

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS**  
**EXATAS E ENGENHARIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**PROCESSOS E TECNOLOGIAS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS**  
**DE GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUO DO COURO CURTIDO**  
**AO CROMO (III) COM TRATAMENTO ENZIMÁTICO**

**Elizete Baggio Brandalise**

Caxias do Sul, 2017

**ELIZETE BAGGIO BRANDALISE**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE  
GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUO DO COURO CURTIDO AO CROMO (III)  
COM TRATAMENTO ENZIMÁTICO**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado por Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Baldasso e coorientada por Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Dettmer.

Caxias do Sul, 2017

B144o Baggio Brandalise, Elizete

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES  
BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUO  
DO COURO CURTIDO AO CROMO (III) COM TRATAMENTO  
ENZIMÁTICO / Elizete Baggio Brandalise. – 2017.

98 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2017.

Orientação: Camila Baldasso.

Coorientação: Aline Dettmer.

1. Biofilmes Resíduo de Couro Gelatina Tratamento enzimático  
Biodegradabilidade. I. Baldasso, Camila, orient. II. Dettmer, Aline,  
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).

**“Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis de gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo (III) com tratamento enzimático.”**

**Elizete Baggio Brandalise**

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 02 de maio de 2017

Banca Examinadora:

Dra. Camila Baldasso  
Orientadora  
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Aline Dettmer  
Coorientadora  
Universidade de Passo Fundo

Dra. Luciane Maria Colla  
Universidade de Passo Fundo

Dra. Rosmary Nichele Brandalise  
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Venina dos Santos  
Universidade de Caxias do Sul

## AGRADECIMENTOS

Diante de uma grande conquista, sempre temos muito que agradecer:

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me possibilitado chegar até aqui, por me dar forças mesmo quando nem eu mesma acreditei ter, por todas as vezes que me consolou nos momentos de cansaço e desespero e por sempre providenciar o melhor.

Agradeço a minha família, pelo amor, compreensão e por sempre torcer e querer o melhor para mim.

Ao meu amor Alex, pelo companheirismo, apoio, carinho, alegrias e tristezas compartilhadas ao longo dessa jornada que juntos estamos trilhando.

Agradeço às orientadoras Aline Dettmer e Camila Baldasso pela oportunidade, pelo exemplo, pelo incentivo, pela compreensão em vários momentos e conhecimento compartilhado. Com toda certeza não conseguiria sem vocês!

Aos bolsistas de iniciação científica que, em cada etapa deste trabalho, tanto se dedicaram. À Duda pela dedicação e empenho. À Júlia pela dedicação, amizade e comprometimento colocado neste trabalho. À Daniele pela dedicação, empenho, pelas risadas e pelo carinho.

A todos os colegas e amigos do LEBIO e de mestrado, em especial à Cleide Borsoi, Gabriela de Jesus, Bianca Scopel e Patrícia Poletto pela ajuda, pelas conversas e pelas risadas!

À Joce e o laboratório LQM, pela ajuda e pelos equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias (PGEPROTEC) e seu coordenador Ademir Zattera.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À empresa Ajinomoto pela doação da enzima transglutaminase.

Assim sendo, deixo aqui meu sincero agradecimento a todos que me ajudaram a encerrar mais uma etapa da minha caminhada profissional.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS .....	18
3.2 BIODEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS .....	19
3.3 PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS .....	21
3.4 APLICAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS .....	22
3.5 GELATINA RECUPERADA DO RESÍDUO DE COURO CURTIDO AO CROMO (III) .....	24
<b>3.5.1 Resíduo do couro curtido ao cromo III</b> .....	24
<b>3.5.2 Gelatina</b> .....	25
3.6 USO DA GELATINA NA PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS .....	27
<b>3.6.1 Aditivos em filmes poliméricos</b> .....	28
<b>3.6.2 Agente reticulante transglutaminase</b> .....	29
<b>3.6.3 Agente antifúngico quitosana</b> .....	31
<b>3.6.4 Plastificantes em filmes poliméricos</b> .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 MATERIAIS .....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....	36
<b>4.3.1 Termogravimetria</b> .....	36
<b>4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</b> .....	36
<b>4.3.3 Atividade da enzima transglutaminase</b> .....	37
4.3.3.1 Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática.....	37
<b>4.3.5 Umidade</b> .....	38
<b>4.3.6 Cinzas</b> .....	38

4.3.7 Cromo, sódio, cálcio e magnésio .....	38
4.3.8 Teor de cromo .....	39
4.3.9 Proteína (Nitrogênio Total Kjeldahl – NTK) .....	39
4.4 EXTRAÇÃO DA GELATINA DO RESÍDUO DE COURO CURTIDO AO CROMO III .....	39
4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES.....	40
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES .....	43
4.6.1 Espessura .....	43
4.6.2 Propriedades mecânicas .....	44
4.6.3 Solubilidade .....	44
4.6.4 Permeabilidade ao vapor d' água.....	44
4.6.5 Umidade dos filmes.....	45
4.6.6 Ângulo de contato .....	45
4.6.7 Termogravimetria.....	46
4.6.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	46
4.6.9 Microscopia óptica .....	46
4.6.10 Teor de cromo .....	46
4.7 DEGRADAÇÃO DOS FILMES .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.. .....</b>	<b>49</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....	49
5.1.1 Termogravimetria.....	49
5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	51
5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	53
5.2.1 Efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática .....	53
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE COURO CURTIDO AO CROMO (III) ..	54
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA COMERCIAL E DA GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUOS DE COURO CURTIDO AO CROMO (III) .....	55
5.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO DOS FILMES COM GELATINA COMERCIAL.....	56

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMERCIAIS OBTIDOS NA SEGUNDA ETAPA DE PRODUÇÃO.....	59
<b>5.6.1 Espessura</b> .....	60
<b>5.6.2 Solubilidade</b> .....	61
<b>5.6.3 Umidade</b> .....	61
<b>5.6.4 Ângulo de contato</b> .....	62
<b>5.6.5 Permeabilidade ao vapor d' água</b> .....	62
<b>5.6.6 Propriedades mecânicas</b> .....	63
<b>5.6.7 Propriedades térmicas</b> .....	64
<b>5.6.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</b> .....	66
5.7 PRODUÇÃO DOS FILMES COM GELATINA EXTRAÍDA DO RESÍDUO DO COURO CURTIDO AO CROMO III.....	67
<b>5.7.1 Espessura</b> .....	68
<b>5.7.2 Solubilidade</b> .....	69
<b>5.7.3. Umidade</b> .....	70
<b>5.7.4 Ângulo de contato</b> .....	70
<b>5.7.5 Permeabilidade ao vapor d' água</b> .....	71
<b>5.7.6 Propriedades mecânicas</b> .....	72
<b>5.7.7 Propriedades térmicas</b> .....	73
<b>5.7.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</b> .....	75
5.5 BIODEGRADABILIDADE DOS FILMES APÓS EXPOSIÇÃO EM SOLO SIMULADO .....	77
<b>5.5.1 Caracterização do solo simulado</b> .....	77
<b>5.5.2 Análise do algodão exposto ao solo simulado</b> .....	77
<b>5.5.3 Avaliação dos filmes</b> .....	78
5.5.3.1 Perda de massa.....	78
5.5.3.2 Microscopia óptica dos filmes expostos no solo.....	80
5.5.3.3 Termogravimetria dos filmes em solo.....	81
5.5.3.4 FTIR dos filmes em solo.....	83
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>86</b>



<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcas comerciais de filmes com materiais de fonte renovável, empregados como cobertura de solo (SCOPEL, 2016). .....	24
Tabela 2. Planejamento experimental 1 para produção dos filmes. ....	42
Tabela 3. Caracterização do resíduo do couro usado na extração de gelatina.....	54
Tabela 4. Comparativo das análises físico-químicas da gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo (III) da gelatina comercial. ....	55
Tabela 5. Solubilidade, alongação e tensão na ruptura para os filmes produzidos no planejamento 1. ....	56
Tabela 6. Análise das propriedades dos filmes produzidos na etapa 2 com gelatina comercial. ....	60
Tabela 7. Análise de variância para as propriedades dos filmes produzidos na etapa 2 com gelatina comercial. ....	60
Tabela 8. Análise das propriedades dos filmes produzidos na etapa 3 com gelatina extraída. ....	68
Tabela 9. Análise de variância para as propriedades dos filmes de gelatina extraída. ....	68
Tabela 10. Resultados das análises químicas do solo simulado durante o período de maturação.....	77
Tabela 11. Principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos filmes dispostos em solo simulado no período de 1 e 3 horas. ....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes de obtenção de materiais biopoliméricos. Fonte: Adaptado Nishihora (2015). .....	18
Figura 2. Ciclo de vida dos polímeros biodegradáveis provenientes de fontes renováveis. Fonte: Mohanty et al. (2005). ....	19
Figura 3. Obtenção de filmes pelo método de casting: (1) formulação do filme, (2) dispersão filmogênica depositada sobre um molde ou superfície, (3) secagem, (4) remoção do filme formado. Fonte: adaptado de Pagno (2016). ....	21
Figura 4. Participação de cada segmento na indústria de embalagem. Fonte: IBGE (2016). ....	22
Figura 5. Estrutura química da gelatina. Fonte: Chaplin (2014). ....	26
Figura 6. Processo de preparação da gelatina do tipo A e B. Fonte: Porto (2007). ....	27
Figura 7. Mecanismo de formação de ligação cruzada da enzima transglutaminase. Fonte: MACEDO; SANTOS (2005). ....	29
Figura 8. Esquema do processo de extração de gelatina, produção e caracterização dos filmes. .....	35
Figura 9. Esquema de extração da gelatina do resíduo do couro curtido ao cromo III por hidrólise alcalina. ....	40
Figura 10. Fluxograma de produção de filmes biopoliméricos a partir de gelatina comercial e gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III. ....	41
Figura 11. Corpos-de-prova do algodão para testar a eficácia do solo simulado. ....	47
Figura 12. Amostras dos filmes (a) dispostas dentro dos copos (b) dispostas na estufa. ....	48
Figura 13. Curva TG para matérias primas utilizadas na produção dos filmes. ....	49
Figura 14. Curvas DTG das matérias primas utilizadas na produção dos filmes. ....	50
Figura 15. Espectros de FTIR para matéria prima de produção dos filmes. ....	52
Figura 16. Atividade enzimática da enzima transglutaminase para: (a) diferentes valores (37, 50 e 60 °C) de temperatura, (b) diferentes valores (6, 7 e 8) de pH. ....	53
Figura 17. Gráfico de Pareto para solubilidade dos filmes. ....	57
Figura 18. Gráfico de Pareto para: (a) tensão de ruptura: (b) alongação. ....	59
Figura 19. Curvas DTG para filmes de gelatina (Gel), gelatina com 1% de TGase (Gel/T1) e gelatina com 5% de TGase (Gel/T5). ....	65
Figura 20. Espectros de FTIR para filmes de gelatina (Gel), gelatina com 1% de TGase (Gel/T1) e gelatina com 5% de TGase (Gel/T5). ....	66

Figura 21. Curvas DTG para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex), gelatina extraída com 1% de TGase (Gel/Ex1) e gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/Ex3). .....	74
Figura 22. Espectros de FTIR para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex), gelatina extraída com 1% de TGase (Gel/Ex1) e gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/Ex3). .....	75
Figura 23. Filmes produzidos com gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) e gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III (Gel/Ex e Gel/Ex3) após 12 h de exposição em solo simulado. ....	78
Figura 24. Microscopia óptica de filmes produzidos com gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) e gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III (Gel/Ex, Gel/Ex1 e Gel/Ex3). Todas as microscopias apresentam aumento de 100x. ....	80
Figura 25. Curva TG para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex3), gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/T5) e gelatina comercial com 5% de TGase. ....	82
Figura 26. Curvas de FTIR para filmes de gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) após 1 e 3 h de exposição ao solo simulado. ....	83
Figura 27. Curvas de FTIR para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex, Gel/Ex1 e Gel/Ex3) após 1 e 3 h de exposição ao solo simulado. ....	84

## RESUMO

Polímeros oriundos de fontes não renováveis são amplamente utilizados na produção de embalagens e para uso na agricultura, em confecção de estufas, sacos para produção de mudas e filmes para cobertura de solo. Estes plásticos são resistentes à degradação e após utilização passam a ser um problema ambiental, portanto, o desenvolvimento de materiais biodegradáveis é uma necessidade, visto que são produzidos de fontes renováveis e decompõem-se rapidamente, diminuindo o impacto sobre o meio ambiente. O reaproveitamento total ou parcial de resíduos perigosos, como os de couro curtido ao cromo III, também tem sido alvo de pesquisas por gerar um ganho ambiental se comparado a disposição em aterros industriais para resíduos perigosos. Dentro deste contexto, no presente trabalho foram produzidos filmes de gelatina comercial e filmes de gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, em associação a plastificante e enzima transglutaminase (TGase) como agente reticulante. A enzima TGase foi estatisticamente significativa nas propriedades de solubilidade, ângulo de contato e alongação dos filmes produzidos com gelatina comercial. Para os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, a enzima TGase atuou de forma estatisticamente significativa nas propriedades de solubilidade, umidade, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor d'água e tensão de ruptura dos filmes. As análises térmicas mostraram que a reticulação enzimática aumentou a estabilidade térmica dos filmes. A análise de infravermelho evidenciou a reticulação da enzima transglutaminase nos filmes pelo deslocamento das bandas. No teste de biodegradabilidade em solo simulado, os filmes degradaram-se em 24 horas, comprovando que o polímero é biodegradável. Este estudo demonstrou a viabilidade da utilização de gelatina recuperada de um resíduo para produzir filmes biodegradáveis com melhorias na suas propriedades com adição de um agente reticulante.

**Palavras Chave:** Biofilmes, Resíduo de Couro, Gelatina, Tratamento enzimático, Biodegradabilidade.

## ABSTRACT

Polymers from non-renewable sources are widely used in the production of packaging and for use in agriculture, in the manufacture of greenhouses, bags for the production of seedlings and films for soil cover. These plastics are resistant to degradation and after use become an environmental problem, therefore, the development of biodegradable materials is a necessity, since they are produced from renewable sources and decompose rapidly, reducing the impact on the environment. The total or partial reuse of hazardous wastes, such as chrome-tanned leather III, has also been the subject of research for generating an environmental gain compared to disposal in industrial landfills for hazardous waste. In this context, commercial gelatin films and gelatin films extracted from leather residue to chromium III, in combination with plasticizer and enzyme transglutaminase (TGase) as crosslinking agent were produced in the present work. The enzyme TGase was statistically significant in the properties of solubility, contact angle and elongation of the films produced with commercial gelatin. For the films produced with gelatine extracted from chromium III tanned leather residue, the enzyme TGase was statistically significant in the properties of solubility, humidity, contact angle, water vapor permeability and rupture stress of the films. Thermal analysis showed that enzymatic crosslinking increased the thermal stability of films. Infrared analysis evidenced the reticulation of the transglutaminase enzyme in the films by the bands displacement. In the biodegradability test in simulated soil, the films degraded in 24 hours, proving that the polymer is biodegradable. This study demonstrated the feasibility of using gelatine recovered from a residue to produce biodegradable films with improvements in its properties with the addition of a crosslinking agent.

**Keywords:** Biofilms, Leather residue, Gelatin, Enzymatic treatment, Biodegradability.

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de produtos plásticos provenientes de fontes não renováveis, utilizados desde embalagens plásticas (sacolas), embalagens de alimentos, bem como na agricultura para confecção de estufas, sacos para produção de mudas e filmes para cobertura de solo (RHIM et al., 2013). Entretanto, a poluição do meio ambiente devido ao descarte desses materiais sintéticos sem nenhum controle é um grande problema mundial, tendo como desvantagem o fato de não serem biodegradáveis, e estarem envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos. (SOUZA, 2011). Portanto, o desenvolvimento de materiais biodegradáveis é uma alternativa, visto que podem ser produzidos de fontes renováveis e decompõem-se rapidamente, diminuindo o impacto sobre o meio ambiente.

Os filmes biodegradáveis configuram-se como uma alternativa a esses materiais, estão inseridos em um grupo de compostos com alto potencial de aplicação industrial devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade. Compostos biodegradáveis, como por exemplo, a gelatina, provêm de fontes naturais e renováveis, sendo importante subproduto de origem animal, a mesma também pode ser recuperada

de resíduos de couro curtido ao cromo (III) e utilizada na obtenção de filmes.

Os filmes produzidos por proteínas apresentam boa resistência mecânica, contudo, seu uso muitas vezes se torna restrito devido ao seu caráter hidrofílico (alta susceptibilidade à umidade). Visando melhorar essas propriedades, a modificação da gelatina por meio de agentes reticulantes, como a enzima transglutaminase, é um método promissor, pois a enzima catalisa reações de formação de ligações cruzadas entre grupos específicos das proteínas. Filmes de gelatina modificados enzimaticamente, quando comparados aos filmes obtidos a partir de outras fontes proteicas, mostraram melhores propriedades de barreira ao vapor d'água e propriedades mecânicas devido a diminuição do caráter hidrofílico (BHATTACHARYA et al., 2008). Devido ao seu caráter hidrofílico, os filmes podem apresentar atividade microbiana ou fúngica durante a sua formação. Uma forma de evitar essa formação é pela adição de compostos antifúngicos, como a quitosana, pois além de ser um biopolímero é amplamente estudada como conservante de alimentos (BONILLA et al., 2013).

A fragilidade dos filmes de proteína pode ser melhorada pela adição de plastificantes, os quais aumentam a flexibilidade da cadeia polimérica. Dentre os

plastificantes empregados, pode ser destacado o glicerol, que é subproduto da produção de biodiesel (GROSSMAN, 2007).

A biodegradação de um polímero é o processo pelo qual microrganismos e suas enzimas consomem este polímero como fonte de nutrientes, em condições normais de umidade, temperatura e pressão. Os polímeros melhor adaptados à biodegradação são aqueles hidrolisáveis a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , ou a  $\text{CH}_4$  e os polímeros sintéticos que possuam estruturas próximas aos naturais (LIMA, 2004; LIMA et al., 2007).

Nesse contexto, a utilização da matéria-prima recuperada de resíduo de couro curtido ao cromo III (gelatina) com adição de agente reticulante (enzima transglutaminase), de glicerol e quitosana na produção de filmes poliméricos configura-se uma promissora alternativa aos polímeros derivados de petróleo, visto que são produzidos com materiais de fontes renováveis e degradados no meio ambiente.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de filmes poliméricos a partir de resíduos de couro curtido ao cromo III utilizando tecnologia de reticulação enzimática.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir as condições ótimas de concentração da enzima transglutaminase e da gelatina para produção dos filmes;

Definir o tempo de reticulação da enzima transglutaminase na produção dos filmes;

Propor um método de extração de gelatina a partir de resíduo do couro curtido ao cromo (III);

Comparar as propriedades dos filmes de gelatina comercial e extraída produzidos com e sem enzima transglutaminase nas condições ótimas de produção dos filmes;

Avaliar a influência das propriedades de espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água, umidade, ângulo de contato e propriedades mecânicas dos filmes;

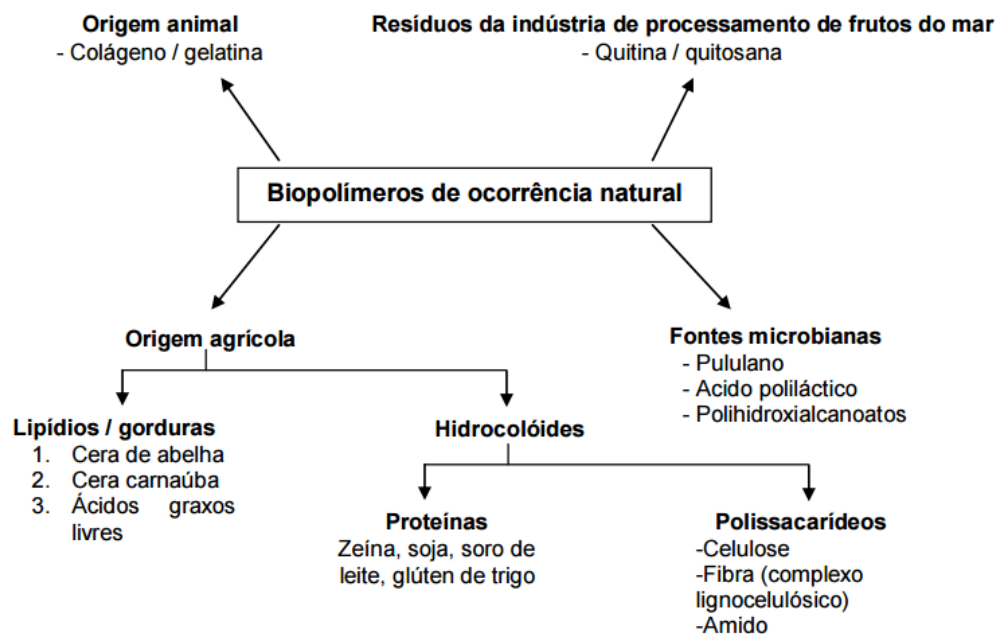
Avaliar a influência da enzima transglutaminase na biodegradação dos filmes reticulados e não reticulados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo serão abordados os aspectos teóricos para o desenvolvimento deste trabalho, tendo por foco as matérias-primas (resíduo de couro curtido ao cromo (III), gelatina, glicerol, quitosana e enzima transglutaminase) e os processos (extração de gelatina por meio de hidrólise alcalina e produção de filmes pela técnica de *casting*) nele empregados.

#### 3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação resulta da ação de microorganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação. Diferentemente dos polímeros oriundos do petróleo (fonte não renovável), eles podem ser provenientes de fontes renováveis como milho, batata, cana-de-açúcar, ou ainda podem derivar de origem animal, como a quitosana, o colágeno e a gelatina (BELGACEM; GANDINI, 2008). A Figura 1 apresenta as principais fontes de obtenção de polímeros biodegradáveis naturais.

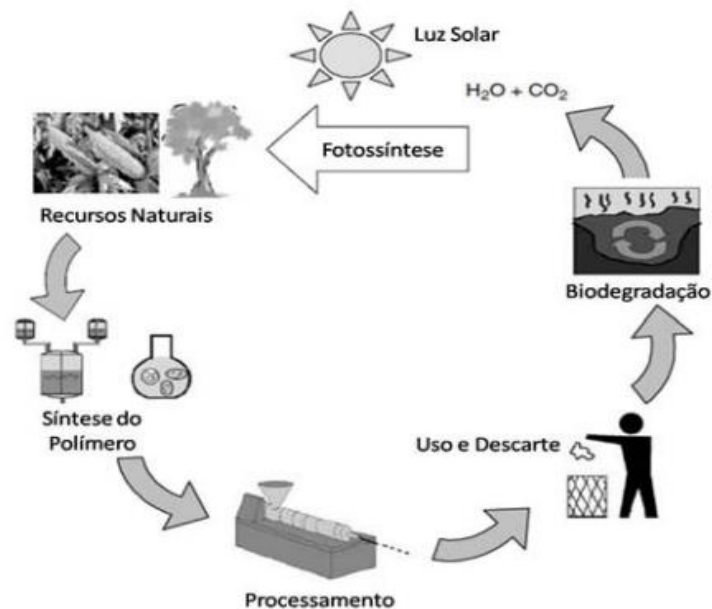


**Figura 1.** Fontes de obtenção de materiais biopoliméricos. Fonte: Adaptado Nishihora (2015).

### 3.2 BIODEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS

A degradação é uma reação química que altera a qualidade de interesse de um material polimérico ou de um composto polimérico. Esta qualidade de interesse entende-se como a característica inerente ao uso de um determinado artefato polimérico, como por exemplo, a resistência elétrica, a flexibilidade, a resistência mecânica, a dureza e até mesmo o aspecto visual (DE PAOLI, 2009).

Os polímeros formados por hidrocarbonetos são resistentes ao ataque químico e biológico, assegurando longevidade e outras propriedades mantidas por períodos longos (AIDER, 2010). No entanto, o descarte destes materiais no meio ambiente, dificulta a degradação da matéria orgânica. Desta forma, o uso de polímeros biodegradáveis (Figura 2) mostra-se como uma alternativa interessante para minimizar os impactos ambientais gerados pelo descarte inadequado dos polímeros convencionais.

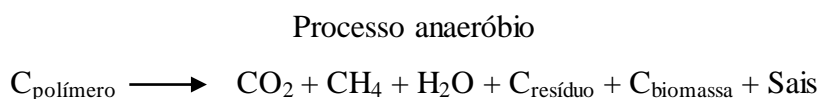
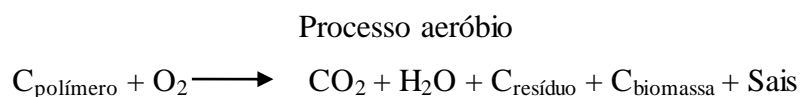


**Figura 2.** Ciclo de vida dos polímeros biodegradáveis provenientes de fontes renováveis. Fonte: Mohanty et al. (2005).

Existem diversos estudos científicos dedicados à produção de polímeros biodegradáveis utilizando proteínas como matriz polimérica. Entre as proteínas utilizadas

como agente formador de biofilmes destacam-se (gelatina, proteína do trigo, proteína do leite, colágeno) e polissacarídeos (amido, goma xantana, quitosana) que provêm de fontes naturais e renováveis (FERNANDES et al., 2015).

