimento lento a baixas temperaturas por longos períodos de tempo. Embora o objetivo seja atingido em ambos os casos, os aspectos físicos da proteína podem ser modificados de uma forma indesejada.¹⁰

Os materiais poliméricos de maneira geral são bons isolantes térmicos, ou seja, tem baixa condutividade térmica. Isso significa que a condução de calor da superfície para o interior da amostra é muito lento. Assim, os resultados das medidas com variação de temperatura são geralmente fortemente dependentes das dimensões da amostra e da velocidade de aquecimento a qual ela está sendo submetida.^{8,21}

3 OBJETIVOS

Observar possíveis mudanças físicas e na composição da proteína isolada de soja com sua exposição ao calor.

Estudar a estabilidade térmica da proteína isolada de soja em função da sua perda de massa e pré-aquecimento.

Obter parâmetros cinéticos sobre a degradação térmica da proteína isolada de soja e associa-los a mudanças no mecanismo de degradação.

Comparar os resultados obtidos entre os sistemas estudados.

4 METODOLOGIA

4.1 Instrumentação

Para a submeter as amostras da PIS ao calor necessário para se obter as condições desejadas para este estudo foi usado um forno tubular Lindberg/Blue M, devidamente calibrado, com temperaturas variando entre 100 e 400°C.

Para a obtenção dos espectros de IV foi utilizado um aparelho Shimadzu com suporte para se trabalhar amostras na forma de filmes e pastilhas na faixa de 400-4000 cm^{-1} .

As análises termogravimétricas foram realizadas em um termoanalisador Shimadzu 50 sobre fluxo de nitrogênio (50 cm^3/min), e os parâmetros experimentais foram obtidos usando o software associado ao aparelho.

O CNH-S foi obtido em um Analisador Elementar CHNOS modelo EA 1110 CHNS-O.

4.2 Amostras e Reagentes

A proteína isolada de soja foi adquirida junto à empresa The Solae Company, como sendo do tipo Supro® 780 E.

Para a confecção dos filmes foi utilizada uma solução de NaOH (1 mol.L^{-1}) adquirido junto a Aldrich e água deionizada.

O KBr utilizado na preparação das pastilhas para IR foi fornecido pela Shimadzu.

4.3 Procedimentos Experimentais

4.3.1 Formação de filmes.

Foram preparados filmes a partir das amostras em pó da PIS pela dissolução em água na concentração 1% (massa/volume). A solução água/PIS teve o valor de pH ajustado para 10 com o auxílio de uma solução 1 molar de NaOH e foi mantida sob agitação por 24 horas para homogeneização. Após

este período os filmes foram formados em placas de poliestireno com evaporação do solvente a temperatura ambiente.

4.3.2 Exposição das amostras ao calor

Primeiramente as amostras de PIS na forma de pó foram pesadas e expostas ao calor no forno tubular por períodos de 1, 2 e 3 horas em temperaturas constantes de 100, 150 e 200°C. Após esta etapa as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, pesadas novamente para se ter um controle preliminar de perda de massa e reservadas para posterior análise de IV e TGA. Este mesmo procedimento foi feito com os filmes da PIS.

4.3.3 Recolhimento dos voláteis

Para análise de voláteis, montou-se um sistema de recolhimento de gases em uma cela com janelas de KBr. A amostra foi exposta ao calor no forno tubular em um regime de rampa de aquecimento onde era aquecida a uma taxa de 10°C/min e recolhido nas temperaturas de 100, 200, 250, 300, 350 e 400°C. Os voláteis foram sendo recolhidos na cela com ajuda de um fluxo mínimo de nitrogênio. A saída do forno foi anexado um pequeno recipiente com agente secante no intuito de se retirar vapor de água presente no arraste. Após cada temperatura desejada ser atingida o forno se mantinha em espera por 10 minutos e iniciava um novo degrau de aquecimento. O sólido restante após o término da rampa foi guardado para análises posteriores de IV e CNHS.

4.4 Análise das amostras

4.4.1 Sólidos

As análises de IV das amostras na forma de pó foram feitas em pastilhas de KBr. Os filmes foram avaliados no infravermelho pela técnica de transmitância.

