

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Marieli Rosseto

**Tratamento enzimático e antimicrobiano em filmes de amido de milho e
gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III**

Passo Fundo
2020

Marieli Rosseto
Tecnóloga em Agronegócio

**Tratamento enzimático e antimicrobiano em filmes de amido e gelatina
recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III**

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Aline Dettmer

Co-orientador: Luciane Maria Colla

Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e
não convencionais na produção de alimentos e
ingredientes

Passo Fundo

2020

CIP – Catalogação na Publicação

R829t Rosseto, Marieli
Tratamento enzimático e antimicrobiano em filmes de amido e gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III [recurso eletrônico] / Marieli Rosseto. – 2020.
3.9 MB ; PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Dettmer. Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Couros – Eliminação de resíduos. 2. Biopolímeros.
3. Enzimas – tratamento. I. Dettmer, Aline, orientadora, II. Colla, Luciane Maria, coorientadora. III. Título.

CDU: 577.11

Catálogo: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

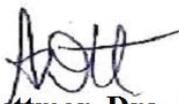
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Tratamento enzimático e antimicrobiano em filmes de amido de milho e gelatina
recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III**

Elaborada por
Marieli Rosseto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



**Aline Dettmer, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)**



**Luciane Maria Colla, Dra., UPF
(Coorientadora)**



Jeferson Steffanello Piccin, Dr., UPF



Camila Baldasso, Dra., UCS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

Dedico aos meus pais e marido, que sempre incentivaram a minha busca por realizar meus sonhos. A minha filha Laura, amor incondicional. E a mim mesma, porque eu mereço!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar coragem quando eu mesma pensei em desistir.

A minha família, pelo amor, dedicação e compreensão nos momentos ausentes.

A minha orientadora Aline Dettmer, pela orientação e paciência, por todo conhecimento transmitido, por ter acreditado no meu potencial para realizar esse projeto, que eu me apaixonei. Saiba! Eu não me imagino chegando aqui sem a sua ajuda.

A minha coorientadora Luciane Maria Colla, por ter acreditado no meu potencial ainda na entrevista, quando até eu mesma duvidava, e dar todo o suporte que precisei nesse período.

A professora Ana Cláudia Marguarites por ter me oportunizado a vivência de grandes momentos durante o estágio e aulas, sempre me auxiliando com muita simpatia.

A todos que doaram um pouquinho de seu tempo para me ajudar nesta caminhada, especialmente as pessoas que mais convivi no Laboratório de Processos. As pessoas mais incríveis que já conheci: César, Daniela, Lillian e Naiana por terem a paciência de começar novamente junto comigo tantas vezes, oferecendo um ombro amigo, parceria e alegria tornando minha caminhada mais leve.

A minha turma do PPGCTA, especialmente as minhas grandes parceiras Viviane, Daiane e Paola, por estarem presentes durante toda essa caminhada.

Ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, aos professores do programa por todas as contribuições.

Aos todos meus amigos pelo apoio incondicional, mas especialmente a Vanusa, minha inspiração veio de ti!

A empresa Sooro Renner Nutrição S.A por acreditar no meu potencial me oferecendo uma flexibilidade de horários que me permitiu vivenciar várias experiências novas.

Aos técnicos de laboratório João e Marilda.

A todos aqueles que contribuíram, o meu muito obrigado!

RESUMO

A reutilização de resíduos agroindustriais para elaboração de filmes biodegradáveis é apontada como uma alternativa sustentável para substituir polímeros de origem fóssil. Dentre as fontes potenciais para sua elaboração, a combinação de proteínas e polissacarídeos se destacam por aprimorar a estabilidade da matriz polimérica. No entanto, o desafio em substituir os polímeros sintéticos tradicionais por materiais oriundos de fontes renováveis está na estabilidade estrutural e funcional durante o armazenamento e o uso. Para atingir esse objetivo é necessário estudar alternativas que permitam prolongar a vida útil desses polímeros, viabilizando sua aplicabilidade. Neste contexto, este estudo tem como objetivo melhorar as propriedades de filmes de amido de milho e gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III (RCCC), através da adição de enzima transglutaminase (TGase) e extratos fenólicos de *Spirulina platensis*. Para avaliar o desempenho da gelatina RCCC nas propriedades dos filmes, sua performance foi comparada com a gelatina comercial. A influência da adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* nos filmes foi verificada através da determinação das propriedades mecânicas, térmicas, químicas, físicas e biológicas dos filmes. Posteriormente, os filmes foram expostos a três diferentes envelhecimentos acelerados que permitem a simulação de possíveis aplicações: termo-oxidação (TO) (70°C), radiação ultravioleta (UV) (lâmpadas solares de 40 w, a 30±1°C) e umidade (UR) (75% de UR em 30°C), durante 64 horas, para posterior caracterização. Ao final foi avaliada a degradação dos filmes em solo sobre a superfície (durante 60 dias - visando avaliar a possibilidade de aplicação do filme como cobertura de solo), e entre camadas de solo (64 horas – avaliando como seria o comportamento do filme para degradação após a sua aplicação). Dentre os filmes elaborados, todos apresentaram maleabilidade, coloração uniforme, sem rupturas ou zonas quebradiças. Os resultados mostram que o uso de aditivos apresentou eficiência para os filmes elaborados com gelatina RCCC, aprimorando suas propriedades e aproximando-as dos filmes controle, elaborados com gelatina comercial, estes não obtiveram o mesmo desempenho com o uso de aditivos, sendo que a adição de fenólicos de *Spirulina* os tornou mais permeáveis e solúveis. Enquanto os filmes RCCC apresentaram melhorias significativas para o uso de ambos os aditivos, enzima e do extrato fenólico de *Spirulina*, sendo que a primeira diminuiu a solubilidade em água (53%) e permeabilidade em vapor de água (2,49%), e o segundo atuou reduzindo a solubilidade (17,35%), Aw (1,25%), permeabilidade (15,48%) e espessura (9,09%). Além disso, tanto a enzima e o extrato fenólico da *Spirulina* exibiram boas propriedades antimicrobianas para o *Aspergillus niger* (RCCC: 8,54%; 40,30%) respectivamente e o *Bacillus pumilus* (RCCC: 9,98%; 45,48%). Avaliando a degradação em solo, os filmes com enzima e com *Spirulina* em sua composição levaram mais tempo para degradar-se fisicamente, o que faz com que atendam a demanda de maior vida útil, podendo ser aplicados em ambiente que monitore umidade e luz UV, como por exemplo cobertura de solo dentro de estufas, na plantação de olerícolas, como alface e rúcula, que possuem um ciclo curto entre o plantio e a colheita. E ao final do processo, ao serem descartados, retornam ao ciclo em forma de matéria orgânica, auxiliando no desenvolvimento das plantas, contribuindo com a sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: Resíduo de couro. Gelatina. Filmes. Reticulação. Inibição. Degradação.

ABSTRACT

The reuse of agro-industrial waste for the production of biodegradable films is considered a sustainable alternative to replace polymers of fossil origin. Among the potential sources for its elaboration, the combination of proteins and polysaccharides stands out for improving the stability of the polymer matrix. However, the challenge in replacing traditional synthetic polymers with materials from renewable sources is structural and functional stability during storage and use. To achieve this objective, it is necessary to study alternatives that allow to prolong the useful life of these polymers, making their applicability feasible. In this context, this study aims to improve the properties of corn starch and gelatin films recovered from leather residues tanned to chromium III (RCCC), through the addition of transglutaminase enzyme (TGase) and phenolic extracts of *Spirulina platensis*. To evaluate the performance of RCCC gelatine on the properties of the films, its performance was compared with commercial gelatine. The influence of the addition of enzyme and *Spirulina* phenolic extract on the films was verified by determining the mechanical, thermal, chemical, physical and biological properties of the films. Subsequently, the films were exposed to three different accelerated aging processes that allow the simulation of possible applications: thermo-oxidation (TO) (70 ° C), ultraviolet radiation (UV) (40 w solar lamps, at 30 ± 1 ° C) and humidity (UR) (75% humidity at 30 ° C), for 64 hours, for further characterization. At the end, the degradation of the films in soil on the surface was evaluated (during 60 days - to evaluate the possibility of applying the film as soil cover), and between soil layers (64 hours - evaluating how the film would behave for degradation after application). Among the elaborated films, all presented malleability, uniform coloring, without breaks or brittle areas. The results show that the use of additives showed efficiency for the films made with RCCC gelatin, improving its properties and bringing them closer to the control films, made with commercial gelatin, they did not obtain the same performance with the use of additives, being that the addition of *Spirulina* phenolics made them more permeable and soluble. While the RCCC films showed significant improvements for the use of both additives, enzyme and the *Spirulina* phenolic extract, the former decreased water solubility (53%) and water vapor permeability (2.49%), and the second acted by reducing solubility (17.35%), Aw (1.25%), permeability (15.48%) and thickness (9.09%). Also, both the enzyme and phenolic extract *Spirulina* exhibited good antimicrobial properties for *Aspergillus niger* (RCCC: 8.54%; 40.30%) and *Bacillus pumilus* (RCCC: 9.98%; 45.48%), respectively. Evaluating soil degradation, films with *Spirulina* and with enzyme in its composition took longer to degrade physically, which makes them meet the demand for a longer useful life, and can be applied in an environment that monitors humidity and UV light, such as soil cover inside greenhouses, in the planting of vegetables, such as lettuce and arugula, which have a short cycle between planting and harvesting. And at the end of the process, when they are discarded, they return to the cycle in the form of organic matter, helping in the development of plants, contributing to environmental sustainability.

Keywords: Leather waste. Gelatin. Films. Crosslinking. Inhibition. Degradation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Nuvem de palavras com palavras frequentemente citadas em títulos de artigos que abordam a temática filmes e enzima	30
Figura 2 - Nuvem de palavras com palavras frequentemente citadas em títulos de artigos que abordam a temática filmes e Spirulina.....	34
Figura 3 - Mecanismos de biodegradação de polímeros.....	39
Figura 4 - Fluxograma geral de materiais e métodos utilizados para desenvolver os filmes biodegradáveis	42
Figura 5 - Determinação de inibição microbiana ocasionada pela adição de extrato fenólico de Spirulina em filmes de amido e gelatina com tratamento enzimático	51
Figura 6 - Recipiente utilizado para ensaio de biodegradação em solo de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	57
Figura 7 - Recipientes e estufa utilizados para simulação de aplicação em solo dos filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	58
Figura 8 - Balanço de massa da extração (A), concentração por ultrafiltração (B) e diafiltração (C) da gelatina de resíduos de couro curtido ao cromo III.....	60
Figura 9 - Mecanismo de ação da enzima transglutaminase.....	63
Figura 10 – Inibição microbiana de <i>Aspergillus niger</i> (A) e <i>Bacillus pumilus</i> (B) ocasionada pelo uso de extrato fenólico de <i>Spirulina platensis</i> nas concentrações de (0, 2, 4 e 6%) em filmes de amido e gelatina comercial com tratamento enzimático	64
Figura 11 - Determinação de FTIR dos filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de Spirulina.....	76
Figura 12 - Determinação de termogravimetria (TG) e derivada (DTG) de filmes de amido e gelatina comercial (COM) com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	79
Figura 13 - Determinação de termogravimetria (TG) e derivada (DTG) de filmes de amido e gelatina RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	80
Figura 14 - Gráficos de Pareto para inibição de <i>Aspergillus niger</i> em filmes de amido e gelatina comercial (a) e RCCC (b) com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	82
Figura 15 - Gráficos de Pareto para inibição de <i>Bacillus pumilus</i> em filmes de amido e gelatina comercial (a) e RCCC (b) com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	83

Figura 16 - Gráficos de resistência à tração de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> durante o envelhecimento por luz ultravioleta (UV), Termo oxidação (TO) e umidade (UR) por 64h	86
Figura 17: Gráficos de alongação de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> durante o envelhecimento por luz ultravioleta (UV), Termo oxidação (TO) e umidade (UR) por 64h	88
Figura 18 - Gráfico FTIR de filmes de amido e gelatina comercial (A) e gelatina RCCC (B) e com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> durante o envelhecimento termo oxidativo (TO), umidade controlada (UR) e luz ultravioleta (UV) por 64h.....	90
Figura 19 - Aplicação como cobertura de solo de filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	93
Figura 20 - Análise de FTIR para a aplicação como cobertura de solo de filmes de amido e gelatina comercial (A) e RCCC (B) com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> ...	95
Figura 21 - Biodegradação em solo de filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos realizados com filmes de amido e gelatina avaliando propriedades de solubilidade em água, resistência à tração e permeabilidade ao vapor de água	24
Tabela 2 – Níveis reais e codificado fatorial 2 ² com ponto central e variáveis reais e codificados para avaliar o efeito do amido de milho e enzima na solubilidade de filmes de gelatina comercial	49
Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial 2 ² para filmes elaborados com gelatina comercial e gelatina RCCC, utilizando as condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	52
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do solo utilizado para determinação de biodegradação e aplicação dos filmes.....	57
Tabela 5 - Caracterização do resíduo de couro curtido ao cromo	59
Tabela 6 - Caracterização da gelatina RCCC extraída, RCCC concentrada (concentrada em membradas de ultrafiltração) e comercial	61
Tabela 7 – Resultados obtidos em função das variáveis de amido e enzima contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas através da solubilidade (%)	62
Tabela 8 – Efeitos estimados das variáveis percentual de amido e percentual de gelatina sobre a solubilidade dos filmes de gelatina comercial	62
Tabela 9 - Concentração de fenóis (mg/L) na solução filmogênica em função do percentual de <i>Spirulina</i> utilizado	63
Tabela 10 – Resultados obtidos para os filmes elaborados com gelatina comercial em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas de acordo com a propriedade avaliada	67
Tabela 11 - Resultados obtidos para os filmes elaborados com gelatina RCCC em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas de acordo com a propriedade avaliada	67
Tabela 12 - Análise estatística dos dados do planejamento que avaliou o efeito produzido pela adição da enzima TGase e do extrato fenólico de <i>Spirulina</i> em filmes de amido e gelatina de comercial e gelatina RCCC	69
Tabela 13 - Resultados obtidos na análise de cor para os filmes elaborados com gelatina comercial e RCCC em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de <i>Spirulina</i> contendo valores reais e codificadas	74

Tabela 14 - Análise estatística da determinação de cor que avaliou o efeito produzido pela adição da enzima TGase e do extrato fenólico de <i>Spirulina</i> em filmes de amido e gelatina de comercial e gelatina RCCC.....	74
Tabela 15 - Inibição microbiana em filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	82
Tabela 16 - Perda de massa durante exposição termo oxidativa (TO), umidade controlada (UR) e luz ultravioleta (UV) em filmes de amido e gelatina RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Estudos realizados para obtenção de fontes alternativas de gelatina para aplicação em filmes biodegradáveis	26
Quadro 2 - Estudos empregando enzima transglutaminase como reticulante para melhorias na estrutura polimérica de proteínas.....	32
Quadro 3 - Estudos que utilizam a <i>Spirulina</i> como agente antimicrobiano	35
Quadro 4 - Estudos de envelhecimento acelerado em filmes: materiais, condições experimentais e monitoramento realizado	37
Quadro 5 - discussão acerca dos comprimentos de onda em cm^{-1} evidenciados na análise de FTIR de filmes de amidos e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

RCCC: Resíduo de Couro Curtido ao Cromo III.

TGase: enzima transglutaminase.

UV: Ultravioleta

UR: Umidade Controlada

TO: Termo oxidação

COM: Comercial

CONC: Concentrada

CECS: Com Enzima e Com *Spirulina*

CESS: Com Enzima e Sem *Spirulina*

SECS: Sem Enzima e Com *Spirulina*

SESS: Sem Enzima e Sem *Spirulina*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 AMIDO E GELATINA	22
2.2 EXTRAÇÃO DA GELATINA DE RESÍDUOS DE COURO.....	27
2.3 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE	29
2.4 AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	33
2.5 DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS	35
2.6 O USO DE FILMES COMO COBERTURA DE SOLO	40
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O REFERENCIAL TEÓRICO	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 MATERIAIS	43
3.2 MÉTODOS.....	43
3.2.1 Extração, concentração da gelatina de Resíduos de Couro Curtido ao Cromo III (RCCC).....	43
3.2.2 Caracterização das gelatinas comercial, extraída e concentrada de RCCC.....	44
3.2.2.1 Determinação de proteína	44
3.2.2.2 Determinação de força de bloom	44
3.2.2.3 Determinação de pH.....	44
3.2.2.4 Determinação de condutividade.....	44
3.2.2.5 Determinação de umidade.....	45
3.2.2.6 Determinação de resíduos minerais – cinzas.....	45
3.2.2.7 Determinação de cromo hexavalente	45
3.2.2.8 Determinação de Sódio.....	46
3.2.2.9 Determinação de Cálcio e Magnésio	46
3.2.3 Extração dos fenóis da <i>Spirulina</i>	47
3.2.4 Caracterização do extrato fenólico da <i>Spirulina</i>	47
3.2.5 Elaboração dos filmes.....	47
3.2.5.1 Elaboração dos filmes pela técnica de espalhamento	47
3.2.5.2 Avaliação do efeito do amido de milho e enzima em filmes de gelatina comercial.....	48
3.2.5.3 Efeito do emprego de extrato fenólico de <i>Spirulina</i> na produção de filmes de gelatina comercial.....	49

3.2.5.4	Elaboração de filmes com gelatina comercial e gelatina RCCC com condições otimizadas de amido, enzima e <i>Spirulina</i>	52
3.2.6	Caraterização dos filmes	52
3.2.6.1	Determinação de solubilidade em água.....	52
3.2.6.2	Determinação de atividade de água (Aw)	53
3.2.6.3	Determinação de propriedades mecânicas – Resistência a tração e alongação	53
3.2.6.4	Determinação de permeabilidade ao vapor de água.....	53
3.2.6.5	Determinação de espessura	54
3.2.6.6	Determinação de aparência global	54
3.2.6.7	Determinação de cor.....	55
3.2.6.8	Determinação de propriedades estruturais - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	55
3.2.6.9	Determinação de propriedades térmicas – Termogravimetria e derivada.....	55
3.2.6.10	Determinação de degradação sob luz ultravioleta, umidade controlada e termo oxidação	56
3.2.6.11	Determinação de degradação em solo.....	56
3.6.12	Tratamento de dados e análise estatística.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DE COURO.....	59
4.2	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA.....	59
4.3	DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO FILME	61
4.3.1	Determinação da concentração de enzima e amido	61
4.3.2	Efeito da adição da <i>Spirulina</i> sobre as propriedades antimicrobianas do filme..	63
4.3.3	Filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	66
4.3.3.1	Solubilidade em água	70
4.3.3.2	Atividade de água (Aw)	70
4.3.3.3	Propriedades mecânicas: Resistência à tração e alongação	71
4.3.3.4	Permeabilidade ao vapor de água.....	72
4.3.3.5	Espessura.....	72
4.3.3.6	Aparência global e cor.....	73
4.3.3.7	FTIR	75
4.3.3.8	Termogravimetria e derivada (DTG)	78

4.3.3.9 Inibição microbiana de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	81
4.4.4 Envelhecimento acelerado	85
4.4.4.1 Propriedades mecânicas	85
4.4.4.2 FTIR.....	89
.....	90
4.4.4.3 Termogravimetria	91
4.5.1 Aplicação como cobertura de solo de fimes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e <i>Spirulina</i>	92
4.5.1.1 FTIR.....	94
4.6.1 Biodegradação em solo de fimes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e <i>Spirulina</i>	96
5 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE MILHO	114
APÊNDICE B – CURVA DE PROTEÍNA – MÉTODO LOWRY	115
APÊNDICE C – CURVA DE DIFENIL PARA ANÁLISE DE CROMO.	116
APÊNDICE D – CURVA ÁCIDO GÁLICO PARA ANÁLISE DE FENÓIS.....	117
APÊNDICE E – CURVA DE AMIOSE E AMILOPECTINA	118
APÊNDICE F – ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA DOS MATERIAIS UTILIZADOS.....	120
APÊNDICE G – FTIR DOS MATERIAIS UTILIZADOS	121
APÊNDICE H – DADOS DIÁRIOS DE TEMPERATURA DA ESTUFA ADAPTADA PARA DEGRADAÇÃO DOS FILMES EM SOLO.....	122
APÊNDICE I – CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA RETIDA E PERMEADO.....	124
APÊNDICE J – ARTIGO FINAL PARA PUBLICAÇÃO	125
APÊNDICE L – ARTIGO DE REVISÃO	144
APÊNDICE M – ARTIGOS PROVENIENTES DESTE ESTUDO PUBLICADOS EM CONGRESSOS.....	145

1 INTRODUÇÃO

A poluição causada por polímeros de origem petrolífera é um importante desafio ambiental da atualidade, uma vez que, cerca de 300 milhões de toneladas são produzidas anualmente em todo o mundo, e aproximadamente 8 milhões acabam nos oceanos a cada ano, sendo que há tendência de dobrar esta quantidade até 2034 (Plastic Oceans, 2020). O tempo de degradação do material é um fator de grande relevância, que ocasiona transferência de poluentes orgânicos para humanos e para a biota (GIRI; ADHIKARI, 2020). Portanto, compreender e gerenciar esta poluição é uma prioridade para os formuladores de políticas, empresas e cientistas (WINTON et al, 2020).

Por outro, a cadeia de processamento de carnes é ampla, abrangendo outros setores industriais além do alimentício, como o coureiro, por exemplo, que é um dos setores econômicos mais importantes globalmente, sendo o Brasil reconhecido mundialmente como referência em qualidade de couros, o que contribui com o desenvolvimento econômico do país. No entanto, o processo de conversão de peles em couro gera uma grande quantidade de resíduos potencialmente poluidores, especialmente por conter cromo III, classificado pela ABNT - NBR 10.004 (2004) como Classe I (perigoso), portanto, estes resíduos devem ser gerenciados de forma adequada (METZ, 2016).

Transformar resíduos industriais em material útil para aplicações industriais ajuda na circulação da economia. Uma alternativa sustentável que pode ser adotada no caso das indústrias de couro e poluição plástica está na extração de gelatina dos resíduos de couro curtido ao cromo III (RCCC), que juntamente com outros biopolímeros, como o amido, podem ser utilizados para elaboração de filmes biodegradáveis. Ambas as fontes são abundantes e de baixo custo, degradam-se rapidamente, minimizando assim impactos ambientais provenientes do ciclo de vida estendido do polímero fóssil.

Mesmo com tendências promissoras para aplicabilidade, polímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis apresentam algumas desvantagens, como baixas propriedades mecânicas, degradação rápida, alta capacidade hidrofílica. (DEMIRGÖZ *et al.*, 2000; SHANKAR *et al.*, 2019).

O desafio em substituir os polímeros sintéticos tradicionais por materiais oriundos de fontes renováveis e facilmente degradáveis é que estes tenham estabilidade estrutural e funcional durante o armazenamento e o uso (SHI *et al.*, 2017). Para atingir esse objetivo é necessário estudar alternativas que permitam prolongar a vida útil desses polímeros, viabilizando sua aplicabilidade. Entre as alternativas estudadas neste trabalho estão a

reticulação da gelatina com a enzima transglutaminase e a avaliação da ação antifúngica do extrato de *Spirulina platensis*. (SHI *et al.*, 2017).

A reticulação da gelatina promovida pela enzima transglutaminase surge como uma alternativa eficaz para melhorar as propriedades de filmes de amido e gelatina (JIANG *et al.*, 2019). A TGase catalisa a reticulação entre resíduos de glutamina intra e inter-cadeias e de peptídeos de lisina e vem sendo utilizada para modificar a estrutura das proteínas

Os agentes antifúngicos, como os compostos fenólicos da *Spirulina platensis* inibem a atividade metabólica microbiana. As microalgas, como a *Spirulina* são um recurso natural interessante, pois crescem em uma ampla gama de ambientes e não interferem na produção de alimentos (KATIYAR *et al.*, 2017). Ambos possuem potencial para serem estudados como aditivos para melhoria das propriedades dos filmes. Segundo Mir *et al.* (2018) o uso de ingredientes variados na elaboração de filmes biodegradáveis vem apresentando resultados inovadores nas propriedades dos filmes.

Neste contexto, este estudo está inserido na linha de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) que engloba Processos Biotecnológicos e Não Convencionais na Produção de Alimentos e Ingredientes, com ênfase no projeto sobre a Produção de Alimentos, Ingredientes e Produtos de Interesse Industrial por Bioprocessos.

O objetivo deste estudo foi avaliar se as propriedades de filmes biodegradáveis elaborados com gelatina extraída de resíduos de couro poderiam ser melhoradas com o uso de TGase e extratos fenólicos microalgais.

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar o efeito da concentração da enzima transglutaminase e de amido de milho para produção dos filmes elaborados com gelatina comercial;
- b) analisar o efeito da concentração do extrato fenólico de *Spirulina platensis* sobre a inibição antimicrobiana nos filmes de amido e gelatina comercial com tratamento enzimático.
- c) avaliar o efeito da adição de enzima transglutaminase e do extrato fenólico de *Spirulina platensis* nas propriedades de filmes elaborados com gelatina comercial e gelatina extraída de resíduos de couro curtido ao cromo III nas propriedades físicas, químicas, térmicas, mecânicas e biológicas dos filmes produzidos;
- d) avaliar a degradação dos filmes quando submetidos a diferentes condições ambientais;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMIDO E GELATINA

A gelatina representa um dos materiais mais interessantes para o desenvolvimento de filmes, principalmente, devido às suas boas propriedades de formação de filmes e abundância na natureza (SUDERMAN *et al.*, 2018). É obtida após a desnaturação parcial das cadeias do colágeno, quando a água penetra em sua estrutura, aumentando a hidratação nos grupos da cadeia polipeptídica, ocasionando perda das forças da estrutura que a mantém unida, dissociando as moléculas de colágeno em moléculas menores (SCOPEL, 2018). Pode ser classificada em tipo A (pré-tratamento ácido) e tipo B (pré-tratamento alcalino) (BENJAKUL; KITTIPHATTANABAWON, 2018). É composta principalmente por carbono (50,5%), oxigênio (25,2%), nitrogênio (17,0%) e hidrogênio (6,8%) (HANANI *et al.*, 2014). As fontes mais abundantes de gelatina são a pele e os ossos de suínos e bovinos (GÓMES-GUILLÉN *et al.*, 2011).