Os polímeros são considerados biodegradáveis quando são passíveis de degradação por ação biológica, onde os microrganismos conseguem assimilar o carbono contido na cadeia polimérica como fonte de alimento. Estes microrganismos podem realizar a degradação na presença ou na ausência de oxigênio, processos admitidos como aeróbio e anaeróbio, respectivamente (MARINI, 2005). Os processos são mostrados a seguir.



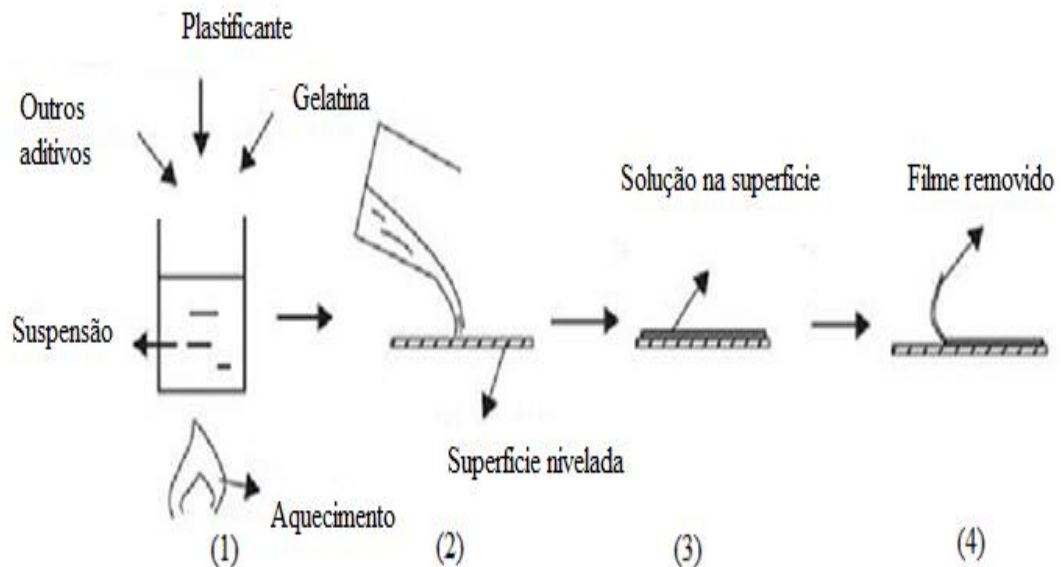
Esses processos promovem a ruptura da cadeia polimérica e redução da massa molar a valores muito baixos, até o ponto em que todo polímero é consumido ou degradado pelos microrganismos em semanas ou meses de modo que os únicos materiais resultantes desta degradação sejam dióxido de carbono, água, metano e hidrogênio (LIMA, 2004; GROSSMANN, 2007).

A completa biodegradação ocorre quando não há mais nenhum resíduo, e a completa mineralização é estabelecida quando o substrato original ( $C_{\text{polímero}}$ ) é completamente convertido em gases e sais (BASTIOLI, 2005). O ambiente onde o processo será realizado deverá ser propício para o crescimento de microrganismos, sendo fatores importantes temperatura, umidade, pH e oxigênio (MARIANI, 2005).

Entre os materiais apresentados, a gelatina que é um subproduto de origem animal, podendo ser obtida do resíduo do ouro curtido ao cromo III, torna-se uma alternativa na produção de filmes biodegradáveis, visto que quando descartada no ambiente, a mesma se degrada reduzindo os problemas causados pelo descarte e gerenciamento incorreto de resíduos de provenientes de fonte não renovável.

### 3.3 PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

Na produção dos filmes pode-se utilizar o método denominado de *casting* (Figura 3), no qual a dispersão filmogênica é depositada sobre um molde ou superfície não adesiva (acrílico, teflon, entre outros) e após levado a secagem, geralmente em estufa e então se obtém um material similar ao polímero sintético (ANDRADE-MAHECHA et al., 2012). No entanto, esta técnica é comumente usada em laboratórios, porém não é prática para a produção em escala industrial. Para a fabricação em grande escala, pode ser utilizado o processo de extrusão (ZHANG et al., 2014).

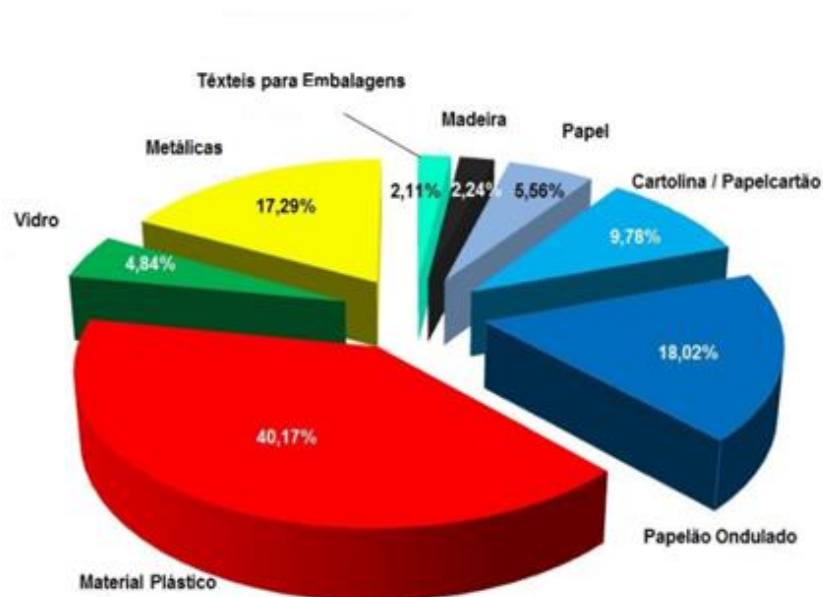


**Figura 3.** Obtenção de filmes pelo método de casting: (1) formulação do filme, (2) dispersão filmogênica depositada sobre um molde ou superfície, (3) secagem, (4) remoção do filme formado. Fonte: adaptado de Pagno (2016).

A finalidade do uso de filmes biodegradáveis depende de suas propriedades funcionais, como barreira à umidade, gases e solutos, solubilidade em água, propriedades óticas, mecânicas, reológicas e térmicas. Estas propriedades dependem da composição da matriz polimérica, do processo de obtenção, modo de aplicação, do condicionamento e da espessura dos filmes (ROBERTSON, 2012).

### 3.4 APLICAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

Nos últimos anos houve um grande aumento do consumo de produtos industrializados em decorrência do crescimento da urbanização em nível mundial. Disso resulta um aumento da quantidade de resíduos gerados, acumulando grandes quantidades de resíduos todos os dias em aterros sanitários. Dentre os produtos mais utilizados como matrizes para embalagens destacam-se papel, papelão e os polímeros sintéticos ou plásticos (Figura 4). Estes últimos são amplamente utilizados por apresentar boas propriedades mecânicas (resistência, deformação, tensão) e boas propriedades de barreira (permeabilidade ao vapor de água), baixo custo e fácil processabilidade. Tradicionalmente, são muito estáveis e não se degradam facilmente, ocasionando sérios problemas ambientais (AVELLA et al., 2005).



**Figura 4.** Participação de cada segmento na indústria de embalagem. Fonte: IBGE (2016).

O aspecto negativo deste material é o seu volume aparente e o tempo que este resíduo requer para se decompor no meio ambiente (YOSHIGA, 2004). Nos últimos anos tem havido um grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de materiais de embalagem biodegradáveis no sentido de diminuir o acúmulo de resíduos plásticos no meio ambiente.

Os filmes biodegradáveis tornam-se uma alternativa e estão inseridos em um grupo de compostos com alto potencial de aplicação industrial devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade. No Brasil as principais aplicações são em segmentos de embalagens

flexíveis para alimentos, cerca de 23%, embalagens de alimentos rígidas (20%), sacolas de mão (14%) e na agricultura (31%) (LANCELLOTTI, 2010).

Na agricultura, a utilização de filmes convencionais de polietileno produz milhares de toneladas de resíduos de plásticos. Nas culturas hortícolas em que se executa a cobertura do solo (*mulching*), os filmes são normalmente utilizados apenas durante uma campanha, sendo removidos no fim do ciclo cultural (ANDRADE, 2014).

A utilização de plásticos biodegradáveis na cobertura do solo encontra-se em fase experimental e de investigação em vários países, havendo algumas informações disponíveis sobre o comportamento da aplicação destes filmes em culturas hortícolas. Coberturas de solo são aplicadas em cultivos agrícolas a fim de manter a umidade do solo, regular sua temperatura e controlar o crescimento de ervas daninhas (TOUCHALEAUME et al., 2015). O aumento na produtividade e a diminuição no uso de herbicidas e pesticidas são alguns dos resultados obtidos a partir desta prática (BRIASSOULIS, 2007).

Em Portugal, têm sido desenvolvidos vários trabalhos, nos últimos anos, sobre o desempenho dos plásticos biodegradáveis e a sua viabilidade técnica e econômica nas culturas de morango e melão (COSTA et al., 2014). O desempenho tem variado mediante a cultura e época de plantação, mas de uma forma generalizada revelaram ser uma alternativa viável a substituição de filmes convencionais de polietileno. Os equipamentos e as práticas culturais utilizadas não sofreram alterações pelo uso dos filmes biodegradáveis, que mantiveram as suas funções de cobertura ao longo dos ciclos das diferentes culturas ensaiadas (SARAIVA et al., 2012).

De acordo com a *Agriculture, Plastics and Environment Europe* (APE, 2015), o polietileno representa 60% (aproximadamente 502.000 toneladas) do total dos plásticos usados na agricultura. Apenas 43% dos plásticos usados na agricultura na Europa são recuperados do solo, sendo que metade deste percentual é reciclado. Visto que o polietileno não é um material biodegradável, presume-se que haja um acúmulo de quantidade substancial deste material no meio ambiente.

Em vista da problemática apresentada pelo uso de polietileno como cobertura de solo, filmes poliméricos biodegradáveis vêm sendo estudados como alternativa para uso na agricultura. Poli (ácido láctico) (PLA), blendas de copoliéster e amido, além do carbonato de polipropileno são alguns dos materiais empregados na produção destes filmes (LI et al., 2014;

TOUCHALEAUME et al., 2015). A Tabela 1 apresenta algumas marcas comerciais de polímeros à base de amido que podem ser usados na fabricação de filmes poliméricos utilizados na agricultura e suas respectivas propriedades mecânicas.

**Tabela 1.** Marcas comerciais de filmes com materiais de fonte renovável, empregados como cobertura de solo (SCOPEL, 2016).

<b>Produto</b>	<b>Bioplast 500</b>	<b>Mater-Bi</b>	<b>Biomind</b>
Fabricante	Biotec	Novamont	Cabopol
Composição	Contém amido de batata	À base de amido de milho	À base de amido de milho
Resistência à tração (MPa)	29	20 – 40	20 – 30
Alongamento na ruptura (%)	250	100 – 300	300 – 500

Por se degradar no ambiente, os polímeros biodegradáveis apresentam vantagens em relação aos polímeros comumente usados, já que não é necessária a sua remoção do campo e, desta forma podem (dependendo do material constituinte) ser incorporados no solo e fornecer nutrientes às plantas. O material tem a vantagem de eliminar as etapas de remoção e tratamento de resíduo e ainda mantém a fertilidade do solo (BERGLUND, 2006).

Em substituição aos materiais apresentados, o presente estudo tem como foco a gelatina obtida a partir do resíduo do couro curtido ao cromo III. Nesse contexto, o tópico a seguir é dirigido especialmente ao estudo da gelatina e aspectos mais relevantes para este estudo.

### 3.5 GELATINA RECUPERADA DO RESÍDUO DE COURO CURTIDO AO CROMO (III)

#### 3.5.1 Resíduo do couro curtido ao cromo III

O Brasil é reconhecido mundialmente como uma referência em qualidade de couros, fornecendo para grandes marcas de moda, segmento automotivo, decoração, dentre outros. O país exporta atualmente 77% da produção de couro bovino. Os principais clientes são China, Itália, Estados Unidos e Vietnã, com receita de US\$ 155 milhões (novembro de 2016). O Rio Grande do Sul, que concentra o maior número de curtumes (cerca de 200), exportou 2,5



milhões de metros quadrados de peles e couros em novembro de 2016, sendo os principais destinos China/Hong Kong com 26,6%, EUA com 14,9% e Itália com 11,5% (CICB, 2016).

O processo de transformação das peles em couro gera uma grande quantidade de efluentes e resíduos com altas concentrações de produtos químicos e matéria orgânica. As operações da unidade curtidora que causam o maior impacto ambiental são a depilação e curtimento ao cromo. O curtimento visa proteger a pele da putrefação que esta sofreria em seu estado natural, tornando-a possível de ser utilizada nos mais diversos artigos, como calçado e vestuário (PEREIRA, 2006).

Estima-se que 90% dos processos de curtimento no mundo utilizem sais de cromo. Apenas a forma trivalente do cromo é utilizada no processo de curtimento e não se tem conseguido substituir o produto químico por outro que confira ao produto final as mesmas características de maciez, enchimento, resistência, flexibilidade entre outras (MAHLER, 1999).

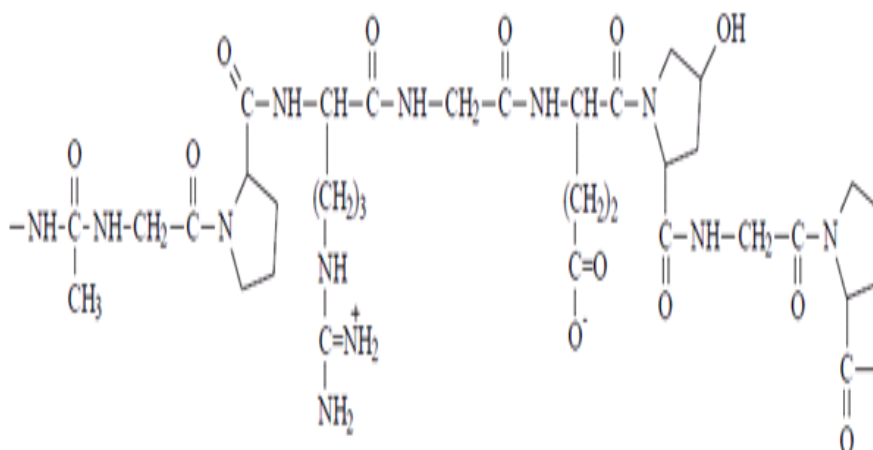
O resíduo de couro curtido ao cromo III gerado em curtumes é classificado pela norma ABNT NBR10.004 (ABNT, 2004b) como Classe I (perigoso). Ele deve, portanto, ser gerenciado de forma adequada. No Brasil, a maior parte do resíduo ainda é disposta em aterros de resíduos industriais perigosos.

Alternativas para a reutilização de resíduo do couro curtido ao cromo III vêm sendo estudadas, visto que a simples disposição deste em aterros de resíduos industriais perigosos torna-se inviável, tanto ambiental como economicamente. Diversos trabalhos realizados no Rio Grande do Sul abordam o reuso do resíduo, por exemplo, na obtenção de adsorventes para tratamento de efluentes, fertilizantes, sais de cromo para curtimento e ligas ferro-cromo a partir de cinzas provenientes do seu tratamento térmico, filmes poliméricos (DETTMER et al., 2010; GIANELLO et al., 2011; PICCIN et al., 2013; WENZEL et al., 2012; SCOPEL, 2016). Configura-se também como alternativa a extração de gelatina a partir de resíduo do couro curtido ao cromo III para produção de filmes biodegradáveis.

### **3.5.2 Gelatina**

A gelatina é um polímero natural que consiste em um pó quebradiço, translúcido, incolor e quase sem sabor. É o produto da desnaturação e da hidrólise parcial das cadeias do

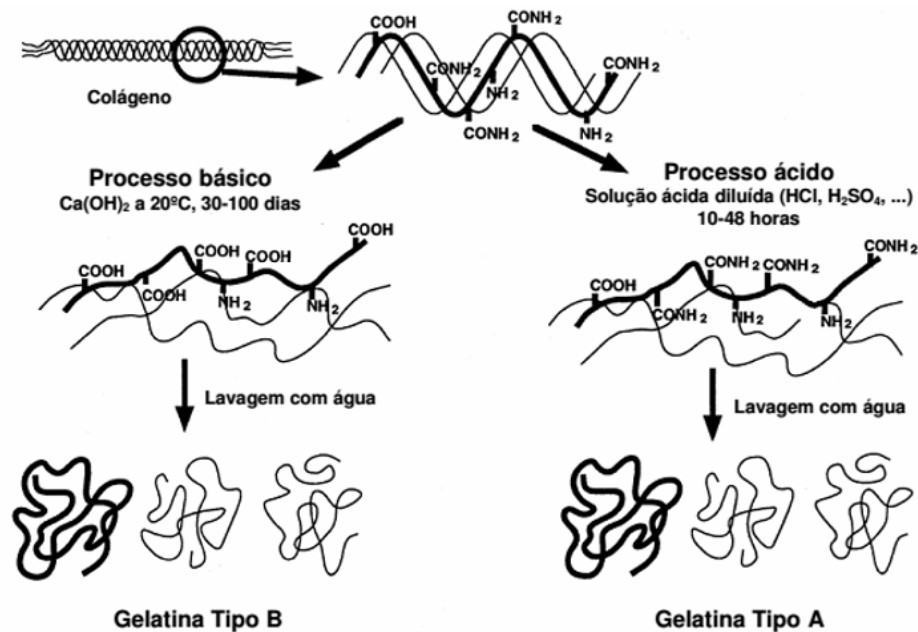
colágeno, sendo amplamente utilizada como um agente de gelificação em alimentos, produtos farmacêuticos, e indústria de cosméticos, pois constitui uma matéria-prima de fácil aplicação e alta disponibilidade, cuja estrutura geral está caracterizada na Figura 5 (EBNESAJJAD, 2012).



**Figura 5.** Estrutura química da gelatina. Fonte: Chaplin (2014).

A gelatina é obtida principalmente da pele e ossos de suínos e bovinos, sendo que 41% da produção mundial de gelatina têm como origem pelas suínas, 29,5% ossos bovinos, 28,5% couros bovinos e 1% peles e ossos de pescados (SHAKILA, et al., 2012).

A gelatina é derivada da dissociação térmica ou química das cadeias polipeptídicas do colágeno, no qual a proteína insolúvel é convertida em gelatina solúvel em temperaturas acima de 50°C por hidrólise ácida ou básica. A produção comercial de gelatina é dividida em seis etapas: pré-tratamento, extração, purificação, esterilização, secagem e moagem. Ela ocorre principalmente por dois processos: ácido (produz gelatina do tipo A) ou alcalino (produz gelatina do tipo B), conforme Figura 6.



**Figura 6.** Processo de preparação da gelatina do tipo A e B. Fonte: Porto (2007).

No processo alcalino, a matéria-prima (principalmente ossos e pele de mamíferos) é submetida por longos períodos de tempo (até 100 dias) a um meio alcalino (em geral de óxido de cálcio ou hidróxido de sódio). No processo ácido, este pré-tratamento é mais curto (um ou dois dias), e ocorre em meio ácido (em geral ácido sulfúrico). A posterior extração da gelatina é conduzida em água a temperaturas variáveis de  $50$  a  $90^\circ\text{C}$ . A purificação do produto é realizada por filtração seguida de desmineralização. O material é então concentrado em evaporadores a vácuo, esterilizado (a aproximadamente  $140^\circ\text{C}$  por 20 s), resfriado, extrudado, seco em túneis de ar e moído. A gelatina produzida pelo processo alcalino apresenta massa molar que geralmente varia de  $20$  a  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (GENNADIOS, 2002; WOLF, 2003).

### 3.6 USO DA GELATINA NA PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS

O uso da gelatina como filme comestível ou revestimento foi estudado consideravelmente até os anos sessenta, resultando em muitas patentes, principalmente na área farmacêutica. A gelatina forma películas transparentes, flexíveis, fortes e impermeáveis ao oxigênio, quando preparadas a partir de soluções aquosas contendo um plastificante, como glicerina ou sorbitol (ZHAO et al., 2008). Park et al. (2008) produziram filmes de gelatina por moldagem por compressão, tornando sua utilização comercialmente viável quando comparado

com o *casting*. Os autores relataram que os filmes de gelatina apresentavam propriedades mecânicas e de barreira aceitáveis, que foram controladas pelo uso combinado de plastificantes.

Fakhouri (2009) estudou a produção de filmes de blendas de gelatina com a adição de amido e observou que a adição de gelatina aumentou a resistência máxima e diminuiu a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes. Wang et al. (2007) constataram que os filmes de proteína (gelatina) apresentaram maior resistência a solventes que os compostos por polissacarídeos. Os resultados também revelaram que o aumento da concentração das soluções de gelatina (entre 4 e 8 %) promoveram melhora das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

Scopel (2016) observou que para a gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III quando empregada em associação com amido de milho, aumentou o alongamento na ruptura e diminuiu a resistência máxima à tração dos filmes. Os mesmos também se apresentaram mais higroscópicos, mais solúveis e mais permeáveis ao vapor de água quando comparados aos produzidos com gelatina comercial.

### **3.6.1 Aditivos em filmes poliméricos**

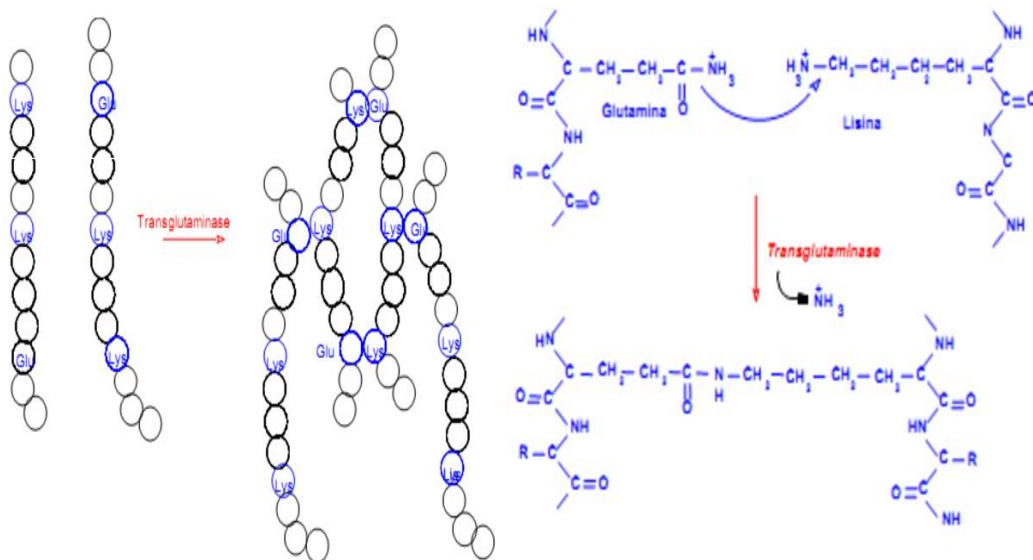
A incorporação de aditivos à matriz polimérica tem como objetivo suprir as deficiências tecnológicas dos filmes e coberturas, melhorando determinadas características, uma vez que estes podem modificar propriedades físicas e/ou mecânicas (REIS, 2011).

Vários materiais podem ser adicionados aos filmes e coberturas para melhorar as suas propriedades mecânicas, de proteção, sensoriais ou nutricionais. A influência de um aditivo nestas propriedades depende de sua concentração, grau de dispersão e da interação com o polímero (BOURTOOM, 2008). Agentes naturais como a transglutaminase podem ser utilizados para obter a reticulação formadora da rede tridimensional dos filmes (RIVERO et al., 2010).

### 3.6.2 Agente reticulante transglutaminase

Um número expressivo de enzimas é produzido comercialmente para uso industrial em vários segmentos (LIMA et al., 2007). O mercado global para enzimas de uso industrial foi de 4 bilhões de dólares em 2015. No Brasil o uso industrial de enzimas atingiu 240 milhões de dólares, aproximadamente 6% do mercado global. Dentre as várias áreas, as enzimas são aplicadas em detergentes, nutrição animal, alimentos, bebidas, biocombustíveis, indústrias têxteis e farmacêuticas (ABIAM; IECG., 2015).

As transglutaminases (TGases) (EC 2.3.2.13) são uma família de enzimas presentes em animais, plantas e organismos unicelulares, que são responsáveis pela modificação de proteínas, agindo como cálcio-dependente. É uma transferase que catalisa a reação de acil transferência entre o grupo  $\gamma$ -carboxilamida da glutamina ligada a peptídeos (doador de acil) e aminas primárias (receptores de acil), incluindo o grupo  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina em proteína (IORIO et al., 2012). A Figura 7 representa o mecanismo de reação da enzima transglutaminase.



**Figura 7.** Mecanismo de formação de ligação cruzada da enzima transglutaminase. Fonte: MACEDO;SANTOS (2005).

Quando o grupo  $\epsilon$ -amino de lisina ligada à proteína age como um acil receptor, ligações cruzadas covalentes (*crosslinking*), intra e/ou intermoleculares são formadas (ligação

isopeptídica (glutamil-lisina), resultando na polimerização de proteínas. Ao contrário da maioria das enzimas que hidrolisam o substrato em pequenos compostos, como amilases e proteases, a transglutaminase catalisa a polimerização de pequenos substratos proteicos em moléculas maiores (JAROS et al., 2006).