Baseado nos resultados de infravermelho e por comparação com a PIS não exposta ao calor, foram avaliadas em que condições aconteceram mudanças mais significativas na cadeia polimérica da PIS. As amostras

submetidas a essas condições de maior interesse foram avaliadas por TGA, obtendo-se informações sobre a perda de massa, energia de ativação e mecanismo de degradação.

O método do CNHS foi aplicado a amostras expostas as mesmas condições estudadas no TGA e no resíduo sólido remanescente das análises de voláteis.

4.4.2 Voláteis

Os voláteis recolhidos em cada temperatura desejada foram levados para imediata análise de infravermelho enquanto o forno mantinha a temperatura constante antes de um novo de grau da rampa de aquecimento.

4.4.3 Cálculos Cinéticos

4.4.3.1 Método de ozawa

A energia de ativação em cada etapa da degradação térmica foi obtida através da relação entre a velocidade de varredura (aquecimento) e a temperatura utilizando-se a equação de Arrhenius como base (Equações 1-3), onde A é o fator pré-exponencial, R a constante dos gases, T a temperatura e E_a a energia de ativação aparente. Conforme a Eq. 2, $k(T)$ é função de α e por sua vez, α depende da razão entre as massas de acordo com a Eq. 3, onde w_i , w e w_∞ são as massas inicial, no tempo t e no tempo infinito, respectivamente.^{21,22}

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T) \cdot f(\alpha) \quad (1)$$

$$k(T) = A \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{w_i - wt}{w_i - w_\infty} \quad (3)$$

Na forma logarítmica, o gráfico de $[-\ln(1-\alpha)]$ versus $1/T$ é linear e o coeficiente angular corresponde a E_a já que T e R são conhecidos

4.4.3.2 Método de Coats-Redfern

O método de Coats-Redfern oferece um processo alternativo para se obter a energia de ativação a partir de uma curva de TGA da amostra utilizando apenas uma velocidade de varredura.

Utilizando a equação (4), onde $g(\alpha)$ é uma função em dependência do mecanismo específico da reação e β a velocidade de aquecimento, podemos obter um gráfico de $\ln g(\alpha)/T^2$ versus $1/RT$ e a partir dele obter a energia de ativação para o processo degradativo da amostra. Na equação de Coats-Redfern o termo $g(\alpha)$ é variável de acordo com o mecanismo de degradação proposto.

Para o caso deste estudo, consideramos o mecanismo de degradação como de 1ª ordem, onde $g(\alpha)$ é dado pela equação (5).²³

$$\ln \frac{g(\alpha)}{T^2} = \ln \frac{AR}{\beta E_a} - \frac{E_a}{RT} \quad (4)$$

$$g(\alpha) = -\ln(1-\alpha)^n \quad (5)$$

Onde para um modelo de ordem de reação de primeira ordem temos $n=1$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Filmes

O filme se formou adequadamente mostrando que o pH utilizado foi adequado para a abertura da estrutura polipeptídica, facilitando a interação da proteína com o solvente e ajudando a boa formação do filme.

Apesar dos filmes da PIS terem sido preparados no pH=10, descrito pela literatura como o ponto onde a estrutura da cadeia se abre e facilita a formação dos mesmos, eles se apresentaram quebradiços e com uma cor amarelada. Como a intenção em sua preparação era facilitar o trabalho de análise diminuindo a quantidade de água presente na amostra e agilizando a obtenção de espectros, não foram adicionados plastificantes aos mesmos para não modificar as características próprias da PIS.

5.2 Exposição das amostras ao calor

Após a exposição de todas as amostras ao calor, pode-se observar uma clara mudança física, nas amostras que foram submetidas a temperaturas maiores de 100°C a proteína se tornou mais escura de acordo com o aquecimento e sua solubilidade diminuiu drasticamente. As alterações apresentadas nas amostras submetidas a 150 e 200°C possivelmente estão relacionadas a perda de água e quebras de ligações fracas.