O amido é um dos principais materiais biodegradáveis de interesse comercial, além de ser uma base atraente para materiais poliméricos, devido à sua abundância e capacidade de ser processado em equipamentos convencionais de processamento de polímeros (KOWALCZYK *et al.*, 2015). É a mistura de dois polímeros de alfa-glicose a amilose e a amilopectina (LIMA, 2010). Em geral, o polímero linear, amilose corresponde a cerca de 20 % em peso do grânulo, e o polímero ramificado, amilopectina, o restante (CHANDRA; RUSTGI, 1998). É o segundo polissacarídeo natural mais abundante em plantas superiores e representa sua maior reserva de carboidratos. Esses polissacarídeos podem ser denominados fécula (substância amilácea extraída de raízes, tubérculos e rizomas) e amido (extraído de grão e cereais) (ANVISA, 2005). Os vegetais considerados mais importantes para a produção comercial de amido são o milho, o trigo, o arroz, a mandioca e a batata, que juntos representam mais de 99% do amido produzido (MANTLEY, 2016).

2.1.2 Filmes de amido e gelatina

O amido e gelatina se tornam foco de pesquisas para elaboração de filmes, pois a mistura de polímeros é um processo utilizado para desenvolver novos materiais e aperfeiçoar as propriedades do polímero, resultando em materiais com melhores propriedades quando

comparados com aqueles feitos de componentes puros (AGAMA-ACEVEDO; A BELLO-PEREZ, 2017). A adição de hidrocolóides (como a gelatina) ao amido fornece proteção aos grânulos de amido contra o cisalhamento durante o processamento. Ele contém umidade e a solubilidade em água e a absorção de água da mistura (MAHMOOD *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2017) estudaram as modificações causadas nos filmes de gelatina com a adição de amido. Eles mostraram que aumentou a espessura, a transparência e a resistência mecânica dos filmes, diminuiu a solubilidade e melhorou a estrutura, o que resulta na ampliação de suas possibilidades de aplicação.

Fakhouri *et al.* (2012) estudaram filmes feitos de amido de mandioca e gelatina, os autores concluíram que as concentrações mais altas de gelatina aumentaram a permeabilidade ao vapor de água, a solubilidade da água, a espessura e os valores de resistência mecânica, além de reduzir a opacidade. Por outro lado, concentrações mais altas de amido aumentaram a espessura e melhoraram as propriedades mecânicas.

Diversos estudos foram realizados para avaliar a aplicabilidade de filmes de amido e gelatina. Eles analisam propriedades mecânicas, solubilidade e permeabilidade modificando vários aspectos desde a quantidade de amido/gelatina até a inserção de aditivos ou testes realizados com diferentes plastificantes. Os resultados mostram que as propriedades variam de acordo com a formulação dos filmes, representado na Tabela 1

Tabela 1- Estudos realizados com filmes de amido e gelatina avaliando propriedades de solubilidade em água, resistência à tração e permeabilidade ao vapor de água

Autores	Estudo e principais matérias primas	Solubilidade (%) *	Resistência a tração (MPa)	Permeabilidade ao vapor de água (g mm / m ² d kPa)
Fakhouri <i>et al.</i> (2012)	Avalia a diferença ocasionada pelos uso de diferentes plastificante, no caso glicerol e sorbitol sobre as propriedades dos filmes	Glicerol: de 21,49 ± 2,23 a 39,51 ± 1,63	Glicerol: de 64,29 ± 9,55 a 166,32 ± 3,51	Glicerol: de 3,59 ± 0,35 a 6,53 ± 0,66
		Sorbitol: de 20,81 ± 1,02 a 39,41 ± 1,10	Sorbitol: de 107,61 ± 6,44 a 170,31 ± 6,13	Sorbitol: de 3,91 ± 0,15 a 7,45 ± 0,74
Acosta <i>et al.</i> (2016)	Filmes antifúngicos à base de mistura de amido de milho e gelatina bovina, contendo óleos essenciais, avaliaram as propriedades funcionais de filmes.	----	De 22 ± 2 a 25 ± 2	De 4,2 ± 0,2 a 5,9 ± 0,4
Scopel <i>et al.</i> (2018)	Compara propriedades de filmes de amido de milho e gelatina comercial <i>versus</i> gelatina recuperada de resíduos de couro curtidos ao cromo.	Gelatina comercial: 12	Gelatina comercial: 37	Gelatina comercial: 13
		Gelatina recuperada: 44	Gelatina recuperada: 2,5	Gelatina recuperada: 24
Alias; Sarbon (2019)	Filme de gelatina de pele de frango incorporado com amido de batata.	0% de amido de batata: 93,66 ± 1,94	0% de amido de batata: 2,11 ± 1,12	0% de amido de batata: 2,10 ± 2,10
		10% de amido de batata: 72,52 ± 4,76	10% de amido de batata: 2,01 ± 0,29	10% de amido de batata: 2,08 ± 0,29

*Solubilidade em água, 25°C por 24 horas

Como o amido e a gelatina são fontes amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, agrícola e outras, pesquisas com estes materiais vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de oferecer oportunidades potenciais de revalorização econômica de resíduos agroindustriais para serem utilizados como matriz polimérica na síntese de filmes biodegradáveis. Os resíduos e subprodutos gerados em maiores quantidades incluem resíduos de frutas e vegetais (cascas, sementes e caules), resíduos de grãos (arroz, trigo, soja) e produtos proteicos (quitosana, gelatina, proteína de soro de leite) (FLÔRES *et al.*, 2017).

Percebe-se que a gelatina está entre os resíduos agroindustriais mais gerados, ela pode ser extraída de diversas fontes alternativas e utilizada para a síntese de filmes, como está apresentado no Quadro 1.

Quadro 1- Estudos realizados para obtenção de fontes alternativas de gelatina para aplicação em filmes biodegradáveis

Autor	Fonte de gelatina	Estudo
Scopel <i>et al.</i> (2017)	Resíduos de couro curtido ao cromo III	Realizaram estudo comparativo de filmes elaborados com gelatina extraída resíduos de couro curtido ao cromo III, com gelatina comercial, adicionando amido de milho e glicerol. E concluíram que a gelatina extraída torna os filmes de amido mais higroscópicos, mais solúveis em água, menos resistentes e mais flexíveis.
Dang; Shan; Chen (2018)		Adicionaram junto a gelatina de resíduos de couro a β -ciclodextrina para elaboração de filmes, e concluíram que ela pode formar ligações intermoleculares com a gelatina, melhorando suas propriedades e aumentando a aplicabilidade das misturas nos campos científico, médico e comercial.
Jridi <i>et al.</i> (2020)	Pele de peixe	Investigaram a influência da pectina da casca de laranja em filmes de gelatina de peixe (pele do peixe-gatilho cinza - <i>Balistes capriscus</i>). Resultando em filmes compostos com propriedades térmicas, mecânicas e estruturais aprimoradas, além de altas capacidades antioxidantes e antibacterianas.
Syahida <i>et al.</i> (2020)		Avaliaram os efeitos da cera de palma em filmes de gelatina de peixe (pele de tilápia) para aplicação em embalagens de alimentos. E concluíram que os filmes com adição de cera de palma apresentaram melhores propriedades mecânicas e de barreira à água do que o filme de gelatina pura, além de apresentar maior resistência à radiação UV.
Peña-rodriguez <i>et al.</i> (2014)	Pele de suíno	Desenvolveram filmes com gelatina de pele de suíno e incorporaram tanino hidrolisável de castanha. E concluíram que a incorporação de tanino afetou a estrutura química dos filmes devido ao estabelecimento de interações de hidrogênio entre os componentes, reduzindo a cristalinidade da gelatina e diminuindo a captação de água dos filmes com tanino.
Said; Sarbon (2020)	Pele de frango	Otimizaram a formulação de filmes compostos à base de gelatina de pele de frango com incorporação de amido de arroz e curcumina. A formulação otimizada do filme foi com incorporação de amido de arroz a 20% (p / p) e curcumina a 0,03% (p / v) e apresentou melhores propriedades mecânicas com baixo valor de permeabilidade e boa atividade antioxidante.

Dentre os estudos abordados, a temática que envolve resíduos de couro curtido ao cromo III se torna interessante, visto que a indústria do couro é de grande importância para o Brasil, que é reconhecido mundialmente como referência em qualidade de couros e possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com maior número de curtumes localizado no estado Rio Grande do Sul (cerca de 200) (CICB, 2018).

O resíduo proveniente do processamento da pele animal, gerado após o curtimento (quando realizado ajuste de espessura e recorte do couro) originam o resíduo de rebaixe e as aparas de couro curtido, que estão entre os mais complexos do ponto de vista ambiental (CABEZA *et al.*, 1998). Esses resíduos gerados contêm cerca de 20% de colágeno, que quando hidrolisado produz a gelatina, que pode ser utilizada para vários fins não comestíveis (MASILAMANI *et al.*, 2016).

2.2 EXTRAÇÃO DA GELATINA DE RESÍDUOS DE COURO

A extração da gelatina dos resíduos de couro ocorre através de hidrólise, que é uma reação química em meio aquoso, em que a água sofre dupla decomposição em um composto, eficiente na solubilização de proteínas (HIJAZIN *et al.*, 2010).

Para extrair a gelatina presente nos resíduos de couro curtido ao cromo III a hidrólise pode ser em meio ácido, alcalino ou enzimático, depende da finalidade de uso. Quando realizada em meio ácido, se utiliza um ácido mineral em solução aquosa, que pode estar diluído ou concentrado. Os ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico (BARCZA, 2010). Gera um extrato líquido com alto teor de cromo e uma torta sólida com teor reduzido de metal (FERREIRA *et al.*, 2010). Em meio alcalino, a hidrólise alcalina gera a gelatina em meio aquoso e a torta sólida rica em cromo (CABEZA *et al.*, 1998). E a hidrólise enzimática ocorre quando há a adição de enzimas na hidrólise, que catalisam a quebra das ligações peptídicas das proteínas acelerando a velocidade da reação, sem participar dela como reagente ou produto (RIBEIRO, 2003). Faz com que as cadeias do colágeno se dividam em cadeias de menor massa molar do que as da gelatina (CANTERA *et al.*, 2002). Esse produto é chamado colágeno hidrolisado (OCAK *et al.*, 2010).

A hidrólise alcalina é vista como uma alternativa para ajudar no desenvolvimento de tecnologias limpas (HIJAZIN *et al.*, 2010). É utilizada para a extração de gelatina de RCCC devido a eficiência na extração de proteínas.

Cabeza *et al.* (1998) utilizaram MgO como alcalinizante (6% sobre a massa em base seca de RCCC), com agitação de 16 rpm, a 72°C por 6 h utilizando proporção entre couro e

água de 1:5 em massa. Obtiveram uma gelatina técnica (17,35% de nitrogênio) que pode ser utilizada como cosméticos, adesivos, impressão, fotografia, microencapsulação, filmes ou aditivo em produtos de acabamento para a indústria do couro. Além do hidrolisado de colágeno que tem usos potenciais como fertilizante e em aditivos para ração animal. E o bolo restante após a remoção da proteína foi tratado quimicamente para purificar o óxido crômico, que pode ser reutilizado para curtimento.

Scopel *et al.*, (2017) extraíram a gelatina de resíduos de couro curtido ao cromo III, utilizando MgO como agente alcalinizante (50 g de resíduo de RCCC, 250 mL de água e 2 g de MgO), sendo conduzida sob agitação orbital (180rpm), durante 6 h a 70 ° C, seguida de filtração em bomba a vácuo, obtendo através desse processo a gelatina em meio aquoso com teores de nitrogênio de 2186 mg L⁻¹, que foi utilizada para a elaboração de filmes biodegradáveis.

E Dang, Shan e Chen (2018) extraíram a gelatina de resíduos de couro curtido ao cromo III através de hidrólise alcalina, utilizando a mistura de RCCC, água e 5% da massa de resíduos de sulfato de cálcio, mantendo agitação de 8 a 10 h, com temperatura de 85 °C, seguida de filtração e ajuste de pH a 6,5. Após essa etapa, a gelatina foi seca por pulverização, apresentou cerca de 40 % de nitrogênio (análise elementar) e foi utilizada na elaboração de filmes de gelatina e β -ciclodextrina.

Mesmo com tendências promissoras de aplicabilidade, a gelatina extraída de RCCC, apresenta algumas desvantagens quando utilizadas para elaboração de filmes, como baixas propriedades mecânicas, taxa de degradação rápida, alta capacidade hidrofílica, especialmente em ambientes úmidos, inviabilizando sua aplicação (SCOPEL *et al.*, 2017). O desafio é obter materiais com propriedades equivalentes a produtos sintéticos e para tal, estas propriedades podem ser superadas com a combinação adequada de compostos e/ou aditivos que possam promover modificações/melhorias na matriz polimérica (MASILAMANI *et al.*, 2016).

2.3 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE

As enzimas são proteínas, que devido ao seu poder de ativação específica e de conversão de substrato em produto, possuem atividade catalítica (FENEMA, 2000).

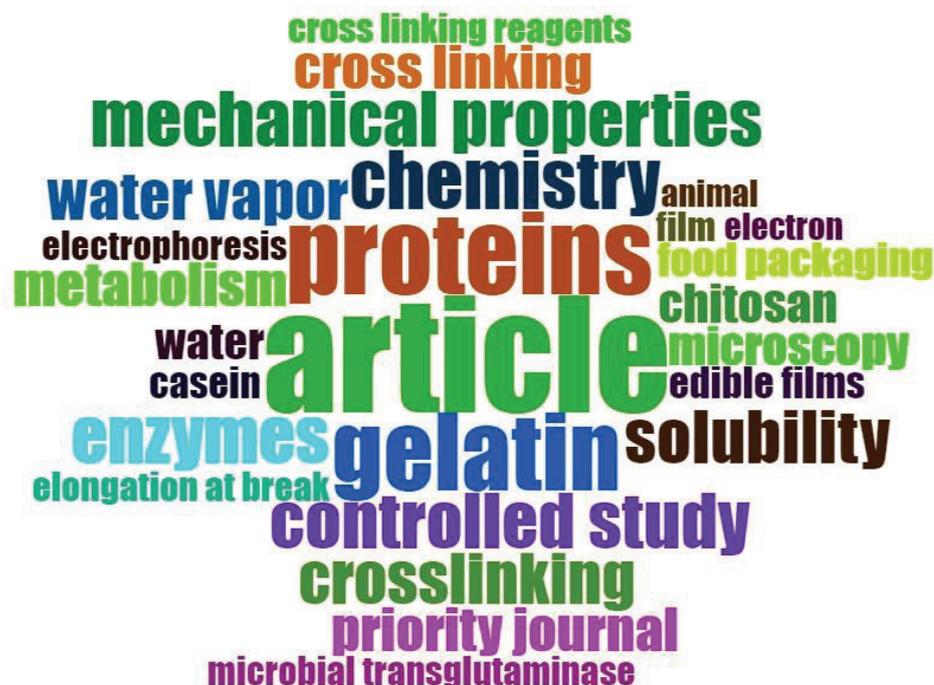
As transglutaminases catalisam a formação de ligações isopeptídicas covalentes entre moléculas de proteínas de diferentes origens (SABBAH *et al.*, 2019). Ela catalisa a reticulação entre resíduos de glutamina intra e inter-cadeias e de peptídeo de lisina, sendo utilizada para modificar a estrutura da proteína (CHENG *et al.*, 2019).

Esta interligação resulta na modificação de várias propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade térmica, ligação à água ou capacidade de emulsificação, formação de espuma, viscosidade, elasticidade e comportamento de geleificação de proteínas (GASPAR; GÓES-FAVONI, 2015). Contribuindo para a obtenção de um produto mais estável, rígido e complexo (AMIRDIVANI *et al.*, 2018).

Estudos apontam que a TGase pode ser usada para modificar as propriedades da maioria dos filmes de proteína, como soja (TANG *et al.*, 2005), ervilhaca amarga (FERNANDEZ-BATS *et al.*, 2018), caseína (FÆRGEMAND *et al.* 1999), colágeno (ELANGO *et al.*, 2017); (CHENG *et al.*, 2019) gelatina (AL-HASSAN; NORZIAH, 2017); (KAEWPRACHU *et al.*, 2017); (BATTISTI *et al.*, 2017), goma guar (SORDE; ANANTHANARAYAN, 2019), pectina (ROSSI MARQUEZ *et al.*, 2017).

Ao realizar uma análise bibliométrica na base Scopus, com o termo “films enzyme”, avaliando o período de 2000 a 2020, há um total de 135 artigos, o Brasil ocupa o 3º lugar no ranking de pesquisas nessa temática, que possui taxa de crescimento anual de 3,72%. Evidenciou-se na nuvem de palavras gerada com auxílio da ferramenta Bibliometrix do software RStudio®, que as palavras “proteins”, “gelatin”, “microbial transglutaminase”, “solubility”, “crosslinking” e “mechanical propoperties”, são frequentemente citadas nos títulos dos artigos envolvendo esse tema, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Nuvem de palavras com palavras frequentemente citadas em títulos de artigos que abordam a temática filmes e enzima



As palavras encontradas vêm ao encontro do objetivo do procedimento de reticulação nos filmes, que é uma estratégia para melhorar as propriedades mecânicas, físicas e térmicas dos materiais (GARAVAND *et al.*, 2017). Além de possuir capacidade de prevenir a absorção excessiva de umidade e as reformas macromoleculares, além da disponibilidade e custos acessíveis quando comparados a novas abordagens como, por exemplo, a adição de nanopartículas como cargas (KUMAR; SINGH, 2008).

Em polímeros, é possível seguir duas abordagens diferentes: reticulação e pós-reticulação. No primeiro caso, o agente reticulante é adicionado diretamente durante a preparação do polímero, enquanto no último caso, a reticulação ocorre após a formação do polímero (TILLET *et al.*, 2011).

O pH e a temperatura possuem influência direta no grau de reticulação que a enzima promove, uma vez que a enzima é sensível aos fatores externos, que interferem na atividade enzimática. Brandalise (2017) estudou a interferência das modificações de pH e temperatura sob a atividade enzimática da TGase, e observou que a condição ótima de atividade enzimática se deu com a temperatura de 37°C a 50°C, e pH de 7 e 8. Já Liu *et al.* (2016) variou as temperaturas da gelatina em meio aquoso com presença da enzima TGase em 15°C, 25°C e

35°C e percebeu que com o aumento da temperatura as estruturas de rede ficaram mais fortes e compactas indicando um maior grau de reticulação.

O Quadro 2 apresenta pesquisas publicadas na literatura sobre o uso da enzima TGase para melhorar características dos filmes.

Quadro 2 - Estudos empregando enzima transglutaminase como reticulante para melhorias na estrutura polimérica de proteínas

Autor	Materiais utilizados	Objetivo	Resultados obtidos
Al-Hassan; Norziah (2017)	Gelatina de peixe, amido e TGase.	Estudar o efeito da gelatina de peixe e da enzima TGase sobre as propriedades dos filmes de amido.	A adição da TGase com concentrações acima de 1 mg afeta a viscosidade, aumentando as propriedades mecânicas.
Fernandez-Bats <i>et al.</i> (2018)	Proteína de ervilhaca amarga, TGase, Tetraetilortossilicato (98%) e glicerol.	Elaborar um novo biomaterial composto com proteínas de ervilhaca amarga reticuladas pela TGase e nanopartículas de sílica mesoporosa aminada	Os filmes elaborados apresentaram aumento de resistência e alongação, melhores propriedades de barreira a vapor de gás e água e aprimoramento das atividades antimicrobianas.
Sorde; Ananthanarayan (2019)	Farelo de coco, carbobenzoil glutamina glicina, glutatona, goma guar, glutamil-y monohidroxamato, ácido tricloroacético, cloreto férrico e TGase.	Avaliar o efeito do tratamento com TGase nas propriedades do filme composto de proteína de coco e goma de guar	A adição de TGase aumentou significativamente a resistência mecânica e o alongamento. Além de aprimorar as propriedades de barreira, como permeabilidade ao vapor de água e taxas de transferência de oxigênio. E ainda houve aumento na temperatura de fusão com o aumento da concentração de TGase.
Cheng <i>et al.</i> (2019)	Colágeno, cal, glicerol e TGase.	Estuda a reticulação e as propriedades de formação de filme de fibras de colágeno modificadas por TGase	A reticulação com TGase diminuiu a espessura de todos os filmes, e melhoraram as propriedades mecânicas e a estabilidade térmica, especialmente a 45 °C e 65 °C.

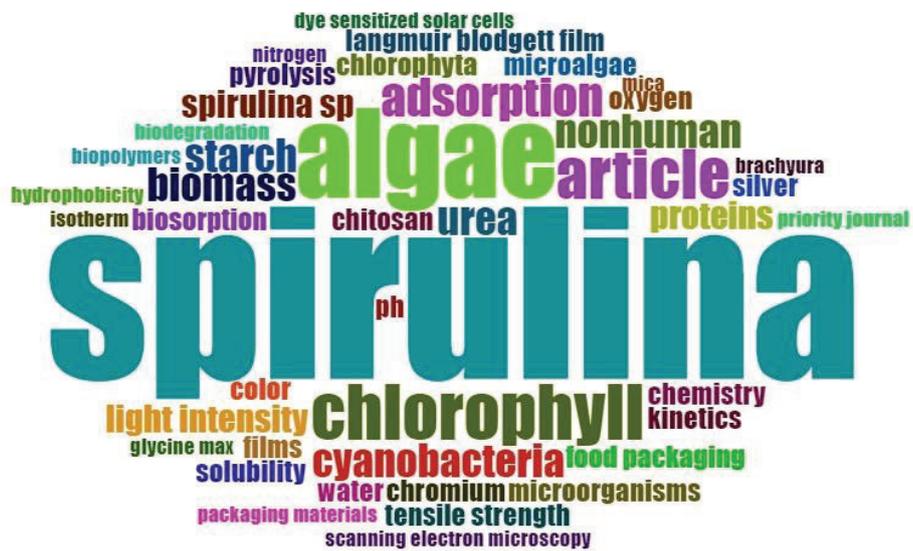
2.4 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos são incorporados aos materiais poliméricos para melhorar seu prazo de validade, através da prevenção ou inibição da deterioração bacteriana ocasionada por microrganismos (BALDEVRAJ; JAGADISH, 2011). Geralmente são classificados em materiais orgânicos e inorgânicos, os materiais orgânicos incluem fenóis, compostos halogenados, sais de amônio quaternário e biopolímeros naturais, e os inorgânicos incluem metais, metais ligados a fosfatos e óxidos metálicos (HOSSEINNEJAD, JAFARISHARMA (2016); SHARMA; JAFARI; SHARMA (2020)).

A *Spirulina* tem sido estudada devido a seu alto valor proteico, digestibilidade e por apresentar quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, fenólicos e ficocianina (MULITERNO, 2005). Os ácidos fenólicos obtidos da *Spirulina* atuam como fungicidas naturais (PAGNUSSATT, 2014). E seus compostos fenólicos possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o que é um diferencial para o desenvolvimento de filmes (KUNTZLER *et al.* 2018).

No entanto ao analisar dados na literatura sobre a inibição microbiana proveniente da *Spirulina* em filmes, os estudos são escassos, o que torna essa aplicação interessante. Em análise bibliométrica na base Scopus, com o termo “films *Spirulina*”, avaliando o período de 2000 a 2020, há um total de 40 artigos, o Brasil ocupa o 3º lugar no ranking de pesquisas nessa temática, que possui taxa de crescimento anual de 4,43%. Evidenciou-se na nuvem de palavras gerada com auxílio da ferramenta Bibliometrix do software RStudio®, que as palavras “films”, “packaging materials”, “chromium”, “microorganisms”, são frequentemente citadas nos títulos dos artigos envolvendo esse tema, conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 - Nuvem de palavras com palavras frequentemente citadas em títulos de artigos que abordam a temática filmes e Spirulina



A ação antimicrobiana da *Spirulina* já foi estudada por vários autores conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Estudos que utilizam a *Spirulina* como agente antimicrobiano

Autor	Estudo realizado
Souza <i>et al.</i> (2011)	Estudaram a atividade antifúngica de extrato fenólico de <i>Spirulina platensis</i> contra <i>Aspergillus flavus</i> , e o extrato fenólico da <i>Spirulina platensis</i> mostrou atividade antifúngica, inibindo glucosamina em até 56%.
Souza (2012)	Estudou o potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de <i>Chlorella sp.</i> e <i>Spirulina platensis</i> , a segunda apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e inibiu de forma mais eficiente o radical DPPH, tornando-a fonte mais atrativa para utilização de seus compostos antioxidantes naturais.
Pagnussatt <i>et al.</i> (2014)	Avaliaram a inibição do crescimento de <i>Fusarium graminearum</i> e produção de micotoxinas pelo extrato fenólico de <i>Spirulina sp.</i> e concluiu que os ácidos fenólicos reduziram os níveis de glucosamina, atividade de amilase e concentração de tricoteceno produzidos pelo complexo de <i>F. graminearum</i> .
Pagnussatt <i>et al.</i> (2016)	Estudaram novamente a inibição do crescimento de <i>Fusarium graminearum</i> , porém agora utilizou a microencapsulação da <i>Spirulina</i> , e obteve melhores resultados quanto ao efeito antifúngico quando o extrato fenólico a 8% (v/v) foi encapsulado com lecitina de soja, resultando em 90% de inibição contra 74% do extrato livre.
Balti <i>et al.</i> (2017)	Elaboraram filmes de quitosana com incorporação de extrato de <i>Spirulina</i> para aplicar como embalagem ativa em alimentos. Os filmes elaborados apenas com quitosana não apresentou inibição microbiana contra nenhuma bactéria testada, enquanto os filmes com extrato de <i>Spirulina</i> apresentou inibição contra as sete bactérias testadas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i> .
Scaglioni <i>et al.</i> (2018)	Utilizou extratos fenólicos de microalgas (<i>Spirulina sp.</i> e <i>Nannochloropsis sp.</i>) para avaliar a inibição do crescimento de fungos toxigênicos, a <i>Spirulina</i> apresentou média de inibição de 68%, apresentando maior eficiência que o tebuconazol (que foi utilizado como controle).