A transglutaminase é altamente ativa na faixa de pH de 5 a 8. A atividade desta enzima permanece estável até aproximadamente 50°C, sendo reduzida gradualmente em temperaturas mais elevadas, porém, o tempo e a temperatura necessários para sua inativação são dependentes de cada tipo de produto (ALMEIDA, 2012). É utilizada na indústria alimentícia na elaboração de produtos reestruturados de carne, permitindo a junção de cortes diversos e melhoramento da textura, na redução de sódio em alimentos, na indústria láctea, provomendo aumento da viscosidade devido às ligações cruzadas formadas entre os aminoácidos, nos farináceos reduzindo a perda de líquidos e consequentemente reduz o tempo de batimento de massas e gera um aumento em (PIETRASIK, 2003). Por promover a reticulação entre proteínas, estudos vem sendo realizados utilizando a enzima transglutaminase na produção de filmes a base de proteínas.

Os filmes à base de proteínas apresentam barreiras efetiva a gases (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>), porém com alta permeabilidade ao vapor de água em função do seu caráter hidrofílico, o que limita sua aplicação. Uma das formas de reduzir a permeabilidade e a solubilidade em água de filmes de gelatina é por meio do processo de reticulação (BHATTACHARYA et al., 2008). Este processo promove a união de duas ou mais cadeias poliméricas por meio de uma ponte de átomos entre elas, todos ligados por ligação covalente (CANEVAROLO, 2006). Dentre os diferentes processos de reticulação existentes, há estudos sendo realizados com a gelatina por via enzimática, no qual a enzima transglutaminase foi usada em alguns trabalhos descritos na literatura (CARVALHO e GROSSO, 2006; ZHANG et al., 2013).

Modificações funcionais decorrentes do aumento de ligações cruzadas foram estudadas por Sakamoto et al. (1998), onde foi observado que géis de proteína isolada de soja, proteína do ovo e gelatina, tiveram um aumento da força de ruptura com adição da enzima transglutaminase. Em estudos realizados por Yildirim e Hettiarachchy (1997), foi verificado que para filmes proteicos à base de proteína isolada de soja e globulina, o tratamento com a enzima transglutaminase provocou diminuição da solubilidade dos filmes em diferentes

valores de pH e aumento na tensão na ruptura, indicando a introdução de ligações covalentes na estrutura proteica.

Carvalho e Grosso (2006) produziram filmes de gelatina com glicerol, 10 g de gelatina e 4,5 g de glicerol por 100 g de solução filmogênica, os quais foram tratados enzimaticamente (TGase, 10 U/g de gelatina) e termicamente. Os autores observaram os filmes reticulados com TGase a 50°C apresentaram permeabilidade de vapor de água significativamente inferior aos filmes não tratados e aos termicamente tratados. Segundo os mesmos, esse resultado pode ser atribuído a uma melhor estruturação da matriz polimérica promovida pelo tratamento enzimático. No entanto, em estudo similar, Piotrowska et al. (2008) constataram que a reticulação enzimática da gelatina de pele de peixe não ocasionou melhorias nas propriedades de barreira a vapor de água dos filmes produzidos, porém houve redução expressiva na solubilidade.

Segundo Weng e Zheng (2015) em que sugerem que filmes de gelatina de peixe tratados com TGase e incorporados com proteína isolada de soja, tendem a ter maior resistência a solubilização em água. Contudo, as propriedades mecânicas dos filmes foram substancialmente alteradas apenas devido ao efeito de reticulação da enzima, sendo que a proteína isolada de soja não afetou tal propriedade. Wang et al. (2015) estudaram a possibilidade de produção de um filme com potencial aplicação para embalagens biodegradáveis, composta por gelatina e carbonato de cálcio, no qual a TGase foi o agente de reticulação utilizado. Os autores observaram por meio de análises térmicas, microscopia e infravermelho, que a enzima realizou a compatibilização dos dois materiais e alterações conformacionais na estrutura da proteína.

### **3.6.3 Agente antifúngico quitosana**

A quitosana é um polissacarídeo linear catiônico derivado da quitina, um componente presente em cascas de camarão, caranguejo e insetos. É insolúvel em água e o segundo polímero natural mais abundante depois de celulose (AIDER, 2010). É obtida pela desacetilação da quitina, com a substituição de grupos acetilas ( $\text{COCH}_3$ ) por grupos aminos livres ( $\text{NH}_2$ ) que podem ser protonados em meio ácido ( $\text{NH}_3^+$ ) fazendo com que a quitosana seja solúvel em soluções ácidas, tais como ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido

lático, ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido adípico e ácido propiônico (ZHONG et al., 2011).

Os filmes a base de quitosana apresentam moderadas propriedades de barreira ao oxigênio e boas propriedades de barreira ao dióxido de carbono, além de apresentarem alta permeabilidade ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica (SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2010). Além disso, a quitosana e seus derivados apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica contra uma vasta gama de microrganismos e são amplamente estudados como conservantes de alimentos (BONILLA et al., 2013). Sua atividade antimicrobiana aumenta com a diminuição do pH, porém depende da força iônica e de alguns fatores intrínsecos, tais como sua massa molar ou o grau de desacetilação. Comercialmente, a quitosana apresenta um grau de desacetilação variando entre 70% e 90% e a massa molar na faixa de  $10^4 - 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. A quitosana na menor faixa de massa molar é mais solúvel, sendo mais reativa com a membrana celular microbiana (CORRALES et al., 2014).

#### **3.6.4 Plastificantes em filmes poliméricos**

Filmes biopoliméricos obtidos exclusivamente a partir de proteínas apresentam geralmente baixa elasticidade e são quebradiços e a introdução de plastificantes é uma alternativa para conferir uma maior elasticidade ao sistema. Os plastificantes são geralmente substâncias de alto ponto de fusão e baixa volatilidade, que devem ser compatíveis com o biopolímero para garantir sua eficiência, interagem com a interface do polímero, enfraquecendo as forças intermoleculares, ocasionando maior mobilidade às cadeias formadoras da matriz polimérica e conseqüentemente, aumentando a flexibilidade dos filmes (SCHROOYEN et al., 2001).

Os plastificantes mais empregados na produção de filmes à base de proteínas são os polióis, tais como o glicerol e o sorbitol, que possuem boa interação com o polímero devido a sua estrutura e seu caráter hidrofílico. O aumento do teor de plastificantes como o glicerol pode levar ao aumento da permeabilidade aos gases de filmes hidrofílicos. Diminuindo a densidade entre as suas moléculas, facilitando a difusão dos gases por meio do material, aumentando a flexibilidade, a processabilidade ou capacidade de alongamento do polímero,



reduzindo a viscosidade do fundido, a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do sistema e o módulo de elasticidade do mesmo (MARCILLA et al., 2009).

Conforme Arrieta et al. (2011) em estudos sobre biofilmes ativos a partir de proteínas do leite, com diferentes concentrações de glicerol, verificaram por microfotografias que, somente a partir de 35% de glicerol a aparência dos biofilmes ficou mais homogênea, além de produzir uma redução significativa no módulo de Young, indicando uma diminuição na rigidez do material, comportamento esperado em um processo de plastificação.

Estudo conduzido por Bergo et al. (2013), demonstraram o efeito do tipo e concentração de alguns polióis (glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol e propilenoglicol) sobre a umidade de filmes de gelatina. Observou-se que os filmes contendo glicerol absorveram mais água que os filmes com os demais plastificantes, o que pode ser atribuído à alta higroscopicidade natural deste poliól. Fakhour et al. (2012), desenvolveram filmes comestíveis e biodegradáveis a partir de blendas de amido e gelatina, aos quais inseriram dois plastificantes, sorbitol e glicerol. Os autores constataram que o aumento na concentração de gelatina ocasionou um aumento na transparência, resistência à tensão e permeabilidade ao vapor de água. E ambos os polióis contribuíram para o aumento da elongação, permeabilidade e solubilidade dos filmes estudados.

Para Scopel (2016) filmes produzidos com gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III em associação ao amido de milho, com o emprego dos plastificantes glicerol e sorbitol, promoveram o aumento no alongamento na ruptura, a redução na resistência máxima à tração e tornou o filme mais higroscópico, sendo que o glicerol se mostrou um agente plastificante mais efetivo do que o sorbitol.

Plastificantes como o glicerol são capazes de garantir boa qualidade no filme biodegradável a ser produzido. Sua adição é necessária, visto que atuam de forma a diminuir a fragilidade, melhorar a flexibilidade, aumentar a resistência ao impacto e impedir as rachaduras dos filmes (GROSSMAN, 2007).

Filmes de gelatina comercial e de gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III com adição de agentes reticulantes, plastificantes e agentes antifúngicos configuram-se uma alternativa aos filmes obtidos de fonte não renovável, visando reduzir os impactos ambientais decorrentes do uso e descarte inadequado desses materiais.

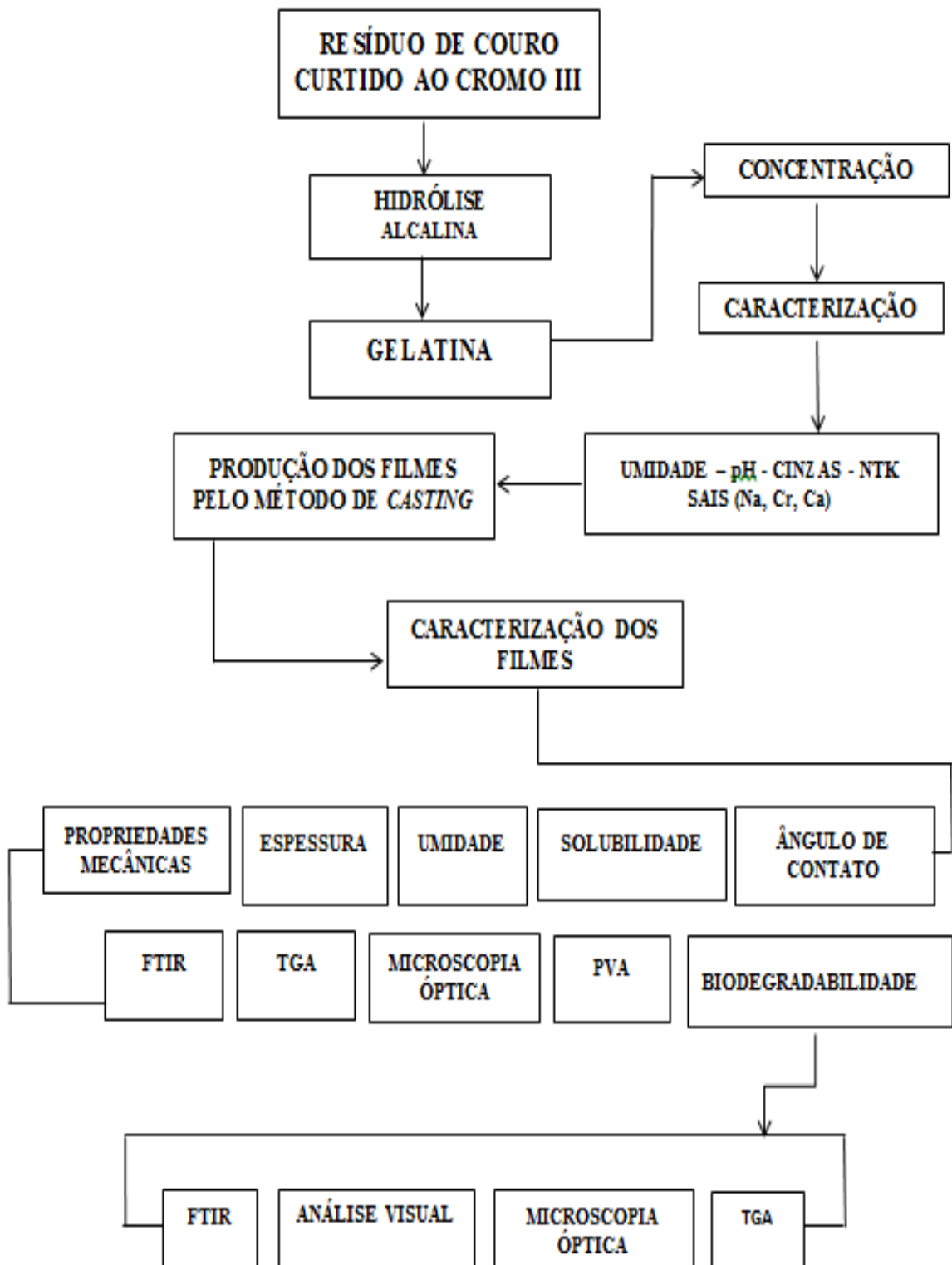
## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

Os materiais utilizados para produção dos filmes foram: gelatina comercial incolor em pó sem sabor (Dr. Oetker, SP) como matriz polimérica, glicerol (Cinética, Brasil) como plastificante, enzima transglutaminase, cedida pela (Ajinomoto do Brasil, Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, SP) comercializada como ACTIVA® YG, quitosana (Sigma, Brasil) e água como solvente. O resíduo de couro curtido ao cromo III fornecido pelo curtume Peles Pampa (Portão-RS, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### **4.2 MÉTODOS**

A Figura 8 apresenta o procedimento empregado neste trabalho desde a extração da gelatina até a produção e caracterização dos filmes.



**Figura 8.** Esquema do processo de extração de gelatina, produção e caracterização dos filmes.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Os materiais utilizados para produção dos filmes foram caracterizados quanto a atividade da enzima transglutaminase, para avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática. O resíduo do couro foi caracterizado quanto ao pH, umidade, cinzas, teor de cromo.

As análises termogravimétricas foram realizadas para a gelatina comercial, gelatina extraída do resíduo do couro curtido ao cromo III, quitosana, glicerol e enzima transglutaminase.

O teor de cromo, sódio, cálcio, magnésio e a determinação de NTK, cinzas, umidade e pH foram determinados para a gelatina comercial e para a gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo III.

#### 4.3.1 Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul (LPOL– UCS). Os testes de TG foram conduzidos utilizando uma termobalança da marca TGA Shimadzu-50. Alíquotas de 10 mg das amostras foram submetidas a uma taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de 20 a  $700^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os ensaios de FTIR foram realizados no Laboratório de polímeros de Caxias do Sul (LPOL– UCS), em um espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (Modelo Spectrum 400, Perkin Elmer). O equipamento foi operado no modo de reflexão total atenuada (ATR) utilizando cristal de diamante. Foram realizadas 32 varreduras com uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  na faixa de comprimento de onda de  $450$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3.3 Atividade da enzima transglutaminase

A metodologia foi adaptada de Grossowicz et al. (1950). Para determinação da atividade enzimática da enzima transglutaminase foi utilizada uma solução  $3 \text{ g.L}^{-1}$  da enzima transglutaminase. O reagente “A” foi preparado com tampão Tris-acetato 200 mM e pH 6,0 contendo 100 mM de hidroxilamina, 10mM de glutationa reduzida e 30 mM de substrato CBZ-Gln-Gly. O Reagente “B” continha: solução 1:1:1(v/v/v) de HCl 3 mol/L, ácido tricloroacético 12% m/v e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5% dissolvido em HCl 0,1 mol/L. Em 1,0 mL de extrato enzimático adicionou-se a mesma quantidade de reagente “A”. Após a homogeneização incubou-se por 10 min a  $37^\circ\text{C}$  e interrompeu-se a reação adicionando 1,0 mL do reagente “B”. Procedeu-se a leitura da amostra em espectrofotômetro (VIS ESPECTROPHOTOMETER) a 525 nm. A curva-padrão foi feita com ácido L-glutâmico- $\gamma$ -monohidroxâmico. Uma unidade de atividade enzimática TGase foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar  $1,0 \mu\text{mol}$  de hidroxamato por minuto.

#### 4.3.3.1 Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática

Diferentes valores de pH (6 a 8) foram avaliados a fim de determinar o ponto de maior atividade da enzima. Foi avaliado o efeito da temperatura e a estabilidade térmica da atividade enzimática. O efeito da temperatura foi avaliado em temperaturas de  $37$ ,  $50$  e  $60^\circ\text{C}$ . Para a determinação da estabilidade térmica, utilizou-se pH 7 e as soluções enzimáticas foram expostas a temperatura de  $50^\circ\text{C}$  durante 0, 15, 30, 45 min.

### 4.3.4 pH

O pH do resíduo do couro curtido ao cromo III foi determinado de acordo com norma da American Society for Testing and Materials (ASTM) D2810-13. Uma alíquota de 5 g de amostra foi misturada a 100 mL de água deionizada. A mistura foi mantida à temperatura ambiente, com ocasional agitação por 4 h. Após este tempo o sistema teve seu pH determinado. O pH da gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III foi determinado no dia da sua extração, antes da sua refrigeração; o da gelatina comercial foi

determinado logo após sua diluição. Todas as medições de pH foram realizadas a temperatura de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  com o auxílio de um pHmetro de bancada (modelo 86502, AZ, Taiwan).

#### **4.3.5 Umidade**

O teor de umidade do resíduo do couro curtido ao cromo III foi determinado de acordo com a norma ASTM D3790-2012. Alíquotas de 5 g foram secas a  $100^\circ\text{C}$  em estufa (modelo A35ED, DeLeo, Brasil) até massa constante. A medição da massa das amostras em balança analítica (modelo AUY220, Shimadzu, Japão), antes e após a secagem, permitiu a determinação do teor de umidade das mesmas. Metodologia semelhante foi empregada na medição do teor de umidade da gelatina, ajustando-se apenas a temperatura de secagem para  $105^\circ\text{C}$ , conforme metodologia indicada por Cabeza et al. (1998).

#### **4.3.6 Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a norma ASTM D2617-2012. Alíquotas de aproximadamente 5 g de amostra previamente secas foram submetidas a  $600^\circ\text{C}$  em forno do tipo mufla (modelo 1963, Fornitec, Brasil) por 4 h. A medição da massa das amostras em balança analítica (modelo AUY220, Shimadzu, Japão) antes e após terem sido calcinadas permitiu a determinação do teor de cinzas, em base seca. Metodologia semelhante foi empregada na medição do teor de cinzas da gelatina, ajustando-se apenas o tempo do ensaio para 2 h.

#### **4.3.7 Cromo, sódio, cálcio e magnésio**

O teor de cromo, sódio, cálcio e magnésio na gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III foi determinado pelo Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais da Universidade de Caxias do Sul (LAPAM – UCS). As amostras foram digeridas com ácido nítrico e clorídrico de acordo com o Método 3030-E do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (SMEWW). Após a digestão, o ensaio foi realizado em espectrômetro

de absorção atômica (modelo Analyst 200, Perkin Helmer, EUA) com chama de ar-acetileno segundo o Método 3111-B do SMEWW.

#### **4.3.8 Teor de cromo**

Para a determinação do teor de cromo nos filmes, amostras previamente secas foram submetidas à digestão com ácido nítrico em chapa de aquecimento por 2 h, de acordo com a norma ASTM D5198-09. A concentração de cromo na solução resultante da digestão foi determinada no LAPAM-UCS seguindo a mesma metodologia empregada para a determinação de cromo na gelatina (SMEWW Método 3111-B).

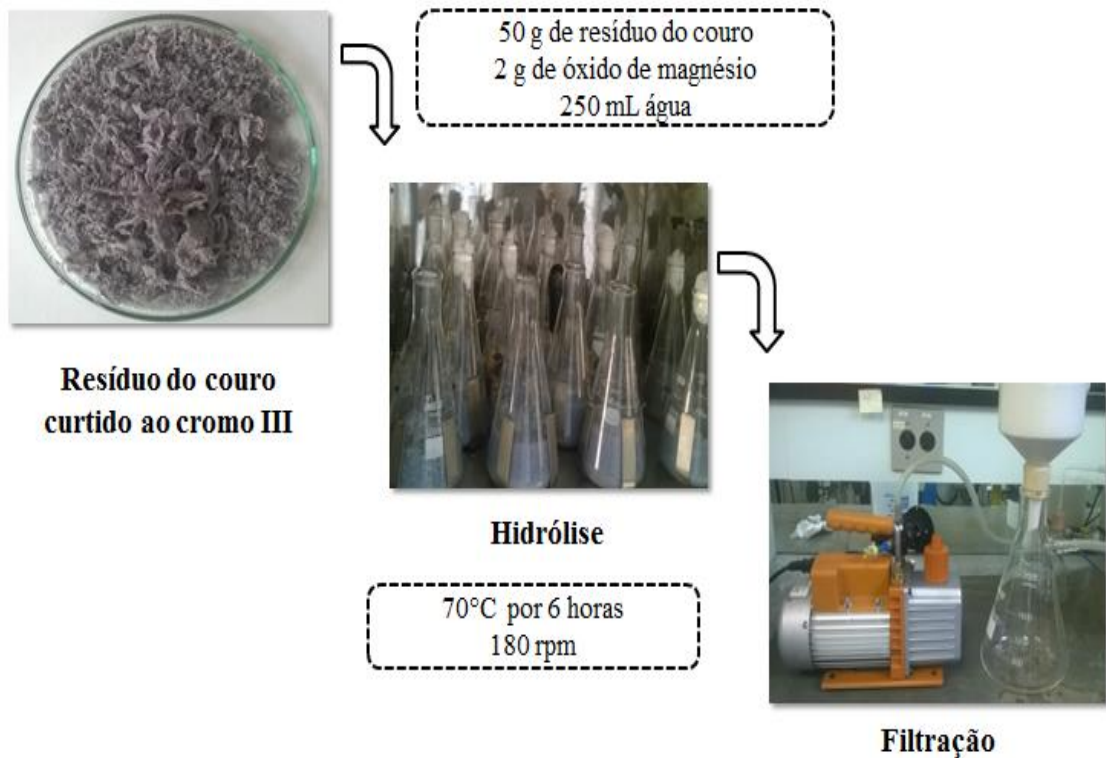
#### **4.3.9 Proteína (Nitrogênio Total Kjeldahl – NTK)**

O teor de NTK da gelatina comercial e extraída dos resíduos do couro curtido ao cromo foi determinado no Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais (LAPAM-UCS). Para tal, foi empregado o método para determinação do Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) de acordo com a metodologia de ensaio do SMEWW 4500. Este procedimento consiste na digestão das amostras com a utilização de ácido sulfúrico concentrado, e posterior destilação e titulação com ácido.

### **4.4 EXTRAÇÃO DA GELATINA DO RESÍDUO DE COURO CURTIDO AO CROMO III**

A gelatina foi extraída por hidrólise alcalina (Figura 9), conforme metodologia de Scopel (2015). A hidrólise foi conduzida em um *shaker* (câmara incubadora com agitação orbital) (MA 832, Marconi, Brasil) durante 6 horas, usando uma proporção de 2 g de MgO para cada 50 g de resíduo de couro curtido ao cromo, em 250 mL de água destilada, em um frasco Erlenmeyer a uma temperatura de 70°C e 180 rpm de agitação.

Após realizada a extração, a suspensão de gelatina foi concentrada em uma membrana de diálise, que também promoveu a retirada dos sais, provenientes do processo de curtimento, mantendo a concentração de NKT próxima a da gelatina comercial, utilizada neste trabalho. A membrana tinha configuração capilar e é fabricada pela Polyflux ®.

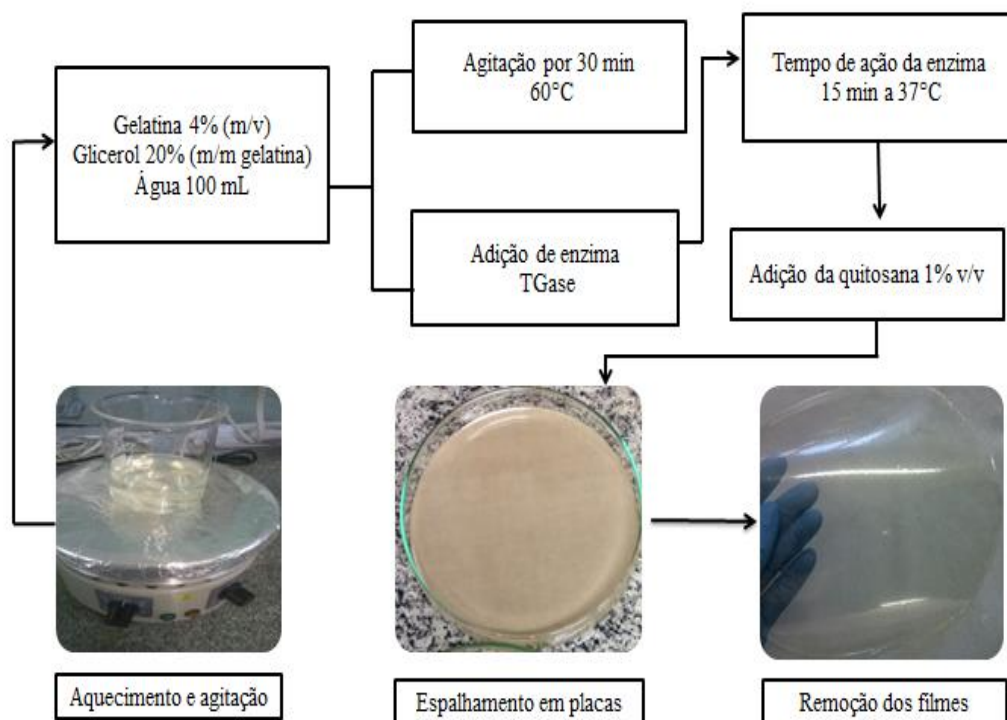


**Figura 9.** Esquema de extração da gelatina do resíduo do couro curtido ao cromo III por hidrólise alcalina.

#### 4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES

A produção foi realizada em três etapas, cada qual compreendendo um diferente planejamento experimental. Diferentes aspectos da produção de filmes foram avaliados em cada etapa, conforme descrito na Figura 10.