As massas das amostras antes e após a exposição ao calor podem ser conferidas nas Tabelas 2-3. De uma forma geral é possível observar perda de massa em todos os processos e temperaturas avaliadas tendendo ao aumento da perda de massa com o tempo de exposição e temperatura, sendo que a perda é consideravelmente maior na temperatura de 200°C e tempo de 3 horas de exposição. Também é interessante destacar que as amostras na forma de filme perderam significativamente mais massa do que as amostras em pó, provavelmente pela amostra ter menor massa e assim ter uma condução de calor mais efetiva.

Tabela 2: Variação de massa das amostras de PIS em pó.

Massa _{inicial} (g)	Massa _{final} (g)	Perda de massa (%)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
0,2038	0,1930	5,30	1	100
0,2373	0,2342	1,31	2	100
0,2005	0,1953	2,59	3	100
0,2010	0,1976	1,69	1	150
0,2058	0,2019	1,90	2	150
0,2006	0,1930	3,79	3	150
0,2083	0,1888	9,36	1	200
0,2006	0,1667	16,90	2	200
0,2008	0,1741	13,30	3	200

Tabela 3: Variação de massa das amostras de PIS na forma de filmes (1%).

Massa _{inicial} (g)	Massa _{final} (g)	Perda de massa (%)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
0,0114	0,0097	14,91	1	100
0,0175	0,0155	11,43	2	100
0,0073	0,0048	34,25	3	100
0,0126	0,0104	17,46	1	150
0,0127	0,0060	52,76	2	150
0,0088	0,0071	19,32	3	150
0,0222	0,0124	44,14	1	200
0,0303	0,0157	48,18	2	200
0,0727	0,0131	81,98	3	200

5.3 Análise das amostras

5.3.1 Infravermelho dos Sólidos

Todas as amostras expostas ao calor, foram analisadas por infravermelho, sendo que as mudanças mais relevantes aconteceram nas amostras submetidas ao calor por 3 horas, especialmente a 200°C.

Todas as amostras apresentaram alterações em seus espectros, mesmo sem a temperatura de exposição atingir a temperatura de máxima degradação da PIS, em torno de 290°C.¹⁷

Os principais espectros de infravermelho obtidos para as amostras analisadas são mostrados nas figuras 4 e 5.

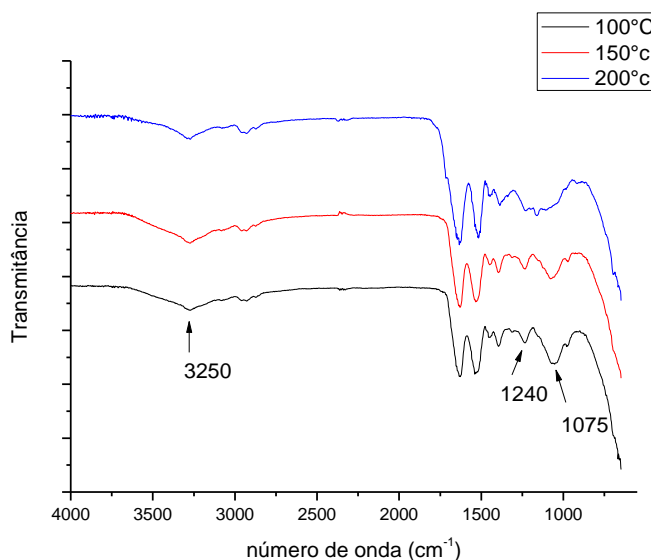


Figura 4: Espectro de infravermelho do filme de PSI exposto ao calor por 3 horas.

Como pode ser observado nas figuras, o padrão dos espectros é semelhante para as análises feitas com pó e com o filme, porém um pequeno deslocamento nas bandas entre os dois espectros acontece porque no filme as moléculas estão em uma estrutura mais rígida. Observa-se também, na figura 5, que os espectros das amostras granuladas apresentam ruídos.