2.5 DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS

Para compreender a degradação de polímeros, deve-se considerar que eles podem ser degradados por processos térmicos, oxidativos, meios químicos, radiativos e mecânicos, bem como por agentes biológicos (ALBERTSSON *et al.*, 1987). As possibilidades de aplicação dos filmes biodegradáveis dependem da compreensão dos mecanismos pelos quais a degradação ocorre (DILKES-HOFFMAN *et al.*, 2019).

A simulação da degradação pode ser acelerada em equipamentos específicos que propiciam acelerar a velocidade de envelhecimento dos polímeros sob condições agravadas adequadas de temperatura, luz e umidade, simulando o ambiente ao qual o produto vai ficar

exposto (MAEGAWA *et al.*, 2016). O envelhecimento acelerado é uma técnica de laboratório simples e rápida, adequada para fornecer informações sobre o desempenho de filmes. E quando combinados com testes mecânicos, espectroscopia e análise térmica, pode ser utilizado como ferramenta para a seleção adequada do material e o design do produto, podendo ser explorados para prever a vida útil de um material sob diferentes condições (TARANTILI; KIOSE, 2008).

O Quadro 4 apresenta as condições utilizadas em alguns estudos de envelhecimento acelerado, bem o tempo e as formas de monitoramento utilizadas.

Quadro 4 - Estudos de envelhecimento acelerado em filmes: materiais, condições experimentais e monitoramento realizado

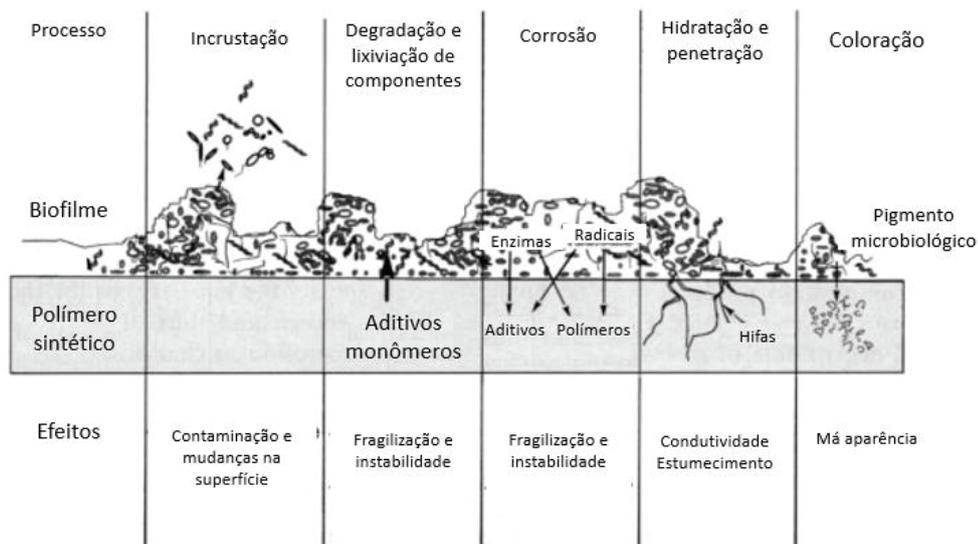
Autor	Material estudado	Tipo de envelhecimento	Condições experimentais	Monitoramento do envelhecimento
Roy et al. (2006)	Filmes de polietileno de baixa densidade contendo complexos de cobalto como pró-oxidantes	Termo oxidação	Aquecimento em estufa a 70°C	Monitoramento nos tempos de 0, 100, 200, 400 e 600 h através de alterações no FTIR, nas propriedades mecânicas, índices de fluxo de fusão e na densidade.
		Luz ultravioleta (UV)	Utilizaram lâmpadas solares de 40 W que emitem luz na faixa de comprimento de onda de 280 nm e 350 nm. As amostras foram posicionadas a uma distância de 5 cm das lâmpadas e a temperatura foi mantida em 30 ± 1 °C.	
		Solo	Filmes foram enterradas no solo a uma profundidade de 1 polegada em copos de plástico perfurados para permitir o acesso a microrganismos e umidade.	
Tarantili e Kiose (2008)	Filmes de polipropileno de monocamada e multicamada	Intemperismo acelerado - Ciclos de exposição à luz UV e a umidade (UR)	As amostras foram expostas a ciclos repetidos nos quais houve exposição à radiação UV e aquecimento úmido. A radiação foi produzida com uma lâmpada do tipo UVB - 313. A água no fundo da câmara de teste foi aquecida, enchendo a câmara com vapor quente e criando 100% de umidade a 50 °C.	Os filmes extrudados foram monitorados no período de 0, 24, 50, 100 e 200 h, verificando alterações nas propriedades mecânicas, permeabilidade, FTIR e termogravimetria.
Lizárraga-Laborín <i>et al.</i> (2018)	Filmes de polietileno extrudido / poli (ácido láctico) / quitosana	Intemperismo acelerado - Ciclos de exposição à luz UV e a umidade (UR)	Foi utilizado lâmpadas UVA-340 com uma região de comprimento de onda de 365 a 295 nm, submetendo os filmes a ciclos repetidos que compreendem um intervalo de 8 horas de irradiância UV com quatro lâmpadas de 0,89 W/m ² a 60 °C e um período de condensação de 4 horas a 40 °C.	Os filmes foram monitorados no período de 50, 100, 150 e 200 h, e foi verificado alterações nas propriedades mecânicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV), FTIR e termogravimetria.
Shi <i>et al.</i> , (2019)	Filmes de colágeno extraído de pele bovina	Combinação de umidade e termo oxidação	Foram armazenados em diferentes condições de temperatura (60, 70 e 80°C), umidade relativa (UR) (60, 70 e 80%) e tempos (1,2 e 3 dias) de envelhecimento usando uma câmara de temperatura e umidade constante, avaliando as variáveis independentes.	As alterações foram avaliadas nas propriedades mecânicas, difração de raios-X, umidade, absorção de água, microestrutura, FTIR, termogravimetria e calorimetria de varredura diferencial.

Percebe-se através dos testes mensurados no Quadro 4 que é possível avaliar a degradação de diferentes formas ao induzir a degradação de acordo com o objetivo do estudo, e em um curto período de tempo se tem resultados que permitem determinar se um sistema é durável o suficiente para satisfazer sua demanda de vida útil, otimizando sua aplicabilidade (MARCEAUX *et al.*, 2018).

A biodegradabilidade do filme, geralmente avaliada em solo, exemplificada por Roy *et al.*, (2006) no Quadro 4 está diretamente relacionada a solubilidade do polímero. Pois a solubilização disponibiliza os componentes do filme para os microrganismos presentes na microbiota do solo, o que inclui bactérias, fungos e protozoários (CARISSIMI *et al.*, 2018). Ao apresentar maior solubilidade os polímeros são mais suscetíveis à degradação, pois os componentes podem hidrolisar mais facilmente e, conseqüentemente, tornarem-se moléculas menores (SIFUENTES-NIEVES *et al.*, 2015). Sua propriedade biodegradável os torna úteis porque eles são capazes de se decompor e se misturar com o solo ao longo do tempo (ASHTER, 2016).

A Figura 3 mostra a degradação de um polímero através da formação de biofilmes. Desse modo, a biodegradação inicia através da modificação de características superficiais do filme, seguindo com a degradação e lixiviação de componentes, corrosão, hidratação e penetração, e coloração.

Figura 3 - Mecanismos de biodegradação de polímeros



Fonte: Adaptado de Fleming (1998)

2.6 O USO DE FILMES COMO COBERTURA DE SOLO

O desenvolvimento do polietileno ocorreu no final dos anos 1930 e sua introdução na agricultura, no início dos anos 1950, sob a forma de filmes de plástico na cobertura do solo e estufas (FORTES NETO, 2016). A expansão da sua utilização como cobertura de solo ocorreu progressivamente em vários países devido a seus benefícios agrônômicos e econômicos, tais como aumento da temperatura do solo, controle de ervas daninhas, conservação de umidade, redução de insetos/pragas, maior rendimento das culturas, uso eficiente dos nutrientes do solo, economia de água e uso reduzido de produtos químicos sintéticos, como pesticidas e herbicidas (SCARINGELLI *et al.*, 2016). Nos últimos anos, há uma crescente demanda por redução do uso de polímeros oriundo do petróleo devido a potenciais riscos ambientais e ecológicos (ZHANG *et al.*, 2019).

Em 2016 e 2017 a agricultura foi responsável por cerca de 3% da demanda mundial de plásticos (ABIPLAST, 2016, 2017); (PLASTICS EUROPE, 2018). Portanto, o desenvolvimento de novos materiais com características especiais como a biodegradabilidade, biocompatibilidade e não-toxicidade é atraente devido a sua aplicabilidade e por serem ecologicamente corretos (LLANOS; TADINI, 2018). Logo, se tornam uma opção para substituir os polímeros de origens fósseis utilizados hoje no setor agrícola, potencializando ainda mais o cuidado com o meio ambiente.

Há vários estudos que abordam diferentes materiais para a elaboração de filmes a serem utilizados como cobertura de solo, o material empregado depende da cultura a ser estudada, devido ao tempo específico para colheita. Sun *et al.* (2018) estudaram filmes compostos de poli butirato adipato tereftalato (PBAT) e amido para minimizar a temperatura e a umidade do solo, aumentar a fotossíntese e o rendimento em amendoim. E observaram que o filme apresentou resultados semelhantes ao filme de polietileno. Bilck, Grossmann e Yamashita (2010) elaboraram filmes com fécula de mandioca e misturas de poli (butileno adipato-co-tereftalato) para uso como filme de cobertura na produção de morangos. E após cinco semanas o filme apresentou pequenas fissuras e redução na resistência à tração, no entanto não influenciou na qualidade do morango fresco.

Ainda, há estudos que abordam a utilização de resíduos agrícolas para elaboração dos filmes. Nisticò *et al.* (2017) utilizaram tomates pós-colheita e resíduos alimentares urbanos para a fabricação de filmes plásticos. E ao comparar esses filmes com outros materiais comerciais

concluíram que são uma boa opção devido ao custo-benefício. Já Sabiha-Hanim e Siti-Norsafurah (2012) desenvolveram filmes a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, que também apresentou bons resultados.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O REFERENCIAL TEÓRICO

Os trabalhos disponíveis na literatura sobre filmes poliméricos de amido e gelatina discutem diferentes propriedades de acordo com o foco do estudo, geralmente, utilizam amido de fontes alternativas ou modificados e gelatina comercial.

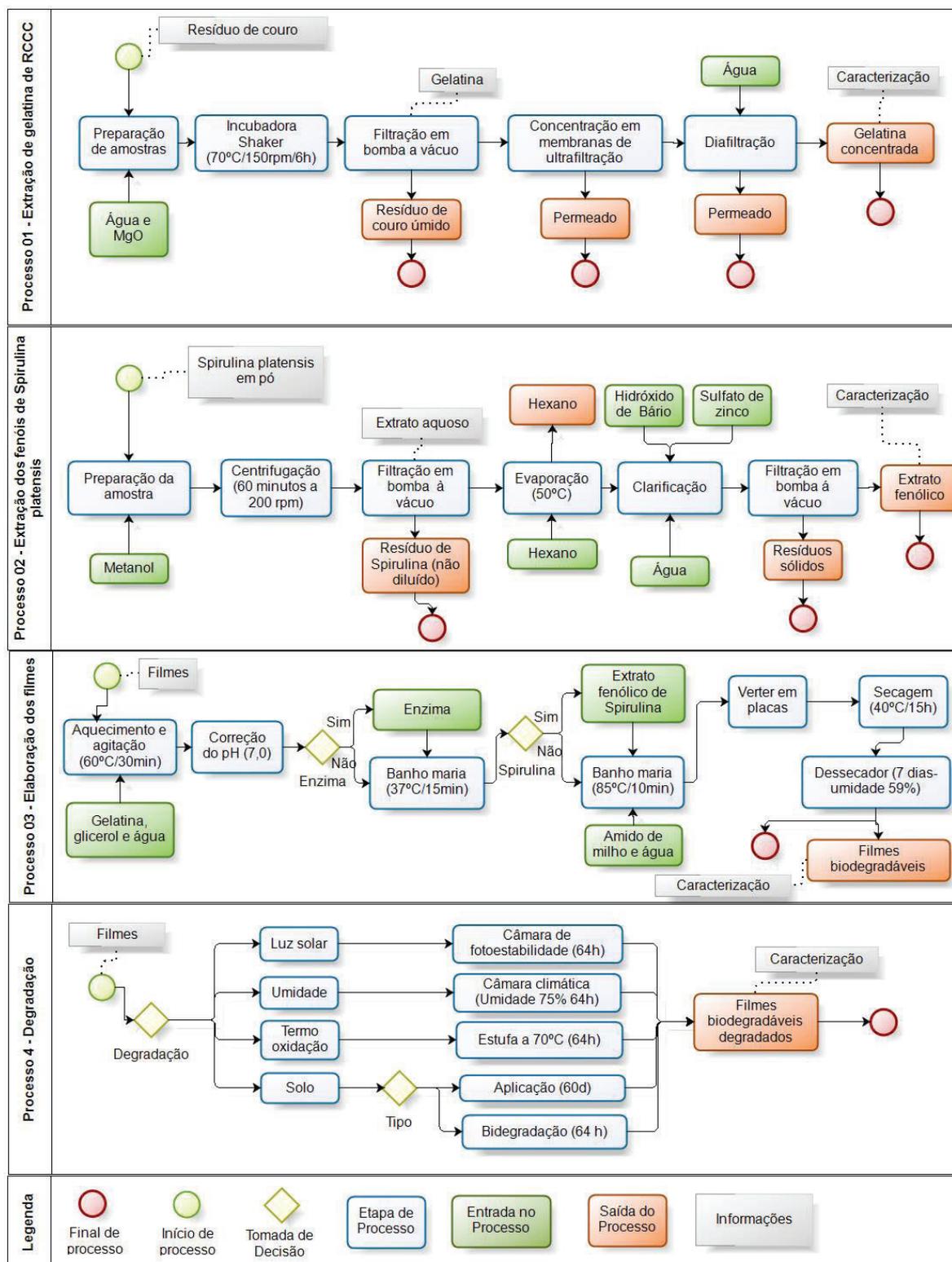
O uso de gelatina extraída de RCCC para elaboração dos filmes é algo que vem sendo estudado para diferentes aplicações, desde que não sejam relacionadas diretamente a alimentação, devido ao cromo presente na solução. Neste caso a aplicação como filme para ser utilizado na cobertura de solo se torna interessante, pois ao fim do ciclo de sua vida útil, o mesmo é utilizado como húmus devido à concentração de nitrogênio nele presente. Porém, as propriedades desses filmes ainda precisam de melhorias, pois a gelatina é altamente hidrofílica devido à quantidade de sais em sua composição. Para melhorar essas características pode-se utilizar agentes reticulantes da gelatina, como a enzima TGase, que cria ligações inter e intramoleculares reforçando a matriz polimérica e conseqüentemente melhorando as propriedades mecânicas, térmicas, estruturais, solubilidade e permeabilidade do filme. O crescimento microbiano pode ser inibido a partir da adição de agentes antimicrobianos, como a *Spirulina*, aumentando a durabilidade do filme.

Além das propriedades normalmente determinadas, tais como, espessura, solubilidade em água, permeabilidade em vapor de água, resistência à tração, alongação, cor, aparência, a é interessante conhecer como ocorre a degradação do filme em diferentes condições ambientais, como umidade, temperatura, luz UV e solo. E utilizar essa caracterização como ferramenta para delimitar de forma precisa ambientes ideais para a aplicação dos filmes, como por exemplo, cobertura de solo em área aberta ou dentro de estufas, em sistemas que demandam solos mais úmidos ou secos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 4 mostra um fluxograma resumido do material e métodos utilizados.

Figura 4 - Fluxograma geral de materiais e métodos utilizados para desenvolver os filmes biodegradáveis



3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para produção dos filmes foram resíduo de couro curtido ao cromo III, fornecido pelo curtume Peles Pampa (Portão-RS, Brasil), gelatina em pó comercial como matriz polimérica (Refeisucos), enzima transglutaminase (Ajinomoto do Brasil, Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, SP, comercializada como ACTIVA® WM) como agente reticulante da matriz polimérica, amido de milho como aditivo (Refeisucos), Glicerol (Dinâmica) como plastificante, *Spirulina platensis* (em pó) como agente antimicrobiano e água como solvente.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração, concentração da gelatina de Resíduos de Couro Curtido ao Cromo III (RCCC)

A gelatina foi extraída dos resíduos de couro curtido ao cromo III através de hidrólise alcalina, utilizando hidróxido de magnésio, conforme metodologia de Scopel (2018).

As amostras de resíduo de couro foram preparadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 12,5 g de resíduo, 0,5 g de óxido de magnésio e 62,5 mL de água destilada. A hidrólise foi realizada em *shaker* (câmara incubadora com agitação orbital), com agitação de 180 rpm e temperatura de 70 °C durante 6 horas, seguida de filtração com bomba a vácuo.

A próxima etapa consistiu na concentração da gelatina extraída em membranas de ultrafiltração, com tamanho corte entre 30 kDa, pressão de 1 bar e vazão de 0,0024 m³/h. A membrana permitiu a obtenção de duas correntes, o retido (gelatina concentrada) e permeado (não utilizado neste estudo), caracterização disponível no Apêndice I. Posteriormente foi realizada a diafiltração, que consistiu na adição de água (100% sobre a quantidade de gelatina concentrada), repassando pela ultrafiltração nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

A gelatina extraída do RCCC concentrada foi caracterizada com relação a propriedades importantes para a aplicação nos filmes: nitrogênio, proteínas, bloom, pH, condutividade, umidade, cinzas, cromo, cálcio, sódio e magnésio.

3.2.2 Caracterização das gelatinas comercial, extraída e concentrada de RCCC

A caracterização da gelatina compara resultados entre a gelatina extraída e a concentrada de RCCC, avaliando a eficiência da concentração e em seguida com a gelatina comercial 4% m/v, avaliando a proximidade das propriedades da gelatina concentrada com a comercial.

3.2.2.1 Determinação de proteína

Para a análise de proteínas seguiu-se método proposto por Lowry (1951), utilizando espectrofotômetro (Tecnal UV 5100) para medir absorvância a 750nm. A quantificação de proteína foi realizada através de equação obtida pela curva de calibração produzida com albumina do soro bovino (BSA) (Apêndice B).

3.2.2.2 Determinação de força de bloom

A força de bloom foi determinada em em texturômetro (TA.XT*plus* Texture Analyser), seguindo metodologia proposta pela ISO 9665 (1998), a amostra previamente preparada foi colocada no centro do equipamento e a sonda penetrou no gel até uma profundidade de 4 mm, sendo realizada a leitura da força máxima e expressa em: Força de bloom por gramas de gel.

3.2.2.3 Determinação de pH

Para a leitura de pH utilizou-se pHmetro (Digimed, Modelo DM-22), o eletrodo foi submerso em 50 mL de amostra e a leitura foi realizada no visor do equipamento.

3.2.2.4 Determinação de condutividade

A condutividade foi realizada através de condutivímetro (Tecnal, Modelo Tec-4MP), a verificação se deu por imersão do bulbo diretamente na amostra (50mL) realizando a leitura diretamente no visor do equipamento.

3.2.2.5 Determinação de umidade

A umidade das amostras foi determinada de acordo com a norma ASTM D3790 (2017), se pesou cerca de 3 a 5 g de amostra em cápsulas de alumínio, que foram levadas à estufa em temperatura de 105° C, e mantidas até obter peso constante, para posterior cálculo de umidade, de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

sendo:

m_i : massa inicial da amostra (g);

m_f : massa final da amostra (g).

3.2.2.6 Determinação de resíduos minerais – cinzas

A quantificação de cinzas seguiu método proposto pela ASTM D2617 (2015), através da utilização de 2 a 5 g de amostra foram incinerados em bico de Bunsen em cadinhos previamente calcinados, seguindo para a mufla, com temperatura de 550° C durante 4 h.

A quantidade de cinzas é determinada pela Equação 3:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(m_f - m_i) \cdot 100}{A} \quad (3)$$

sendo:

m_i : massa inicial (amostra + cadinho) (g);

m_f : massa final (amostra + cadinho) (g);

A: amostra (g)

3.2.2.7 Determinação de cromo hexavalente

Para a caracterização da gelatina, a determinação de cromo seguiu o método da difenil carbazida, proposto pela ASTM D1687 (2017), o cromo foi determinado na forma de cromo hexavalente por espectrofotometria, através da previa elaboração de curva padrão com dicromato de potássio, fornecendo uma equação da reta utilizada para o cálculo da concentração de cromo (Apêndice C).

O teor de cromo do RCCC foi determinado na forma de óxido de cromo (III) segundo a norma ASTM D2807 (2009), através da oxidação com ácido perclórico, nítrico e sulfúrico de alíquotas de 5g de RCCC previamente transformadas em cinzas em chapa de aquecimento.

3.2.2.8 Determinação de Sódio

A análise de sódio foi realizada em fotômetro de chama (Micronal – B462/ Brasil), de acordo com método sugerido pela APHA (2017), o equipamento foi previamente calibrado seguindo de disposição da amostra junto ao capilar para que seja aspirada pelo equipamento, a leitura do teor de sódio aparece no visor.

3.2.2.9 Determinação de Cálcio e Magnésio

A determinação de cálcio e magnésio foi calculada por titulometria com EDTA, seguindo norma APHA (2017), sendo primeiramente calculada a dureza total, conforme Equação 4:

$$Dureza\ total = \frac{V \cdot M \cdot 100.000 \cdot FC}{A} \quad (4)$$

sendo:

V: volume de EDTA (mL);

M: molaridade do EDTA

FC: fator de correção

A: amostra (g)

Em seguida calculou-se a dureza de cálcio, Conforme Equação 5:

$$Dureza\ de\ cálcio = \frac{V \times 100.000}{A} \quad (5)$$

sendo:

V: volume de EDTA (mL);

A: amostra (g)

E posteriormente calculou-se a dureza de magnésio, conforme Equação 6:

$$Dureza\ de\ Mg = Dureza\ total - Dureza\ de\ Ca \quad (6)$$

3.2.3 Extração dos fenóis da *Spirulina*

Para extração dos compostos fenólicos, utilizou-se a metodologia sugerida por Souza *et al.* (2011). 2 g de *Spirulina* foram homogeneizados com 10 mL de metanol em centrífuga (Centrilab – 80-2B) a 25°C durante 60 minutos a 200 rpm, a agitação foi interrompida aos 15 minutos para adicionar mais 10 mL de metanol. O extrato foi filtrado e lavado três vezes seguidas com 20 mL de hexano, seguindo para evaporador rotativo (Tecnal – TE 211), sendo mantido a 50°C para evaporação do hexano.

Na sequência foi dissolvido em 25 mL de água destilada e clarificado com 5 mL de hidróxido de bário 0,1 M e 5 mL de sulfato de zinco a 5%.

3.2.4 Caracterização do extrato fenólico da *Spirulina*

O extrato fenólico extraído da *Spirulina* foi caracterizado quanto a quantidade de fenóis presentes na amostra.

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada por metodologia sugerida por Correia *et al.* (2004) através de espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Tecnal UV 5100) em comprimento de onda de 725 nm, utilizando o etanol a 95% como branco. E para o cálculo da concentração de ácido gálico por miligrama da amostra, utiliza-se uma curva de calibração construída a partir de ácido gálico (Apêndice D).

3.2.5 Elaboração dos filmes

A produção dos filmes foi realizada em quatro etapas, sendo avaliadas diferentes características do filme, com o objetivo principal de reduzir a solubilidade e aumentar o tempo para degradação. As propriedades dos filmes produzidos com a gelatina comercial e a recuperada de RCCC foram comparadas, assim como a modificação ocasionada pela adição ou não de enzima transglutaminase e extrato fenólico de *Spirulina platensis*.

3.2.5.1 Elaboração dos filmes pela técnica de espalhamento

A produção dos filmes foi realizada pela técnica de espalhamento, com metodologia similar a Al-Hassan; Norziah (2012) e Brandalise (2017), com algumas adaptações referentes ao uso do agente antimicrobiano.

Inicialmente, foi homogeneizado 8 gramas de gelatina em 100 mL de água destilada, (a quantidade de gelatina RCCC foi calculada mediante o resultado da análise de proteína). Em seguida foi adicionado 20% de glicerol em relação à massa de gelatina, para posterior solubilização a 60 °C por 30 min. Após essa etapa, corrigiu-se o pH para 7, a temperatura foi reduzida a 37 °C e adicionou-se a enzima transglutaminase, quando utilizada, nos estudos preliminares, descrito no item 3.2.5.2, variaram condições de enzima (0,5%, 1,5% e 2,5% sobre a massa de gelatina) que permaneceu em ação em banho maria durante 15 minutos.

Em seguida, foi adicionado amido de milho previamente diluído em água (variando 0,5%, 1,0% e 1,5% sobre a solução filmogênica) e o extrato fenólico de *Spirulina platensis* (variando 0%, 2%, 4% e 6% de fenólicos sobre a solução filmogênica), quando utilizado, seguindo para banho maria a 85 °C durante 10 minutos. Na sequência, a solução foi vertida em placas de Petri e secas em estufa de secagem com circulação de ar (Ethik 420-4TDE) a 40 °C, por 15 h.

Os filmes, já secos foram mantidos em ambiente com solução saturada de brometo de sódio (NaBr), equivalente a 59% de umidade relativa por sete dias, para posterior caracterizações.

3.2.5.2 Avaliação do efeito do amido de milho e enzima em filmes de gelatina comercial

Um planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos centrais e duas réplicas foi realizado utilizando-se gelatina comercial, sendo variadas as quantidades de amido e enzima (variáveis independentes) foram variadas, como apresentado na Tabela 2. As alterações provocadas nas propriedades físicas do filme foram analisadas pela análise de solubilidade (variável dependente) e posterior análise estatística dos dados.

Tabela 2 – Níveis reais e codificado fatorial 2² com ponto central e variáveis reais e codificados para avaliar o efeito do amido de milho e enzima na solubilidade de filmes de gelatina comercial

Nível	Amido (%)*	Enzima (% m/m _{gelatina})
-1	0,5	0,5
0	1	1,5
1	1,5	2,5

*em relação a solução filmogênica

As variáveis fixas foram gelatina (4%), quantidade de glicerol (20% sobre a massa de gelatina), pH da gelatina (7), tempo no dessecador com umidade controlada por solução saturada de brometo de sódio (59%) (7 dias) (BRANDALISE, 2017).