**Figura 10.** Fluxograma de produção de filmes biopoliméricos a partir de gelatina comercial e gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III.

A produção dos filmes transcorreu em três etapas: a primeira consiste em um planejamento experimental visando analisar a melhor concentração de gelatina e de enzima transglutaminase bem como, o tempo de reticulação da enzima nas propriedades de solubilidade e propriedade mecânica de tensão e alongação dos filmes poliméricos.

*Planejamento experimental 1.* Os filmes foram produzidos solubilizando-se a gelatina comercial na concentração de 2, 4 e 6% (m/v) em 100 mL de água destilada, com adição do plastificante glicerol com concentração de 20% m/v sobre a massa de gelatina, com aquecimento a uma temperatura de 60°C sob agitação por 30 min. Paralelamente a enzima transglutaminase foi solubilizada em água, na concentração de 1 e 2% (m/v) sobre a massa de gelatina e adicionada à dispersão filmogênica. Transcorrido o tempo de 30 min a temperatura foi baixada para 37°C onde a enzima é adicionada emantida em aquecimento e agitação pelos tempos de 15, 22,5 e 30 minutos. A quitosana foi adicionada no final a uma concentração de 1% v/v. A espessura dos filmes foi controlada utilizando-se 90 mL da dispersão, vertida em

placas Petri (19,5 x 2,5) e secas em ambiente com condições controladas ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade de 50%) por 48 h, para evaporação do solvente e remoção dos mesmos. Para amostra controle, foram produzidos filmes poliméricos sem adição de enzima. A Tabela 2 apresenta o planejamento experimental 1 de produção dos filmes, consiste em um planejamento do tipo  $2^k$  com 3 fatores e duas repetições no ponto central.

**Tabela 2.** Planejamento experimental 1 para produção dos filmes.

<b>Filme</b>	<b>Gelatina (%)</b>	<b>Enzima (%)</b>	<b>Tempo (min)</b>
1	2,00	0,00	15
2	6,00	0,00	15
3	2,00	2,00	15
4	6,00	2,00	15
5	2,00	0,00	30
6	6,00	0,00	30
7	2,00	2,00	30
8	6,00	2,00	30
9 (C)	4,00	1,00	22,5
10	2,00	0,00	15
11	6,00	0,00	15
12	2,00	2,00	15
13	6,00	2,00	15
14	2,00	0,00	30
15	6,00	0,00	30
16	2,00	2,00	30
17	6,00	2,00	30
18 (C)	4,00	1,00	22,5

\*(C) ponto central.

As variáveis respostas avaliadas no planejamento experimental 1 foram: solubilidade e propriedades mecânicas (alongamento máximo na ruptura, tensão máxima na ruptura). Todos os filmes foram produzidos em duplicatas.

A segunda etapa consiste na produção dos filmes de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa, onde foram utilizadas concentrações de 4% de gelatina, e variadas as concentrações de enzima transglutaminase de 1 e 5%, sendo o tempo de reticulação da enzima mantido em 15 min.

A terceira etapa consiste na produção dos filmes utilizando a gelatina extraída do resíduo de couro curtido ao cromo III, onde foram variadas as concentrações de enzima de 1 e 3%.

Os resultados dos filmes obtidos nas etapas 1, 2 e 3 foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA). A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software Statistica 12.0 (StatSoft Inc.). Foi empregado um nível de confiança de 95% em todas as análises estatísticas. O resultado destas foi avaliado em função do Valor-p obtido. Valores-p inferiores a 0,05 indicam a significância estatística do fator, quanto menor o Valor-p, maior a alteração provocada pelo fator na correspondente variável estudada.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, propriedades mecânicas, umidade, solubilidade, ângulo de contato e permeabilidade ao vapor d' água, teor de cromo e biodegradabilidade.

##### 4.6.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada por meio de um micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Mitutoyo, Japão). Foram realizadas dez medidas em pontos localizados nas extremidades e no centro dos filmes, a partir disto, calculou-se a média aritmética expressa em mm.

#### 4.6.2 Propriedades mecânicas

A determinação das propriedades mecânicas dos filmes, tensão e alongamento máximo na ruptura foram realizadas em máquina universal (Emic, Modelo DL2000, Brasil) sendo submetidos a uma taxa de separação de 25 mm.min<sup>-1</sup> com célula de carga com capacidade de 20 kN. Para cada filme foram cortados quatro corpos de prova retangulares de 2 x 10 cm de acordo com a ASTM D882-12. Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul (LPOL – UCS).

#### 4.6.3 Solubilidade

A determinação do percentual de material solúvel em água foi realizada conforme método descrito por Cuq et al. (1997), com algumas adaptações. Amostras quadradas de 2 x 2 cm foram secas em estufa (Modelo A35ED, DeLeo, Brasil), a 70°C por 24 horas. Posteriormente, foram pesadas em balança analítica (Modelo AUY220, Shimadzu, Japão) para determinação da massa inicial. Após foram imersas 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação por 24 h a 80 rpm a 25°C em um banho termostático (Modelo 501/1D, Nova Era, Brasil). Transcorrido este período, as amostras foram retiradas da água e secas em estufa durante 24 h a 70°C e pesadas para obtenção da massa final. Os testes foram realizados em quintuplicata. A solubilidade foi determinada através da equação 1.

(1)

$$\%S = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Onde, S é a solubilidade do filme (%),  $m_i$  a massa inicial do filme (g) e  $m_f$  a massa final do filme (g), após a imersão na água.

#### 4.6.4 Permeabilidade ao vapor d' água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com o método descrito na norma ASTM E96-00. Em recipientes plásticos com 3,5 cm de diâmetro de

abertura foram colocados 10 g de sílica gel. A abertura do recipiente foi coberta com amostras dos filmes. O sistema foi colocado em atmosfera controlada com 75% de umidade, por meio de solução saturada de cloreto de sódio.

O conjunto foi pesado a cada 1 h durante 10 h. Todas as medições de massa foram realizadas utilizando uma balança analítica (Modelo AUY220, Shimadzu, Japão). Os testes foram realizados em quintuplicata. A PVA será calculada de acordo com a equação 2.

(2)

$$PVA = \frac{E}{A(\Delta P)} \times M$$

Onde,  $PVA$  é a permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2$  hora kPa),  $E$  é a espessura média do filme (mm),  $A$  é a área de permeação ( $\text{m}^2$ ),  $\Delta P$  é a diferença de pressão parcial do vapor de água através do filme (kPa) e  $M$  é a taxa de umidade absorvida (g/tempo).

#### 4.6.5 Umidade dos filmes

Para a umidade dos filmes com e sem incorporação da enzima transglutaminase, foram pesadas em uma balança analítica (Modelo AUY220, Shimadzu, Japão) amostras com tamanho 4x4 cm e secas em estufa (Modelo A35ED, DeLeo, Brasil) a 70°C por 24 horas. Posteriormente as amostras foram pesadas para determinação da massa final. A umidade foi realizada em triplicata e calculada de acordo com a equação 3.

(3)

$$\%U = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Onde,  $U$  é a umidade do filme (%),  $m_i$  é a massa inicial da amostra (g) e  $m_f$  a massa seca final da amostra (g).

#### 4.6.6 Ângulo de contato

As amostras foram segmentadas em retângulos (2 x 5 cm) e mantidas em ambiente controlado ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade de 50%) por 24 h antes da análise. As condições

experimentais foram: temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), água destilada como fluido de referência. As análises foram feitas sobre a superfície superior do filme. Como resultado da medida, considerou-se a média entre os ângulos direito e esquerdo da gota, o ensaio foi realizado em triplicata, o gotejamento foi feito em três regiões distintas da amostra.

#### **4.6.7 Termogravimetria**

A termogravimetria dos filmes foi realizada em instrumento de análise térmica simultânea (Modelo Jupiter 449, Netzsch, Alemanha). Alíquotas de 10 mg das amostras, mantidas por 2 dias em dessecador antes da análise, foram submetidas a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio ( $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de 20 a  $700^\circ\text{C}$ .

#### **4.6.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**

Os ensaios de FTIR foram realizados no Laboratório Polímeros da Universidade de Caxias do Sul (LPOL – UCS), em um espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (Modelo Spectrum 400, Perkin Elmer). O equipamento foi operado no modo de reflexão total atenuada (ATR) utilizando cristal de diamante. Foram realizadas 32 varreduras com uma resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$  na faixa de comprimento de onda de 450 a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram mantidas 2 dias em dessecador antes de serem analisadas.

#### **4.6.9 Microscopia óptica**

Os filmes foram avaliados por microscopia óptica empregando-se microscópio trinocular com óptica infinita plana (TNB-40T-PL, Opton) com aumento de 100 vezes.

#### **4.6.10 Teor de cromo**

Para a determinação do teor de cromo nos filmes, amostras previamente secas foram submetidas à digestão com ácido nítrico em chapa de aquecimento por 2 h, de acordo com a norma ASTM D5198-09. A concentração de cromo na solução resultante da digestão foi

determinada no LAPAM-UCS seguindo a mesma metodologia empregada para a determinação de cromo na gelatina (SMEWW Método 3111-B).

#### 4.7 DEGRADAÇÃO DOS FILMES

A avaliação da suscetibilidade microbiológica dos filmes foi realizada de acordo com a norma ASTM G 160-03. O solo simulado utilizado para a avaliação da degradação dos filmes foi preparado a partir da mistura de 4 kg de solo fértil, 4 kg de areia grossa e 4 kg de esterco de cavalo, totalizando 12 kg de substrato.

O esterco de cavalo foi coletado junto ao Posto Policial de Cavalaria Montada, na Universidade de Caxias do Sul, apresentava o aspecto úmido e aglomerado. A mistura dos três substratos, areia grossa, solo fértil e esterco de cavalo, foi realizada com auxílio de uma betoneira da marca Horbach. O esterco de cavalo foi triturado, a terra e a areia grossa foram peneiradas, utilizando uma peneira de 3,5 *mesh* e novamente pesadas para que a massa final ficasse em 4 kg.

Após o processo de mistura e homogeneização, o solo simulado foi armazenado por um período de 3 meses, em condições de temperatura ambiente (25°C) para a maturação. O controle de umidade foi realizado periodicamente, durante todo o experimento, segundo a norma ASTM G 160-03 a umidade deve ser mantida entre 20 e 30%.

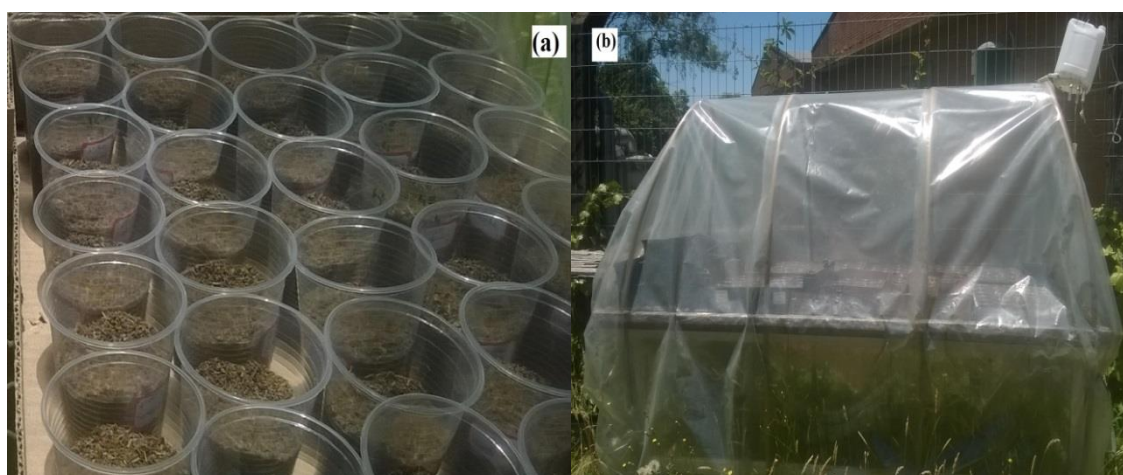
De acordo com a norma ASTM G 160-03, o solo simulado encontra-se em condições ideais para avaliar a suscetibilidade microbiológica quando amostras de tecido 100% algodão (dimensões de 100 x 20 mm) com gramatura entre 400 e 475 g.m<sup>-2</sup> (Figura 11) enterradas no solo perderem ao menos 50% da resistência à tração na ruptura após cinco dias de exposição.



**Figura 11.** Corpos-de-prova do algodão para testar a eficácia do solo simulado.

Os ensaios de resistência à tração dos tecidos 100% algodão, antes e após a exposição ao solo simulado, foram realizados em uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000, 50 conforme norma ASTM D882, com célula de carga de 200 kgf, com extensômetro interno e velocidade de  $50 \text{ mm.min}^{-1}$ . Nesse experimento foram utilizados 5 corpos-de-prova para cada ensaio.

As amostras dos filmes submetidas à avaliação foram cortadas nas dimensões de 2 x 2 cm, em triplicata. O solo utilizado nesse experimento foi dividido em partes iguais (40 g) e distribuído em copos transparentes de polipropileno (PP) de 200 mL cada, onde as amostras foram incubadas por um período de até 2 dias, dentro de uma estufa construída na parte externa da Universidade de Caxias do Sul (Figura 12).



**Figura 12.** Amostras dos filmes (a) dispostas dentro dos copos (b) dispostas na estufa.

As amostras foram retiradas com o auxílio de espátulas e pinças. Cada amostra foi lavada com água destilada. As amostras dos filmes foram retiradas nos tempos de 1, 3, 8 e 12 horas de exposição do solo.



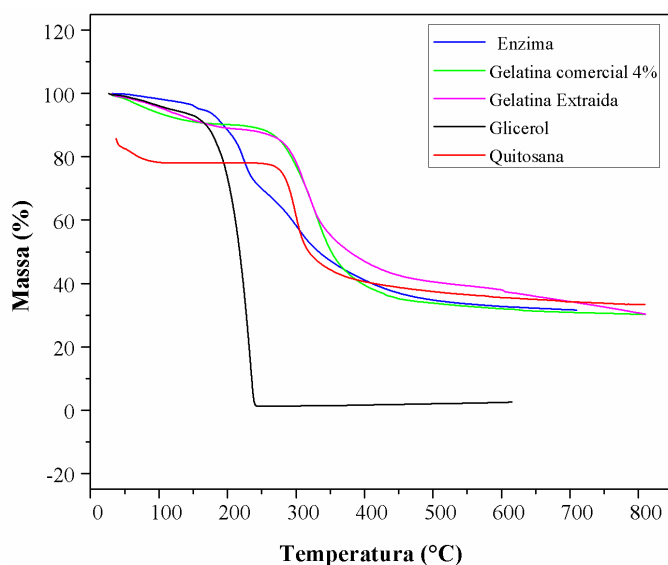
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, tem-se a caracterização dos materiais (glicerol, enzima transglutaminase, quitosana e gelatina), planejamento experimental para produção dos filmes e caracterização dos filmes e biodegradabilidade dos filmes.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

#### 5.1.1 Termogravimetria

A TG é baseada no estudo da variação de massa de certa amostra, resultante de uma transformação física como a sublimação, evaporação ou condensação, ou química, como a degradação, decomposição ou oxidação, em função do tempo ou da temperatura da análise. Desta forma, a TG é definida como um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma substância ou material em função da temperatura e/ou tempo (MOTHÉ, 2002). A Figura 13 apresenta as curvas TG para as matérias primas utilizadas na produção dos biofilmes.

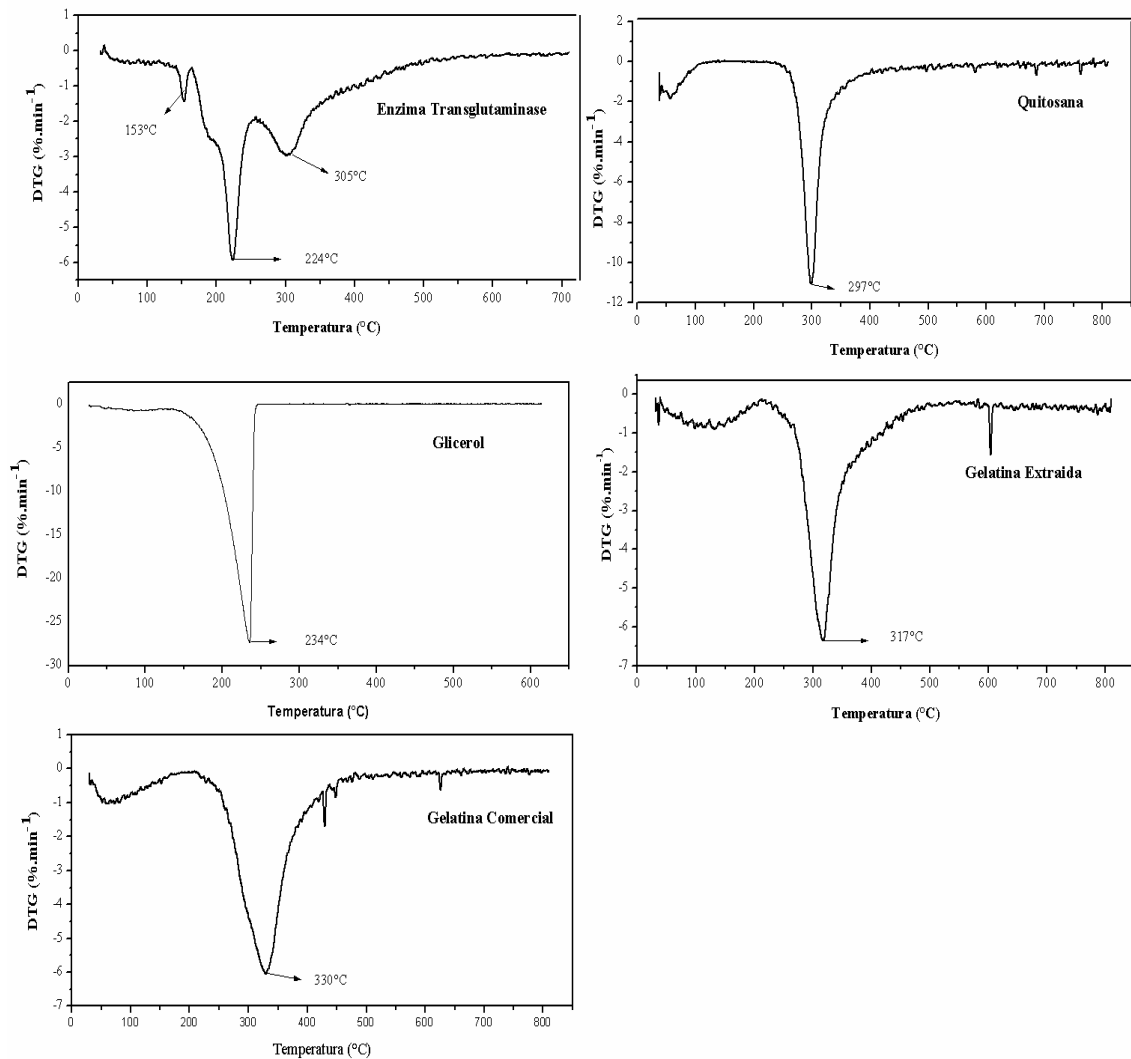


**Figura 13.** Curva TG para matérias primas utilizadas na produção dos filmes.

É possível observar que para todas as curvas há um primeiro evento, que caracteriza perda de massa, relativa à perda de umidade e, em seguida, o início da degradação.

A gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III apresentou massa residual de 50% em comparação a gelatina comercial de 56%. A menor massa residual da gelatina extraída pode estar associada ao fato da mesma ter passado pelo processo de concentração por diálise, que promoveu a remoção de uma maior quantidade de compostos inorgânicos e impurezas presentes na gelatina, provenientes tanto do processo de curtimento (sais de sódio e cálcio, entre outros), como da extração da gelatina (MgO).

A Figura 14 apresenta as curvas DTG para a matéria prima utilizada na produção dos filmes.



**Figura 14.** Curvas DTG das matérias primas utilizadas na produção dos filmes.

As curvas DTGs permitem a identificação dos eventos térmicos que ocorrem com os materiais na termogravimetria. Com relação às matérias-primas, o glicerol se degrada à 234°C em um único evento de perda de massa, o que está de acordo com valores reportados por outros autores (LUO et al., 2013). Na quitosana verificou-se a degradação em 297°C. A enzima transglutaminase apresentou três eventos de perda de massa, a primeira em 153°C, a segunda em 224°C e a terceira em 305°C.

A curva de DTG permite a determinação rápida da temperatura em que a velocidade de perda de massa apresenta um máximo e isto promove uma informação adicional para a extrapolação de temperatura inicial e da temperatura final (HATAKEYAMA, 1994).

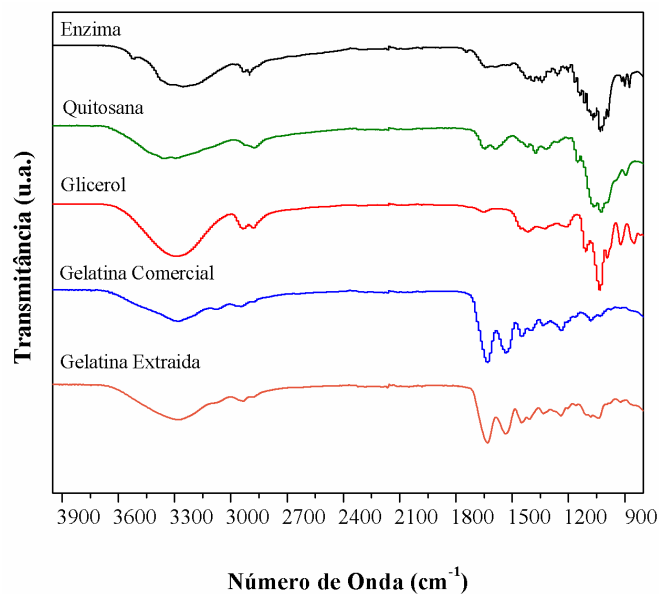
As DTGs da gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III e da gelatina comercial mostram um evento de perda de massa próximo aos 100°C, provavelmente relacionado à perda de moléculas de água presentes na amostra. A gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III degradou a 317°C, valor próximo aos 330°C nos quais a gelatina comercial degradou. Ambos os valores estão de acordo com a temperatura de degradação da gelatina comercial reportada por outros autores (LIU et al., 2013).

Em estudos realizados por Scopel (2016) a gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III degradou a 319°C, valor próximo aos 317°C nos quais a gelatina comercial degradou.

Os valores de temperatura evidenciados na análise de termogravimetria indicaram que, a matéria prima, não sofreu degradação nas temperaturas utilizadas para a produção dos filmes biodegradáveis.

### **5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**

Na Figura 15 estão contidos os espectros de infravermelho dos componentes puros utilizados na produção dos filmes.



**Figura 15.** Espectros de FTIR para matéria prima de produção dos filmes.

A enzima transglutaminase apresenta bandas na região de 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao grupo (CO-NH<sub>2</sub>) amina. Na região de 1040 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao grupo amida (VEIGA, 2014).

Para a quitosana as bandas de absorção características da amida, nas regiões de 1655  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C=O, conhecida como banda de amida I; 1561  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a deformação N-H, banda de amida II e 1315  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à deformação CONH e ao grupo CH<sub>2</sub>, que acontecem à mesma frequência. Essa última banda tem sido denominada banda de amida III, devido à deformação do grupo CO-NH. A banda aguda a 1377  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à deformação simétrica do CH<sub>3</sub>. A banda em 3272  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento N-H, e a observada a 3463  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento O-H (SANNAN et al., 1978).

O espectro de infravermelho do glicerol apresentou uma banda na região de alto número de onda de 3280  $\text{cm}^{-1}$  característica da deformação axial simétrica e assimétrica do grupo hidroxila OH.

Através do espectro de FTIR das amostras de gelatina pura e extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, foram observadas bandas larga em 3282  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação O-H, enquanto a banda em 2940  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação C-H em cadeias alifáticas, ambas presentes na constituição dos aminoácidos. Essa banda presente na gelatina comercial foi deslocada para 2936  $\text{cm}^{-1}$  para a gelatina extraída.