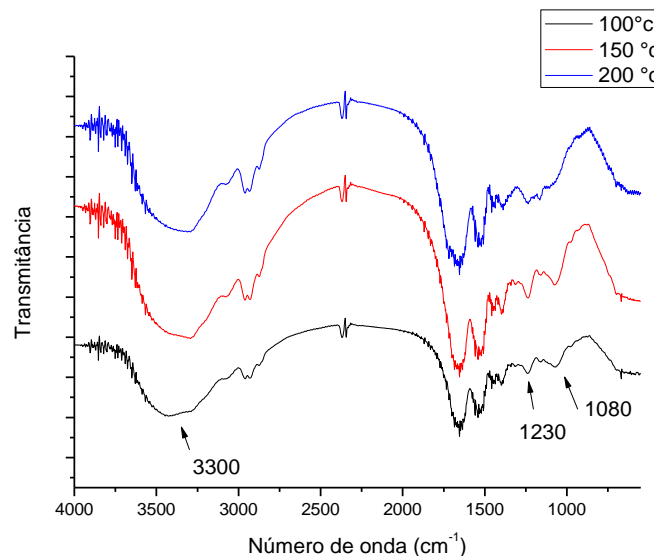


Figura 5: Espectro de infravermelho da PSI em pó exposto ao calor por 3 horas.

Os espectros mostram que em todas as amostras houve uma mudança nas regiões próximas de 1080 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} e na região de 3300 cm^{-1} . A banda em 3300 cm^{-1} é muito larga na amostra em pó, provavelmente porque nessas condições a amostra tem mais água adsorvida favorecendo interações via ligações de hidrogênio, para os filmes esta banda está mais bem definida, havendo portanto uma melhor definição dos grupos O-H e N-H. Em algumas amostras as bandas também aparecem um pouco deslocadas com o aumento da temperatura, sugerindo uma possível transição da cadeia polipeptídica de α para β .²⁴

É provável que a diminuição da intensidade da banda por volta de 1240 cm^{-1} se deva à quebra das primeiras ligações C-N na cadeia de alguns aminoácidos, indicando a degradação da proteína. As bandas na região de 1080 se devem a distorções em ligações de C-OH⁶ e são mais intensas nos filmes devido à presença de meio básico. Em todas as amostras essas modificações mostram que nas temperaturas consideradas já ocorreu degradação do material.

5.3.2 Infravermelho dos Voláteis

Foram realizadas ainda análises dos voláteis provenientes da exposição térmica da PIS. A cada intervalo de 100°C os voláteis foram recolhidos, iniciando o recolhimento a 100°C. Em cada degrau da rampa de aquecimento os voláteis foram levados para análise de infravermelho. Os espectros obtidos estão na figura 6.

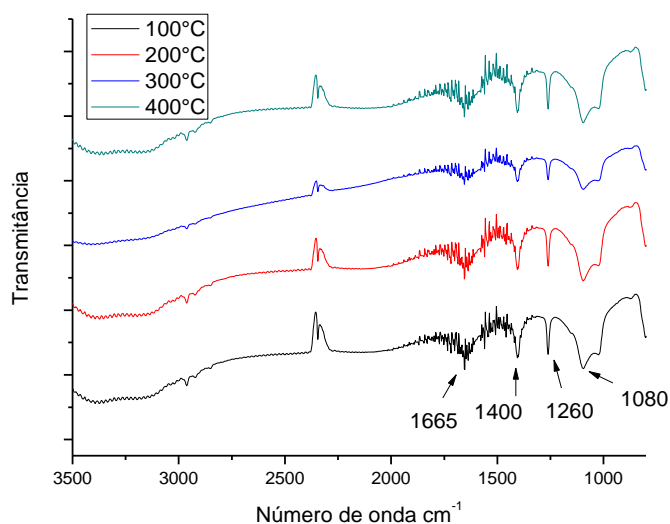


Figura 6: Espectros de infravermelho dos voláteis recolhidos da PIS.

O espectro de infravermelho apresenta poucas bandas, e também mostra que o resíduo da degradação varia pouco conforme o aumento da temperatura, sendo um sinal de que a degradação da proteína começa antes de sua principal etapa de perda de massa (vista no TGA). Na região compreendida entre 3000 e 3500 são observadas bandas típicas de água, aminas e C-H. Algumas das mesmas bandas observadas no infravermelho de sólidos podem ser observadas para os voláteis, como na região das ligações C-N em 1260, das carbonilas em 1665 e C-OH em 1080. Uma das principais modificações do espectro é a referente a banda na região de 1400, banda esta que pode ser associada a $-(CH_2)_n-$. O resíduo sólido obtido após a exposição da PIS a temperatura de 400°C foi analisado por IV (Figura 7) e CHNS (Tabela 4).