3.2.5.3 Efeito do emprego de extrato fenólico de *Spirulina* na produção de filmes de gelatina comercial

Utilizou-se a melhor condição encontrada após a análise dos experimentos realizados conforme descrito no item 3.2.5.2 adicionou-se 0, 4, 6 e 8% de extrato fenólico de *Spirulina* sobre a solução filmogênica para calcular de inibição microbiana.

A análise microbiológica foi realizada com adaptações da ASTM E2180 (2018), sendo utilizado uma espécie de fungo (*Aspegillus niger*) e uma bactéria (*Bacillus pumillus*). Em seguida foi induzido o crescimento do fungo em meio PDA (temperatura de 25°C durante 72 horas) e da bactéria em meio PCA (temperatura de 37°C durante 24 horas), seguindo de filtração e contagem em câmara de Neubauer até a padronização de 1 a 5x10⁸. Posteriormente foi adicionado 1mL da diuição padronizada em solução de ágar equilibrada (0,85g de Na Cl, 0,3g de ágar-ágar em 100mL de água deionizada, autoclavada e equilibrada a 45±2°C), de modo que a concentração final seja de 1 a 5x10⁵.

Em paralelo, os filmes foram preparados de acordo com item 3.2.5.1 e recortados (3 x 3 cm), sendo adicionados no centro da placa de petri previamente umedecida com solução salina (0,85% de Na Cl). Em seguida foi adicionando 1mL da solução padronizada (com concentração de 1 a 5x10⁵) sobre o filme e incubado os fungos (temperatura de 25°C durante 72 horas) e bactérias (temperatura de 37°C durante 24 horas).

Após esse período, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ e vertido em placas de petri contendo meio PDA (fungos) e PCA (bactérias), e incubado os fungos (temperatura de 25°C durante 72 horas) e bactérias (temperatura de 37°C durante 24 horas).

Na sequência foi realizado contagem dos microrganismos em UFC/g, e calculado inibição microbiana, através da média geométrica do número de microrganismos no filme controle (sem enzima e sem *Spirulina*) de acordo com a Equação 7:

$$\text{Média geométrica} = \frac{\text{Log}_{10}X}{3} \quad (7)$$

sendo:

X: número de microrganismos recuperados da incubação no período de incubação (triplicata).

E na sequência, calculou-se a porcentagem de redução de microrganismos em todos os filmes formulados, de acordo com a Equação 8:

$$\% \text{ de redução} = \frac{(a - b). 100}{a} \quad (8)$$

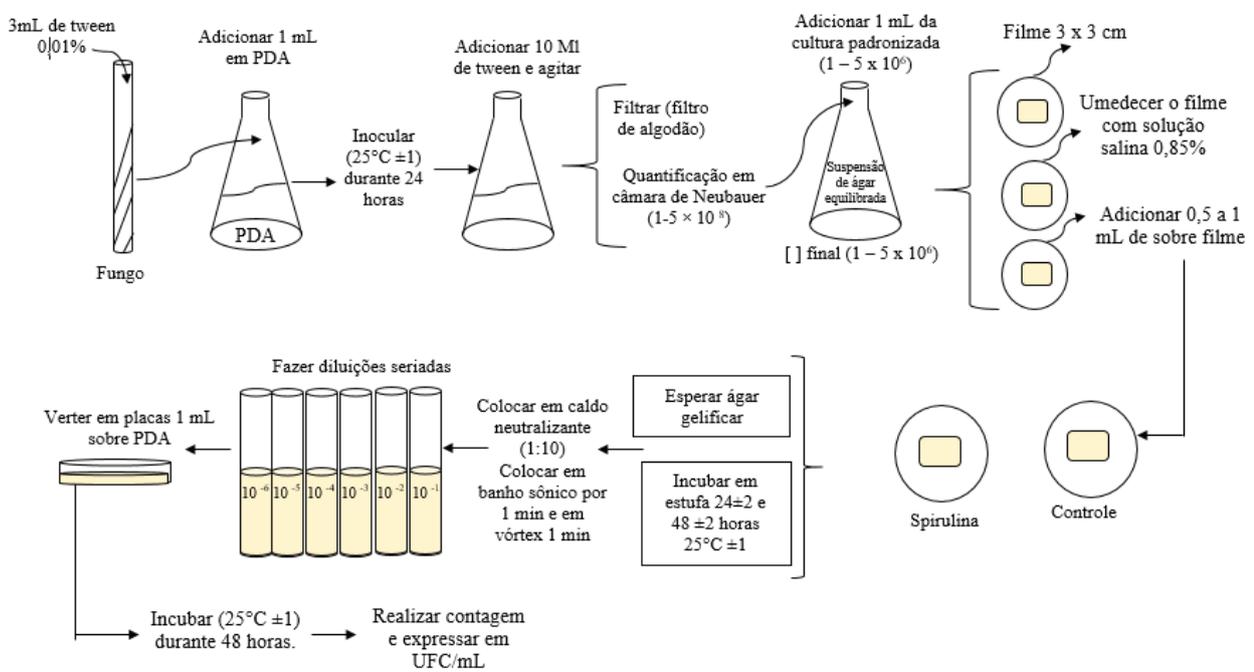
sendo:

a: média dos microrganismos recuperados na amostra controle;

b: média de microrganismos recuperados da incubação no período de incubação (Equação 7).

A Figura 5 mostra o procedimento da análise utilizando o fungo (*Aspergillus niger*). Para realizar a análise com a bactéria (*Bacillus pumilus*), é necessário adaptar o meio, tempo e temperatura, conforme descrito neste item.

Figura 5 - Determinação de inibição microbiana ocasionada pela adição de extrato fenólico de Spirulina em filmes de amido e gelatina com tratamento enzimático



Fonte: Adaptado de ASTM E2180 (2018)

3.2.5.4 *Elaboração de filmes com gelatina comercial e gelatina RCCC com condições otimizadas de amido, enzima e Spirulina*

Nesta etapa foi utilizado um planejamento 2², utilizando 4% de gelatina comercial (a quantidade de gelatina RCCC foi ajustada para apresentar o mesmo teor de proteínas, determinada pelo método de Lowry), 20% de glicerol sobre a massa de gelatina. E condições otimizadas de amido (1%) como apresenta a Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial 2² para filmes elaborados com gelatina comercial e gelatina RCCC, utilizando as condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

Gelatina Comercial		Gelatina RCCC concentrada	
*Enzima	** <i>Spirulina</i>	*Enzima	** <i>Spirulina</i>
1 (2,5%)	1 (6%)	1 (2,5)	1 (6)
1 (2,5%)	-1 (0%)	1 (2,5)	-1 (0)
-1 (0%)	1 (6%)	-1 (0)	1 (6)
-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0)	-1 (0)

*Enzima sobre a massa de gelatina

***Spirulina* sobre a solução filmogênica

Os filmes foram avaliados quanto às propriedades de físicas (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR), térmicas (termogravimetria - TG), aparência global, espessura, resistência à tração, alongação, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, cor e inibição microbiana.

3.2.6 **Caraterização dos filmes**

3.2.6.1 *Determinação de solubilidade em água*

A baixa solubilidade em água é desejável, pois é essencial para melhorar a integridade do filme em ambientes úmidos (Jiang *et al.*, 2019), visto que é considerada um indicador da resistência à água (Rostamzad *et al.*, 2016), além de ser um fator determinante na definição da aplicabilidade do filme.

A solubilidade em água foi determinada através da metodologia sugerida por Cuq *et al.* (1997), as amostras de 2 x 2 cm foram cortadas e secas a 70 °C por 24 h para determinar o peso seco inicial. Após a pesagem, as amostras são imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação por 24 h a 25 °C. Decorrido este tempo, as amostras foram removidas e secas a 70

°C durante 24 h para determinação de seu peso seco final . Calcula-se a solubilidade conforme a Equação 9:

$$S = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (9)$$

sendo:

S: solubilidade do filme (%);

m_i : massa inicial do filme (g);

m_f : massa final do filme (g), após a imersão na água.

3.2.6.2 Determinação de atividade de água (A_w)

Os ensaios de atividade de água foram realizados em analisador de atividade de água (Tecnal – LabMaster Neo) que determina a quantidade de água livre (para reações químicas, bioquímicas e microbiológicas) na amostra de acordo com a ISO 18787 (2017).

3.2.6.3 Determinação de propriedades mecânicas – Resistência a tração e alongação

A resistência à tração e a porcentagem de alongação na ruptura foi determinada utilizando o texturômetro (TA.XTplus Texture Analyser), operando de acordo com ASTM D882 (2002), com separação inicial de garras de 40 mm e velocidade do teste de 0,8 mm.s⁻¹. As amostras utilizadas tinham tamanho padronizado, de 85 x 25 mm.

3.2.6.4 Determinação de permeabilidade ao vapor de água

A análise de permeabilidade foi realizada de acordo com metodologia proposta pela ASTM E96-00 ajustando os filmes sobre cápsulas de alumínio contendo 20 g de sílica gel e área de 16,63 cm², com abertura circular na tampa, de modo que a transferência de massa seja somente através do filme. As cápsulas de alumínio foram colocadas em dessecador com umidade relativa controlada de 75%, através de solução saturada de cloreto de sódio. A quantidade de vapor de água que migra através do filme foi determinada indiretamente pelo ganho de massa da sílica gel, pesando a cápsula de alumínio a cada hora, durante 10 h. A taxa

de transmissão de vapor (TVA) foi determinada através de regressão linear, utilizando como dados o tempo e as pesagens que ocorreram no período especificado, conforme a Equação 10:

$$Tva = \frac{G}{t \cdot A} \quad (10)$$

sendo:

Tva: taxa de transmissão de vapor de água ($\text{g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$);

G: variação de massa da célula de medida (g);

t: tempo transcorrido (dias);

A: área superficial de transferência de massa do filme (m^2).

Posteriormente foi determinada a permeabilidade ao vapor de água (PVA), de acordo com a Equação 11:

$$Pva = \frac{Tva \cdot X}{S (R1 - R2)} \quad (11)$$

Sendo:

Pva: permeabilidade ao vapor de água do filme ($\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{kPa}^{-1}$);

X: espessura do filme (mm);

S: pressão de vapor (kPa) a 20°C ;

R_1 e R_2 : umidades relativas da câmara de teste (75%) e do interior da célula de medição (0%), respectivamente.

3.2.6.5 Determinação de espessura

A espessura dos filmes foi avaliada com auxílio de um micrômetro externo digital (Digimess, 110.284 new). Esta análise foi realizada em toda a área do filme (verificando cerca de 6 pontos) a fim de evidenciar se a espessura encontra-se uniforme.

3.2.6.6 Determinação de aparência global

A análise de aparência dos filmes seguiu metodologia proposta por Gontard (1991), sendo os filmes avaliados macroscopicamente, avaliando a homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e de bolhas, coloração uniforme) que apresentem continuidade (sem a presença de

rupturas ou zonas quebradiças) e que possibilitem o manuseio (facilidade em retirar os filmes do suporte).

3.2.6.7 Determinação de cor

A cor foi determinada em espectrofotômetro de refletância difusa (ColorQuest II, HunterLab, EUA) disponível no Laboratório de Cereais da Universidade de Passo Fundo. A leitura de cor foi realizada diretamente na amostra, cada letra representa uma característica, L^* é a luminosidade, a^* representa as cores vermelho e verde (+a indica vermelho e -a indica verde) e b^* representa as cores amarelo e azul (+b indica amarelo e -b indica azul).

3.2.6.8 Determinação de propriedades estruturais - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR permite identificar as características estruturais dos polímeros, principalmente, no que se refere a grupos funcionais e de ligações, mudanças estruturais dos materiais do filme no nível molecular (WANG *et al.*, 2015).

Os ensaios de FTIR foram realizados em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Modelo Cary 630, Argilent Technologies, EUA). Operou-se o equipamento no modo de reflexão total atenuada (ATR) utilizando cristal de diamante, realizando 48 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} na faixa de número de ondas de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.2.6.9 Determinação de propriedades térmicas – Termogravimetria e derivada

A análise de termogravimétrica representa a perda de massa dos filmes em relação à temperatura. A termogravimetria dos filmes foi realizada em instrumento de análise térmica simultânea (Modelo STA 6000, PerkinElmer, EUA), utilizando alíquotas de 10 mg de amostra foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 min^{-1} em atmosfera de nitrogênio ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) de 20 a $700\text{ }^\circ\text{C}$. E para análise dos filmes, a amostra é seca a 60°C durante 6 h e mantidas por 5 dias em dessecador com sílica antes da análise.

3.2.6.10 Determinação de degradação sob luz ultravioleta, umidade controlada e termo oxidação

Todos os filmes elaborados com gelatina comercial e RCCC, com e sem adição de enzima e *Spirulina* foram avaliados quanto à degradação acelerada após exposição de 64h a radiação ultravioleta, umidade e termo oxidação.

O envelhecimento termo oxidativo foi realizado de acordo com Sharma *et al.* (2001). Os filmes foram dispostos em estufa (De Leo – Modelo K48E) a 70 ° C. O envelhecimento por umidade foi realizado em câmara climática (Tecnal – Modelo TE 4001) de acordo com ASTM D7444 (2018), mantendo a temperatura de exposição a 30°C e a umidade relativa de 75%. O envelhecimento sob luz ultravioleta foi realizado de acordo com método proposto por Roy *et al.* (2006), onde utilizaram-se lâmpadas de 40 W (Philips make) em câmara de foto estabilidade (Ethiktecnology – Modelo 424-CF) com controle de temperatura, que se mantém a 30 ± 1 °C.

As propriedades mecânicas de resistência a tração e alongação foram avaliadas nos tempos de 0, 4, 8, 16, 32 e 64 h, e as análises de FTIR e TG foram realizadas no início da exposição e após as 64 h.

3.2.6.11 Determinação de degradação em solo

A degradação em solo foi avaliada de duas formas enterrada em solo (biodegradação), de acordo com a metodologia proposta por Roy *et al.* (2006), e sob o solo, simulando a aplicação como cobertura de solo. O solo utilizado no ensaio foi oriundo de lavoura utilizada para cultivo de soja e milho, localizada no município de Estação no Rio Grande do Sul. A temperatura e a umidade durante o período do ensaio foram avaliadas diariamente com auxílio de Termo-Higrômetro Digital com Sensor Externo (Akso- Modelo AK28), a temperatura se manteve de 15 a 28°C, e a umidade relativa de 42 a 89 %, conforme Apêndice H.

A Tabela 4 apresenta as caracterizações físicas e químicas do solo utilizado para realizar os testes de biodegradação e aplicação dos filmes, realizadas no Laboratório de Solos da Universidade de Passo Fundo.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do solo utilizado para determinação de biodegradação e aplicação dos filmes

Tipo do parâmetro	Identificação do parâmetro	Quantificação
Físico	Tipo de solo	Tipo 3
	Argila (%)	59
	Areia (%)	24
	Silte (%)	17
Químico	Matéria orgânica (%)	2,5
	pH	5,7
	Fósforo (mg/dm ³)	14,4
	Potássio (mg/dm ³)	38
	Alumínio (cmol _c /dm ³)	0,3
	Cálcio (cmol _c /dm ³)	3,7
	Magnésio (cmol _c /dm ³)	2

Para o ensaio de biodegradação em solo, foram utilizados copos descartáveis de 250 mL, com 10 cm de altura, foram feitas cinco aberturas na parte inferior do copo (furos) para permitir a entrada de umidade. As amostras dos filmes (com cinco centímetros de diâmetro) foram enterradas a 4 cm de profundidade, acima de uma tela milimétrica, como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Recipiente utilizado para ensaio de biodegradação em solo de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*



Os filmes foram desenterrados após 4, 8, 16, 32, 64 e 128 h, foram realizados registros fotográficos.

Para a simulação de aplicação em solo, utilizando os mesmos recipientes descritos acima, porém ao invés de enterrar o filme, o mesmo foi colocado na superfície do solo, e mantido em ambiente simulando estufa, com acesso à luz solar, conforme mostra a Figura 7.

Figura 7 - Recipientes e estufa utilizados para simulação de aplicação em solo dos filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*



Para avaliar a degradação que ocorreu durante a aplicação dos filmes foram realizados registros fotográficos (nos tempos de 0, 15, 30 e 60 dias) e avaliadas propriedades de FTIR e TG antes e após a exposição.

3.6.12 Tratamento de dados e análise estatística

A significância estatística dos fatores avaliados foi analisada por meio de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software Statistica 7.0, com um nível de confiança de 95% em todas as análises estatísticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DE COURO

O resíduo de couro utilizado apresentou as características apresentadas na Tabela 5. A caracterização do resíduo de couro utilizado para a extração da gelatina é importante, pois diferentes procedências e/ou formas de curtimento interferem no rendimento da extração e conseqüentemente, na qualidade da gelatina extraída.

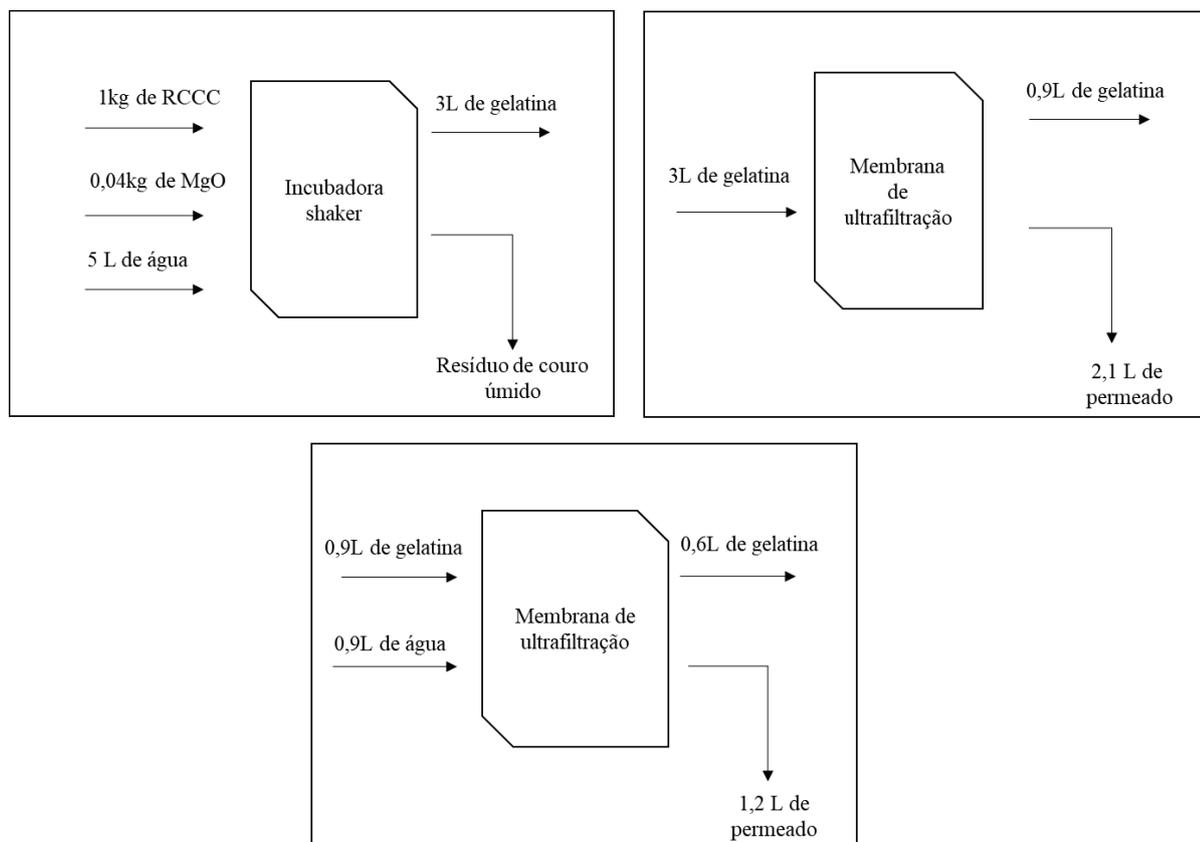
Tabela 5 - Caracterização do resíduo de couro curtido ao cromo

Parâmetro	Resultado
Umidade (%)	44,53 ± 0,3
Cinzas (%)	10,32 ± 0,01
pH	3,78 ± 0,02
NTK- base seca (%)	16,21 ± 0,08
Teor de cromo (%)	2,52 ± 0,03

4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA

Foi realizado o balanço de massa correspondente ao rendimento da concentração da gelatina, conforme mostra a Figura 8.

Figura 8 - Balanço de massa da extração (A), concentração por ultrafiltração (B) e diafiltração (C) da gelatina de resíduos de couro curtido ao cromo III



Estima-se que para cada quilo de RCCC tenha sido possível obter três litros de gelatina. A concentração da gelatina obtida por processo de separação por membranas objetivou retirar sais e concentrar a proteína, visando aproximar as características da gelatina extraída da gelatina comercial. A Tabela 6 apresenta a caracterização das gelatinas comercial, extraída de RCCC e extraída de RCCC concentrada em membrana de ultra-filtração.

Tabela 6 - Caracterização da gelatina RCCC extraída, RCCC concentrada (concentrada em membradas de ultrafiltração) e comercial

Caracterização	RCCC extraída	RCCC concentrada	Comercial*
Umidade (%)	97,726 ^a	96,477 ^b	94,672 ^c
Cinzas (%)	15,576 ^a	6,054 ^b	0,637 ^c
Proteína (mg/L)	18422 ^a	27903 ^b	36406 ^c
Bloom (Bloom/g)	N/A	96,215 ^b	170,419 ^c
pH	8,680 ^a	7,650 ^b	5,920 ^c
Condutividade (mS/cm ²)	9,030 ^a	4,220 ^b	0,500 ^c
Cromo (mg/L)	0,600 ^a	0,432 ^b	0,080 ^c
Sódio (mg/L)	594,400 ^a	147,100 ^b	37,960 ^c
Magnésio (mg/L)	325,000 ^a	110,000 ^a	55,000 ^c
Cálcio (mg/L)	4,000 ^a	3,000 ^{ac}	2,000 ^c

N/A: Não avaliado

Resultados médios de três ensaios / *Resultados de solução com 4% de gelatina

Letras iguais na mesma linha significa que não houve diferença significativa, enquanto letras diferentes indicam diferença significativa através de Teste de Tukey com 5 % de significância

A redução do teor de sais pode ser atribuída a ultrafiltração, uma vez que à medida que a membrana vai concentrando a proteína reduz-se a quantidade de sais, diminuindo a condutividade. Isso ocorre, pois, uma alta quantidade de sal promove maior transporte de carga elétrica, devido à presença de elétrons livres, o que significa que quanto maior a quantidade de sais presentes na amostra, maior será a condutividade e o teor de cinzas. E quanto ao elevado pH da gelatina de resíduo do couro, se deve ao óxido alcalino empregado durante sua extração (Cabeza *et al.*, 1998; MU *et al.*, 2003; DETTMER *et al.*, 2014).

A força de bloom interfere diretamente na formação de géis, e a gelatina RCCC concentrada apresentou menores valores para esta propriedade quando comparada com a gelatina comercial. Esta diferença pode ser atribuída ao teor de sais, que tem interferência na força de bloom da gelatina, pois estudo realizado por Cabeza *et al.*, (1998) após a deionização (retirada de sais) a força de gel da gelatina extraída de resíduos de couro melhorou.

4.3 DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO FILME

4.3.1 Determinação da concentração de enzima e amido

A Tabela 7 apresenta o planejamento 2² para avaliar a solubilidade do filme variando condições de amido e enzima.

Tabela 7 – Resultados obtidos em função das variáveis de amido e enzima contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas através da solubilidade (%)

Amido (% da solução filmogênica)	Enzima (% sobre a massa da gelatina)	Solubilidade (%)
-1 (0,5)	-1 (0,5)	40,34 ± 0,87 ^{bcef}
-1 (0,5)	1 (2,5)	32,56 ± 1,80 ^{bcd}
0 (1)	0 (1,5)	29,68 ± 1,50 ^{acdf}
1 (1,5)	-1 (0,5)	91,91 ± 0,82 ^{abef}
1 (1,5)	1 (2,5)	26,68 ± 0,61 ^{abde}

*sobre a massa da gelatina

Letras iguais na mesma coluna significa que não houve diferença significativa, enquanto letras diferentes indicam diferença significativa através de Teste de Tukey com 5 % de significância, sendo as letras (a, b, c) para a amido e (d,e,f) para a enzima, nas variáveis -1, 0 e 1, respectivamente

A análise estatística demonstrou que amido e enzima foram significativos sobre a solubilidade dos filmes, conforme apresenta a Tabela 8.

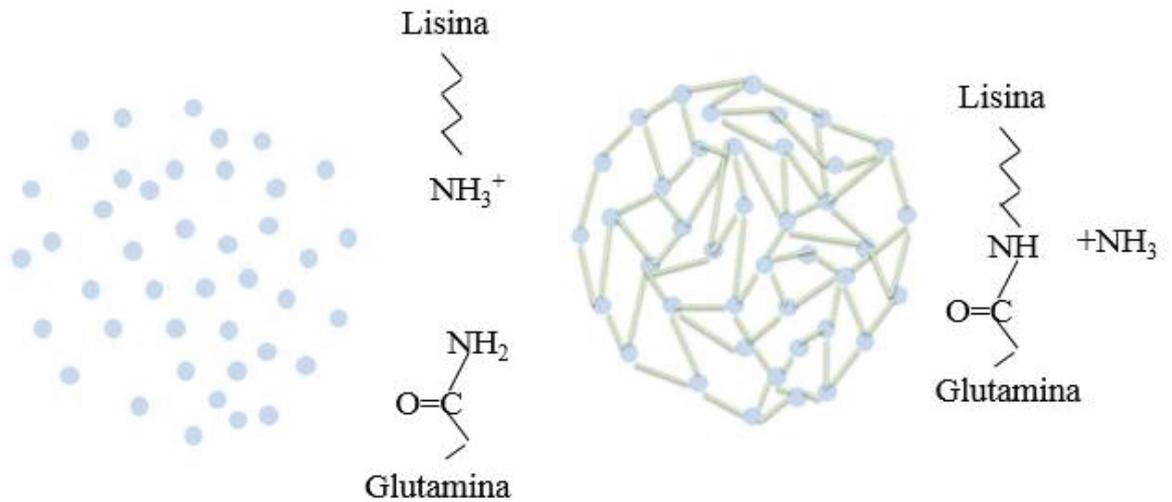
Tabela 8 – Efeitos estimados das variáveis percentual de amido e percentual de gelatina sobre a solubilidade dos filmes de gelatina comercial

Fator	p (nível de significância)	Efeitos estimados
Amido	1 · 10 ⁻³	4,006989
Enzima	1 · 10 ⁻⁴	-6,39634

A maior solubilidade foi obtida quando se utilizou maior percentual de amido e menor de enzima. Como o objetivo é a menor solubilidade, será utilizada a maior quantidade de enzima (2,5% sobre a massa de gelatina) e menor quantidade de amido (0,5%).