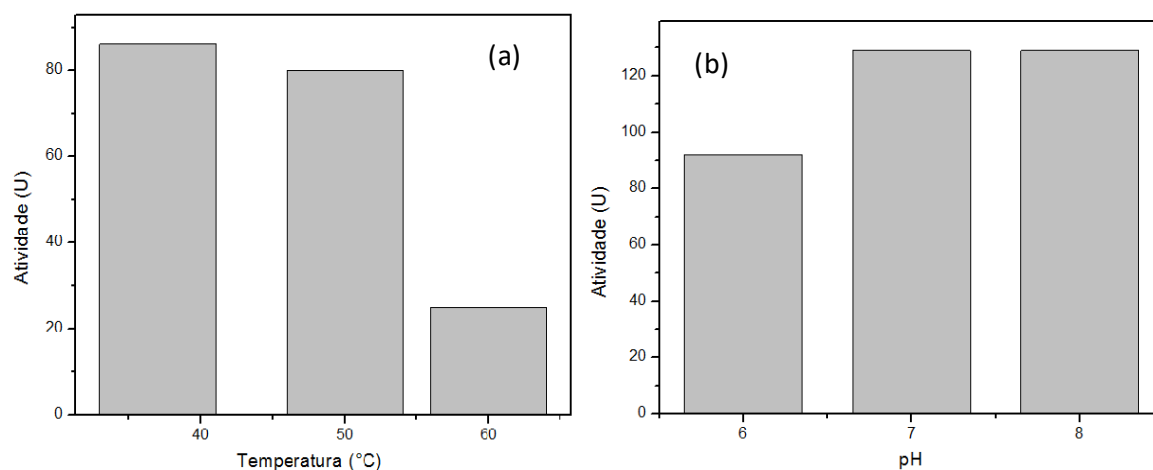
Também pode ser observadas as bandas de absorção específica para a amina NH em  $3285\text{ cm}^{-1}$ , amida I em  $1631\text{ cm}^{-1}$  e amida II  $1480\text{ cm}^{-1}$ . Pela técnica foi possível observar um pequeno aumento na intensidade das bandas em algumas regiões para a gelatina extraída quando comparada com a gelatina comercial. As bandas presentes em  $1630\text{ cm}^{-1}$ ,  $1532\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  correspondem, á deformação simétrica da ligação N-H e ao estiramento da ligação C=O no carboxilato (SKOOG, 2000).

## 5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 5.2.1 Efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática

Diversos fatores afetam as reações catalisadas pelas enzimas, dentre os quais se destacam: a concentração da enzima, a concentração de substratos, temperatura e pH. A análise de todos esses fatores é importante no conhecimento da natureza da reação enzimática.

O efeito dos diferentes valores de temperatura sobre a atividade enzimática da enzima transglutaminase está apresentado na Figura 16 (a). Observa-se que os maiores valores para a atividade enzimática foram obtidos para valores de pH 7 e 8.



**Figura 16.** Atividade enzimática da enzima transglutaminase para: (a) diferentes valores (37, 50 e 60 °C) de temperatura, (b) diferentes valores (6, 7 e 8) de pH.

As maiores atividades ocorreram nas temperaturas de 37 e 50°C. De acordo com Piccolo (2006) e Gauche (2008), a enzima transglutaminase, normalmente, apresentam pH ótimo entre 5-8 e temperatura ótima de 50°C. Diversos trabalhos apresentados na literatura indicam que a utilização da enzima transglutaminase deve acontecer em temperaturas de 50°C (CHAMBI; GROSSO, 2006; PIOTROWSKA et al., 2008). A partir dos resultados obtidos neste trabalho observa-se que a 37°C podem ser utilizadas sem prejudicar a ação da enzima.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE COURO CURTIDO AO CROMO (III)

A Tabela 3 apresenta a análise de composição química do resíduo de couro curtido ao cromo III, utilizado para extração de gelatina e empregado na produção dos filmes neste trabalho.

**Tabela 3.** Caracterização do resíduo do couro usado na extração de gelatina.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>
pH	3,38 ± 0,08
Umidade (% m.m <sup>-1</sup> )	53 ± 0,02
Cinzas (% m.m <sup>-1</sup> , b.s.)	3,89 ± 0,1
NTK (% m.m <sup>-1</sup> , b.s.)	16,93 ± 0,51
Cr Total (% m.m <sup>-1</sup> , b.s.)	1,28 ± 0,3

b.s. = base seca

A reprodutibilidade do processo de extração de gelatina depende da composição do resíduo de couro curtido ao cromo III. Diferenças entre amostras são encontradas devido a diferentes origens da pele e a diferentes processos de curtimento (SCOPEL, 2016).

Os resultados da Tabela 3 estão de acordo com os valores encontrados por outros autores (CABEZA et al., 1998; MU et al., 2003; WIONCZYK et al., 2011). Eles também são similares àqueles obtidos por (DETTMER et al., 2014; SCOPEL, 2016) que empregaram resíduo de couro curtido ao cromo III proveniente da mesma empresa que forneceu o material para este trabalho, porém de diferente lote do produto.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA COMERCIAL E DA GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUOS DE COURO CURTIDO AO CROMO (III)

As gelatinas comercial e a extraída do resíduo de couro curtido ao cromo III foram caracterizadas quanto ao teor de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK). Foram obtidos 5681 mg/L de NTK para a amostra comercial 4% (m/v) e para a amostra extraída de resíduo de couro curtido ao cromo a quantidade de NTK foi de 1509 mg/L. O fator de conversão de NTK para proteína em gelatina é igual a 5,5 (JONES, 1941). Dessa maneira, 50 g de resíduo de couro curtido ao cromo III rendem aproximadamente 1,1 g de proteína.

De posse deste valor, a gelatina extraída do resíduo de couro curtido ao cromo III foi concentrada pelo processo de diálise, a fim de remover os sais e aumentar a concentração de NTK desta gelatina para que fossem comparáveis ao da gelatina comercial. A Tabela 4 apresenta um comparativo entre a gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III e a gelatina comercial.

**Tabela 4.** Comparativo das análises físico-químicas da gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo (III) da gelatina comercial.

Gelatina	pH	Umidade (%)	Cinzas (%)	NTK (mg.L <sup>-1</sup> )
Comercial (4% m.v)	6,3 ± 0,11	95,49 ± 0,26	--	5681
Extraída	8,7 ± 0,11	98,15 ± 0,17	26,1 ± 0,48	1509
Concentrada	8,6 ± 0,12	98,25 ± 0,11	6,36 ± 0,55	4400

A gelatina obtida de resíduos do couro curtido ao cromo III pelo processo de hidrólise alcalina, resultou em uma gelatina diluída com teor de cinzas de 26% para a gelatina extraída e de 6,36% (m.m<sup>-1</sup>, base seca), para a gelatina concentrada e filtrada. O elevado pH da gelatina de resíduo do couro se deve ao óxido alcalino empregado durante sua extração. Estudos realizados por outros autores encontraram valores na faixa de 8,6 a 18,5% (m.m<sup>-1</sup>, base seca) (CABEZA et al., 1998; MU et al., 2003; SCOPEL, 2016).

Foi realizada a determinação de metais na gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III provenientes do processo de curtimento e extração da gelatina. O magnésio foi determinado devido ao emprego do MgO como agente alcalinizante na extração

de gelatina, a concentração foi de 303,40 mg.L<sup>-1</sup>. Cálcio e sódio foram determinados devido ao amplo uso de seus sais no processo de transformação da pele em couro, com valores de 98,10 mg.L<sup>-1</sup> e 975,45 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estudos realizados por Scopel, (2016), utilizando resíduos de couro curtido ao cromo III provenientes do mesmo curtume obteve 256 mg.L<sup>-1</sup> de cálcio, 504 mg.L<sup>-1</sup> de magnésio e 2145 mg.L<sup>-1</sup> de sódio.

## 5.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO DOS FILMES COM GELATINA COMERCIAL

Na Tabela 5 estão apresentados os valores para as variáveis respostas analisadas do planejamento experimental 1 descrito no item 4.5.

**Tabela 5.** Solubilidade, alongação e tensão na ruptura para os filmes produzidos no planejamento 1.

<b>Filme</b>	<b>Gelatina (%)</b>	<b>Enzima (%)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Solubilidade (%)</b>	<b>Elongação (%)</b>	<b>Tensão Ruptura (MPa)</b>
1	2,00	0,00	15	32,11 ± 0,16	4,480 ± 1,7	27,14 ± 9,9
2	6,00	0,00	15	25,73 ± 0,05	8,96 ± 3,3	35,87 ± 2,4
3	2,00	2,00	15	32,47 ± 0,06	4,51 ± 1,6	75,40 ± 6,4
4	6,00	2,00	15	21,69 ± 0,06	6,29 ± 0,9	30,58 ± 3,5
5	2,00	0,00	30	58,04 ± 0,14	8,25 ± 4,3	63,53 ± 4,8
6	6,00	0,00	30	32,20 ± 0,17	2,09 ± 1,0	27,34 ± 8,9
7	2,00	2,00	30	27,93 ± 0,02	3,53 ± 0,1	47,57 ± 2,9
8	6,00	2,00	30	20,60 ± 0,12	1,41 ± 0,02	26,11 ± 5,0
9 (C	4,00	1,00	22,5	33,43 ± 0,07	9,44 ± 2,5	63,73 ± 4,3
10	2,00	0,00	15	37,07 ± 0,11	4,26 ± 1,2	90,82 ± 17,9
11	6,00	0,00	15	38,98 ± 0,14	13,11 ± 3	42,04 ± 5,4

(\*C) ponto central

(continua)



(Conclusão)						
Filme	Gelatina (%)	Enzima (%)	Tempo (min)	Solubilidade (%)	Elongação (%)	Tensão Ruptura (MPa)
12	2,00	2,00	15	23,54 ± 0,15	4,71 ± 0,02	120 ± 4,5
13	6,00	2,00	15	32,07 ± 0,07	7,90 ± 8,9	33,07 ± 9,4
14	2,00	0,00	30	54,68 ± 0,2	3,43 ± 0,8	35,76 ± 1,0
15	6,00	0,00	30	40,51 ± 0,16	14,37 ± 0,8	42,68 ± 3,5
16	2,00	2,00	30	30,28 ± 0,04	4,47 ± 2,3	59,25 ± 5,0
17	6,00	2,00	30	26,05 ± 0,01	18,17 ± 3,8	40,23 ± 1,3
18 (C)	4,00	1,00	22,5	36,13 ± 0,05	10,74 ± 7	63,12 ± 12

(\*C) ponto central

Na Figura 17 são apresentados os efeitos dos fatores sobre a variável de resposta solubilidade, obtida a partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 3. Os efeitos apresentados no eixo das ordenadas cujos valores estiverem à direita da linha  $p = 0,05$  apresentaram efeitos significativos sobre as variáveis respostas em estudo (com 95% de confiança).

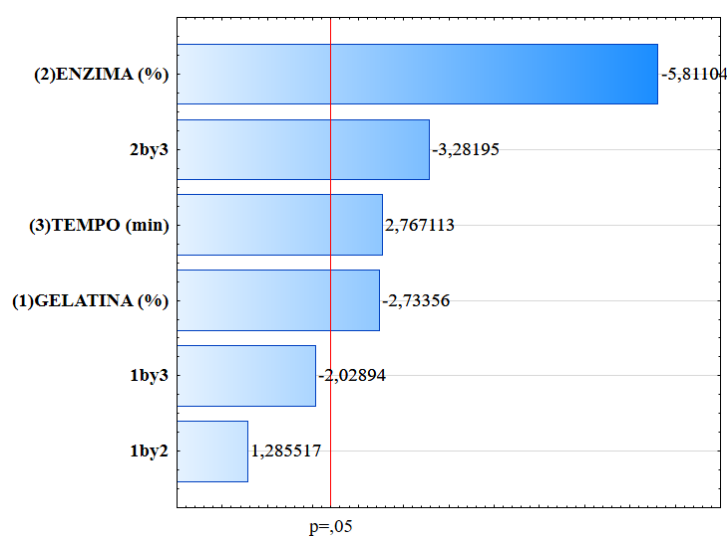


Figura 17. Gráfico de Pareto para solubilidade dos filmes.

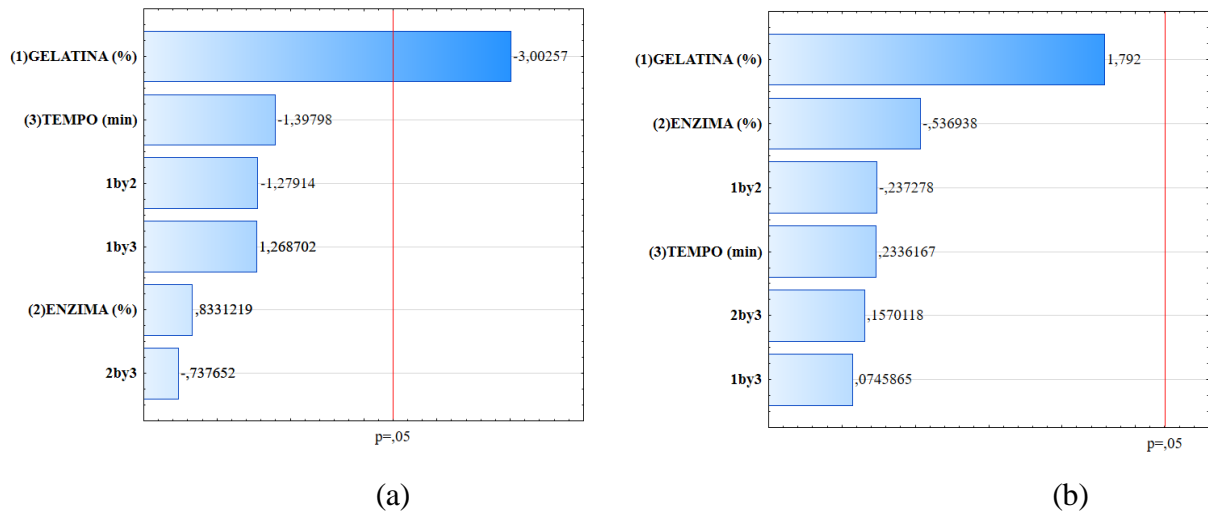
Conforme a Figura 17 observou-se que o efeito da concentração de enzima (valor  $p = 0,000117$ ), gelatina (valor  $p = 0,019454$ ) e tempo (valor  $p = 0,018321$ ) foram significativos para a variável resposta solubilidade.

Com a adição da enzima transglutaminase foi observada a diminuição da solubilidade dos filmes em todas as concentrações de gelatina 2, 4 e 6% em comparação aos filmes sem tratamento enzimático. A gelatina é suscetível à ação da água, assim a enzima transglutaminase diminui a interação entre o filme e a água, conseqüentemente, diminuído a solubilidade dos mesmos. A solubilidade é uma característica importante dos filmes biodegradáveis no que se refere a seu emprego, algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001).

A alta solubilidade de filmes pode ser uma alternativa para a aplicação em produtos que necessitem de hidratação prévia para o consumo ou na cobertura de sementes agrícolas que necessitam de rápida germinação ou como carreadores de aditivos necessários ao crescimento das plantas (BATISTA et al., 2005). O decréscimo da solubilidade em água pode ser um indicativo bastante interessante da maior estabilidade desses materiais às diferentes condições ambientais (DEBIAGI et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos, a enzima transglutaminase atuou de forma a reduzir a solubilidade dos filmes, em contrapartida, estudos realizados por Weng e Zheng (2015) constataram que o aumento da concentração de TGase promovia reduções pouco expressivas da solubilidade a 30 °C por 24 h. Segundo Nishihora (2015) filmes de gelatina com 4 mg.mL<sup>-1</sup> de enzima transglutaminase, apresentaram solubilidade de 39,18% em 25°C por 24 h.

A Figura 18 apresenta os efeitos dos fatores sobre a variável de resposta alongação e tensão na ruptura, respectivamente, obtidas a partir da ANOVA dos resultados apresentados na Tabela 3.



**Figura 18.** Gráfico de Pareto para: (a) tensão de ruptura: (b) alongação.

Conforme a Figura 18 (a) observa-se que o efeito da gelatina foi significativo para a variável resposta tensão na ruptura (valor  $p = 0,012$ ) e muito próximo da significância Figura 18 (b) para a alongação (valor  $p = 0,10$ ). A partir destes resultados, um novo planejamento experimental foi executado, conforme descrito no item 4.5. Neste planejamento, a concentração de gelatina foi fixada em 4% m/v e o tempo de ação da enzima em 15 min. Em virtude da ação da enzima sobre a solubilidade, testou-se concentrações superiores de enzima, de 1 e 5% para analisar se as propriedades dos filmes seriam melhoradas.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMERCIAIS OBTIDOS NA SEGUNDA ETAPA DE PRODUÇÃO

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da análise de propriedades para a espessura, solubilidade, umidade, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor d' água para os filmes desenvolvidos na etapa 2 com gelatina comercial, conforme descrito no item 4.5.

**Tabela 6.** Análise das propriedades dos filmes produzidos na etapa 2 com gelatina comercial.

Propriedades	Gel/T1	Gel/T5	Gel
Espessura (mm)	0,129 ± 0,01	0,130 ± 0,01	0,118 ± 0,08
Solubilidade (%)	34,71 ± 0,01	26,66 ± 0,82	35,37 ± 7,26
Umidade (%)	11,65 ± 0,09	11,82 ± 0,09	12,04 ± 0,05
Ângulo de contato (°)	66,96 ± 5,74	74,51 ± 0,76	78,21 ± 5,5
PVA (g.mm/m <sup>2</sup> .hora.kPa)	0,80 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,83 ± 0,04
Elongação (%)	10,09 ± 0,91	32,18 ± 0,81	20,41 ± 0,84
Tensão de Ruptura (MPa)	63,42 ± 0,43	50,65 ± 1,8	65,50 ± 12,09

Gel/T1: Filmes de gelatina com 1% de TGase; Gel/T5: Filmes de gelatina com 5% de TGase; Gel: Filmes de gelatina sem enzima.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da análise de variância para as propriedades de espessura, solubilidade, umidade, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor d' água para os filmes desenvolvidos na etapa 2, conforme descrito no item 4.5.

**Tabela 7.** Análise de variância para as propriedades dos filmes produzidos na etapa 2 com gelatina comercial.

Propriedades	Valor-P
Espessura	1
Solubilidade	8,59 x 10 <sup>-6</sup> *
Umidade	0,09108
Ângulo de contato	0,017867*
Permeabilidade ao vapor d' água	0,237726
Tensão de ruptura	0,267913
Elongação	0,001527*

\*significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05) para avaliação da influencia das concentrações de enzima TGase nos filmes.

### 5.6.1 Espessura

A análise estatística da variação de espessura dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase indicou que a adição da enzima não tem efeito significativo sobre a

propriedade de espessura (valor  $p = 1$ ). O filme sem tratamento enzimático Gel apresentou espessura de 0,118 mm e os filmes com tratamento, Gel/T1 e Gel/T5 apresentaram espessura de 0,129 e 0,130 mm respectivamente. Observou-se um aumento da espessura dos filmes com tratamento enzimático quando comparados aos filmes sem tratamento. Esse aumento está associado a formação de ligação cruzada dos resíduos de glutamina e lisina de ligações peptídicas, modificando a estrutura molecular e possibilitando novas formações estruturais (HINZ et al., 2007).

### 5.6.2 Solubilidade

A análise estatística da variação de solubilidade dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase indicou que a adição da enzima tem efeito significativo sobre a propriedade de solubilidade (valor  $p = 8,59 \times 10^{-6}$ ). Os filmes obtidos a partir da gelatina sem tratamento enzimático Gel, apresentaram solubilidade de 35,87% e os filmes com tratamento Gel/T1 e Gel/T5 apresentaram solubilidade de 34,71% e 26,66%, respectivamente.

Carvalho e Grosso (2006) obtiveram solubilidade de 26% para filmes de gelatina com glicerol e transglutaminase, e 30% para filmes não tratados, faixa de valores semelhantes a este trabalho. Enquanto Nishihora (2015) para filmes de gelatina com transglutaminase obteve solubilidade de 39,18%, valor superior aquela obtida para os filmes deste trabalho.

A gelatina é suscetível a ação da água. Assim, a enzima transglutaminase em maiores concentrações, diminui a interação entre o filme e a água, diminuindo também a solubilidade, este fato pode ser justificado pelo aumento de grupos amina livres disponíveis para a realização de ligações cruzadas devido a ação da enzima na estrutura biopolimérica (CARVALHO; GROSSO, 2006).

### 5.6.3 Umidade

A análise estatística da variação de umidade dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase, não apresentou valor significativo (valor  $p = 0,09108$ ). De acordo com a literatura filmes comerciais devem apresentar umidade inferior a 10%, no entanto, os filmes produzidos neste trabalho, apresentaram umidade: Gel/T1 11,65% e Gel/T5 11,82%,

este comportamento era esperado, visto que a gelatina e glicerol são hidrofílicos, ou seja, apresentam alta afinidade com a água. Os estudos encontrados na literatura apresentam a umidade de filmes de gelatina, onde o valor varia entre 9 e 14 % (ALMEIDA, 2012).

#### **5.6.4 Ângulo de contato**

A análise estatística da variação de ângulo de contato dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou valor significativo para a propriedade de ângulo de contato (valor  $p = 0,017867$ ) quando comparados os filmes com tratamento enzimático. O ângulo do filme sem tratamento foi de  $78,21^\circ$ , sendo que os filmes com tratamento enzimático Gel/T1 e Gel/T5 apresentaram  $66,96^\circ$  e  $74,5^\circ$ , respectivamente, caracterizando um filme com comportamento hidrofílico, em concordância com a natureza higroscópica da gelatina.

A adição da enzima transglutaminase aos filmes provocou a redução do ângulo de contato dos filmes, indicando uma maior molhabilidade devido à presença de grupos hidrofílicos na superfície do material, que por sua vez promovem o aumento da energia superficial livre, tornando material mais interativo com a água (TAUBERT et al., 2013).

Quando comparados os filmes tratados enzimaticamente, observou-se que o aumento da concentração de enzima 5% (m/m) provocou um aumento no ângulo de contato, devido a melhor estruturação da matriz polimérica promovida pelo tratamento enzimático realizando a compatibilização dos materiais e alterações na estrutura da proteína.

Estudos realizados por Tang e Jiang (2007) também observaram que o tratamento enzimático em filme de gelatina incorre num pequeno aumento do ângulo de contato, porém no estudo os autores não obtiveram nenhuma diferença estatisticamente significativa em tal propriedade.

#### **5.6.5 Permeabilidade ao vapor d' água**

A análise estatística da variação de permeabilidade ao vapor d' água dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase não apresentou (valor  $p = 0,237726$ ). A permeabilidade do filme sem tratamento Gel foi de  $0,83 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ , sendo que os

filmes com tratamento enzimático Gel/T1 e Gel/T5 apresentaram 0,80 e 0,82  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ , respectivamente.

Estudos realizados por Carvalho e Grosso (2006) demonstraram que o tratamento enzimático de filmes de gelatina e glicerol conduzem a redução significativa da permeabilidade ao vapor de água, sendo que o filme não tratado apresentou 0,198 e o tratado com TGase 0,120  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ . Segundo os autores, a adição da enzima transglutaminase nos filmes, provoca a reticulação da cadeia polimérica, conferindo mudança estrutural na matriz, a qual pode ter influência no coeficiente de difusão de umidade na rede de gelatina.

Chambi e Grosso (2006) observaram que o tratamento enzimático elevou a permeabilidade de 0,208 para filmes sem tratamento enzimático para 0,25  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$  com tratamento enzimático, valores estes inferiores aos apresentados neste trabalho.

#### **5.6.6 Propriedades mecânicas**

A análise estatística da variação de propriedades mecânicas dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase, apresentou tensão na ruptura de 65,50 MPa, enquanto os filmes com tratamento enzimático Gel/T1 e Gel/T5 apresentaram tensão de 63,65 MPa e 50,65 MPa respectivamente, embora tenha ocorrido uma diminuição na tensão de ruptura dos filmes, esses valores não foram estatisticamente significativos (valor de  $p = 0,267913$ ) em um nível de confiança de 95%. Para a propriedades de alongamento a análise estatística apresentou valor significativo (valor  $p = 0,001527$ ). O filme Gel apresentou alongação de 20,41%, enquanto que para Gel/T1 a alongação foi de 10,09% e para Gel/T5 foi de 32,18%.

Observou-se que para a tensão de ruptura, a enzima TGase não apresentou diferença significativa entre as concentrações de enzima utilizadas, enquanto que o alongamento teve seu valor aumentado em concentrações maiores de enzima TGase (5%). No entanto, o filme com 1% (m/m) de enzima apresentou menor alongação em comparação ao filme sem tratamento. O fato pode estar associado a baixa concentração de enzima não ter sido suficiente para à formação de ligações cruzadas na rede proteica.