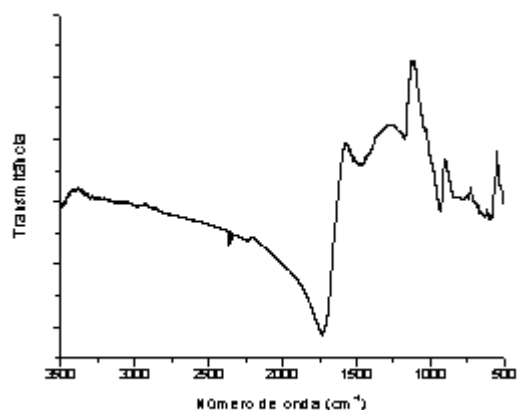


Figura 7: Espectro da PIS aquecida até 400°C

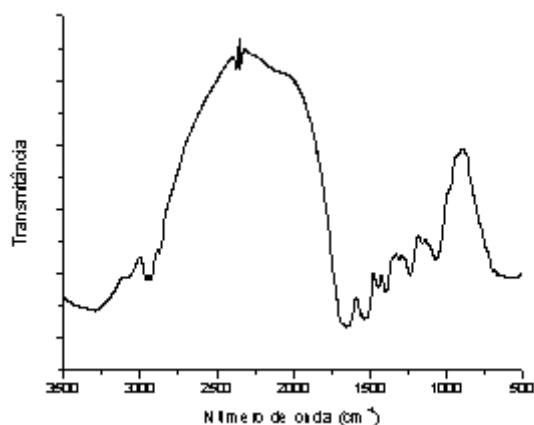


Figura 8: Espectro da proteína não aquecida

Comparando-se os espectros de IV da PIS sem aquecimento e submetida a 400°C (Figura 7-8) foram observadas diferenças importantes. Por exemplo, a maioria de seus grupos funcionais já foram degradados deixando apenas grupos relacionados a ligações C-C, bandas fracas relativas a C-N, além da banda C=O. As bandas de amins e água não estão mais presentes mostrando a degradação da estrutura protéica.

5.3.3 Análise de CNH-S

Para a análise de CHN-S foram enviadas cerca de 0,4 mg da PIS com diferentes estágios de pré-aquecimento. A tabela 4 relaciona as amostras e os resultados obtidos.

Tabela 4: Análise de CHN de algumas amostras estudadas.

Amostra	Temperatura	N(%)	C(%)	H(%)
0	Sem aquecimento	13,6	47,4	6,4
1	2 horas – 150°C	13,0	45,6	6,3
2	3 horas – 200°C	13,1	47,6	5,5
3	Resíduo voláteis - 400°	10,5	60,5	2,7

As amostras analisadas cobrem bem toda a faixa de aquecimento utilizada e mostram como a composição, principalmente em relação a quantidade de carbono, varia com o aquecimento.

Os resultados apresentados mostram que a quantidade de carbono cresce nas amostras com maior degradação. Estes dados estão de acordo com o fato de que as ligações C-N, C-H tem menor energia de dissociação (Tabela 1) e são as primeiras a serem quebradas no processo degradativo.

A pequena alteração entre as amostras 0 e 1 podem indicar que nesta temperatura não houve uma mudança significativa na estrutura da proteína, além de que pode ter ocorrido a formação de óxidos, uma vez que a atmosfera não era inerte para este sistema.

5.3.4 Termogravimetria

Algumas amostras foram analisadas por TGA para se identificar parâmetros como as temperaturas de maior perda de massa, uma comparação entre a massa residual de cada sistema, as etapas da degradação e possibilitar cálculos das energias de ativação associadas com o processo de degradação térmica.

Estas análises foram realizadas em experimentos não isotérmicos com variação de 25° a 600°, e velocidades entre 5 e 40°c/min.