A condição selecionada apresentou média de solubilidade de 32,54%, que é similar a média trazida por estudos realizados com a adição da enzima TGase. A enzima atuou formando ligações cruzadas entre as moléculas de proteína presentes no filme, tornando-os menos solúveis (AL-HASSAN; NORZIAH, 2017; LIU, 2016; VERA; TAPIA; ABUGOCH, 2020). A Figura 9 mostra a ação da enzima transglutaminase.

Figura 9 - Mecanismo de ação da enzima transglutaminase



Fonte: adaptado de Hirakawa et al. (2007)

4.3.2 Efeito da adição da *Spirulina* sobre as propriedades antimicrobianas do filme

A condição experimental que apresentou a menor solubilidade foi utilizada para a elaboração dos filmes desta etapa e adicionou-se extrato fenólico de *Spirulina* (0, 2, 4 e 6%) a fim de avaliar o efeito antimicrobiano sobre o *Bacillus pumilus* e *Aspergillus niger*. As análises foram realizadas em duplicata. A *Spirulina* apresentou 3,0175 mg/L de fenóis totais, sendo esse valor superior a outros estudos, Pagnussatt *et al.* (2016) encontraram 0,7 mg/L. Essa diferença pode ser atribuída à diversidade na forma de cultivo da microalga, bem como a espécie. A Tabela 9 apresenta a quantificação de fenóis presentes na solução filmogênica (200mL) de acordo com a porcentagem de *Spirulina* utilizada.

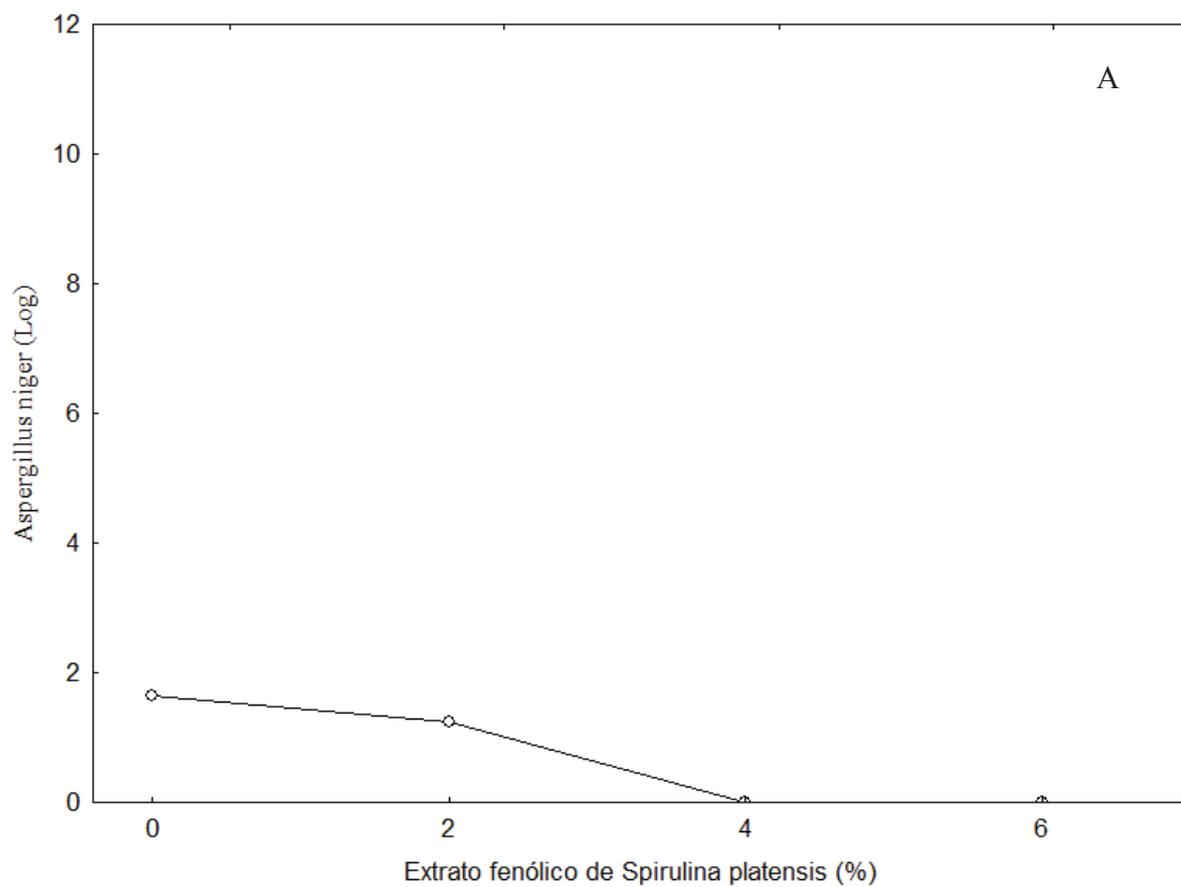
Tabela 9 - Concentração de fenóis (mg/L) na solução filmogênica em função do percentual de *Spirulina* utilizado

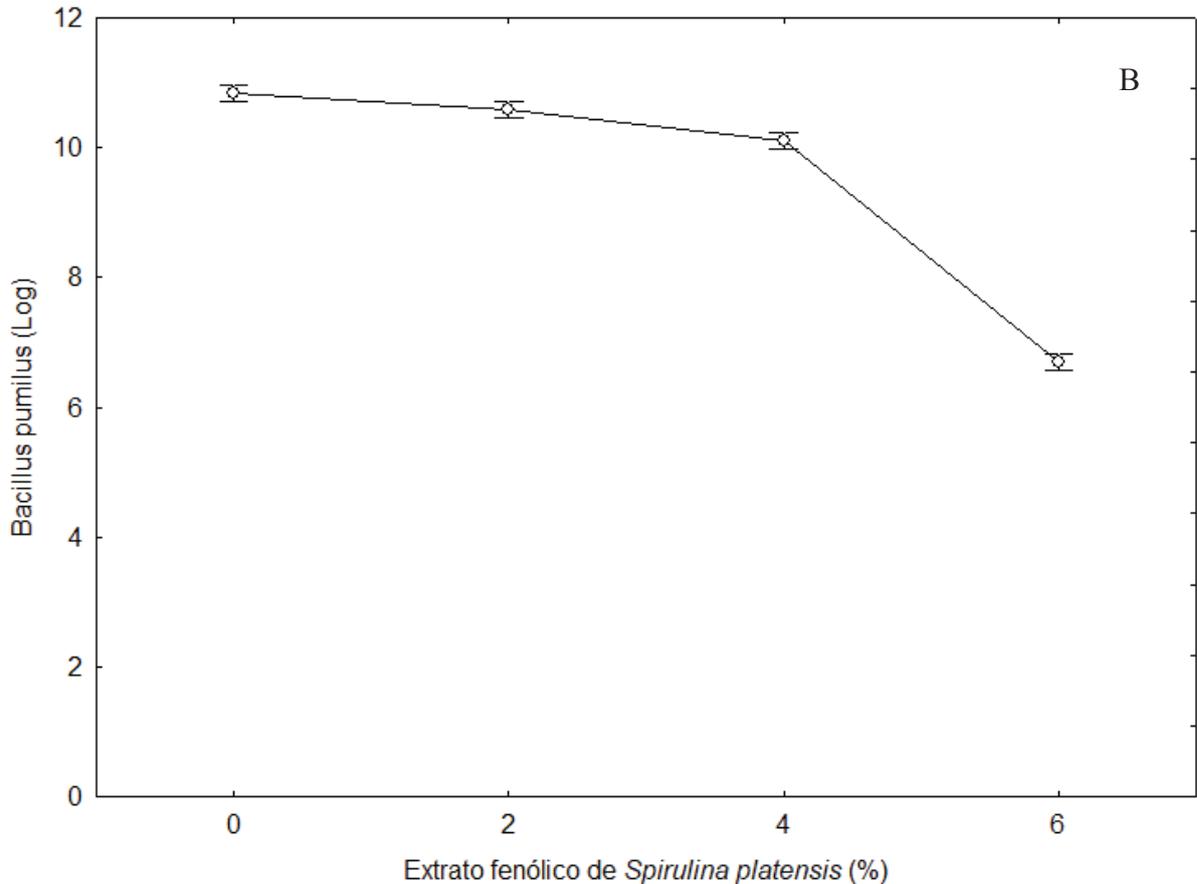
<i>Spirulina</i> (%)	Concentração de fenóis (mg/L)
0	0
2	0,0313
4	0,0655
6	0,0926

O extrato fenólico de *Spirulina* apresentou efeito significativo na inibição microbiana ($p < 0,05$) para ambos os microrganismos. A inibição sobre o *Aspergillus niger* e sobre o *Bacillus pumilus* foi significativamente diferente do controle ($p = 0,0001$ e $4 \cdot 10^{-7}$, respectivamente). A

Figura 10 apresenta o crescimento de microrganismos quando utilizado 0%, 2%, 4% e 6% de extrato fenólico de *Spirulina platensis*.

Figura 10 – Inibição microbiana de *Aspergillus niger* (A) e *Bacillus pumilus* (B) ocasionada pelo uso de extrato fenólico de *Spirulina platensis* nas concentrações de (0, 2, 4 e 6%) em filmes de amido e gelatina comercial com tratamento enzimático





Verificou-se que a redução no crescimento dos microrganismos estudados ocorreu proporcionalmente ao aumento da concentração de fenólicos de *Spirulina* no filme. Observou-se que o fungo *Aspergillus niger* foi mais sensível, sendo que com a adição de 4% de extrato fenólico de *Spirulina* (0,2655 mg/L) houve inibição completa, já para o *Bacillus pumilus* ao utilizar 6% de extrato fenólico (0,3826 mg/L) ainda houve crescimento.

O aumento na atividade antimicrobiana mencionada pode ser explicado pela presença dos fenólicos, que pode estar relacionada a ação antioxidante (KG; SARADA; RAVISHANKAR 2014). A atividade antimicrobiana das microalgas pode ser explicada pela presença de peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. E podem ser atribuídas a compostos de várias classes químicas como ácido γ -linolênico, ácido graxo ativo, efeito sinérgico do ácido láurico e palmitoleico (EL-SHEEKH et al., 2014). Cowan, 1999 menciona que várias classes de fenólicos nas plantas estão envolvidas no mecanismo de defesa das plantas contra microrganismos patogênicos. Portanto, utilizar o extrato fenólico em diferentes aplicações exerce inibição microbiana.

4.3.3 Filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

Nesta etapa foram elaborados filmes com a gelatina extraída do RCCC e a gelatina comercial. O objetivo é que os filmes elaborados com gelatina RCCC possuam diferenciação significativa quanto utilizadas a TGase e o extrato fenólico de *Spirulina*, com aumento na flexibilidade, resistência, biodegradabilidade, inibição microbiana, e diminuição da atividade de água, solubilidade, permeabilidade em água e espessura, além de coloração uniforme e melhoria na estabilidade das propriedades físicas e térmicas. Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentadas as respostas obtidas no item 3.2.5 para gelatina comercial e RCCC, respectivamente.

Tabela 10 – Resultados obtidos para os filmes elaborados com gelatina comercial em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas de acordo com a propriedade avaliada

Enzima*	<i>Spirulina</i> **	Solubilidade em água (%)	Aw	Resistência à tração (MPa)	Elongação (%)	Permeabilidade em vapor de água (g mm / m ² d kPa)	Espessura (mm)
1 (2,5%)	1 (6%)	74,11 ± 3,51 ^{ac}	0,60 ^{ac}	11,98 ± 0,27 ^{ac}	155,13 ± 4,33 ^{ac}	8,30 ± 3,13 ^{ac}	0,22 ± 0,02 ^{ac}
1 (2,5%)	-1 (0)	27,70 ± 0,31 ^{ad}	0,61 ^{ad}	11,07 ± 0,31 ^{ad}	184,33 ± 1,71 ^{ad}	9,20 ± 1,50 ^{ad}	0,22 ± 0,01 ^{ad}
-1 (0)	1 (6%)	90,82 ± 3,64 ^{bc}	0,60 ^{bc}	10,33 ± 0,61 ^{bc}	171,67 ± 2,21 ^{bc}	25,72 ± 5,49 ^{bc}	0,20 ± 0,02 ^{bc}
-1(0)	-1 (0)	37,33 ± 1,76 ^{bd}	0,61 ^{bd}	8,76 ± 0,44 ^{bd}	160,88 ± 2,14 ^{bd}	10,63 ± 1,28 ^{bd}	0,14 ± 0,02 ^{bd}

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

Letras iguais na mesma coluna significa que não houve diferença significativa, enquanto letras diferentes indicam diferença significativa através de Teste de Tukey com 5 % de significância, sendo as letras (a, b) para a enzima e (c, d) para a *Spirulina*.

Tabela 11 - Resultados obtidos para os filmes elaborados com gelatina RCCC em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* contendo valores reais e codificadas e as respostas expressas de acordo com a propriedade avaliada

Enzima*	<i>Spirulina</i> **	Solubilidade em água (%)	Aw	Resistência à tração (MPa)	Elongação (%)	Permeabilidade em vapor de água (g mm / m ² d kPa)	Espessura (mm)
1 (2,5%)	1 (6%)	36,62 ± 1,72 ^{ac}	0,64 ^{ac}	1,89 ± 0,10 ^{ac}	248,62 ± 4,80 ^{ac}	7,16 ± 3,04 ^{ac}	0,14 ± 0,01 ^{ac}
1 (2,5%)	-1 (0)	45,78 ± 0,14 ^{ad}	0,65 ^{ad}	1,83 ± 0,08 ^{ad}	252,08 ± 12,07 ^{ad}	29,69 ± 2,69 ^{ad}	0,15 ± 0,01 ^{ad}
-1 (0)	1 (6%)	80,58 ± 0,92 ^{bc}	0,63 ^{bc}	1,86 ± 0,20 ^{bc}	251,48 ± 1,58 ^{bc}	25,72 ± 5,49 ^{bc}	0,15 ± 0,01 ^{bc}
-1(0)	-1 (0)	97,50 ± 1,29 ^{bd}	0,64 ^{bd}	1,85 ± 0,07 ^{bd}	252,73 ± 3,76 ^{bd}	30,43 ± 6 ^{bd}	0,16 ± 0,01 ^{bd}

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

Letras iguais na mesma coluna significa que não houve diferença significativa, enquanto letras diferentes indicam diferença significativa através de Teste de Tukey com 5 % de significância, sendo as letras (a, b) para a enzima e (c, d) para a *Spirulina*.

Após a caracterização, foi realizada análise estatística, visando avaliar a influência da enzima TGase e do extrato fenólico de *Spirulina* sobre as propriedades dos filmes de amido e gelatina comercial e RCCC. Os resultados estão apresentados na Tabela 12, e os resultados serão discutidos em subitens a seguir.

Tabela 12 - Análise estatística dos dados do planejamento que avaliou o efeito produzido pela adição da enzima TGase e do extrato fenólico de Spirulina em filmes de amido e gelatina de comercial e gelatina RCCC

Variável de resposta	Gelatina comercial				Gelatina RCCC			
	p		Efeitos estimados		p		Efeitos estimados	
	Enzima	<i>Spirulina</i>	Enzima	<i>Spirulina</i>	Enzima	<i>Spirulina</i>	Enzima	<i>Spirulina</i>
Solubilidade em água (%)	$2 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-5}$	-13,16	49,94	$1 \cdot 10^{-12}$	$5 \cdot 10^{-8}$	-47,83	-13,03
Atividade de água	$4 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$-1 \cdot 10^{-3}$	$-3 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-11}$	$2 \cdot 10^{-10}$	0,01	$-8 \cdot 10^{-3}$
Permeabilidade em vapor de água (g mm/m ² d kPa)	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	-9,42	7,09	$6 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-4}$	-9,65	-13,62
Resistência a tração (MPa)	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$	1,98	1,24	0,93	0,70	6E-03	0,02
Elongação (%)	0,06	$4 \cdot 10^{-4}$	3,45	-9,20	0,66	0,56	-1,75	-2,35
Espessura (mm)	0,56	$4 \cdot 10^{-4}$	$-6 \cdot 10^{-3}$	0,06	0,18	0,05	$-8 \cdot 10^{-3}$	-0,01

Valor de $p < 0,05$ significa que há diferença significativa entre as amostras

4.3.3.1 Solubilidade em água

A partir dos resultados da Tabela 12 foi possível verificar que a enzima teve efeito significativo sobre a solubilidade dos filmes elaborados com ambas as gelatinas, atendendo o objetivo de diminuir a solubilidade. A TGase atuou formando uma compacta estrutura de rede espacial, reduzindo assim o espaço intermolecular, inibindo a difusão de moléculas de água e reduzindo a solubilidade dos filmes, o que faz com que o tratamento enzimático seja visto como uma abordagem eficaz para reduzir a suscetibilidade dos filmes a umidade (AL-HASSAN; NORZIAH, 2017; CHENG *et al.*, 2019).

A adição do extrato fenólico de *Spirulina*, apresentou efeitos significativos para ambos os filmes, porém positivo e negativo para gelatina comercial e a RCCC, respectivamente. Nos filmes com a gelatina comercial a solubilidade aumentou com aumento da concentração de *Spirulina*. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de ser adicionada ao final da elaboração da solução filmogênica (juntamente com o amido), e estudo realizado por Fabra *et al.*, (2018) mostrou que a presença de microalgas em filmes de amido limitava a acessibilidade à água em direção ao interior dos grânulos de amido, dificultando o arranjo das cadeias de amilose e amilopectina em estruturas lamelares, esse fator pode interferir na estruturação da rede polimérica facilitando a absorção de água e conseqüentemente aumentando a solubilidade, Uma vez que a *Spirulina* possui capacidade altamente hidrofílica.

Os resultados para a solubilidade dos filmes com a gelatina RCCC apresentam menor solubilidade quando maiores concentrações de *Spirulina* foram utilizadas. Isso pode ser explicado pelas ligações entre íons metálicos do cromo (presente na gelatina RCCC) com os fenólicos da *Spirulina* por meio de vários mecanismos físico-químicos. Uma vez que a microalga é utilizada em muitos estudos de biossorção de cromo com resultados interessantes por possuir capacidade de biossorver metais pesados, e mecanismos responsáveis pela biossorção, embora compreendidos até certo ponto, podem ser uma combinação de troca iônica (REZAEI, 2016). Esta ligação pode dificultar o acesso da água ao interior do filme e por isso diminuir a solubilidade.

4.3.3.2 Atividade de água (A_w)

A água livre tem interferências nas reações químicas, bioquímicas e microbiológicas, o que se torna um fator relevante durante a aplicação do filme. Pode ser reduzida ao aperfeiçoar o processo de secagem das amostras. A adição de novos solutos e/ou biopolímeros e

plastificantes presentes na composição do filme tem interferência direta com esse parâmetro (SHAHRAMPOUR *et al.*, 2020).

Os resultados de atividade de água demonstraram que a incorporação do extrato fenólico de *Spirulina* foi significativa para os filmes elaborados com ambas as gelatinas, diminuindo a atividade de água para ambas. Essa redução pode ocorrer devido a interações entre as cadeias poliméricas, que podem diminuir a disponibilidade dos grupos hidroxila e levar à redução das ligações de hidrogênio entre o polímero e a água (MARTINS *et al.*, 2009).

Quanto à enzima, a adição diminuiu a atividade de água para os filmes de gelatina comercial e aumentou para os de gelatina RCCC, o que indica que a enzima transglutaminase não teve força suficiente para criar ligações cruzadas nos filmes de gelatina RCCC que conseguissem minimizar a A_w , uma vez que a gelatina RCCC possui maior quantidade de sais que ocasionam maior higroscopicidade ao filme (SCOPEL *et al.*, 2018). Enquanto nos filmes de gelatina comercial, por possuírem distribuição e densidade homogêneas, a TGase agiu criando interações intermoleculares e intramoleculares na estrutura polimérica do filme reduzindo a disponibilidade dos grupos hidrofílicos, e levando subsequentemente a uma diminuição da afinidade do filme em relação às moléculas de água (CHAMBI; GROSSO, 2006).

4.3.3.3 Propriedades mecânicas: Resistência à tração e alongação

As propriedades mecânicas são importantes para a compreensão da interação interna dos biomateriais, pois em geral, o objetivo é obter materiais resistentes e flexíveis (JIANG *et al.*, 2019). Esses testes revelam a capacidade de um filme manter sua integridade sob estresse durante o processamento e a aplicação (SHI *et al.*, 2017).

Para estas propriedades, tanto a enzima quanto o extrato fenólico de *Spirulina* apresentaram efeitos significativos apenas para a gelatina comercial, aumentando a resistência à tração e diminuindo a alongação.

O aumento na resistência ocorre porque os filmes são homogêneos e há compatibilidade entre os materiais utilizados. A adição de TGase criou ligações cruzadas covalentes entre os constituintes da proteína, o que facilitou a polimerização intramolecular dos peptídeos na gelatina, aumentando assim a resistência à tração. Quanto maior o grau de reticulação alcançado no filme, maior vai ser a resistência à tração devido à rigidez e ao peso molecular (WANG *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2019; CHENG *et al.*, 2019). Já a interação com a *Spirulina* pode ser explicada pela ocorrência de uma adesão interfacial mais forte entre as moléculas de gelatina e

Spirulina no filme, e interações mais estreitas entre os polímeros, que levam a uma resistência mais efetiva ao estresse mecânico, ocasionada por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (XIANG *et al.*, 2016).

Resultados similares foram encontrados por Balti *et al.* (2017) que utilizou extrato de *Spirulina* para elaborar filmes e obteve aumento de resistência e queda de alongação, e atribuiu esse fator às interações entre os componentes, que produziram um efeito de reticulação, diminuindo a mobilidade molecular do polímero, causando uma diminuição no alongamento, que pode ser variável de acordo com o polímero a ser estudado.

4.3.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

A taxa de transmissão de vapor de água dos filmes desempenha um papel importante nas reações de decomposição do filme. Para a permeabilidade ao vapor de água, tanto a enzima como a *Spirulina* apresentaram efeitos significativos, diminuindo a permeabilidade ao vapor de água para ambos os tipos de gelatina. A presença do extrato fenólico de *Spirulina* dificultou o rearranjo e empacotamento da estrutura das cadeias poliméricas, efeito que pode ser atribuído ao rompimento da parede celular no processamento, onde as microalgas poderiam atuar como agente de enchimento e bloqueio, reduzindo a transferência de vapor de água através do filme (FABRA *et al.*, 2018). Essa diminuição pode ter sido ocasionada devido às interações entre a matriz polimérica da gelatina e os compostos fenólicos da *Spirulina*, que possivelmente resultou em aumento de interações entre monômeros de gelatina, reforçando as interações de polímero diminuindo a permeabilidade (BALTI *et al.*, 2017).

A enzima TGase influenciou as propriedades da barreira do filme, através da reticulação, que criou ligações cruzadas catalisadas entre a TGase e as proteínas, que pode estar associado a uma estrutura de filme mais compacta, o que diminuiu a permeabilidade (PORTA *et al.*, 2015).

4.3.3.5 Espessura

Através da espessura pode-se definir o tempo necessário para a biodegradação completa de um polímero, quando menor, se espera que a biodegradação ocorra de maneira mais rápida que em materiais mais espessos, devido à propensão à formação de fissuras, o que aumenta a

área superficial e permite incrustações e fragmentações mais rápidas. (WANG *et al.*, 2018; DILKES-HOFFMAN *et al.*, 2019).

A adição do extrato fenólico de *Spirulina* promoveu o aumento significativo de espessura apenas para os filmes com a gelatina comercial, o que pode ser justificado pelo fato de que quantidades maiores de sólidos na formulação do filme provocam aumento de espessura (CARDOSO *et al.*, 2019).

4.3.3.6 Aparência global e cor

A aparência global das é um fator importante para sua aplicação, sendo que a decisão dos consumidores pela escolha de uma ou outra marca, bem como de um ou outro produto, geralmente é influenciada pela aparência da embalagem (BIDUSKI, 2015). A análise é realizada de maneira qualitativa. Neste caso, em que a proposta é a aplicação dos filmes como cobertura de solo, deseja-se que eles sejam homogêneos, sem presença de rupturas ou zonas quebradiças e de fácil manuseio.

Todos os filmes elaborados apresentaram homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e de bolhas) continuidade (sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças) e de fácil manuseio (facilidade em retirar os filmes das placas).

A cor do filme está relacionada a aplicabilidade do filme, pois pode facilitar ou dificultar o acesso à luz, e como objetiva-se aplicar como cobertura de solo, dependendo da planta a ser utilizada precisa de uma passagem de luz solar menor ou maior para otimizar seu crescimento. A Tabela 13 apresenta os parâmetros de cor, enquanto a Tabela 14 apresenta a análise estatística.