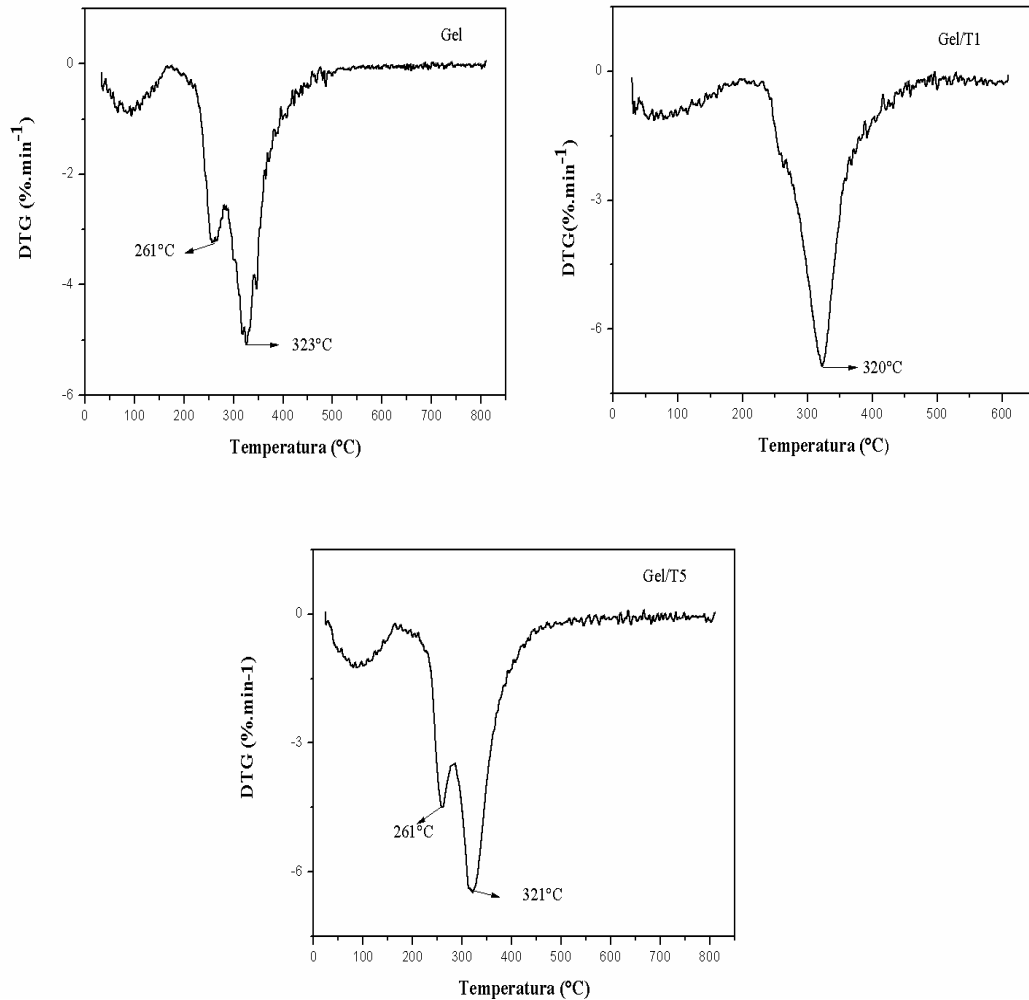
Diferentes condições de produção (temperatura de processamento da solução filmogênica, temperatura e umidade de secagem e de armazenamento dos filmes), diferentes concentrações de enzima, de glicerol, de gelatina podem levar à alteração das propriedades. Filmes com maior umidade podem provocar o inchamento da matriz, ocasionando assim um aumento da mobilidade das cadeias poliméricas e tornando mais fracas as forças de ligação entre as mesmas o que, conseqüentemente, provoca um aumento na capacidade de deformação e uma diminuição da força na ruptura dos filmes poliméricas (DONHOWE; FENEMMA, 1992).

Chambi e Grosso (2006) observaram que o tratamento enzimático conferiu um ganho no alongamento de aproximadamente 5% (m/m) em relação ao filme não tratado. Além disso, os autores ainda relatam um aumento pouco expressivo na tensão máxima de ruptura, de 35 MPa para 37 MPa, indicando que um ganho de tensão é seguido por diminuição do alongamento. Contudo, pesquisa realizada por Wang et al. (2015) mostrou também que o aumento da concentração enzimática promovia aumento da tensão e alongamento.

### **5.6.7 Propriedades térmicas**

A análise termogravimétrica (Figura 19) revela os estágios de degradação característicos dos filmes estudados.





**Figura 19.** Curvas DTG para filmes de gelatina (Gel), gelatina com 1% de TGase (Gel/T1) e gelatina com 5% de TGase (Gel/T5).

Todos os filmes apresentaram perda de cerca de 11% de massa no intervalo de temperatura entre 50 °C e 170°C. Esse estágio está relacionado com a perda de água livre adsorvida nos filmes ou umidade residual (NAGARAJAN et al., 2013). De acordo com Barreto et al. (2003), o segundo estágio de perda de massa está associado com a degradação da proteína, a qual corresponde a uma redução aproximada de 60%.

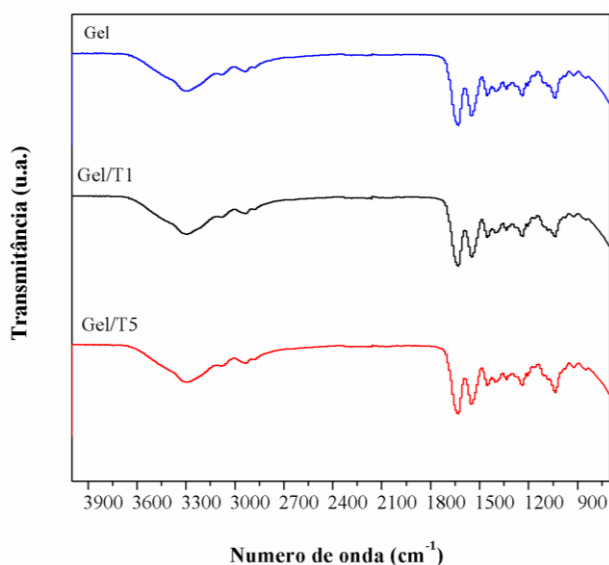
Um evento de perda de massa foi identificado próximo aos 100°C, provavelmente está relacionado à perda de moléculas de água presentes na amostra. O filme de gelatina comercial sem enzima (Gel) degradou-se a 323°C. Para os filmes com adição de enzima (Gel/T1 e Gel/T5) estes eventos ocorreram em 320°C e 321°C respectivamente. Fakhoury et al. (2013)

observou a degradação de filmes de gelatina comercial e amido a 317°C. Para Scopel (2016) filmes de gelatina comercial e amido de milho degradaram-se a 306°C.

De acordo com os resultados apresentados, o filme sem o tratamento enzimático degradou em menor temperatura, em contrapartida os filmes com tratamento enzimático degradam em maior temperatura, ou seja a enzima transglutaminase atua de forma a aumentar a temperatura de degradação dos filmes, embora os valores sejam muito semelhantes. Visando a aplicação dos filmes em solo, esse resultado pode ser considerado benéfico, visto que o mesmo está exposto as condições climáticas (altas e baixas temperaturas).

### 5.6.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A Figura 20 apresenta os espectros de FTIR para os filmes preparados a partir de gelatina comercial com adição de 1 e 5% de enzima transglutaminase e sem adição da enzima.



**Figura 20.** Espectros de FTIR para filmes de gelatina (Gel), gelatina com 1% de TGase (Gel/T1) e gelatina com 5% de TGase (Gel/T5).

Pelo espectro observou-se em 3296  $\text{cm}^{-1}$  bandas correspondentes ao estiramento -OH de moléculas de água, para todos os filmes. Deformação axial assimétrica das ligações C-H e  $-\text{NH}_3^+$  (banda tipicamente identificada em amidas) estão presentes em 3074  $\text{cm}^{-1}$  (ZHANG et al., 2013; KAEWRUANG et al., 2013). Observou-se um deslocamento das bandas em

relação aos filmes sem tratamento enzimático de  $3065\text{ cm}^{-1}$  para  $3079\text{ cm}^{-1}$  para os filmes com tratamento enzimático.

A presença de gelatina, como de toda proteína, é caracterizada pelas bandas de vibração das ligações amida, as vibrações amida I e amida II. A amida I, localizada em  $1633\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação C=O (carbonila) enquanto a Amida II, com picos em  $1545\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação ou flexão da ligação N-H (NAGARAJAN et al., 2012). Como tanto o grupo carbonila como o grupo amino estão envolvidos em ligações de hidrogênio responsáveis pela manutenção de estruturas secundárias, as posições de ambas as regiões da Amida I e Amida II são sensíveis às alterações estruturais das moléculas proteicas. Assim, o que se observa é que a banda correspondente de amida II situada em  $1530\text{ cm}^{-1}$  para a gelatina comercial foi deslocada para  $1549\text{ cm}^{-1}$  para os filmes com tratamento enzimático. Este deslocamento pode ser considerado como indicativo de reticulação entre a enzima transglutaminase e a matriz polimérica do filme.

## 5.7 PRODUÇÃO DOS FILMES COM GELATINA EXTRAÍDA DO RESÍDUO DO COURO CURTIDO AO CROMO III

A Tabela 8 apresenta os resultados para análises das propriedades de espessura, solubilidade, umidade, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor d' água e propriedades mecânicas para os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III, produzidos na etapa 3.

**Tabela 8.** Análise das propriedades dos filmes produzidos na etapa 3 com gelatina extraída.

<b>Propriedades</b>	<b>Gel/Ex1</b>	<b>Gel/Ex3</b>	<b>Gel/Ex</b>
Espessura (mm)	0,085 ± 0,002	0,086 ± 0,005	0,099 ± 0,004
Solubilidade (%)	40,38 ± 0,036	33,12 ± 3,57	44,37 ± 0,018
Umidade (%)	11 ± 0,018	7,45 ± 0,07	6,73 ± 0,015
Ângulo de contato (°)	59,31 ± 3,79	90,53 ± 1,41	67,22 ± 8,87
PVA (g.mm/m <sup>2</sup> .hora.kPa)	0,59 ± 0,04	1,18 ± 0,167	1,55 ± 0,125
Elongação (%)	11,16 ± 0,62	20,90 ± 4,95	16,26 ± 1,796
Tensão de Ruptura (MPa)	28,40 ± 1,34	45,18 ± 3,96	34,15 ± 3,51

Gel/Ex1: Filmes de gelatina extraída com 1% de TGase; Gel/Ex3: Filmes de gelatina extraída com 3% de TGase; Gel/Ex: Filmes de gelatina extraída sem enzima.

A Tabela 9 apresenta os resultados para as análises de variância das propriedades dos filmes produzidos na etapa 3 com gelatina extraída.

**Tabela 9.** Análise de variância para as propriedades dos filmes de gelatina extraída.

<b>Propriedades</b>	<b>Valor-P</b>
Espessura	0,724510
Solubilidade	0,022757*
Umidade	0,005218*
Ângulo de contato	0,000217*
Permeabilidade ao vapor d'água	5,05x10 <sup>-5</sup> *
Tensão de ruptura	0,027667*
Elongação	0,109386

\*significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05) para avaliação da influência das concentrações de enzima TGase nos filmes.

### 5.7.1 Espessura

A análise estatística da variação de espessura dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase indicou que a adição da enzima não teve efeito significativo sobre a

propriedade de espessura (valor  $p = 0,724$ ). O filme sem tratamento enzimático Gel/Ex apresentou espessura de 0,099 mm e os filmes com tratamento, Gel/Ex1 e Gel/Ex3 apresentaram espessura de 0,085 e 0,086 mm respectivamente. A Figura 24 apresenta os resultados de espessura dos filmes.

Estudos realizados por Nishihora utilizando filmes de gelatina suína tipo A com adição de enzima transglutaminase apresentaram espessura de 0,086 mm. Scopel produziu filmes com gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III com adição de amido e glicerol e obteve espessura de 0,159 mm e filmes de gelatina com amido sem presença de glicerol com espessura de 0,130, esses valores foram justificados devido ao fato de que, filmes de gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III apresentam maior teor de material sólido presente, visto que a gelatina não passou por nenhuma etapa de remoção de sais.

### 5.7.2 Solubilidade

A análise estatística da variação de solubilidade dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou efeito significativo sobre a propriedade de solubilidade (valor  $p = 0,022$ ) quando comparadas as concentrações de enzima. Os filmes obtidos a partir da gelatina sem tratamento enzimático Gel/Ex, apresentaram solubilidade de 44,37% e os filmes com tratamento Gel/Ex1 e Gel/Ex3 apresentaram solubilidade de 40,38% e 33,12%, respectivamente.

Filmes com maior concentração de enzima (3%) tiveram estatisticamente sua solubilidade reduzida (valor  $p = 0,00546$ ), quando comparados aos filmes sem tratamento enzimático. Este fato indica boa interação da enzima transglutaminase com a matriz polimérica do filme, e maior caráter hidrofóbico da gelatina, devido ao aumento de grupos aminas livres disponíveis para a realização de ligações cruzadas pela ação da enzima na estrutura biopolimérica (MACEDO e SATO, 2005).

Os valores obtidos são condizentes com estudos dirigidos por Carvalho e Grosso (2006), no qual a solubilidade obtida de filmes de gelatina com glicerol e transglutaminase foi de 26% para filmes tratados enzimaticamente e 30% para filmes não tratados, valores inferiores aos apresentados nesse trabalho, enquanto Nishihora (2015) para filmes de gelatina

com enzima transglutaminase obteve solubilidade de 39,18%, valor superior ao filme com 3% de enzima TGase apresentados nesse trabalho.

### 5.7.3. Umidade

A análise estatística da variação de umidade dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou valor significativo para a propriedade de umidade (valor  $p = 0,005$ ) quando analisada a influência da concentração de enzima nos filmes. Os filmes produzidos neste trabalho, apresentaram umidade: Gel/Ex1 11% e Gel/Ex3 7,45% este comportamento era esperado, visto que a gelatina e glicerol são hidrofílicos, ou seja, apresentam afinidade com a água. Para os filmes Gel/Ex3 quando comparado ao filme sem tratamento enzimático não apresentou diferença significativa (valor  $p = 0,594$ ).

Os filmes com maior concentração de enzima (Gel/Ex3), apresentaram redução na umidade quando comparado ao filme com menor concentração de enzima (Gel/Ex1), indicando que a enzima tornou os filmes menos higroscópicos. Estudos descritos na literatura apresentam a umidade de filmes de gelatina, onde o valor varia entre 9 e 14 % (ALMEIDA, 2012).

### 5.7.4 Ângulo de contato

A análise estatística da variação de ângulo de contato dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou significância para a propriedade de ângulo de contato (valor  $p = 0,0002$ ). O ângulo do filme sem tratamento foi de  $67,22^\circ$ , sendo que os filmes com tratamento enzimático Gel/Ex1 e Gel/Ex3 apresentaram  $59,31^\circ$  e  $90,53^\circ$ , respectivamente. O ângulo de contato se relaciona com a hidrofobicidade ou com a hidrofiliabilidade, e quanto menor o ângulo de contato de uma gota de água com a superfície da amostra, maior é a hidrofiliabilidade (NUNES, 2014).

Para os filmes com 1% de enzima transglutaminase observa-se que o ângulo de contato diminuiu, em comparação ao filme de maior concentração de enzima e ao filme sem tratamento. Esse fato pode estar associado a baixa concentração de enzima não ser suficiente para que ocorra a reticulação da matriz polimérica, permanecendo espaços livres na cadeia e

consequentemente, os grupos polares disponíveis nas cadeias proteicas ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$  e  $-\text{NH}_2$ ) presentes nos aminoácidos da proteína estarem livres para poderem fazer ligações com a água e consequentemente aumentar o caráter hidrofílico do filme (DI PIERRO et al., 2006).

Já para os filmes com 3% de enzima TGase, o ângulo de contato teve seu valor aumentado, indicando que a enzima atuou de forma a promover a reticulação da cadeia polimérica, e consequentemente aumentando o caráter hidrofóbico dos filmes.

Estudo realizado por Cristiano (2009) mostrou que o ângulo de contato de filmes de gelatina reticulados com EDC ficaram em torno de  $94,7 \pm 4,5^\circ$ , valor que está em conformidade com os encontrados no presente estudo. Tang e Jiang (2007) observaram que o tratamento enzimático em filme de gelatina incorre num pequeno aumento do ângulo de contato, porém no estudo os autores não obtiveram nenhuma diferença estatisticamente significativa em tal propriedade.

#### **5.7.5 Permeabilidade ao vapor d' água**

A análise estatística da variação de permeabilidade ao vapor d' água dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou efeito significativo para a propriedade de permeabilidade ao vapor d' água (valor  $p = 5,05 \times 10^{-5}$ ). A permeabilidade do filme sem tratamento Gel/Ex foi de  $1,55 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ , sendo que os filmes com tratamento enzimático Gel/Ex1 e Gel/Ex3 apresentaram 0,59 e  $1,18 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ , respectivamente, ou seja, a enzima na concentração de 1 e 3% m/m provocou redução na permeabilidade em comparação ao filme sem tratamento enzimático. Essa diferença pode ser explicada por dois fatores. O primeiro deles diz respeito à espessura dos filmes: maiores espessuras tendem a aumentar a permeabilidade ao vapor de água, devido a mudanças estruturais causadas pelo inchamento da matriz hidrofílica, o que afeta a estrutura dos filmes e provoca tensões internas que podem influenciar a permeação (PARK; CHINNAN, 1995). O segundo aspecto diz respeito à reticulação da cadeia polimérica devido a adição da enzima transglutaminase

Estudos realizados por Carvalho e Grosso (2004) demonstraram que o tratamento enzimático de filmes de gelatina e glicerol conduzem a redução significativa da permeabilidade ao vapor de água, sendo que o filme não tratado apresentou 0,198 e o tratado

com TGase  $0,120 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ . Segundo os autores, isso indica mudança estrutural na matriz polimérica em função da reticulação, a qual pode ter influência no coeficiente de difusão de umidade na rede de gelatina.

### 5.7.6 Propriedades mecânicas

A análise estatística da variação das propriedades mecânicas dos filmes em função da concentração de enzima transglutaminase apresentou valor significativo para a propriedade de tensão de ruptura dos filmes (valor  $p = 0,027667$ ) em um nível de confiança de 95%. O filme Gel/Ex, apresentou tensão na ruptura de 34,15 MPa, enquanto os filmes com tratamento enzimático Gel/Ex1 e Gel/Ex3 apresentaram tensão de 28,40 MPa e 45,18 MPa respectivamente.

Para a propriedade de alongamento a análise estatística não apresentou valor significativo (valor  $p = 0,109386$ ). O filme Gel/Ex apresentou alongação de 16,26%, enquanto que para Gel/Ex1 a alongação foi de 11,16% e para Gel/Ex3 foi de 20,90%.

As propriedades mecânicas de tensão na ruptura e alongação dos filmes são melhoradas (aumentadas) quando concentrações maiores de enzima TGase (3%) foram utilizadas. Ao mesmo tempo observou-se que as propriedades de ângulo de contato e solubilidade também apresentaram mesmo feito (melhoradas). Os filmes se apresentaram mais hidrofóbicos, ou seja, diminuído a interação da água com a cadeia polimérica, devido a reticulação causada pela enzima TGase e a formação de redes proteicas mais coesas (BABIN e DICKINSON, 2001).

Chambi e Grosso (2006) observaram que o tratamento enzimático conferiu um ganho no alongamento de aproximadamente 5% em relação ao filme não tratado. Os autores ainda relatam um ganho pouco expressivo na tensão máxima de ruptura, de 35 MPa para 37 MPa, indicando que um ganho de tensão é seguido por diminuição do alongamento, fato também constatado neste trabalho para concentrações maiores de enzima transglutaminase.

Pesquisa realizada por Wang et al. (2015) mostrou também que o aumento da concentração enzimática promovia aumento da tensão de ruptura e alongamento. Os autores mencionam duas razões prováveis para esse comportamento:

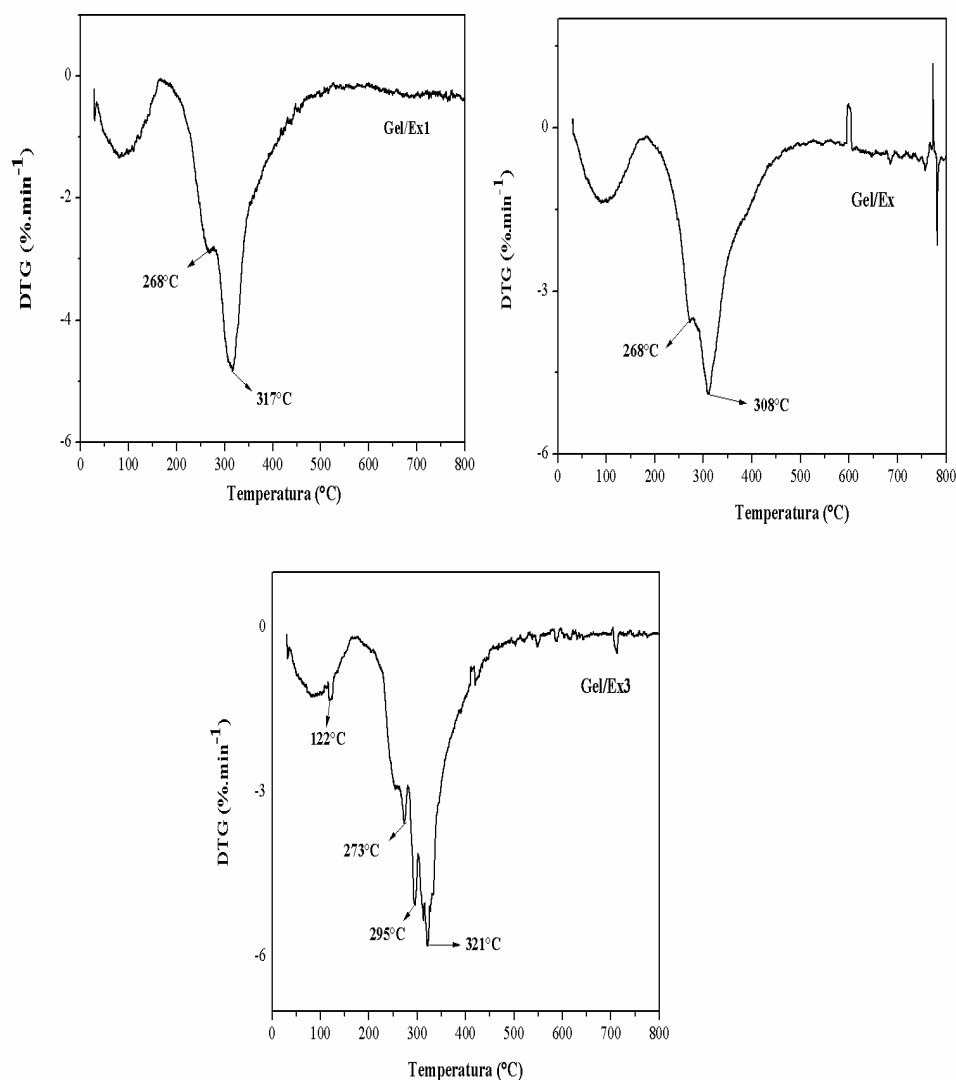


- a presença de diferentes composições da cadeia de proteína, bem como as distribuições de pesos moleculares, formas e concentrações de aminoácidos;
- os diferentes tipos e meios de interações entre as cadeias proteicas e plastificante, porque os plastificantes são meramente incorporados em algumas regiões específicas na matriz polimérica, resultando assim na ampliação da sua distância, que por sua vez afeta a mobilidade das cadeias.

A partir dos resultados apresentados entende-se que a gelatina recuperada de resíduo de couro curtido ao cromo III com adição da enzima transglutaminase apresenta efeito estatisticamente significativo nas propriedades mecânicas de tensão de ruptura, ângulo de contato e permeabilidade ao vapor d' água, solubilidade e umidade tornando seu uso promissor em filmes poliméricos, visando melhores propriedades dos mesmos.

#### **5.7.7 Propriedades térmicas**

A análise termogravimétrica (Figura 21) revela os estágios de degradação característicos dos filmes estudados.



**Figura 21.** Curvas DTG para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex), gelatina extraída com 1% de TGase (Gel/Ex1) e gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/Ex3).

Para todos os filmes, observou-se uma perda de massa próximo aos 100°C, provavelmente relacionado à perda de moléculas de água presentes na amostra e, em seguida, o início da degradação. É possível observar que a degradação acontece em mais de uma etapa, tornando-se a distinção entre as etapas mais nítida na concentração maior de enzima transglutaminase.

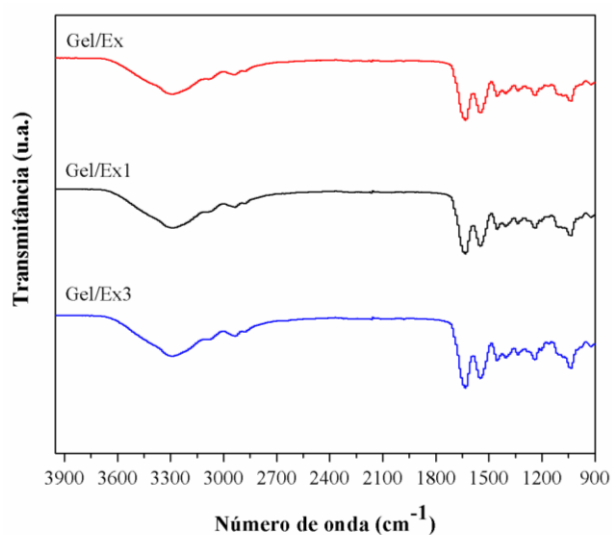
A primeira perda de massa, relativa à perda de umidade no intervalo de temperatura entre 30°C e 160°C. Essa perda de massa é condizente com os valores de umidade dos filmes, e foi em torno de 11% para os filmes Gel/Ex e Gel/Ex3 e em torno de 10% para o filme Gel/Ex1. Também é possível observar que a temperatura inicial é muito próxima entre os

filmes. Os valores observados foram de 173°C e mudando em 360°C para o filme Gel/Ex, de 150°C e mudando em 378°C para o filme Gel/Ex1 e de 185°C e mudando em 352°C para o filme Gel/Ex3, indicando que o filme com maior concentração de enzima apresenta uma melhor estabilidade térmica inicial. De acordo com Barreto et al. (2003), o segundo estágio e o terceiro de perda de massa está associado com a degradação da proteína, a qual corresponde a uma redução aproximada de 60%.