Para esta etapa do estudo foi dada ênfase as amostras da PIS como filme devido ao menor teor de água presente no sistema, possibilitando uma melhor comparação entre as etapas de perda de massa das amostras.

A Figura 9 exemplifica bem o padrão de mudanças nas curvas com a variação dos parâmetros experimentais.

Pode-se observar que a primeira etapa de perda de massa, atribuída a perda de água, é muito mais discreta nas amostras previamente expostas ao calor. A perda de massa devido a degradação da proteína também é muito mais proeminente na amostra pura, enquanto nas amostras expostas ao calor a massa residual chega a 55% (3 horas a 200°C) a amostra sem aquecimento não ultrapassa 25%.

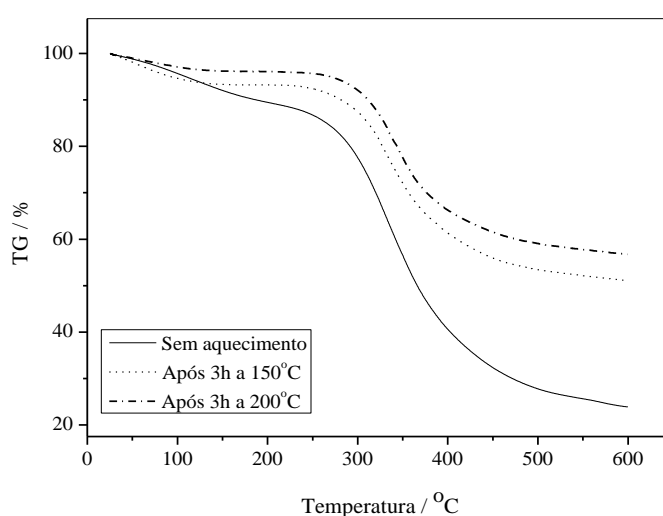


Figura 9: Curvas de TGA das amostras de PIS.

A utilização do método de Coats-Redfern para as curvas acima nos fornece valores de energia de ativação para cada sistema. A Tabela 5 mostra os valores obtidos.

Tabela 5: Energias de ativação calculadas pelo método de Coats-Redfern

Amostra	Ea (kJ/mol)
Sem aquecimento	295
3 horas 150°C	320
3 horas 200°C	329

Para uma avaliação comparativa da estabilidade térmica também foram obtidas curvas da amostra não pré-aquecida, que foi comparada aos resultados obtidos das amostras expostas ao calor por 3 horas a 150 e 200°C. A análise destas curvas foram feitas em velocidades variando entre 5 e 30 °C/min.

Através do método de Ozawa pode-se obter os dados da E_a em função da perda de massa de cada amostra.

Os dados podem ser mais claramente analisados através de um gráfico comparativo relacionando a E_a e a perda de massa cada amostra.

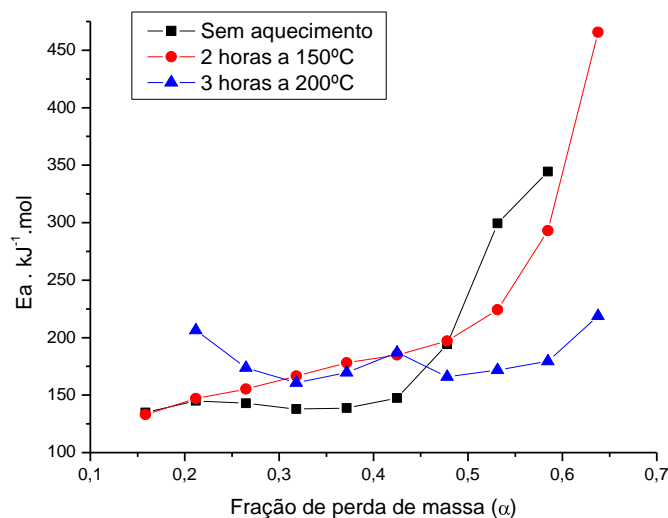


Figura 10: Variação da E_a em função da perda de massa para a PIS.