Tabela 13 - Resultados obtidos na análise de cor para os filmes elaborados com gelatina comercial e RCCC em função das variáveis de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* contendo valores reais e codificadas

Enzima*	<i>Spirulina</i> **	Gelatina comercial			Gelatina RCCC		
		L*	a*	b*	L*	a*	b*
1 (2,5%)	1 (6%)	44,22 ± 2,89 ^{ac}	-0,56 ± 0,33 ^{ac}	16,82 ± 3,69 ^{ac}	46 ± 0,1 ^{ac}	-1,02 ± 0,26 ^{ac}	-14,84 ± 1,76 ^{ac}
1 (2,5%)	-1 (0)	45,27 ± 1,99 ^{ab}	-0,33 ± 0,20 ^{ab}	16,705 ± 9,74 ^{ab}	46 ± 1 ^{ac}	-0,39 ± 0,14 ^{ab}	10,96 ± 1,72 ^{ab}
-1 (0)	1 (6%)	48,18 ± 1,50 ^{bc}	-1,16 ± 0,06 ^{bc}	6,79 ± 0,75 ^{bc}	47 ± 1,15 ^{ac}	-1,09 ± 0,04 ^{bc}	8,43 ± 0,62 ^{bc}
-1(0)	-1 (0)	49,34 ± 0,16 ^{bd}	-1,33 ± 0,13 ^{bd}	6,72 ± 1,08 ^{bd}	47 ± 0,1 ^{ac}	-0,62 ± 2,88 ^{ac}	5,58 ± 2,88 ^{ac}

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

L*: Luminosidade; a* (-a* é verde, + a* é vermelho) e b* (-b* é azul, + b* é amarelo)

Letras iguais na mesma coluna significa que não houve diferença significativa, enquanto letras diferentes indicam diferença significativa através de Teste de Tukey com 5 % de significância, sendo as letras (a, b) para a enzima e (c, d) para a *Spirulina*.Tabela 14 - Análise estatística da determinação de cor que avaliou o efeito produzido pela adição da enzima TGase e do extrato fenólico de *Spirulina* em filmes de amido e gelatina de comercial e gelatina RCCC

Cor	Gelatina comercial				Gelatina RCCC			
	Valor de p		Efeito		Valor de p		Efeito	
	Enzima*	<i>Spirulina</i> **	Enzima	<i>Spirulina</i>	Enzima	<i>Spirulina</i>	Enzima	<i>Spirulina</i>
L*	0,0066	0,3461	-4,0150	-1,1050	0,0438	0,9628	-1,1992	0,0242
a*	0,0001	0,8615	0,8083	-0,0217	0,2902	0,0032	0,1500	-0,5500
b*	0,0002	0,5522	9,2350	0,8617	0,0004	0,0074	6,4817	3,9517

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

L*: Luminosidade; a* (-a* é verde, + a* é vermelho) e b* (-b* é azul, + b* é amarelo)

Valor de p <0,05 significa que há diferença significativa entre as amostras

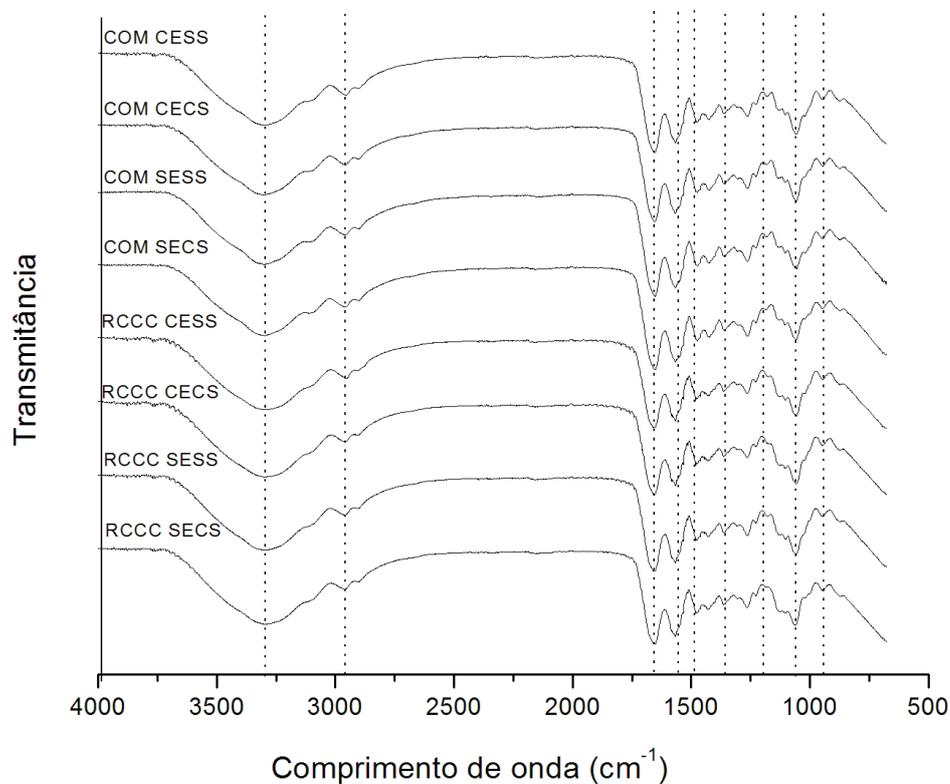
Todos os a^* foram negativos indicando cor verde para os filmes, enquanto os b^* foram positivos indicando uma cor amarelada, ou seja, a caracterização de cor determinou filmes amarelo-esverdeados.

A enzima atuou diminuindo a luminosidade e aumentando as cores amarelo e verde, com maior intensidade na primeira. E para a gelatina RCCC, além de diminuir a luminosidade e aumentou somente a cor amarela. E a adição da *Spirulina* diminuiu a coloração verde e intensificando o amarelo. Esta alteração na cor pode ser atribuída a alteração da cristalinidade, ocasionada pela reticulação induzida pela transglutaminase, que altera a estrutura molecular da matriz proteica, ocasionando menor passagem de luz (TANG *et al.*, 2005, WANGTUEAI *et al.*, 2010).

4.3.3.7 FTIR

As análises de FTIR de todos os materiais utilizados está no Apêndice G. A Figura 11 mostra a determinação de FTIR dos filmes.

Figura 11 - Determinação de FTIR dos filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Todos os filmes mostraram os principais espectros típicos de plastificantes, carboidratos (amido) e proteínas (gelatina) atribuídos à ligação peptídica da amida I e amida II (HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020). Espectros de absorção no infravermelho de diferentes filmes apresentaram os comprimentos de onda apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - discussão acerca dos comprimentos de onda em cm^{-1} evidenciados na análise de FTIR de filmes de amidos e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

Comprimento de onda (cm^{-1})	Atribuições
955-1186	Corresponde a bandas características de carboidratos, C-O e C-C
1100 - 1200	Amida III: vibrações em grupos N-N e N-H de amida ligada ou vibração de grupos CH ₂ de glicina, bem como amida A e B, indicando vibrações de estiramento C-N e deformação N-H a partir de ligações amidadas, os picos são mais intensos representando, em sua maioria, ligações entre C-O típico de polissacarídeos como amido e glicerol.
1590-1500	Amida II: acoplamento da flexão da ligação N-H e o alongamento da ligação C-N, resulta da curvatura do N-H.
1700-1600	Amida I: vibração de alongamento acoplada a CO que resulta das vibrações de estiramento de C-O de ligações peptídicas, característico da <i>Spirulina</i> .
3290	Amida A: alongamento H, associado à ligação de induzindo a presença de ligações O-H.
2950	Alongamento assimétrico de CH ₂
3400 e 3250	Aminas primárias: representadas pelo estiramento das ligações N-H e a presença de hidroxilas (O-H), que estão presentes devido às moléculas de água e glicerol que constituem a solução filmogênica.

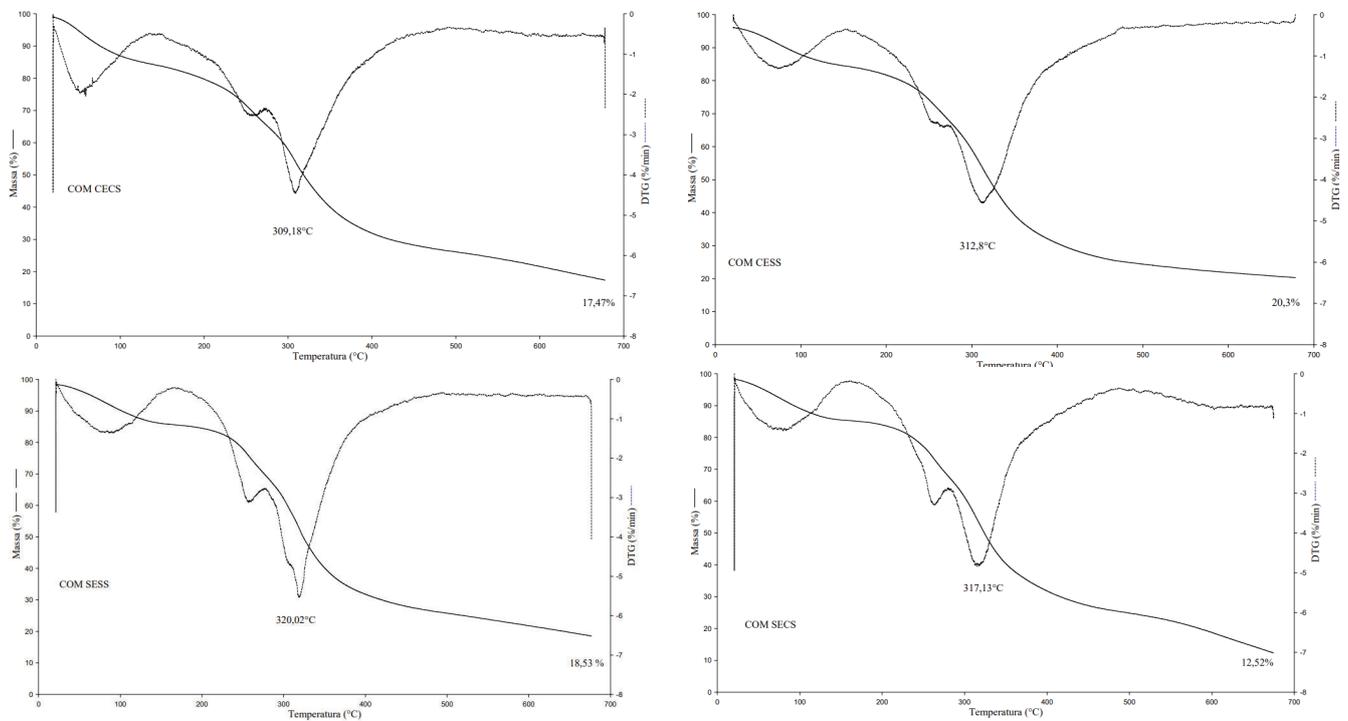
Fonte: (Dotto et al., 2013; Bataller; Capareda, 2018; Scopel et al., 2018; Jamróz; Juszczak; Kucharek 2018; Dang et al., 2018; Cheng et al., 2019; Wu et al., 2018)

Comparando os filmes elaborados com diferentes gelatinas e aditivos, percebeu-se que exibiram picos na mesma faixa de comprimento de ondas, apresentando diferença na intensidade nos picos 1500 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} , característicos de gelatina, os filmes elaborados com gelatina RCCC apresentam menor intensidade, esse pico representa os grupos amina e amida (secundárias e secundárias). As amidas primárias sofrem alongamento da ligação C=O, e secundárias, sofrem estiramento da ligação entre C-N (WANG, 2015). O pico 1070 e 920 cm^{-1} pode ser atribuído a ação da enzima TGase, respectivo a vibração da ligação C-N e C-O característico do grupo amida para estiramentos da ligação C-O (WU, 2017) (CHENG et al., 2019).

4.3.3.8 Termogravimetria e derivada (DTG)

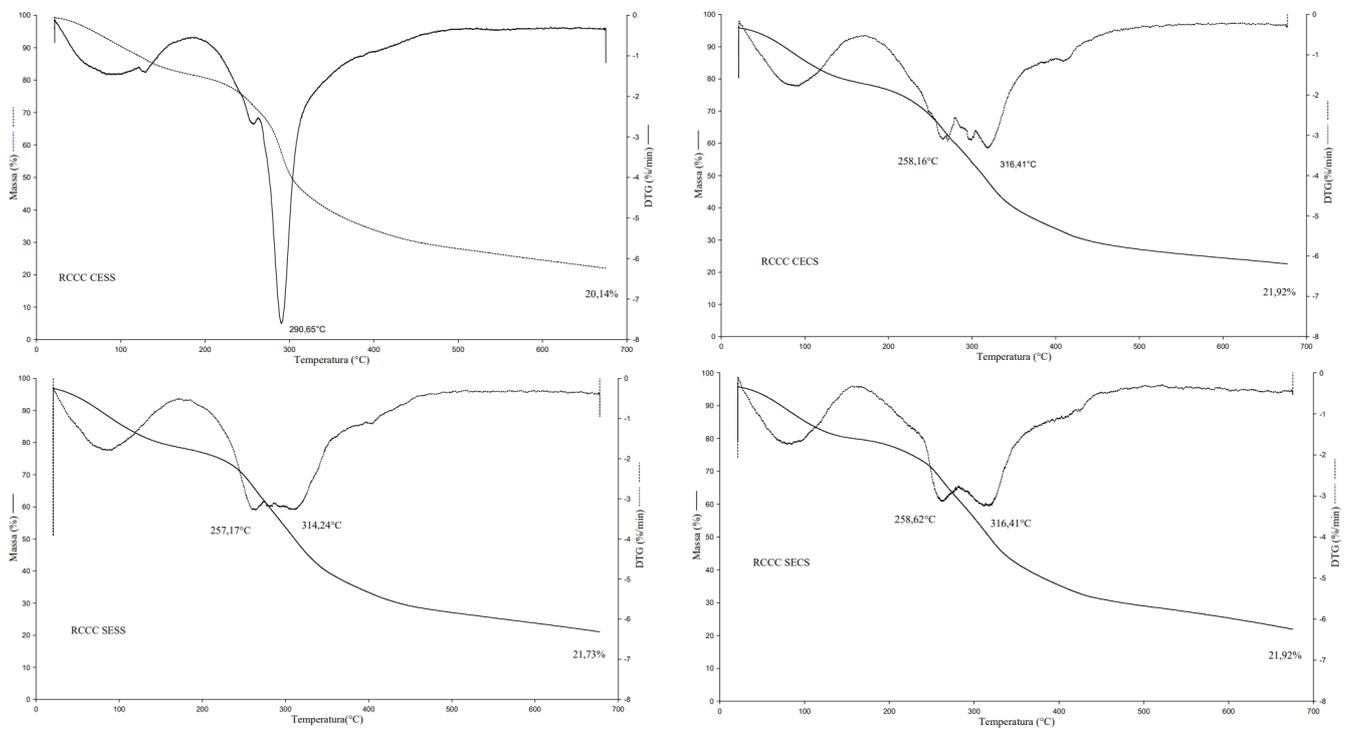
As Figuras 12 e 13 mostram as análises de termogravimetria e derivada correspondente aos filmes de amido e gelatina comercial e RCCC elaborados em condições otimizadas de enzima e *Spirulina*.

Figura 12 - Determinação de termogravimetria (TG) e derivada (DTG) de filmes de amido e gelatina comercial (COM) com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*.



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Figura 13 - Determinação de termogravimetria (TG) e derivada (DTG) de filmes de amido e gelatina RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*.



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Para todos os filmes produzidos observaram-se três estágios de perda de massa. A primeira perda de massa que ocorreu abaixo de 100 °C foi atribuída à perda de água devido à evaporação de componentes mais voláteis, como moléculas de água livre e estrutural (CHENG *et al.*, 2019). O segundo e terceiro estágio iniciam a partir de 200 °C e estabilizam próximo a 450 °C, variação está que é atribuída a modificações moleculares, como a degradação de proteínas e polissacarídeos que ocasionam a decomposição da amostra (WANG *et al.*, 2017)

No segundo pico de temperatura, foi observado que os filmes elaborados com gelatina comercial e o RCCC com enzima e sem *Spirulina* houve diferenciação de perda de massa, que ocorre de forma mais acentuada ocorre no terceiro pico. Enquanto os demais filmes elaborados com gelatina RCCC, a perda de massa observada no segundo e terceiro pico se mantém aproximadas e são menores.

Ainda na gelatina comercial se percebeu que os filmes com enzima, com ou sem adição de *Spirulina* apresentam menor perda de massa que os filmes sem enzima. O que indica que os filmes elaborados com enzima possuem maior estabilidade térmica, ou seja, a TGase melhorou o desempenho das proteínas quando expostas ao calor, promovendo uma melhor termo estabilidade, formando uma estrutura de rede estável dentro do filme, impedindo a evaporação da água do filme (Liu *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2019).

Ao observar a massa residual final, percebe-se que os filmes elaborados com gelatina RCCC possuem valores maiores que os filmes elaborados com gelatina comercial, o que pode ser atribuído à quantidade de minerais presentes na amostra, inclusive durante a caracterização da gelatina percebe-se um valor elevado de cinzas, correspondente a esse fator (SCOPEL *et al.*, 2018).

4.3.3.9 Inibição microbiana de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e Spirulina

Os resultados de inibição microbiana ocasionada nos filmes pela adição de extrato fenólico de *Spirulina* e enzima TGase para o *Bacillus pumilus* e *Aspergillus niger* estão apresentados na Tabela 15.

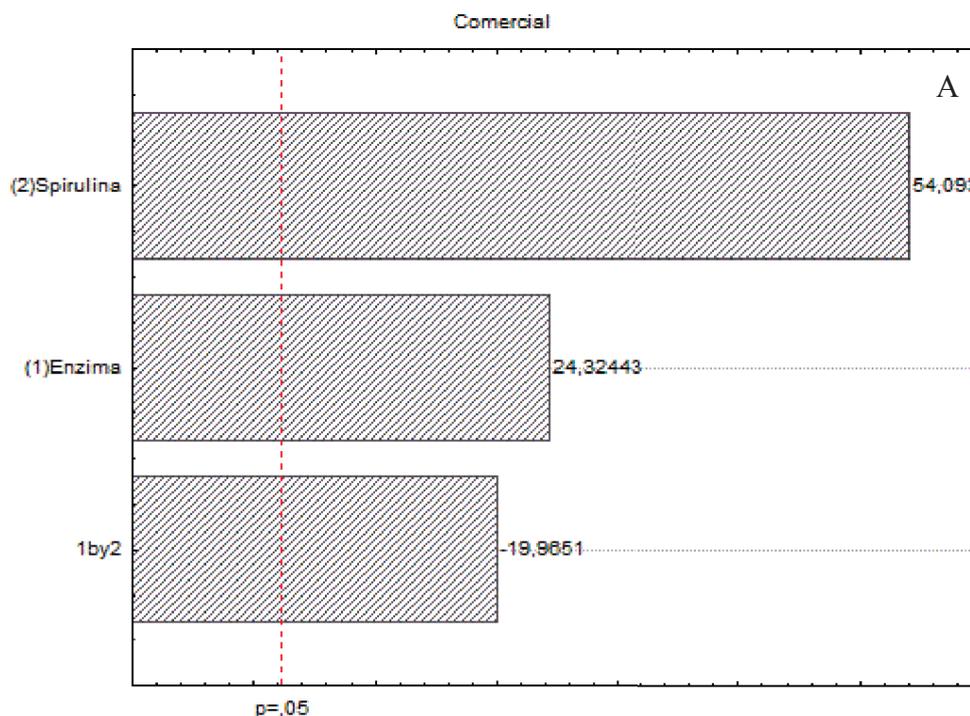
Tabela 15 - Inibição microbiana em filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

Enzima	<i>Spirulina</i>	Gelatina comercial		Gelatina RCCC	
		Inibição (%)		Inibição (%)	
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus pumillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus pumillus</i>
1 (2,5%)	1 (6%)	60,70 ± 1,12	25,84 ± 0,39	39,22 ± 3,09	57,6 ± 10,65
1 (2,5%)	-1 (0)	34,15 ± 0,80	34,64 ± 0,88	7,82 ± 2,14	9,95 ± 6,57
-1 (0)	1 (6%)	57,45 ± 2,29	84,04 ± 11,94	39,22 ± 1,88	45,20 ± 5,15
-1(0)	-1 (0)	0,00	0,00	0,00	0,00

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

Na sequência, as figuras 14 e 15 mostram o gráfico de pareto da influência das variáveis sobre a inibição dos microrganismos.

Figura 14 - Gráficos de Pareto para inibição de *Aspergillus niger* em filmes de amido e gelatina comercial (a) e RCCC (b) com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*



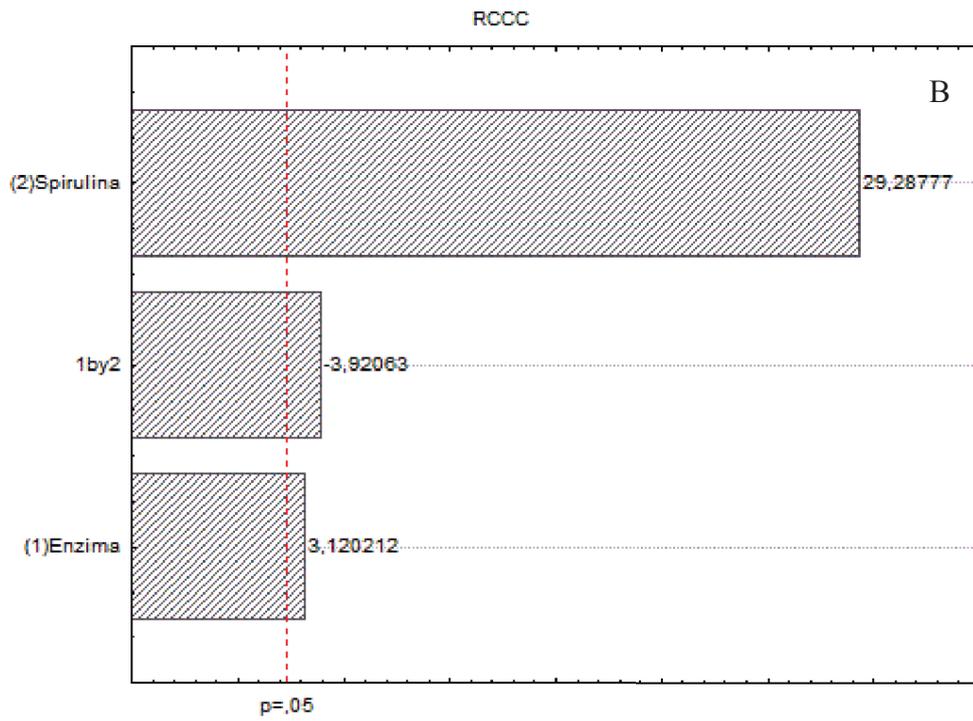
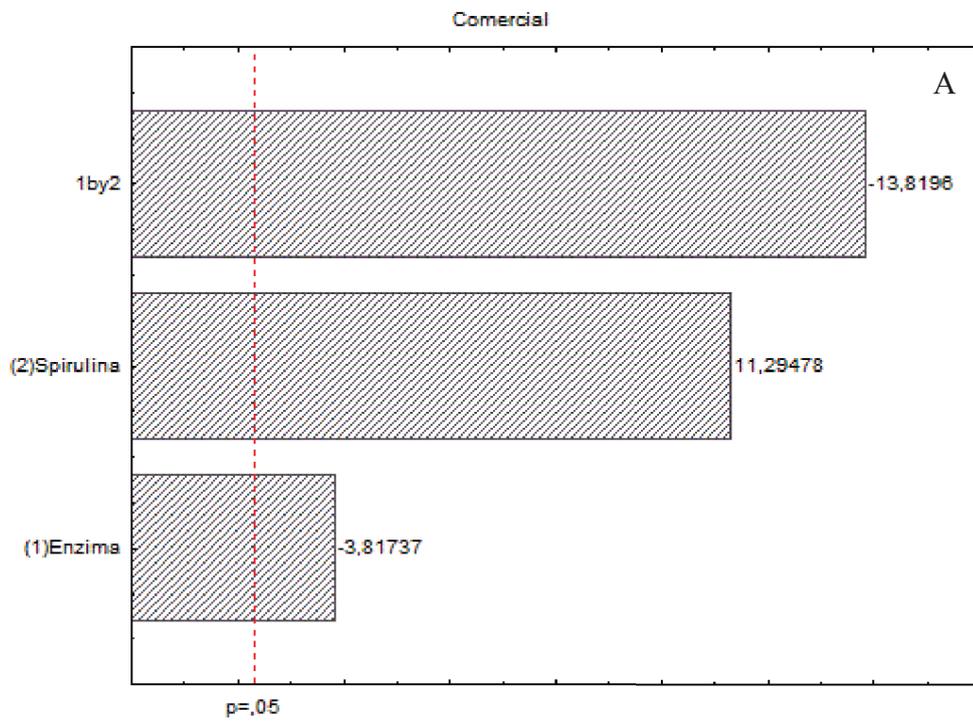
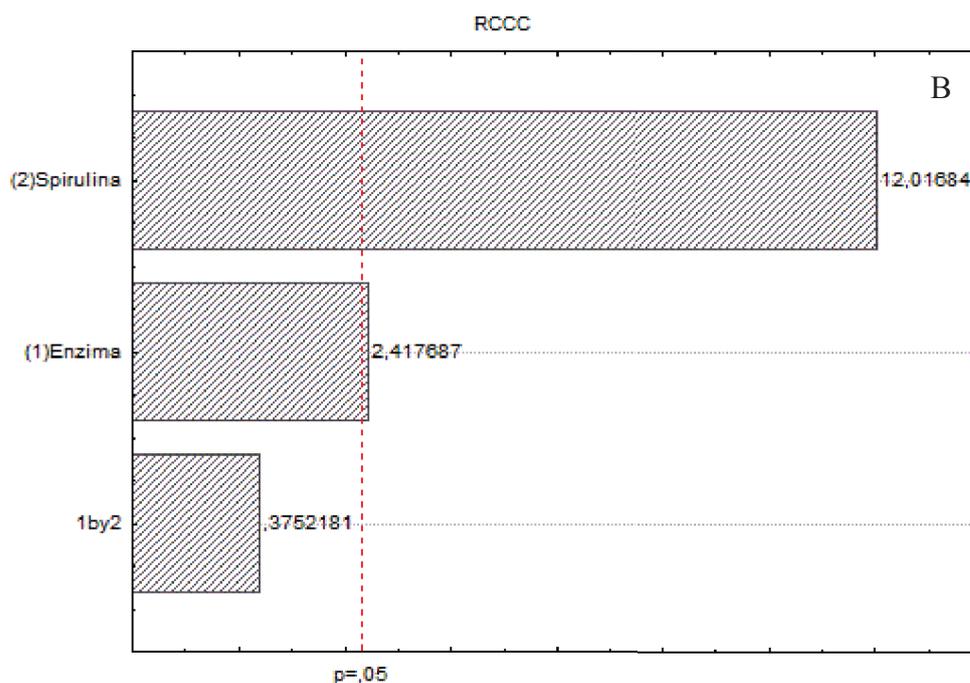


Figura 15 - Gráficos de Pareto para inibição de *Bacillus pumilus* em filmes de amido e gelatina comercial (a) e RCCC (b) com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*





Percebe-se que tanto a adição de enzima quanto do extrato fenólico de *Spirulina* apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento microbiano. Porém o efeito ocasionado pela *Spirulina* é mais assertivo com o objetivo desta propriedade, já que é quanto maior a inibição microbiana obtida, melhor.