Os filmes apresentaram vários eventos de perda de massa, sendo que a degradação máxima ocorreu em 308°C para o filme Gel/Ex, 317°C para o filme Gel/Ex1 e em 321°C para o filme Gel/Ex3. Observou-se pela análise que a enzima transglutaminase atuou de forma a aumentar a temperatura de degradação dos filmes, fato associado a reticulação da cadeia polimérica provocada pela enzima transglutaminase. O resíduo para o filme Gel/Ex, de 19,26% foi inferior aos resíduo dos filmes Gel/Ex1, de 25,5% e do Gel/Ex3, de 21,9%.

### 5.7.8 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Na Figura 22 estão apresentados os espectros de infravermelho dos componentes puros utilizados na produção dos filmes.



**Figura 22.** Espectros de FTIR para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex), gelatina extraída com 1% de TGase (Gel/Ex1) e gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/Ex3).

Os espectros dos filmes se mostraram muito semelhantes. A banda de absorção presente em  $3292\text{ cm}^{-1}$ ,  $3298\text{ cm}^{-1}$  para filmes tratados e  $3290\text{ cm}^{-1}$  para o filme sem tratamento enzimático, corresponde à presença de grupos funcionais OH nas amostras como à absorção de água pelos filmes, que são higroscópicos.

Os três filmes apresentaram a banda de absorção em aproximadamente  $3070\text{ cm}^{-1}$ , tipicamente atribuída a amins. Também é possível identificar as ligações C-N das amins na banda de absorção em  $2940\text{ cm}^{-1}$  para todos os filmes.

A banda de absorção em  $1631\text{ cm}^{-1}$  é tipicamente encontrada em gelatinas, indicando a presença de amidas primárias. Na faixa de  $1242$  até  $1545\text{ cm}^{-1}$  estão presentes as bandas típicas de gelatina, representando grupos amina e amida (secundárias e terciárias). Destaca-se a banda de absorção em  $1545\text{ cm}^{-1}$ , frequentemente empregada na identificação de proteínas (KAEWRUANG et al., 2013).

Quando comparado o FTIR dos filmes com o FTIR da gelatina pura, observou-se que a banda em  $1031\text{ cm}^{-1}$  foi deslocada para  $1040\text{ cm}^{-1}$  nos filmes com tratamento enzimático. Segundo Silverstein e Webster (1998) esse sinal está compreendido na faixa das ligações C-N de amins alifáticas ( $1300$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ ), podendo ser decorrente da formação de ligações cruzadas advindas do efeito da TGase sobre os resíduos de glutamina, lisina e amins primárias.

Uma vez que a gelatina apresenta tanto resíduos de grupamento glutamina quanto de lisina, o produto da reação de reticulação ocorre através da formação de um grupamento amida monosubstituída bem como amônia (FUCHSBAUER et al., 1996; CORTESI et al., 1999; CARVALHO e GROSSO, 2006;). Neste caso, pode-se dizer que houve formação de filmes reticulados covalentemente, pois houve um deslocamento da bande de  $1633\text{ cm}^{-1}$  para  $1623\text{ cm}^{-1}$  quando comparados com a gelatina pura. Isso se dá devido à ação da transglutaminase que promoveu as ligações de reticulação nos grupos.

## 5.5 BIODEGRADABILIDADE DOS FILMES APÓS EXPOSIÇÃO EM SOLO SIMULADO

### 5.5.1 Caracterização do solo simulado

A Tabela 10 apresenta os resultados das análises químicas realizadas no solo simulado durante o período de maturação do meio. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais LAPAM-UCS. Em relação às condições ideais do solo (meio), a norma ASTM G160-03 indica um pH entre 6,5 a 7,5, estando o pH monitorado neste estudo dentro deste limite. Carbono, nitrogênio e fósforo são nutrientes para os microrganismos e, portanto, devem ser consumidos no decorrer do experimento, para que as colônias se desenvolvam (OLIVEIRA et al., 2008). Estes parâmetros foram avaliados antes do filme ser disposto em solo.

**Tabela 10.** Resultados das análises químicas do solo simulado durante o período de maturação.

<b>Propriedades</b>	<b>Resultado</b>
pH a 25°C	7,1
Sólidos voláteis (%)	18,76%
Carbono orgânico total (% em base seca)	4,53%
Nitrogênio total (% em base seca)	0,63%
Fósforo total (% em base seca)	0,28%

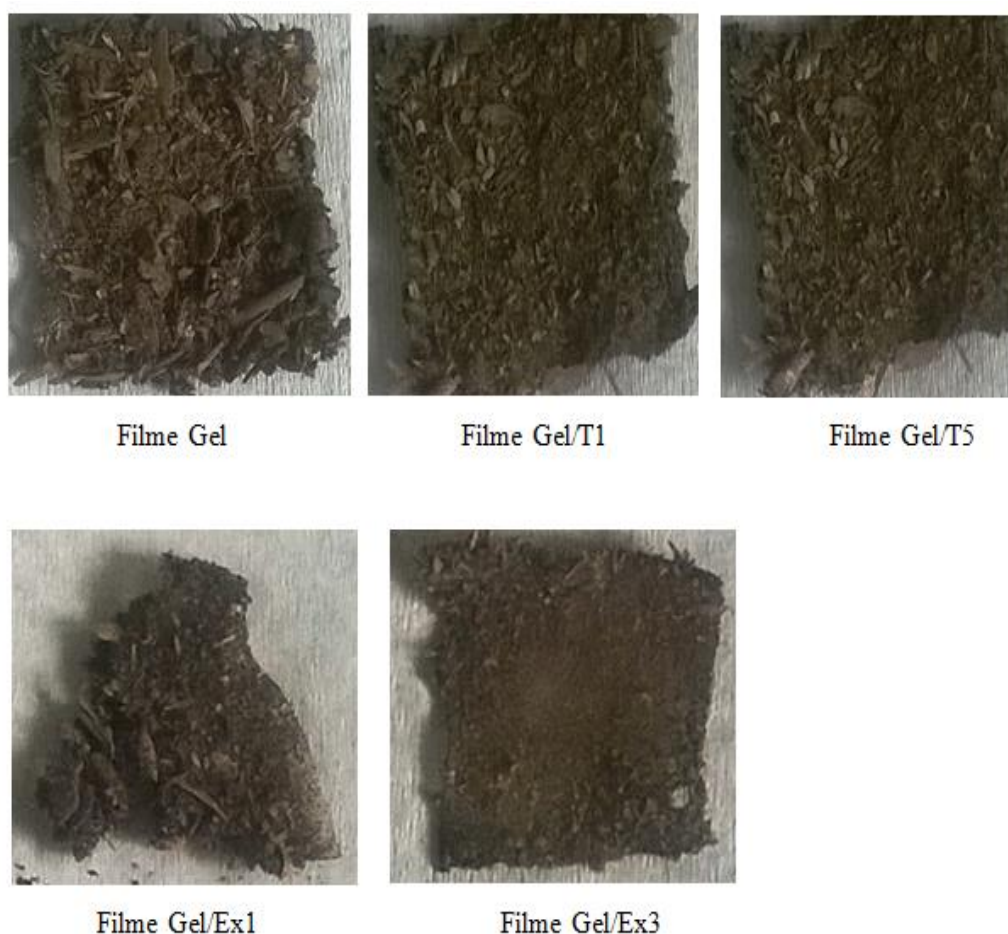
### 5.5.2 Análise do algodão exposto ao solo simulado

Foi realizado ensaio de resistência à tração, segundo norma ASTM D882-10, em cinco corpos de prova de 100 % algodão, com gramatura de 411 g.m<sup>-2</sup>, antes e após exposição no solo. A força máxima de resistência do algodão antes do solo foi de 25,74 Kgf e após cinco dias de exposição foi de 13,32 Kgf. Desta forma foi possível observar que o tecido de algodão perdeu 51,75 % de suas propriedades. Segundo a norma ASTM G160-03 50 % de perda da resistência à tração do algodão após 3 meses de maturação do solo significa que o mesmo está em condições ideais para início dos testes de degradação.

### 5.5.3 Avaliação dos filmes

#### 5.5.3.1 Perda de massa

No presente trabalho não foi possível determinar a perda de massa dos filmes, produzidos com gelatina comercial e extraída do resíduo de couro curtido ao cromo III, pois o solo aderiu ao material já nas primeiras horas de exposição e conseqüentemente a etapa de lavagem para posterior pesagem não foi realizada, mas conforme a Figura 23 observou-se que houve perda de massa e que os mesmos foram degradados. Os filmes foram degradados após 24 horas de exposição ao solo, nas condições especificadas na norma ASTM-G160-03.



**Figura 23.** Filmes produzidos com gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) e gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III (Gel/Ex e Gel/Ex3) após 12 h de exposição em solo simulado.

Conforme observado na imagem os filmes de gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) se apresentaram visualmente, com um menor grau de degradação, e que a adição da enzima transglutaminase conferiu ao material uma maior integridade da estrutura polimérica do filme. Já para os filmes produzidos com gelatina extraída do resíduo de couro curtido ao cromo III (Gel/Ex1 e Gel/Ex3) a degradação ocorreu mais rapidamente, sendo que em 12 horas o filme sem a adição da enzima transglutaminase Gel/Ex já estava em estágio avançado de degradação (não foi possível registrar a partir de fotografias, pois a degradação ocorreu antes da primeira retirada das amostras do solo). Observa-se que para ambos os filmes (comercial e extraída) a enzima atuou de forma a manter a estrutura mais intacta e, conseqüentemente, aumentar o tempo de degradação dos filmes em solo simulado quando comparado ao filme sem o tratamento enzimático.

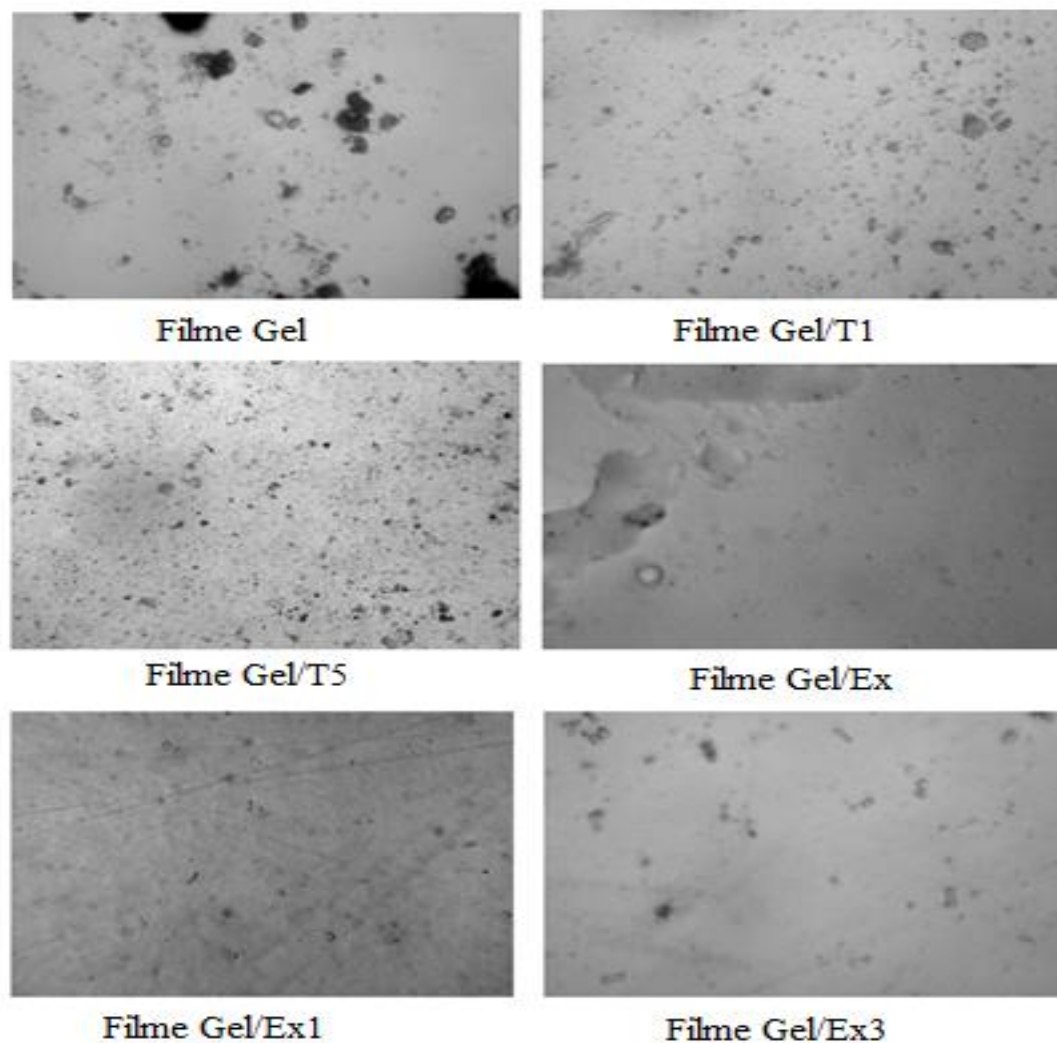
A análise de biodegradabilidade em solo simulado, constatou que os filmes produzidos com gelatina comercial e extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III são biodegradáveis. A alta biodegradabilidade dos filmes está associada as características do material e pelo aumento da hidrofilicidade do polímero, o qual é realizado pela introdução de segmentos hidrofílicos na sua estrutura. Isso pode ser feito por meio da adição de uma hidroxila, e a formação de grupos carbonil ou carboxil. Essa incorporação aumenta a polaridade das moléculas, o que incorre em aumento do caráter hidrofílico dos componentes, favorecendo assim o ataque biológico das moléculas. Em conclusão, a presença de uma proporção adequada e equilibrada de hidrofobicidade-hidrofilicidade na estrutura do polímero facilita a degradação dos mesmos (GIGLI et al., 2013).

Estudo realizado por Lucena et al. (2015) revelou que os filmes produzidos à base de xilana e gelatina apresentam alta degradabilidade (inferior a 15 dias), podendo ser considerados como uma nova matéria-prima não poluente de interesse na indústria de embalagens. Para Scopel (2016) a produção de filmes de amido de milho e de gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III quando aplicados como cobertura de solo, resistiram por período de aproximadamente 30 dias.

Filmes biodegradáveis de gelatina apresentam-se como uma alternativa promissora aos materiais produzidos de fontes não renováveis (petróleo), uma vez que seu descarte reduz os impactos causados ao ambiente e quando utilizados como cobertura de solos acabam por fornecer nutrientes devido a presença de nitrogênio presente na estrutura polimérica.

### 5.5.3.2 Microscopia óptica dos filmes expostos no solo

A Figura 24 contém as micrografias obtidas por microscopia óptica, com aumento de 100 vezes, para os filmes. A partir das imagens, é possível observar que todas as composições de filmes a gelatina forma uma matriz. No entanto, observou-se partículas que não se dispersaram na solução e ficaram visíveis na microscopia dos filmes, o que indica uma menor adesão interfacial, e pode-se observar a ocorrência de formatos variados.



**Figura 24.** Microscopia óptica de filmes produzidos com gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) e gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III (Gel/Ex, Gel/Ex1 e Gel/Ex3). Todas as microscopias apresentam aumento de 100x.



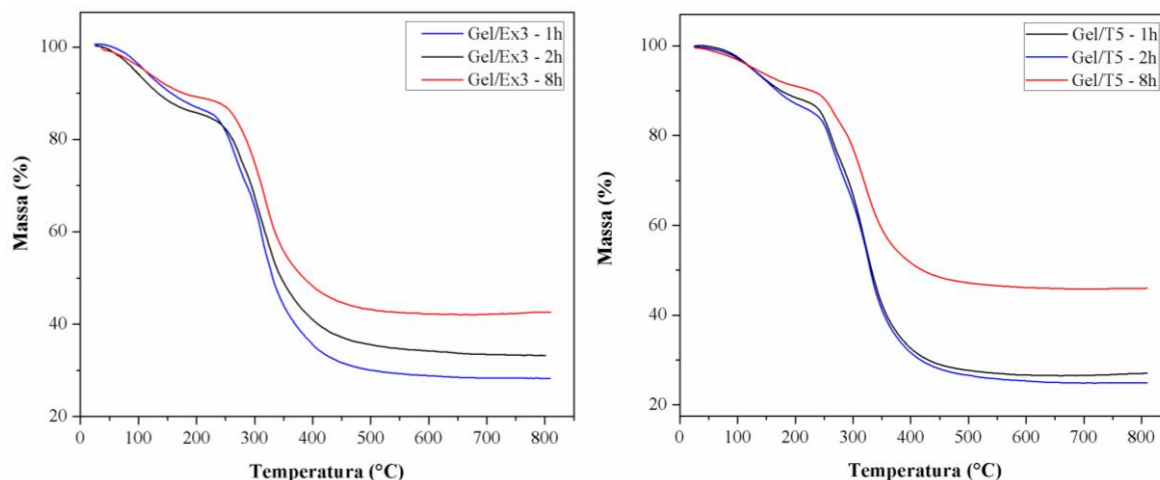
Os filmes produzidos com a gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III, apresentam uma maior interação com a enzima transglutaminase, pois as partículas apresentam tamanhos menores e formatos regulares, indicando melhor dispersão, enquanto que com a gelatina comercial, as partículas apresentam um formato esférico e irregular. Observa-se também a presença de pequenos aglomerados nos filmes. Esses aglomerados são provavelmente, sais inorgânicos precipitados. Quanto a superfície das amostras é possível observar uma uniformidade, que indica uma eficiente plastificação.

Os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III apresentaram superfície aparentemente mais homogênea. Esta maior homogeneidade da gelatina extraída pode estar associada ao fato de a mesma ter passado pelo processo de concentração por diálise, a qual consiste na concentração da gelatina e remoção de sais, estes presentes no processo de curtimento do couro.

A superfície rugosa pode representar uma superfície com maior área de contato levando à maior sorção de água. O maior teor de água sorvido nos filmes pode, então, ter levado aos consequentes efeitos nas propriedades mecânicas, de solubilidade e de barreira dos filmes produzidos com gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III (SCOPPEL, 2016).

#### 5.5.3.3 Termogravimetria dos filmes em solo

Uma pequena amostra de filme foi removida do solo para determinação da análise termogravimétrica (Figura 25), que revelou os estágios de degradação característicos dos filmes produzidos com maior concentração de enzima transglutaminase quando submetidos ao teste de biodegradabilidade em solo simulado. Visto que para os demais filmes, não foi possível determinar a análise de Tg devido o solo ter aderido ao filme.



**Figura 25.** Curva TG para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex3), gelatina extraída com 3% de TGase (Gel/T5) e gelatina comercial com 5% de TGase.

Os filmes Gel/Ex3 expostos em solo simulado pelo período de 1 hora exibiram uma primeira perda de massa de cerca de 19%, a segunda perda de 40% e 19% para terceira perda. Para os filmes expostos por 2 horas a perda de massa foi de 18%, de 31% e de 22%. Os filmes expostos por 8 horas em solo simulado apresentaram a primeira perda de massa de 10%, a segunda perda de 30% e a terceira perda de 18%. Ao final do aquecimento a 800°C os filmes apresentaram massa residual de 28% (1h), 33% (2h) e 43% (8h).

Para os filmes produzidos com gelatina comercial, Gel/T5 dispostos por 1 hora em solo simulado apresentaram no primeiro evento 10% de perda de massa, 46% no segundo, e 23% no terceiro. Filmes expostos por 2 horas em solo simulado apresentaram a primeira perda de massa de 11%, a segunda perda de 47% e a terceira perda de 18%. Para 8 horas de exposição a primeira perda de massa foi de 9%, a segunda perda de 29% e a terceira perda de 15%. Ao final do aquecimento a 800°C os filmes apresentaram massa residual de 25% (1h), 27% (2h) e 46% (8h).

Os valores de massa residual estão relacionados com o teor de cinzas das substâncias que compõem o material, desta forma os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III apresentaram massa residual maior para o tempo de 8h. Este fato também está associado ao processo de degradação, na qual ocorre a formação de novos produtos ligados a cadeia polimérica (NUNES, 2014).

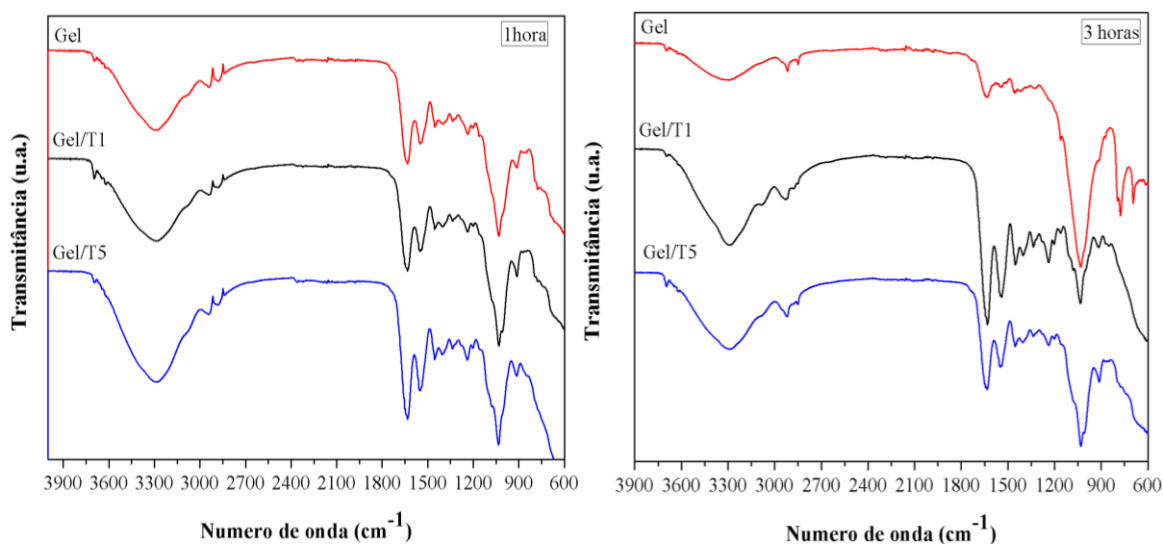
Nas primeiras horas de exposição ao solo simulado os filmes produzidos com gelatina extraída apresentaram um pequeno aumento na massa residual para os tempos de 1 e 2 horas

de exposição. Em 8 horas de exposição os filmes produzidos com gelatina comercial apresentaram um pequeno aumento na massa residual. As perdas de massa foram semelhantes para os filmes produzidos com gelatina comercial e com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, esse fato pode ser atribuído a composição da estrutura protéica da matriz do filmes. A primeira perda de massa, está relacionada com a umidade dos filmes, enquanto que a segunda e a terceira são atribuídas a degradação da matéria orgânica.

Se comparados com os filmes apresentados nas microscopias, sem adição de enzima e com 1% de enzima, os quais não foi possível realizar essa análise, devido ao solo ter aderido ao material, podemos salientar que a adição da enzima transglutaminase atuou de forma a manter a integridade do material e retardar a degradação dos mesmos. Sendo assim, a enzima transglutaminase atuou de forma a promover a reticulação das cadeias poliméricas dos filmes.

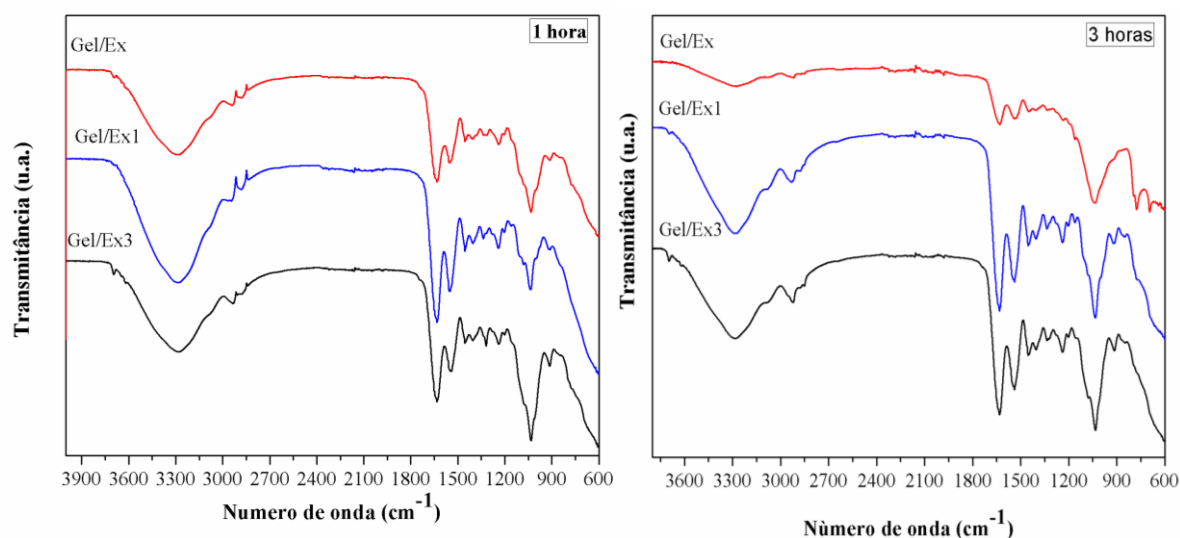
#### 5.5.3.4 FTIR dos filmes em solo

A Figura 26 apresenta os espectros de FTIR para os filmes produzidos com gelatina comercial, dispostos em solo simulado no período de 1 e 3 horas.



**Figura 26.** Curvas de FTIR para filmes de gelatina comercial (Gel, Gel/T1 e Gel/T5) após 1 e 3 h de exposição ao solo simulado.

A Figura 27 apresenta os espectros de FTIR para os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, dispostos em solo simulado no período de 1 e 3 horas.