Analisando-se as curvas da Figura 10 é possível observar que a PIS sem tratamento térmico apresenta valores de energia de ativação constantes ($\approx 140 \text{ kJ mol}^{-1}$) até praticamente 50% da perda de massa (α). Nesta etapa do processo de degradação devem ocorrer perdas de massa relativas aos grupos protéicos fracamente ligados a estrutura da proteína e/ou ramificações. A partir de $\alpha=0,45$ a energia de ativação aumenta consideravelmente devido a cisão de ligações mais fortes da cadeia principal da proteína.

Com o tratamento térmico (3 h a 150°C e 200°C) muitas das estruturas mais instáveis da proteína, cadeias laterais e água adsorvida foram previamente degradadas. Pela análise de TGA observa-se que com a perda de massa a E_a , além de apresentar valores maiores que aqueles para o sistema sem tratamento, aumenta consideravelmente com α para o sistema pré-aquecido a 150°C, sugerindo que após o tratamento o sistema é mais estável termicamente. Um comportamento com menor variação para os valores da E_a é

observado para o sistema pré-aquecido a 200°C, isso é devido a provável quebra das ligações mais fracas ainda no forno tubular.

Enquanto o valor médio das energias de ativação para as amostras com tratamento térmico é de aproximadamente 175kJ/mol, a amostra sem aquecimento tem um valor médio de 148kJ/mol. Grande parte desta estabilidade é creditada à cadeia pelas ligações cruzadas entre enxofre que se formam com o aquecimento.

Os valores altos de E_a (maiores do que 100 kJ/mol) sugerem um mecanismo ligado as quebras aleatórias das ligações fortes da cadeia polimérica. A variação das energias de ativação com o aquecimento do polímero indicam uma mudança no mecanismo de degradação com a perda de massa (α), estas mudanças são uma consequência da existência de muitas etapas envolvidas no processo.

As curvas da proteína não pré-aquecida e da aquecida a 150°C mostram o mesmo padrão, sugerindo que os mecanismos de degradação são similares para estes dois sistemas. A curva da proteína aquecida a 200°C mostra uma característica diferente, provavelmente isso acontece pois parte de sua cadeia principal já sofreu cisão no forno tubular, diminuindo assim a E_a de sua degradação.

Os dois métodos de análise mostram valores distintos entre si para as energias envolvidas no processo, mas são coerentes em dizer que a energia para a degradação da proteína aumenta com o pré-aquecimento da amostra. Isso sugere que com o tratamento térmico as amostras foram mais estáveis, uma vez que precisam de uma maior energia para o processo de degradação acontecer.

6 CONCLUSÕES

Com o aquecimento foi possível que as propriedades físicas da proteína como coloração, solubilidade e composição foram alteradas para temperaturas acima de 200°C. Os espectros de infravermelho não apontem grandes modificações para amostras aquecidas até 200°C, que é a faixa de temperatura onde ela é amplamente utilizada, indicando que a sua estrutura se mantém estável até esta temperatura.

A partir da análise termogravimétrica foi observado que a estabilidade térmica da proteína isolada de soja aumenta com o pré-aquecimento ao qual é exposta. Isso é um sinal de que a proteína não tem uma mudança radical em sua composição mas provavelmente sim em sua estrutura.