Observou-se que a bactéria Gram-positiva *Bacillus pumillus* foi menos suscetível ao efeito do composto fenólico de *Spirulina platensis* quando comparada ao fungo *Aspergillus niger*. Isso pode ser atribuído ao fato de que a parede celular em bactérias gram-positivas, como o *Bacillus pumillus*, consiste em uma única camada, formada por uma estrutura de peptídeos (proteínas) ligados a polissacarídeos (açúcares), capazes de envolver externamente a membrana plasmática. Enquanto a parede celular dos fungos é formada por quitina (EL-SHEEKH et al., 2014).

Outros estudos confirmaram que os compostos fenólicos das microalgas têm potenciais propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas (El-SHEEKHA et al., 2014; BALTI et al., 2017). Além disso, considera-se que os compostos produzidos naturalmente, em vez de sinteticamente, serão biodegradados mais facilmente e, portanto, será ecologicamente aceitável com o proposto neste estudo (OZDEMIR et al, 2004).

A adição da TGase apresentou efeitos diferentes em cada filme, porém menor que quando comparada a *Spirulina*. Nos filmes elaborados com gelatina comercial, a enzima teve

um efeito maior na inibição do *Aspergillus niger*. Enquanto para o *Bacillus pumilus* ela ocasionou queda na inibição nos filmes de gelatina comercial e aumento nos RCCC.

O aumento de inibição ocasionados principalmente nos filmes com gelatina comercial indica que as ligações cruzadas ocasionam a polimerização das proteínas e participam na estabilização dos corpos apoptóticos, reduzindo assim a quantidade de microrganismos presentes na amostra. Estudos utilizando a TGase com esse objetivo é usual na área de saúde (PIACENTINI; COLIZZI, 1999). Já a queda na inibição representa que a enzima não obteve efeitos significativos na propriedade de inibição microbiana.

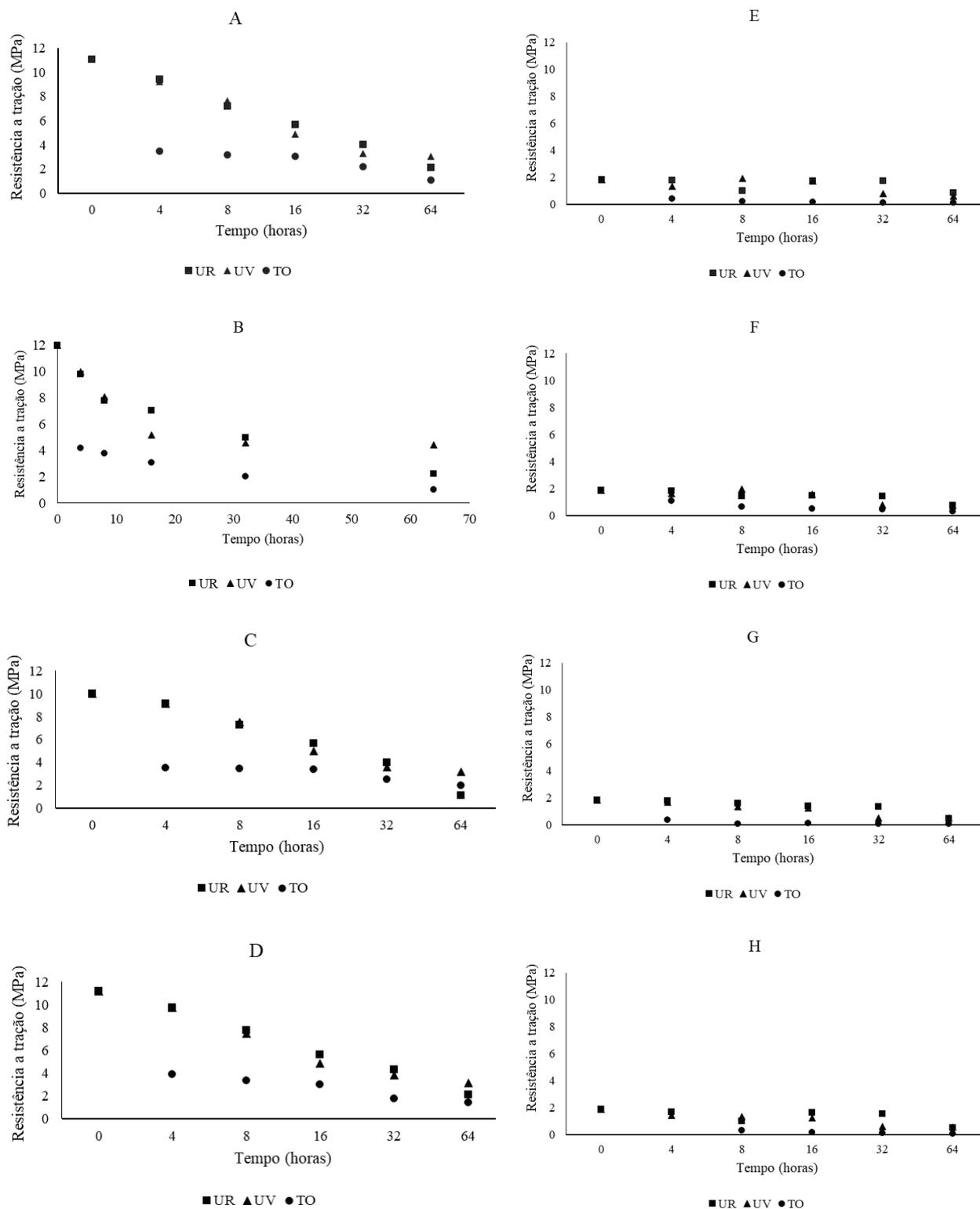
4.4.4 Envelhecimento acelerado

Para o envelhecimento nos filmes, avaliou-se as propriedades mecânicas, FTIR e termogravimetria visando identificar alterações que ocorreram nos filmes das diferentes composições durante o período de exposição de 64 h. Estes testes apresentaram efeitos diferentes em cada um dos filmes estudados.

4.4.4.1 Propriedades mecânicas

Alterações na resistência à tração e na porcentagem de perda no alongamento na ruptura são consideradas indicadores diretos de degradação (ROY *et al.*, 2006). Por isso estudou-se essas propriedades. E os resultados de resistência a tração e alongação de todos os filmes durante o envelhecimento acelerado podem ser visualizados nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Gráficos de resistência à tração de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* durante o envelhecimento por luz ultravioleta (UV), Termo oxidação (TO) e umidade (UR) por 64h



Filmes com gelatina comercial: com enzima e sem *Spirulina* (A); com enzima e com *Spirulina* (B); sem enzima e sem *Spirulina* (C); sem enzima e com *Spirulina* (D).

Filmes com gelatina RCCC: com enzima e sem *Spirulina* (E); com enzima e com *Spirulina* (F); sem enzima e sem *Spirulina* (G); sem enzima e com *Spirulina* (H).

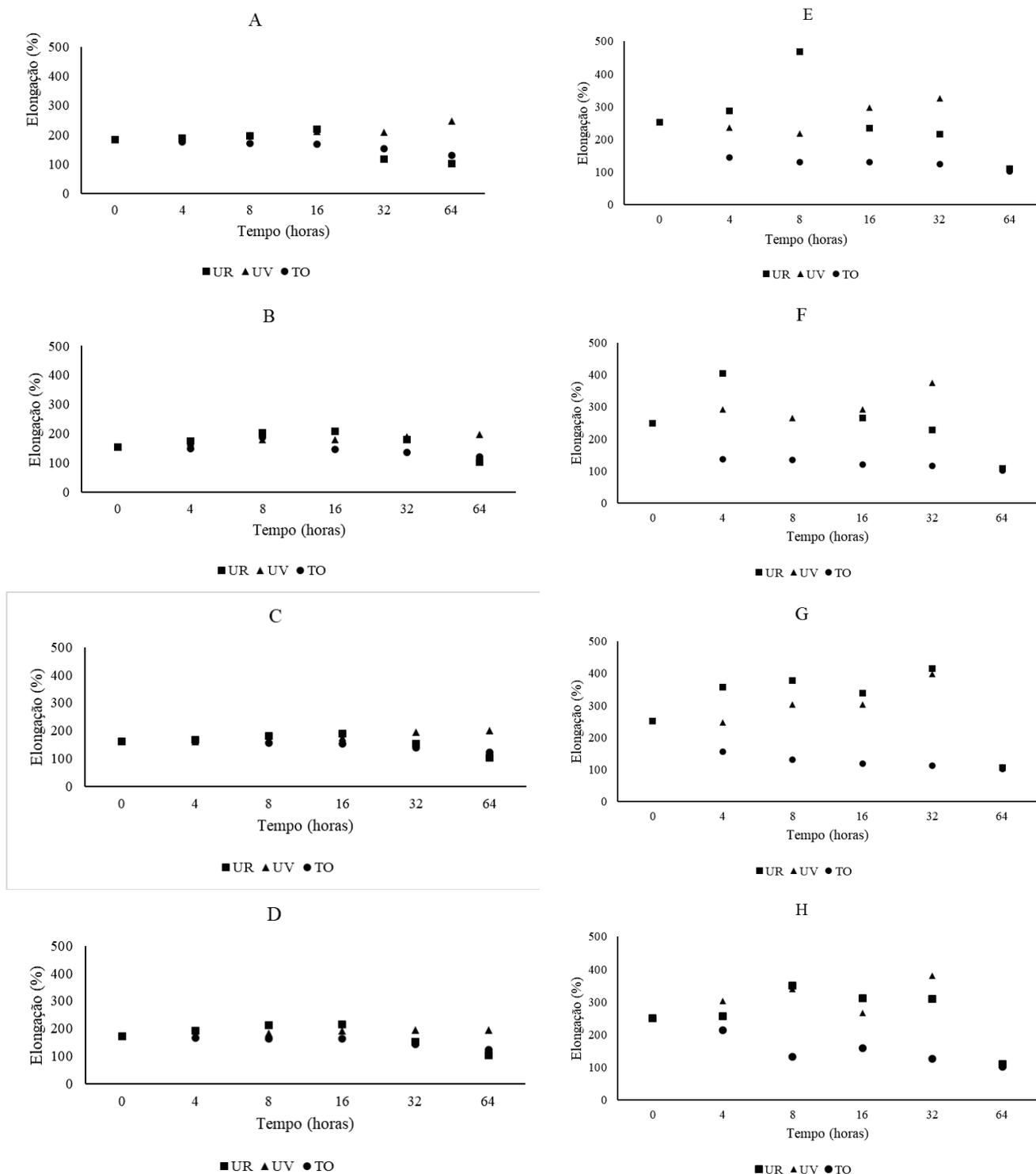
Percebe-se que todas as que as formulações exibiram diferenças na resistência ao longo da exposição. A exposição para TO foi a que mais alterou as propriedades de resistência para todos os filmes, para ambas as gelatinas, observou-se diminuição entre 80 a 95 % na propriedade de resistência. Já a UR causou perda de resistência com maior intensidade, entre 80% e 90% nos filmes de gelatina comercial, enquanto nos filmes de gelatina RCCC ocasionou perda entre 50% e 75 %. E a exposição UV foi a que menos interferiu nas propriedades de resistência dos filmes, que perderam cerca de 60 e 73 % para filmes elaborados com ambas as gelatinas.

É possível considerar que um material é suficientemente degradado quando 50% da resistência à tração inicial é atingida (LIZÁRRAGA-LABORÍN *et al.*, 2018). Após as 64 h de exposição aos diferentes tipos de envelhecimentos, todos os filmes aqui abordados apresentaram perda de resistência maior que 50%, sendo assim, os filmes foram considerados degradados.

Os filmes com adição de enzima se destacaram no envelhecimento por UR, sendo que exibiu menor perda de resistência que quando comparada aos demais envelhecimentos, em que os filmes com enzima apresentaram maior de resistência e estavam quebradiços. Este resultado pode ser explicado levando-se em consideração que as propriedades mecânicas dos materiais estão amplamente associadas tanto à distribuição quanto à densidade das interações intermoleculares e intramoleculares dos materiais determinantes da matriz polimérica (FERNANDEZ-BATS *et al.*, 2018). Neste caso, a transglutaminase criou ligações isopeptídicas intermoleculares e intramoleculares, reduzindo o espaço intermolecular, o que pode ter ocasionado perda de resistência ao longo da exposição UV e TO, uma vez que estas exposições ocasionam um ambiente seco e com altas temperaturas. Já para UR, a TGase atuou minimizando a absorção de água do filme, por isso fornece uma maior estabilidade ao filme durante esta exposição.

Já os filmes com *Spirulina* apresentaram menor queda de resistência quando expostos a UV, esse fator pode ser atribuído aos compostos fenólicos presentes na amostra, que atuaram como fonte natural de absorvedores de UV, obtendo efeitos fotoquimioprotetores e seus mecanismos moleculares irradiados por UV (MAPOUNG *et al.*, 2020).

Figura 17: Gráficos de alongação de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* durante o envelhecimento por luz ultravioleta (UV), Termo oxidação (TO) e umidade (UR) por 64h



Filmes com gelatina comercial: com enzima e sem *Spirulina* (A); com enzima e com *Spirulina* (B); sem enzima e sem *Spirulina* (C); sem enzima e com *Spirulina* (D).

Filmes com gelatina RCCC: com enzima e sem *Spirulina* (E); com enzima e com *Spirulina* (F); sem enzima e sem *Spirulina* (G); sem enzima e com *Spirulina* (H).

Para os filmes elaborados com gelatina comercial e submetidos a exposição UV percebe-se um ganho de alongação que varia entre 13 a 34%, enquanto para TO e UR há uma queda nesta propriedade, sendo mais acentuada na segunda (cerca de 40 %).

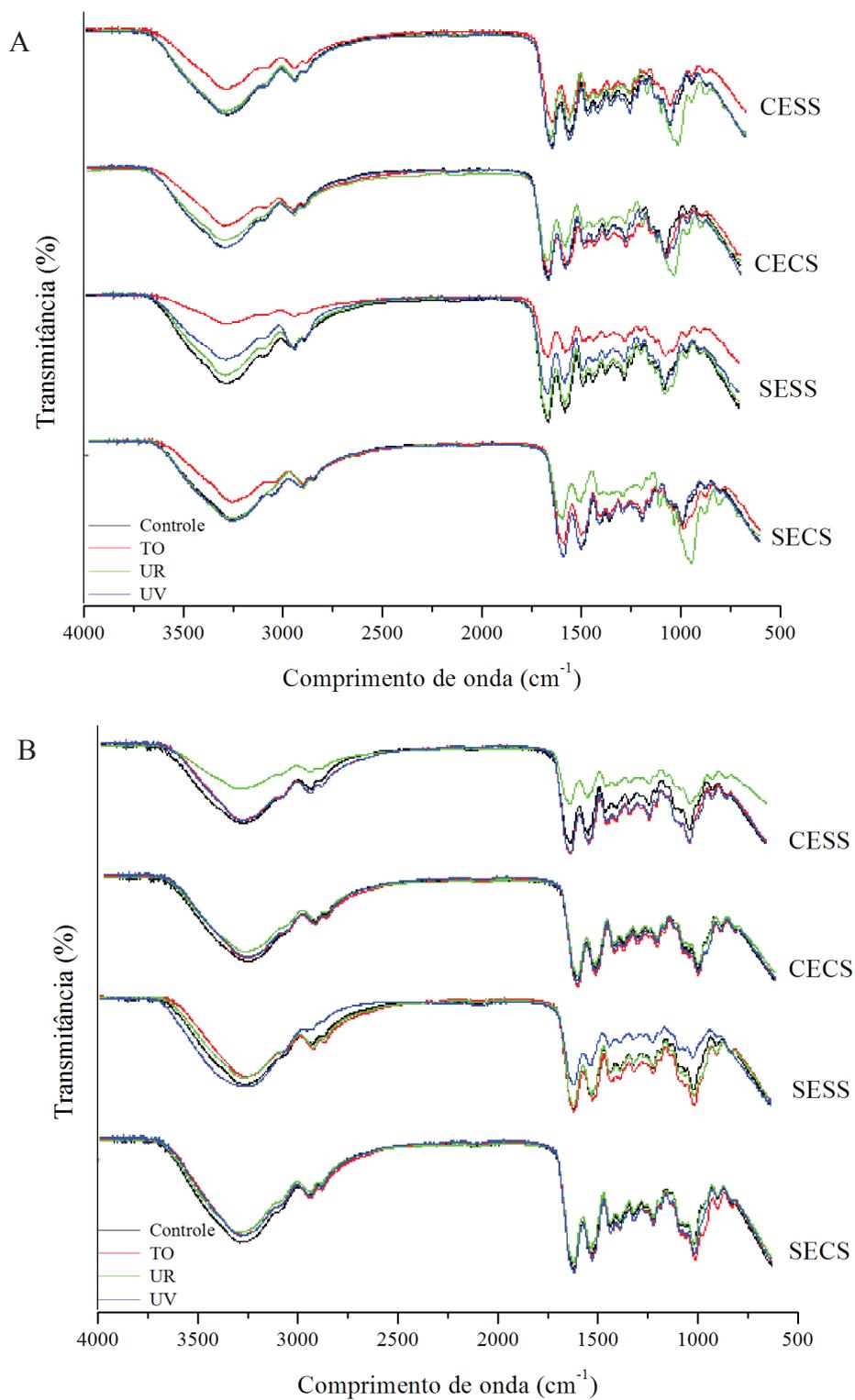
Já para os filmes RCCC, há queda de alongação maior que 50 % para todas as exposições, sendo que antes das exposições, estes filmes apresentavam propriedades de alongação superiores aos filmes de gelatina comercial. A queda iniciou a partir das 16 h de exposição. Este aumento inicial na resistência pode ser atribuído ao aumento da cristalinidade dos filmes e a última diminuição é resultado da cisão da cadeia, através da remoção da fase desordenada e como resultado há a criação de superfícies modificadas com maior cristalinidade (Roy *et al.*, 2006).

Através da avaliação das propriedades mecânicas pode-se mencionar que os filmes RCCC que apresentaram melhores condição são os que possuem enzima e/ou *Spirulina* em sua composição. No caso, a presença de aditivos levou à proteção da degradação, minimizando o processo de hidrólise em amostras submetidas a testes de envelhecimento acelerado, diminuindo a cisão da cadeia em comparação com o polímero puro (SOUZA *et al.*, 2018).

4.4.4.2 FTIR

A análise de FTIR foi realizada com objetivo de compreender como foi o comportamento da estrutura do polímero durante o envelhecimento acelerado. A alteração nos espectros de FTIR dos filmes foi mensurada de acordo com o tipo de envelhecimento realizado para cada filme, representados nas Figuras 18.

Figura 18 - Gráfico FTIR de filmes de amido e gelatina comercial (A) e gelatina RCCC (B) e com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* durante o envelhecimento termo oxidativo (TO), umidade controlada (UR) e luz ultravioleta (UV) por 64h



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Para os filmes elaborados com gelatina RCCC observou-se que os filmes com *Spirulina* não sofreram alteração, considerando que o tempo de 64 h não foi suficiente para causar deformação na estrutura do filme, apenas para o filme RCCC com enzima e sem *Spirulina* (CESS) evidenciou-se variação para a exposição UR, e para o filme RCCC sem enzima e sem *Spirulina* (SESS) para a exposição UV. Já os filmes de gelatina comercial, apresentaram variações nos picos correspondentes as exposições TO e UR (maior intensidade no filme sem enzima e com *Spirulina* (SECS).

Para monitorar a degradação foi observada a intensidade do pico correspondente a carbonila, centrado em torno de 1714 cm^{-1} . E nos filmes mencionados acima se percebeu modificações próximas ao pico de carbonila ($1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), que indica a presença de vários produtos de oxidação como aldeídos (1733 cm^{-1}), grupos carboxílicos (1700 cm^{-1}), indicando que a degradação ocorreu com maior intensidade nesses filmes (ROY *et al.*, 2006; HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020).

Quanto as mudanças nos filmes elaborados com gelatina comercial, o sem enzima e com *Spirulina* (SECS) submetido a UR apresentou queda na intensidade da banda centralizada em 1540 cm^{-1} (entre $1542\text{ e }1538\text{ cm}^{-1}$) da região amida II que sugere que a umidade teve impacto nas estruturas secundárias da proteína (ROY *et al.*, 2006) (HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020). Além de reduzir o pico entre $1030\text{ e }980\text{ cm}^{-1}$, causando deformação entre C-H, C-O e/ou C-C, ligações estas que podem ser relacionadas a molécula de amido (SCOPEL *et al.*, 2018). Enquanto para a exposição TO, percebe-se uma redução na intensidade do pico próximo a 3250 cm^{-1} , devido a interações entre moléculas de O-H, dando início a evaporação de componentes, como a água, e grupos de hidroxila como o glicerol, contribuíram para uma queda na intensidade dessa banda, devido ao baixo número de grupos hidroxila nos plastificantes (HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020).

4.4.4.3 Termogravimetria

Durante o envelhecimento foi realizada análise de termogravimetria investigando se a exposição ocasionou aumento da perda de massa no pico de fusão (que não ultrapassou $\pm 10^\circ\text{C}$ entre o início e o final da exposição), representado na Tabela 16.

Tabela 16 - Perda de massa durante exposição termo oxidativa (TO), umidade controlada (UR) e luz ultravioleta (UV) em filmes de amido e gelatina RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

		Perda de massa no evento (%)							
Enzima*	<i>Spirulina</i> **	Gelatina comercial				Gelatina RCCC			
		Controle	TO	UR	UV	Controle	TO	UR	UV
1 (2,5%)	1 (6%)	52	60	52	51	60	61	57	59
1 (2,5%)	-1 (0)	53	61	56	57	62	64	55	65
-1 (0)	1 (6%)	52	63	51	53	66	65	55	65
-1(0)	-1 (0)	52	63	45	45	62	67	54	61

*sobre a massa de gelatina **sobre o volume de solução filmogênica

A perda de massa no pico de temperatura ocorre com maior intensidade para os filmes submetidos a TO, os demais possuem maior estabilidade.

O filme sem enzima e com *Spirulina* (SECS) elaborado com gelatina comercial e todos os filmes RCCC apresentaram menor porcentagem de perda massa no evento ao final do envelhecimento quando comparados com o inicial, com base nisso pode-se mencionar que estes filmes mantem estabilidade térmica ao serem expostos em condições adversas.

Enquanto os demais para os filmes elaborados com gelatina comercial, evidenciou-se aumento na perda de massa quando comparados com o início da exposição. Essa queda na estabilidade térmica pode ser atribuída a uma redução das cadeias poliméricas em estágios adicionais do processo de degradação (LIZÁRRAGA-LABORÍN *et al.*, 2018).

4.5.1 Aplicação como cobertura de solo de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com condições otimizadas de enzima e *Spirulina*

A aplicação ocorreu durante 60 dias para todos os tipos de filmes, sendo possível observar que a partir dos 30 dias de aplicação iniciou o crescimento de bolores sobre a superfície do filme, ocorrendo com maior rapidez nos filmes sem enzima e sem *Spirulina* na gelatina RCCC, como mostra a Figura 19.

Figura 19 - Aplicação como cobertura de solo de filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

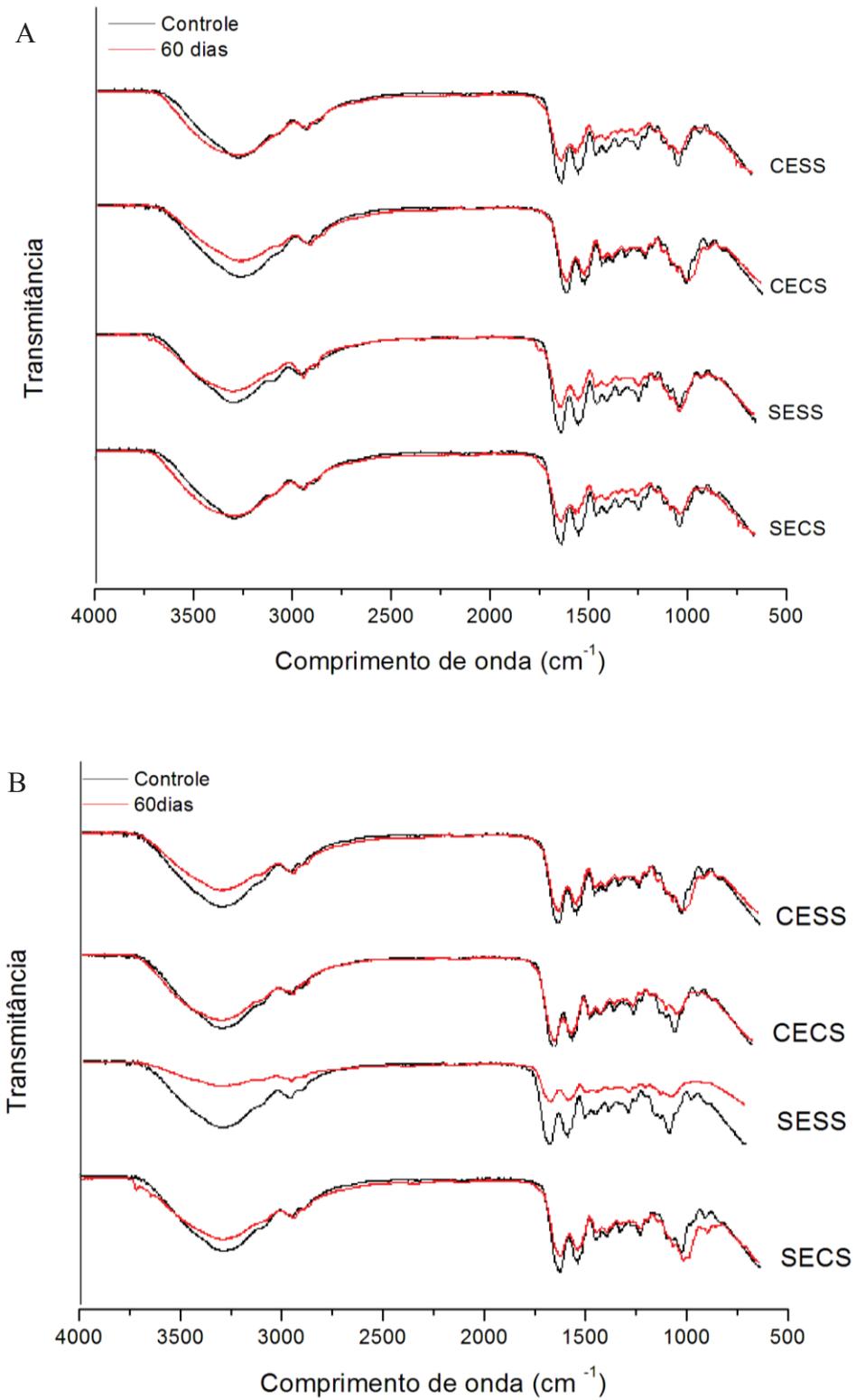
Ao final dos 60 dias percebe-se que para a gelatina comercial os filmes com *Spirulina* apresentaram menor quantidade de fungos, assim como o de gelatina RCCC com enzima e com *Spirulina*. E conseqüentemente estavam com menor proporção degradada.