**Figura 27.** Curvas de FTIR para filmes de gelatina extraída (Gel/Ex, Gel/Ex1 e Gel/Ex3) após 1 e 3 h de exposição ao solo simulado.

De acordo com os gráficos de FTIR, pode-se observar a degradação dos filmes pelo deslocamento e diminuição de intensidade das bandas após três horas de exposição em solo simulado. A presença de gelatina, como de toda proteína, é caracterizada pelas bandas de vibração das ligações amida, as vibrações Amida I e Amida II. A amida I corresponde ao estiramento da ligação C=O (carbonila) enquanto a Amida II corresponde à deformação ou flexão da ligação N-H. Como tanto o grupo carbonila como o grupo amino estão envolvidos em ligações de hidrogênio responsáveis pela manutenção de estruturas secundárias, as posições de ambas as regiões da Amida I e Amida II são sensíveis às alterações estruturais das moléculas proteicas. Algumas ligações observadas nos espectros são comuns às gelatinas, como ligações O-H e a C-H (D'AVILA, 2010). Observou-se que a banda de absorção presente em  $3294\text{ cm}^{-1}$  se deve tanto à presença de grupos funcionais OH da glicerina que se expressam nessa faixa do espectro, como à absorção de água pelos filmes, que são higroscópicos.

A banda do filme Gel/Ex (1h) correspondente ao estiramento -OH de moléculas de água e estiramento -NH em faixas de número de onda entre  $3294\text{ cm}^{-1}$  deslocou para  $3276\text{ cm}^{-1}$  após três horas de exposição ao solo simulado. Para os filmes com tratamento enzimático Gel/Ex1, a banda deslocou de  $3282\text{ cm}^{-1}$  para  $3276\text{ cm}^{-1}$  após três horas de exposição ao solo simulado e o filme Gel/Ex3, deslocou de  $3282\text{ cm}^{-1}$  para  $3285\text{ cm}^{-1}$  estas

observações indicam que a adição de enzima transglutaminase promoveu a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos -OH e -NH, demonstrando que houve mudanças a nível molecular quando da interação da enzima e a matriz polimérica.

As bandas identificadas em  $3056\text{ cm}^{-1}$  para o filme Gel/Ex deslocou para  $2927\text{ cm}^{-1}$  após 1h de exposição e para  $2919\text{ cm}^{-1}$  após 3h de exposição ao solo simulado. Para o filme Gel/Ex1 a banda inicial de  $3046\text{ cm}^{-1}$  deslocou para  $2946\text{ cm}^{-1}$  em 1h e para  $2928\text{ cm}^{-1}$  após 3h de exposição. A banda icinical do filme Gel/Ex3 deslocou de  $3056\text{ cm}^{-1}$  para  $2932\text{ cm}^{-1}$  em 1h e para  $2919\text{ cm}^{-1}$  em 3h de exposição ao solo. Essas bandas são caracetísticas do estiramento O-H dos ácidos carboxílicos presente nos aminoácidos prolina, hidroxiprolina e lisina presentes na estrutura da gelatina (SILVESTRIN; ALENCASTRO, 2007).

Como pode ser observado nos gráficos, a degradação dos filmes ocorreu pelo deslocamento das bandas características ao grupo O-H de moléculas de água e estiramento -NH e pelo grupo O-H dos ácidos carboxílicos. A Tabela 11 apresenta as possíveis atribuições das bandas de FTIR encontradas para as amostras deste trabalho.

**Tabela 11.** Principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos filmes dispostos em solo simulado no período de 1 e 3 horas.

Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Tipo de deformação
3292	Estiramento O-H
3069	Deformação axial assimétrico das ligações C-H e -NH <sup>3+</sup> (banda tipicamente identificada em amidas)
2500 – 3100	Estiramento O-H de ácidos carboxílicos
1636	Vibração C=O da amida I
1624	Deformação axial da ligação C=O (banda tipicamente identificada em amidas primárias) Deformação angular simétrica no plano da ligação N-H
1541	Deformação angular no plano das ligações C-N e N-H (banda tipicamente identificada em amidas secundárias)
1451	Deformação angular no plano das ligações C=C e C=N (banda tipicamente identificada em compostos com anéis pirrolidínicos dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina)

(Continua)

(Conclusão)

<b>Número de onda cm<sup>-1</sup></b>	<b>Tipo de deformação</b>
1333 e 1398	Deformação axial das ligações C–N (bandas tipicamente identificada em aminas)
1235	Deformação axial da ligação C–N (banda tipicamente identificada em amidas terciárias)
1150	Deformação axial das ligações C–O e C–C e C–OH
1083	Deformação axial da ligação
1024 a 1038	Estiramento da ligação C–O de éteres
930	Deformação angular das ligações C–OH e –CH <sub>2</sub>
920	Deformação angular da C=O de ácidos carboxílicos
790 - 730	Deformação angular (–(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> - para n > 3) Grupos etila e propila

Fonte: Adaptado de Scoppel, (2016).

O teste de biodegradabilidade em solo simulado confirma que os filmes são biodegradáveis, e que a adição da enzima transglutaminase mantém a estrutura polimérica mais intacta e menos sujeita a ação do vapor de água. No entanto a formulação e as propriedades dos mesmos ainda precisam ser aprimoradas, mas fornecem indícios de que a degradabilidade do material permitiria sua disposição na terra após seu uso, pois, ao ser degradado/deteriorado, o filme poderia atuar como fertilizante, devido a liberação de nitrogênio para o solo.

Como exemplo de aplicação de material proteico proveniente de gelatina de resíduo de couro como fonte de nitrogênio pode-se citar o estudo onde o colágeno obtido de gelatina de resíduo de couro curtido ao cromo III foi empregado em cultivos de arroz substituindo fertilizantes nitrogenados sem prejuízos na produtividade (COELHO et al., 2015).

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo tinha como objetivo obter e caracterizar filmes de gelatina comercial e extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III e as principais conclusões encontram-se a seguir apresentadas:

Os filmes produzidos com 4% de gelatina e 2% de enzima em tempos de 15 min de reticulação da enzima, apresentaram maior tensão de ruptura e alongação.

A solubilidade e o ângulo de contato dos filmes com adição da enzima transglutaminase foi reduzida em ambas as concentrações (1 e 5%).

Se comparados aos filmes sem tratamento enzimático, a enzima atuou diminuindo a solubilidade, a umidade, o ângulo de contato e a tensão de ruptura.

Para os filmes produzidos com gelatina extraída de resíduo de couro curtido ao cromo III, a enzima atuou de forma a diminuir a solubilidade, a umidade, o ângulo de contato, a permeabilidade ao vapor de água e a tensão de ruptura.

As análises térmicas mostraram que a adição da enzima TGase aumentou a estabilidade térmica dos filmes.

Quando comparadas as gelatinas utilizadas nos filmes, observou-se que a gelatina extraída de resíduo do couro curtido ao cromo III apresentou melhores propriedades quando comparada com a gelatina comercial.

A enzima transglutaminase atuou de forma a promover a reticulação da cadeia polimérica, onde apresentou efeito significativo na maioria das propriedades dos filmes avaliadas.

O teste de biodegradabilidade comprovou que os filmes são biodegradáveis, tornando-se, portanto, uma alternativa ao uso de materiais provenientes de fontes não renováveis, podendo ser utilizados como cobertura de solos reduzindo assim, os impactos ambientais causados pelo descarte incorreto desses materiais.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Novos testes são necessários antes da utilização dos filmes como cobertura de solo na agricultura, para isso, sugere-se ao final deste trabalho:

- Avaliar diferentes plastificantes.
- Avaliar o efeito da espessura na propriedade dos filmes.
- Determinar as isotermas de sorção dos filmes.
- Estudar gelatinas de diferentes fontes e blooms.



## REFERÊNCIAS

ABIPLAST. Perfil 2015 - Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico. São Paulo 2016.

ABNT. NBR 10.005 Procedimento para obtenção de lixiviado de resíduos sólidos: 2004a. \_\_\_\_\_. NBR 10004: Resíduos sólidos – Classificação 2004b.

ABRE. Associação Brasileira de Embalagem. 2016. Disponível em: <<http://www.abre.org.br/setor/estudo-macroeconomico-da-embalagem-abre-fgv/>>. Acesso em 03 de julho de 2017.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Food Science Technology**, 43, p.837, 2010.

ALMEIDA, Poliana Fernandes. **Análise da Qualidade de Gelatina obtida de tarsos de frango e aspectos envolvidos no processo produtivo**. 135f. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.

ANDRADE-MAHECHA, M. M.; TAPIA-BLACIDO, D. R.; MENEGALLI, F. C. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 449-458, 2012.

APE, A., PLASTIC AND ENVIRONMENT EUROPE 2016. Disponível em: <<http://www.apeeurope.eu/index.php>>. Acesso em: December 3rd.

ARRIETA, M., PELTZER, M., GARRIGÓS, M., JIMENEZ, A Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. **Journal of Food Engineering**, 114, 486–494, 2011.

ASTM. D882-12: Standart test method for tensite properties of thin plastic sheeting, 2012.

ASTM. D 6003/96: Standard Test Method for Determining Weight Loss from Plastic Materials Exposed to Simulated Municipal Solid-Wast (MSW) Aerobic Compost Environment”, 1996.

ASTM. E96/96M-13: Standart test method for water vapor transmission of materiais, 2013.

ASTM. G 160-98 “Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptility of Nonmetallic Materials by Laboratory Soil Buria, 1998.

ASTM G160: Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptibility of Nonmetallic Materials By Laboratory Soil Burial, 2003.

AVELLA, M.; DE VLIENER, J. J.; ERRICO, M.E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; . VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite film for food packaging applications. *Food Chemistry*, v. 93, p. 467-474, 2005.

BABIN, H.; DICKINSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 15, n. 3-4, p. 271-276, 2001.

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, v. 79, n. 1, p. 147-152, 2003.

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Reino Unido: Rapra Technology Limited, 2005.

BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes a base de pectina.. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas , v. 25, p. 781-788, dez. 2005.

BELGACEM, M. N. GANDINI, A. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. **Oxford: Elsevier**, 2008.

BERGO, P.; MORAES, I. C. F.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. *Food Hydrocolloids*, v. 32, n. 2, p. 412-415, 2013.

BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J. W.; RAY, P. *Polymer Grafting and Crosslinking*. Wiley, 2008.

BONILLA, J.; TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Effect of the Incorporation of Antioxidants on Physicochemical and Antioxidant Properties of Wheat Starch-Chitosan Films. *Journal of Food Engineering, Essex*, v. 118, n. 3, p. 271-278, 2013.

BOURTOOM, T. Factor Affecting the Properties of Edible Film Prepared from Mung Bean Proteins. *International Food Research Journal* 15(2): 167- 180, 2008.

BRIASSOULIS, D. Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films. *Polymer Degradation and Stability*, v. 92, n. 6, p. 1115-1132, 2007.

CABEZA, L. F.; TAYLOR, M. M.; DIMAIO, G. L.; BROWN, E.; MARMER, W.; CARRIÓ, R.; CELMA, P. J.; COT, J. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein product and chromium. *Waste Management*, v. 18, p. 211 - 218, 1998.

CANEVAROLO, S. V. **Ciências dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. Artliber, 2006.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004.

CARVALHO, R. A. D.; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Food Science Technol**, v. 26, p. 495-501, 2006.

CHAMBI, H.; GROSSO, C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v. 39, 458–466, 2006.

CHAPLIN, M. Water structure and science. Gelatin, 2014. Acesso em: 12/12/2015.

COELHO, L. C.; FERREIRA, M. M.; BASTOS, A. R. R.; OLIVEIRA, L. C. A. D.; FERREIRA, E. D. Resíduo de Curtumes como Fonte de Nitrogênio para Trigo e Arroz em Sucessão. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 39, p. 1445-1455, 2015.

CORRALES, M.; FERNÁNDEZ, A.; HAN, J. H. Antimicrobial Packaging Systems. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging** (Second Edition). Academic Press. p.133-170, 2014.

COSTA R., SARAIVA A., RODRIGUES C., ANDRADE C.S., PALHA M.G., DUARTE E. Mulch biodegradável Agrobiofilm® – uma alternativa sustentável aplicada à cultura de morango. *Pequenos Frutos n.º 8*: 4-7, 2014.

CRISTIANO, C. M. Z. **Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros**. 2009. 135 f (Doutorado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

D'AVILA, Viviane Dalla Lana. **Biofilmes à base de gelatina, aplicados na conservação de frutos de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. 2010. 117f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DEBIAGI, F. Efeito de fibras vegetais nas propriedades de compósitos biodegradáveis de amido de mandioca produzidos via extrusão. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)*, v. 34, n. 06, p. 1522-1529, nov./dez. 2010.

DE PAOLI, M.A. Degradação e Estabilização de Polímeros. Ed. Artliber Publishers, São Paulo, 2009.

DETTMER, A.; NUNES, K. G.; GUTTERRES, M.; MARCILIO, N. R. Production of basic chromium sulfate by using recovered chromium from ashes of thermally treated leather. **J Hazard Mater**, v. 176, n. 1-3, p. 710-4, 2010.

DETTMER, A.; SANTOS, R. M. O.; ANJOS, P. S.; GUTTERRES, M. Protein extraction from chromium tanned leather waste by *Bacillus subtilis* enzymes. **Journal of Asociación Química Española de la Industria del Cuero**, v. 65, n. 3, p. 93 - 100, 2014.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINIELLO, L.; DAMAIO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. **Biomacromolecules, Washington**, v. 7, n. 3, p. 744-749, 2006.

DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. The effect of relative humidity on water vapor permeance of lipid-hydrocolloid bilayer films. **JOACS**, v. 69, n. 1, p. 1081-1087, 1992.

EBNESAJJAD, S. 2012. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications. **Elsevier Science**, 2012.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis a base de amido e gelatina**. PhD. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

FAKHOURY, F. M.; SILVIA, M. M.; LARISSA, C. B.; YAMASHITA, F.; MEI, L. H. I.; QUEIROZ, F. P. C. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 149-154, 2012.

FERNANDES, A. P. S.; COSTA, J. B.; SOARES, D. S. B.; MOURA, C. J. DE; SOUZA, A. R. M. DE. **Application of biodegradable films produced from irradiated whey protein concentrate**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia-GO, v. 45, n. 2, p. 192-199, 2015.

FUCHSBAUER, H. L., GERBER, U., ENGELMANN, J., SEEGER, T., SINKS, C., HECHT, T. Influence of gelatin matrices cross-linked with transglutaminase on the properties of an enclosed bioactive material using Pgalactosidase as model system. **Biomaterials**, 17(15), 1481-1488, 1996.

GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. Boca Raton, US: CRC Press, 2002. 650 ISBN 1587161079.

GIANELLO, C.; DOMASZAK, S. C.; BORTOLON, L.; KRAY, C. H.; MARTINS, V. **Viabilidade do uso de resíduos da agroindústria coureiro-calçadista no solo**. Ciência Rural v. 41, p. 242 - 245, 2011.

GIGLI, M.; NEGRONI, A.; SOCCIO, M.; ZANAROLI, G.; LOTTI, N.; FAVA, F.; MUNARI, A.; **Polym. Degrad. Stab.** 98, 934, 2013.

GROSSMAN, M. V. E.; MALI, S.; SHIMAZU, A. A. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v.28, n. 1, p. 79-88, 2007.

GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WAELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, v.187, p.111-125, 1950.

HATAKEYAMA, H. Thermal analysis of environmentally compatible polymers containing plant components in the main chain. *J. Therm. Anal. Cal.*; 50, 755- 759, 2002.

HINZ, K.; HUPPERTZ, T.; KULOZIK, U.; KELLY, A. L. Influence of enzymatic crosslinking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 289-293, 2007.

IORIO, R.; SANDRO, A, D.; PARIS, R.; PAGLIARANI, G. TARTARINI, S.; RICCI, G.; SERAFINI-FRACASSINI, D. VERDERIO, E.; DUCA, S.D. Simulated environmental criticalities affect transglutaminase of *Malus* and *Corylus pollens* having different allergenic potential. **Amino Acidos**, v.42., p.1007–1024, 2012.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, n 37, p. 113-155, (2006).

JONES, D. B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. U.S. **Department of Agriculture**, 1941.

KAERUANG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; NALINANON, S. Physicochemical and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as affected by extraction conditions. **Food Bioscience**, v. 2, p. 1-9, 2013.

LANCELLOTTI, A. Bioplastics in Brazil: Beyond the Green Speech. **Frost e Sullivan**. 2010.

LI, C.; MOORE-KUCERA, J.; LEE, J.; CORBIN, A.; BRODHAGEN, M.; MILES, C.; INGLIS, D. Effects of biodegradable mulch on soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 79, p. 59-69, 2014.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P., BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2007.

LIMA, S.L.T., Reciclagem e biodegradação de plásticos. In Revista Científica do IMAPES. Sorocaba. p. 28-34, 2004.

LIU, J.; LIU, C.; LIU, Y.; CHEN, M.; HU, Y.; YANG, Z. Study on the grafting of chitosan–gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 103-108, 2013.

LUCENA, C. A. A., COSTA, S. C., ELEAMEN, G. R. A., MENDONÇA, E. A. M., OLIVEIRA, E. E. Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. **Revista Polímeros**, 2015.

LUO, X.; HU, S.; ZHANG, X.; LI, Y. Thermochemical conversion of crude glycerol to biopolyols for the production of polyurethane foams. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 323-329, 2013.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alim. Nut. Araraq.**, v. 16, 2005.

MAHLER, D. P. A. **Descromagem hidrometalúrgica de resíduos sólidos (serragem) de couro**. 1999. Dissertação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e dos Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do sul, UFRGS, 1999.

MARCILLA, A.; GÓMEZ-SIURANA, A.; GOMIS, C.; CHÁPULO, E.; CATALÁ, M. C.; VALDÉS, F. J. Characterization of microalgal species through TGTA/FTIR analysis: Application to *Nannochloropsis* sp. **Termochim. Acta**, v. 484, p. 41-47, 2009.

MARIANI, P. D. S. C. **Estudo da Biodegradação da blenda de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSEN, G. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MOTHÉ, C. G.; ARAÚJO, C. R. DE; OLIVEIRA, M. A. YOSHIDA, M. I. - Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 67, p.305-312, 2002.

MU, C.; LIN, W.; ZHANG, M.; ZHU, Q. Towards zero discharge of chromium-containing leather waste through improved alkali hydrolysis. **Waste Management**, v. 23, n. 9, p. 835-843, 2003.

NAGARAJAN, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P.; KISHIMURA, H. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 389-397, 2012.

NISHIHORA, R. K.; NIEHUES, E.; QUADRI, M. G. N.; Propriedades mecânicas e solubilidade de filmes de gelatina reticulados com transglutaminase", p. 14067-14074. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, 2015.

NUNES, L.Y. **Preparação e caracterização de bioblendas poliméricas a partir de gelatina bovina e de tilápia com amido de milho**. 2014, 113f. Dissertação (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio grande do Norte, 2014.

OLIVEIRA, E.C.A.; SARTORI, R.H.; GARCEZ, T.B. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Programa de pós-graduação em solos e nutrição de plantas, 2008.

PAGNO, C. H., COSTA, T. M. H., DE MENEZES, E. W., BENVENUTTI, E. V., HERTZ, P. F., MATTE, C. R. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, 173, 755-762, 2015.

PARK, J.W.; WHITESIDE, W.S.; CHO, S.Y. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 692–700, 2008.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Eng.**, Oxford, 25, 497-507, 1995.

PEREIRA, S.V.; **Obtenção de cromato de sódio a partir das cinzas de incineração de resíduos de couro do setor calçadista visando á produção de sulfato básico de cromo.** Porto Alegre, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Dederal do Rio Grande do Sul, 2006.

PÉRES-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1034-1037, 2001.

PICCIN, J. S.; FERIS, L. A.; COOPER, M.; GUTTERRES, M. Dye Adsorption by Leather Waste: Mechanism Diffusion, Nature Studies, and Thermodynamic Data. **Journal of Chemical & Engineering Data (Online)**, 2013.

PIETRASIK, Z. Binding and textural properties of beef gels processed with k-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. **Meat Science**, v.63, n.3, p.317-324, 2003.

PIOTROWSKA, B. et al. Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fishskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1362-1371, 2008.

PORTO, L. C. **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.** 2007. 95 f (Mestrado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

REIS, L.C.B. **Formulação e caracterização de filmes biodegradáveis de fécula de mandioca e incorporados com polpa de manga e extrato de erva-mate, e seu efeito na preservação de alimentos.** 2011. 151f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, BA.

RHIM, J.W.; PARK, H.M.; HA, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.33, n. 10-11, p.1629-1652, 2013.

RIVERO, S., GARCÍA, M. A., PINOTTI, A. Crosslinking Capacity of Tannic Acid in Plasticized Chitosan Films. **Carbohydrate Polymers**, 82, 270–276, 2010.

ROBERTSON, G. L. Food Packaging: **Principles and Practice, Third Edition**. Taylor & Francis. CRC Press, 3a edição, 2012.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, 866-871, 1998.

SANCHEZ-GONZALEZ, L. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 277-283, 2010.

SANNAN, T.; KURITA, K.; OGURA, K.; IWAKURA, Y. **Polymer**. 19, 458, 1978.

SARAIVA A., COSTA R., CARVALHO L., DUARTE E. The use of biodegradable mulch films in muskmelon crop production. **Basic J. Agric. Sci. Rev.** 1(4): 88-95, 2012.

SCHROOYEN, P. M. M., van der Meer, R., De Kruif, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, 60, 475–479, 2001.

SCOPEL, S. B. **Obtenção e caracterização de filmes poliméricos a partir de amido e de gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologias) - Universidade de Caxias do Sul, 2016.

SHAKILA, J.R.; JEEVITHAN, E.; VARATHARAJAKUMAR, A. Comparison of the properties of multi composite fish gelatin films with that of mammalian gelatin films. **Food Chemical** 1335 (4): 2260-2267, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Spectrometric identification of organic compounds. Wiley, 1998. ISBN 9780471134572.

SILVESTRIN, R.M.; ALENCASTRO, R.B. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 429 p., 2007.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J., Analytical Chemistry. An Introduction, 7.ed. Fort worth: Harcourt College Publishers, 2000.

SMEWW. **4500Norg-B**: Macro-kjedahl method: 2012a.

\_\_\_\_\_. **3111-B**: Metals by flame atomic absorption – direct air-acetylene flame method: 2012b.



\_\_\_\_\_. **3030-E**: Preliminary treatment of samples – filtration for dissolved and suspended metals 2012c.

SOUZA, C. O. Mango and Acerola Pulps as Antioxidant Additives in Cassava Starch Bio-based Film. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2248-2254, 2011.

TANG, C.-H.; JIANG, Y. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. **Food Research International**, v. 40, n. 4, p. 504-509, 2007.

TAPIA-BLÁCIDO, D. **Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos**. 2005. 351 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAUBERT, A.; MANO, J. F.; RODRIGUEZ-CABELLO, J. C. Biomaterials Surface Science. **Wiley**, 2013.

TOUCHALEAUME, F.; MARTIN-CLOSAS, L.; ANGELLIER-COUSSY, H.; CHEVILLARD, A.; CESAR, G.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films. **Chemosphere**, v. 144, p. 433-439, 2015.

WANG, Y. W. MO, W. YAO, H. WU, Q. CHEN, J. CHEN, G. Q. Biodegradation studies of poly(3 – hydroxybutyrate – co – 3 – hydroxyhexanoate). **Polymer Degradation Stability**, v. 85, p. 815 – 821, 2007.

WANG, Y. et al. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films. **Food Chemistry**, v. 166, n. 0, p. 414-422, 2015.

WBG. World Bank Group - Fertilizer consumption (kilograms per hectare of arable land). 2014. Disponível em: < <http://data.worldbank.org/indicator/AG.CON.FERT.ZS> >. Acesso em: 21 de jan. 2017.

WENG, W.; ZHENG, H. Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. **Food Chemistry**, v. 169, n. 0, p. 255-260, 2015.

WENZEL, B. M.; MARCILIO, N. R.; KLUG, J. L.; HECK, N. C.; GODINHO, M. Production of high carbon ferrochromium alloy from footwear leather waste ash through a carbothermic reduction. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 107, p. 375 - 384, 2012.

WIONCZYK, B.; APOSTOLUK, W.; CHAREWICZ, W. A.; ADAMSKI, Z. Recovery of chromium(III) from wastes of uncolored chromium leathers. Part I. Kinetic studies on alkaline hydrolytic decomposition of the wastes. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 2, p. 223-236, 2011.

WOLF, F. A. Collagen and Gelatin. In: (Ed.). Progress in Biotechnology: **Elsevier Science B.V.**, 2003.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 255-262, 2014.

YILDIRIM, M.; HETTIARACHCHY, N. S. Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 270-275, 1997.

YOSHIGA, A.; TOFFOLI, S. M.; WIEBECK, H. Estudo do Composto PVC Reciclado/CaCO<sub>3</sub> em Pastas Vinílicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, nº 3, 2004. p. 134-141.

ZHANG, Y.; REMPEL, C.; MCLAREN, D. Chapter 16 - Thermoplastic Starch. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging** (Second Edition). San Diego: Academic Press, 2014. p.391-412.

ZHAO, R.; TORLEY, P.; HALLEY, P.J. Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 43, p. 3058–3071, 2008.

ZHONG, Y.; SONG, X. Y.; LI, Y. F. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.