As energias de ativação relacionadas a fração de perda de massa (α) para sistemas aquecidos até 150°C tem um mesmo perfil, indicando que estes sistemas tem um mecanismo de degradação similar. Já em 200°C este perfil se altera, indicando que o mecanismo de degradação para esta temperatura difere dos demais estudados e que nesta temperatura uma degradação da cadeia polimérica ocorre ainda no forno tubular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PAOLI, M. A. De; **Degradação e Estabilização de Polímeros**, 2ª Ed , Chemkeys,45-55, 2008.
- [2] TURNER, A., GURNEE, E.F. **POLÍMEROS ORGÂNICOS**,1ª Ed, USP,1-34, 1971.
- [3] CANEVAROLO, SEBASTIÃO V. JR. **CIÊNCIA DOS POLÍMEROS**, 2ª Ed., Artliber,2006.
- [4] Nelson, D. L.; Cox M. M; **Principles of Biochemistry**, 3ª Ed, Câmara brasileira do livro, 2002.
- [5] SOLOMONS, T. W. G; Fryhle, C. B; **Organic Chemistry**, 9ª Ed, John Wiley & Sons Inc, pag 1119-1140, 2007.
- [6] KUMAR,R.; Wang L.; Zhang L.; Structure and Mechanical Properties of Soy Protein Materials Plasticized by Thiodiglycol, **Wiley InterScience**, online, 2008.
- [7] HERRERO, A. M.; Jiménez-Colmenero, F.; Carmona, P.; Elucidaton of structure in soy protein isolate upon heating by Raman Spectroscopy, **International Journal of Food Science & Tecnology**, V. 44, 711-717, 2009.
- [8] MO, X. ; SUN, X. S.;WANG, Y. Effects of molding temperature and pressure on properties of soy protein polymers. **Journal of applied Polymer Science**, V. 72, 2593-2602, 1999.
- [9] LACERDA, L., D.; **Avaliação das propriedades físico químicas da proteína isolada de soja, glutém e suas misturas**, 91, Tese de mestrado, URGs, 2008.
- [10] KINSELA, J. E.; Functional Properties of Soy Proteins, **Journal of American Oil Chemistry Society**, V. 56, 242-258, 1979.
- [11] KUMAR, R.; CHOUDHARY V.; MISHRA S.; VARMA I.K., MATTIASSON B.; Adhesives and Plastics Based on Soy Protein Products, **Industrial Crops and Products**, V. 16, 155-172, 2002.

[12] DAMODARAN S.; **Aminoácidos, péptidos e proteínas**. Química de los alimentos, Acribia, 383, 2000.

[13] CHO S. Y.; Park J. W.; BATT H. P.; THOMAS R. L.; Edible Filmes Made From Membrane Processed Soy Protein Concentrates. **LWT**, V. 40, 418-423, 2007.

[14] GUERRERO P., Retegi A., Gabilondo N., de la Caba K., Mechanical and thermal properties of soy protein filmes processed by casting and compresion, **Journal of Engineering**, V. 100, 145-151, 2010.

[15] SWAIN, S. N. S.; BISWAL, M.; NANDA P. K.; NAYAK P. L. - Effect of ionic strength and pH on the thermal and rheological properties of soy protein-amylopectin blend, **LWT**, V. 40, 418-423, 2007.

[16] MILLS E. N. C., Jenkins J., Narigheto N., Belton P. S., Gunning A. P., Morris V. J., Allergens of the cupin superfamily, *Plant Food Allergens*, V. 30, 925, 2002.

[17] SCHIMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V.; Thermal Stability of Filmes Formed by Soy Protein Isolate – Sodium Dodecyl Sulfate, **Polymer Degradation and Stability**, V. 87, 25-31, 2005.

[18] SCHARNAGL, C.; Reif M.; Friedrich J.; Stability of proteins: temperatura, pressure and role of the solvent. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 1749, 187-215, 2005.

[19] SILVERSTEIN R.M.; Bassler G. C.; Morrill T. C.; **Spectrometric identification of organic compounds**, 5^a Ed, John Willey & Sons, 91-100, 1991.

[20] RYAN M.; McEvoy E.; Duignan S.; Crowley C.; Fenelon M.; O'Callaghan D.M.; FritzGerald R. J.; Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients, **Food Chemistry**, V. 108, 503-510, 2008.

[21] OZAWA T; Critical investigation of methods for kinetic-analysis of thermoanalytical data, **Journal of Thermal Analysis**, V. 4, 601-617, 1975.

[22] MARQUES, P.T.; LIMA, A. M. F.; BIANCO, G.; LAURINDO J.B.; BORSALI, R.; LE MEINS, J.F.; SOLDI, V.; Thermal properties and stability of cassava starch films cross linked with tetraethylene glycol diacrylate, **Polymer degradation and stability**, V. 91, 726-732, 2006.

[23] COATS A. W.; REDFERNJ.; Kinetics Parameters from Thermogravimetric Data, **Nature**, V. 201, 68-69, 1964.

[24] HILL, N.; **THE PROTEINS**, 3^a Ed, Academic Press, 280, 1982.