Dessa forma é possível confirmar o que foi apresentado anteriormente nos testes com bactérias e fungos, ou seja, que a *Spirulina* agiu como agente antimicrobiano, retardando a degradação dos filmes quando aplicados no solo.

4.5.1.1 FTIR

A Figura 20 mostra a análise de FTIR dos filmes aplicados no solo, antes e após a aplicação.

Figura 20 - Análise de FTIR para a aplicação como cobertura de solo de filmes de amido e gelatina comercial (A) e RCCC (B) com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Durante o tempo de 60 dias percebeu-se mudanças intensas nos filmes RCCC em relação os filmes elaborados com gelatina comercial, especialmente no sem enzima e sem *Spirulina* apresentando menor intensidade no pico de 1000 cm^{-1} que corresponde ao estiramento ligação C O, 1100 cm^{-1} : deformação axial das ligações C-O, C-C e C-OH; 1200 cm^{-1} consiste na deformação axial C N (bandas identificadas em aminas) e 3250 cm^{-1} , interações entre moléculas de O-H, que é quando se dá início a evaporação de componentes (SCOPEL *et al.*, 2018; HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020).

Através da análise de FTIR pode-se evidenciar que a utilização de enzima e da *Spirulina* favoreceu a estrutura dos filmes, fazendo com que eles permaneçam mais tempo com a estrutura intacta, ou seja, sem penetração de água, e conseqüentemente otimizando sua aplicabilidade.

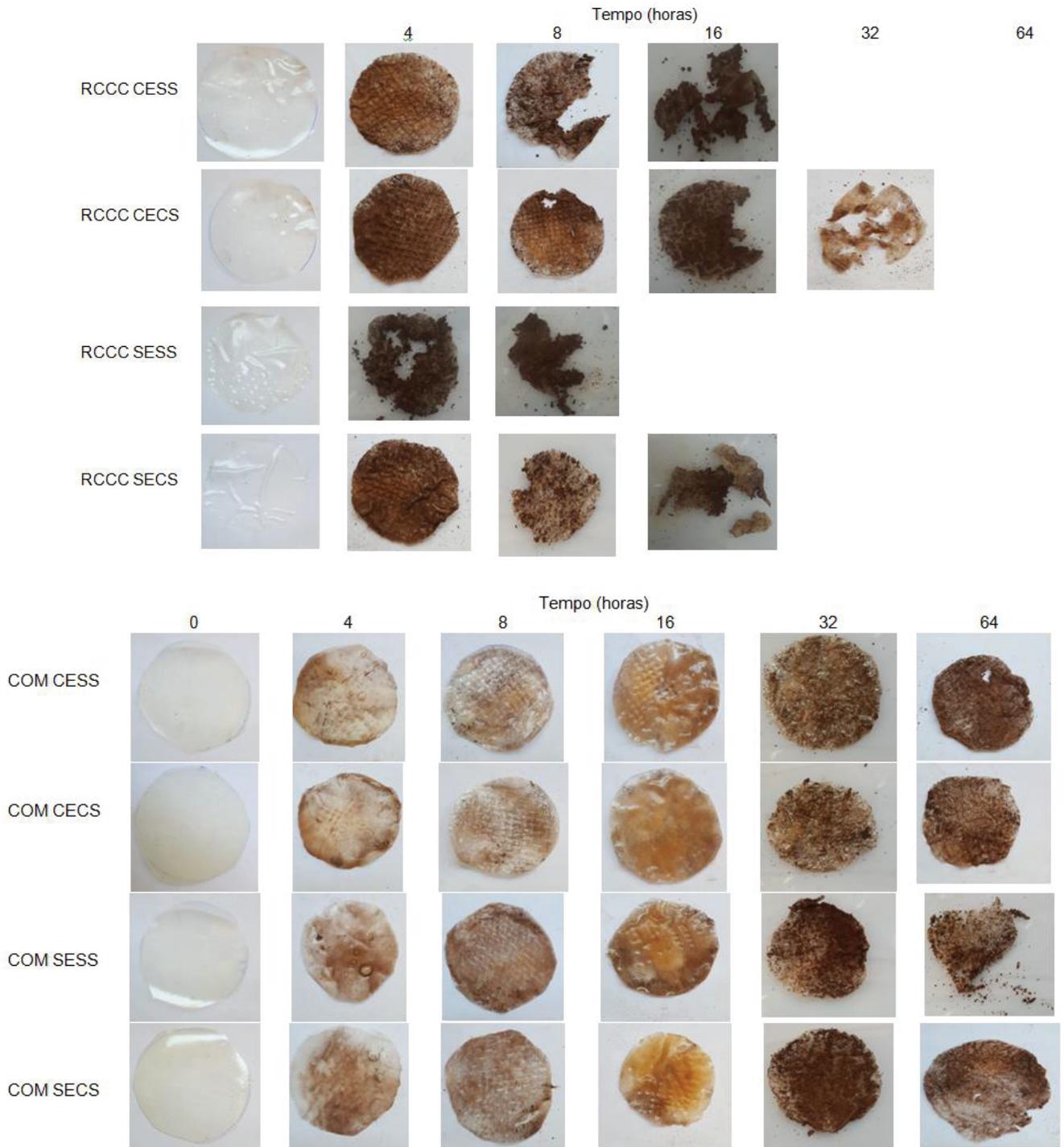
O filme poderia ser utilizado para plantio de mudas transplantadas, que demandam de um tempo menor até o cultivo. Dentre elas a rúcula (cerca de 60 dias), alface e o morango (70 dias) e couve (80 dias).

4.6.1 Biodegradação em solo de filmes de amido e gelatina comercial e RCCC com adição de enzima e *Spirulina*

A biodegradação dos polímeros dependerá da estrutura química do polímero e do meio (CHANDRA; RUSTGI, 1998). A maioria dos polímeros biodegradáveis possui em sua cadeia ligações hidrolisáveis, e essas ligações é que o tornam susceptível a biodegradação por microrganismos (FECHINI, 2013).

Para a biodegradação em solo, os filmes foram enterrados, a Figura 21 mostra os os estados de decomposição do filme durante a degradação.

Figura 21 - Biodegradação em solo de filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina*



CESS (com enzima e sem *Spirulina*), CECS (com enzima e com *Spirulina*), SESS (sem enzima e sem *Spirulina*) e SECS (sem enzima e com *Spirulina*)

Após 128 horas todos os filmes estavam totalmente degradados. Percebeu-se que a biodegradação ocorre de maneira rápida, pois após 16 h, para os filmes RCCC havia cerca de 50% do filme com adição de enzima e *Spirulina*, os demais estavam totalmente degradados ou

em processo de degradação bem avançado. Já na gelatina comercial no tempo de 64 h percebeu-se o início da degradação do filme sem enzima e sem *Spirulina*.

Ao avaliar a Figura 21 pode-se inferir que a estrutura da rede polimérica da gelatina comercial é mais resistente, pois dificultou a interação com moléculas de água, que podem causar a degradação desordenada, uma vez que a biodegradação ocorreu de forma regular. Enquanto para a RCCC, os filmes possuem propriedades hidrofílicas devido a quantidade de sais, facilitou a penetração de água na estrutura do filme, e as reações de hidrólise ocorreram de maneira irregular, percebeu-se uma intensidade menor no filme CECS, onde a *Spirulina* ocasionou menor solubilidade do filme, pois os demais a partir das 16 h estavam cerca de 50% degradados (FECHINI, 2013).

A rápida biodegradação é um dos fatores de grande importância no estudo de polímeros biodegradáveis, uma vez é a principal motivação na busca de fontes renováveis. No caso dos filmes de gelatina RCCC, após a biodegradação, há presença de muita matéria orgânica e vários nutrientes e oligoelementos pode ser usado como fertilizante para o crescimento das plantas (CABEZA, 1988); (DANG; SHAN; CHEN, 2018), fechando o ciclo como material sustentável, pois é inserido novamente no processo.

5 CONCLUSÕES

Este estudo tinha por objetivo melhorar as características de filmes biodegradáveis elaborados com gelatina extraída de resíduos de couro curtido ao cromo III, através da adição de agentes reticulantes e de inibição microbiana.

A gelatina foi extraída, caracterizada e concentrada, obtendo boas propriedades de formação de filmes.

A variação das quantidades de amido e enzima elenca como melhor condição para diminuir a solubilidade menor quantidade de amido sobre a solução filmogênica (0,5%) e maior quantidade de enzima sobre a massa de gelatina (2,5%). As variações de quantidades de extrato fenólico de *Spirulina* para atividade antimicrobiana para *Aspergillus niger* e *Bacillus pumillus* mostra que quanto maior a quantidade de extrato fenólico utilizado, maior a inibição, neste caso foi definido a utilização de 6% sobre a solução filmogênica.

Os filmes elaborados com gelatina RCCC apresentaram melhorias com o uso de aditivos, onde a enzima atuou diminuindo a solubilidade e a permeabilidade. Porém os efeitos da adição da enzima foram mais evidenciados na gelatina comercial (controle), pois além destes melhorou as propriedades mecânicas.

Já a adição do extrato fenólico de *Spirulina* apresentou melhor atuação nos filmes de gelatina RCCC, sendo que as propriedades ficaram de acordo com a desejabilidade, com exceção da alongação que ficou menor. Enquanto na gelatina comercial ocasionou maior solubilidade e permeabilidade, diminuindo a alongação e aumentando a espessura.

O uso de aditivos foi realizada com maior sucesso com a gelatina RCCC, visto que a *Spirulina* não teve uma interação significativa com a gelatina comercial. Além disso, a adição de enzima e extrato fenólico de *Spirulina* permitiu a obtenção de filmes mais resistentes ao crescimento de *Aspergillus niger* e o *Bacillus pumilus* e os filmes elaborados foram íntegros, maleáveis e com coloração uniforme. E ao final é possível mensurar, que o filme RCCC que apresentou melhor desempenho foi o que utilizou enzima e extrato fenólico de *Spirulina*.

Quanto ao envelhecimento acelerado, durante as 64 h de exposição perceberam-se um forte efeito nas propriedades mecânicas dos filmes. E ainda a degradação mais acentuada se deu por termo oxidação, onde apresentou maior queda de resistência, alteração nos espectros de FTIR no pico de carbonila, que correspondem a degradação. Os filmes com adição de enzima apresentam maior resistência a UR enquanto a *Spirulina* a UV. O nos filmes que contemplam os dois aditivos apresentou-se promissor para a gelatina RCCC.

A aplicabilidade em solo reforçou o teste de inibição microbiana, ou seja, os filmes que contém *Spirulina* em sua composição, levam mais tempo para degradar-se fisicamente, o que faz com que atendam a demanda de vida útil, podendo ser aplicados em ambiente que monitore umidade e luz UV, como por exemplo, como cobertura de solo dentro de estufas, na plantação de olerícolas que possuem um ciclo curto entre o plantio e a colheita, como alface ou rúcula. E ao final do processo, ao ser descartado, possui rápida degradabilidade, retornando ao ciclo em forma de matéria orgânica, auxiliando no desenvolvimento das plantas.

Uma sugestão para próximos estudos que utilizem gelatina extraída de RCCC para elaboração de filmes seria realizar processo de deionização, pois aumenta as forças de bloom, retira maior quantidade de sais, o que tornaria o filme menos higroscópico e com aplicabilidades ainda melhores. Outro fator interessante seria realizar identificação dos compostos fenólicos extraídos da *Spirulina*, visando identificar quais os compostos fenólicos extraídos que ocasionam maior inibição microbiana. E ainda, alguns estudos trazem a utilização de luz ultravioleta para tratamento microbiológico em filmes, avaliam antes e depois da exposição (por um período menor) que não ocasione degradação do polímero, e os resultados apresentados são promissores.

REFERÊNCIAS

ABIPLAST. Perfil 2016. **Indústria de Transformação de Material Plástico**. São Paulo, 2016.

ABIPLAST. Perfil 2017. **Indústria de Transformação de Material Plástico**. São Paulo, 2017.

ABNT. **NBR 10.004**. Resíduos sólidos – Classificação 2004b, 2004.

_____. **NBR 11065**. Couro — Determinação de nitrogênio e de substância dérmica, 2007.

_____. **NBR 13347**. Couro - Banho residual e efluente líquido - Determinação de nitrogênio total – Método Kjeldahl (NTK), 2015.

ACOSTA, S; CHIRALT, A; SANTAMARINA, P; ROSELLO, J; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C; CHÁFER, M. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 233-240, 2016.

AGAMA-ACEVEDO, E; BELLO-PEREZ, L.A. Starch as an emulsions stability: the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 78-83, 2017.

ALBERTSSON, C.A; ANDERSSON, O.S; KARLSSON, S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. **Polymer degradation and stability**, v. 18, p. 73-87, 1987.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 108-117, 2012.

AL-HASSAN, A.A; NORZIAH, H.N. Effect of transglutaminase induced crosslinking on the properties of starch/ gelatin films. **Food Packaging and Shelf Life**, v.13, p.15–19, 2017.

ALIAS, S.A; SARBON, N.M. Rheological, physical, and mechanical properties of chicken skin gelatin films incorporated with potato starch. **Npj Science of Food**, v. 3, p.300-321, 2019.

AMIRDIVANI, S; KHORSHIDIAN, N; FIDELIS, M; GRANATO, D; KOUSHKI, M.R; MOHAMMADI, M; KHOSHTINAT, K; MORTAZAVIAN, A.M. Effects of transglutaminase on health properties of food products. **Current Opinion in Food Science**, v.22, p. 74–80, 2018.

ANVISA. **RDC N° 263**. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos: 2005.

APHA **Standard methods for the examination of water and waste water**, American Public Health Association, Washington, DC,2017.

ASHTER, A.S. Introduction to Bioplastics Engineering. **Plastics Design Library**, p.1-17, 2016.

ASTM. **D1687**: Standard Test Methods for Chromium in Water: 2017.

_____ **D2617**: Standard Test Method for Total Ash in Leather: 2015.

_____ **D2807**: Standard Test Method for Chromic Oxide in Leather n Leather (Perchloric Acid Oxidation): 2009.

_____ **D2810**: Standard Test Method for pH of Leather: 2015.

_____ **D3790**: Standard Test Method for Volatile Matter (Moisture) of Leather by Oven Drying: 2017.

_____ **D3913**: Standard Test Method for Acidity in Basic Chromium Tanning Liquors: 2015.

_____ **D7444**: Standard Practice for Heat and Humidity Aging of Oxidatively Degradable Plastics: 2018.

_____ **D882**: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International: 2002.

_____ **E2180**: Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials: 2018.

_____ **E96/96M-13**: Standart test method for water vapor transmission of materials, 2013.

_____ **E9600**: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, ASTM International: 2000.

BALTI, R; MANSOUR, M.B; SAYARI, N; YACOUBI, L; RABAOUI, L; BRODU, N; MASSÉ, A. Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with *Spirulina* extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p.1464-1472, 2017.

BALDEVRAJ, R.S. MATCHE; JAGADISH, R.S. Incorporation of chemical antimicrobial agents into polymeric films for food packaging. **Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging**, p.368-420, 2011.

BARCZA, M.V.L. **Hidrólise**. Escola de Engenharia de Lorena, EEL. USP. Disponível em: < <http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf> >. Acesso em 10 out. 2018.

BATALLER, B.G.; CAPAREDA, S.C. A rapid and non-destructive method for quantifying biojammolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transforms infrared–Attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal research**, v. 32, p. 341-352, 2018.

BATTISTI, R; FRONZA, N; JÚNIOR, Á.V; DA SILVEIRA, S.M; DAMAS, M.S.P; QUADRI, M.G.N. Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v.11, p.115-124, 2017.

BENJAKUL, S; KITTIPHATTANABAWON, P. Gelatin. Reference Module in Food, p.7, 2018.

BIDUSKI, B. **Modificação ácida e oxidação de amido de sorgo e sua aplicação em filmes biodegradáveis**. Mestrado. Universidade de Pelotas: Pelotas, 2015.

BILCK, A.P; GROSSMANN, M.V.E; YAMASHITA.F. Biodegradable mulch films for strawberry production. **Polymer Testing**, v. 29, p. 471-476, 2010.

BRANDALISE, B.E. **Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis de gelatina recuperada de resíduos de couro curtido ao cromo III com tratamento enzimático**. Mestrado. Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul, 2017.

CABEZA, L.F; TAYLOR, M.M.; DIMAIO, G.I.; BROWN, E.M.; MARMER, W.N.; 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.

CANTERA, C.; MARTEGANI, J.; ESTERELLES, G.; VERGARA, J. Collagen hydrolysate: 'soluble skin' applied in post-tanning processes part 2: interaction with acrylic retanning agents. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 86, p. 195 - 202, 2002.

CARDOSO, T; ESMERINO, L.A; BOLANHO, B.C; DEMIATE, I.M; DANESI, E.D. G. Technological viability of biobased films formulated with cassava by-product and *Spirulina platensis*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 5, p.278-284, 2019.

CARISSIMI, M; FLÔRES, H.S; RECH, R. Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. **Algal Research**, v. 32, p.201–209, 2018.

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

CHANDRA, R; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in polymer science**, v. 23, p.1273–1335, 1998.

CHENG, S; WANG, W; LI, Y; GAO, G; ZHANG, K; ZHOU, J; WU, Z. Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. **Food Chemistry**, v. 271, p.527-535, 2019.

CICB – Centro das indústrias de curtume do Brasil. Exportando valor agregado: Dados. Disponível em: < <http://www.cicb.org.br/cicb/dados-do-setor>>. Acesso em 02 out, 2018.

CORREIA, R.T; MCCUE, P; MAGALHÃES, M.M; MACÊDO, G.R; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was

temixed with soy flour using *Rhizopus Oligosporus*. Process. **Biochemistry**, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, 1999, v.12.4, p.564-582.

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

DANG, X; SHAN, Z; CHEN, H. Biodegradable films based on gelatin extracted from chrome leather scrap. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p.1023-1029, 2018.

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, p. 93 - 100, 2014.

DILKES-HOFFMAN, L.S; PRATT, S; LANT, P.A; LAYCOCK, B. The role of biodegradable plastic in solving plastic solid waste accumulation. **Plastics to Energy**. William Andrew Publishing, 2019.

DOTTO, G. L; VIEIRA, M.L.G; ESQUERDO, V.M.; PINTO, L.A.A. Equilibrium and thermodynamics of azo dyes biosorption onto *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 13-21, 2013.

ELANGO, J; BU, Y; BIN, B; GEEVARETNAM, J; ROBINSON, J.S; WU, W. Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films. **Food Bioscience**, v. 17, p. 42-51, 2017.

EL-SHEEKH, M. M., DABOOR, S. M., SWELIM, M. A., MOHAMED, S. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, p.112, 2014.

FABRA, M. J; MARTÍNEZ-SANZ, M; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G; GAVARA, R; LÓPEZ-RUBIO, A. Structural and physicochemical characterization of thermoplastic corn starch films containing microalgae. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p.184-191, 2018.

FÆRGEMAND, M; MURRAY, B; DICKINSON, E; QVIST, K.B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3-6, p. 343-346, 1999.

FAKHOURI, F.M; MARTELLI, S.M; BERTAN, L.C; YAMASHITA, F; MEI, L; HELENA, 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, p.149-154, 2012.

FAKHOURI, M.F. *et al.* The effect of fatty acids on the physicochemical properties of edible films composed of gelatin and gluten proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v.87, p.293-300, 2018.

FECHINE, G.J.M. **Polímeros biodegradáveis: tipos, mecanismos, normas e Mercado mundial**. São Paulo,SP: Mackensie, 2013.

FENEMA, R.O. **Química de los alimentos**. Acribia: Zaragoza, 2000.

FERNANDEZ-BATS, I. Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 106-115, 2018.

FERREIRA, M. J.; ALMEIDA, M. F.; PINHO, S. C.; SANTOS, I. C. Finished leather waste chromium acid extraction and anaerobic biodegradation of the products. **Waste Manag**, v. 30, p. 1091-100, 2010.

FLEMING, HC. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer degradation and stability**, v. 59, p. 309-315, 1998.

FLÔRES, S.H.; RIOS, A.O; IAHNKE, A.O.; CAMPO, C; VARGAS, CG.; SANTOS, C.D.; CAETANO, K.S.; STOLL, L; CRIZEL, T.M. Films for food from ingredient waste. **Reference Module in Food Science**, p. 1-40, 2017.

FORTES NETO, P. **Avaliação do bioplástico como cobertura do solo para o cultivo agrícola**. São Paulo, Universidade de Taubaté, p.81, 2016.

GARAVAND, F; ROUHI, M; RAZAVI, S.H., CACCIOTTI, I; MOHAMMADI, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.104, p. 687-707, 2017.

GASPAR, C.L.A; GÓES-FAVONI, P.S. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food Chemistry**, v.171, p. 315-322, 2015.

GIRI, J; ADHIKARI, R. Biodegradable Copolyester-Based Natural Fibers–Polymer Composites: morphological, mechanical, and degradation behavior.: Morphological, Mechanical, and Degradation Behavior. **Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials**, [s.l.], p. 289-319, 2020. Springer Singapore.

GÓMEZ-GUILLÉN, C.M; GIMÉNEZ, B; LÓPEZ-CABALLERO, E.M; MONTERO, P.M. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. Doutorado. CIRAD-CEEMAT: 1991.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, p. 39-50, 1994.

HANANI, N.Z; ROSS, H.Y; KERRY, P.J. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 94-102, 2014.

HIJAZIN, H.A.C; SIMÕES, T.A; SILVEIRA, R.D. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude**, v.7, p.90-93, 2010.

HIRAKAWA, H; KAMIYA, N; TANAKA, T; NAGAMUNE, T. Intramolecular electron transfer in a cytochrome cam system with a site-specific branched structure. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 20, p. 453-459, 2007.

HOSSEINNEJAD, M; JAFARI, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 467-475, 2016.

HUNTRAKUL, K; HARNKARNSUJARIT, N. Effects of plasticizers on water sorption and aging stability of whey protein/carboxy methyl cellulose films. **Journal of Food Engineering**, v. 272, p.109809-109815, 2020.

ISO. **18787**: Foodstuffs — Determination of water activity: 2017.

ISO. **9665**: Adhesives Animal glues - Methods of sampling and testing: 1998.

JIANG, Z; WANG, C; LI, T; SUN, D; GAO, H; GAO, Z; MU, Z. Effect of ultrasound on the structure and functional properties of transglutaminase-crosslinked whey protein isolate exposed to prior heat treatment. **International Dairy Journal**, v. 88, p. 79-88, 2019.

JRIDI, M; ABDELHEDI, O; SALEM, A; KECHAOU, H; NASRI, M; MENCHARI, Y. Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of fish gelatin-based edible films enriched with orange peel pectin: Wrapping application. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p.105688-105694, jun. 2020.

JAMRÓZ, E; KOPEL, P; JUSZCZAK, L; KAWECKA, A; BYTESNIKOVA, Z; MILOSAVLJEVIĆ, V; ADAM, V. Development and characterisation of furcellaran-gelatin films containing SeNPs and AgNPs that have antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v.83, p.9-16, 2018.

KAEWPRACHU, P; OSAKO, K; TONGDEESOONTORN, W; RAWDKUEN, S. The effects of microbial transglutaminase on the properties of fish myofibrillar protein film. **Food packaging and shelf life**, v.12, p.91-99, 2017.

KG, M. G; SARADA, R; RAVISHANKAR, G. A. Supercritical CO₂ extraction of functional compounds from Spirulina and their biological activity. **Journal of Food Science and Technology**, p.320-325, 2014.

KATIYAR, R; GURJAR, B.; BISWAS, S; PRUTHI, V; KUMAR, N; KUMAR, P. Microalgae: an emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues: An emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 1083-1093, 2017.

- KOWALCZYK, D; WIATER, K.M; NOWAK, J; BARANIAK, B. Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p.350–359, 2015.
- KUMAR, P.A; SINGH, P.R. Biocomposites of cellulose-reinforced starch: Improvement of properties by photo-induced crosslinking. **Bioresource Technology**, v.99, p. 8803–8809, 2008.
- KUNTZLER, G.S; COSTA, V.A.J; DEMORAIS, G.M. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.117, p. 800-806, 2018.
- LIMA, A.U. **Matérias-primas dos alimentos**. Blücher: São Paulo, 2010.
- LIU, F; MAJEED, H; ANTONIOU, J; LI, Y; MA, Y; YOKOYAMA, W; MA, J; ZHONG, F. Tailoring physical properties of transglutaminase-modified gelatin films by varying drying temperature. **Food Hydrocolloids**, v.58, p.20-28, 2016.
- LIZÁRRAGA-LABORÍN, L.L; QUIROZ-CASTILLO, J.M; ENCINAS-ENCINAS, J.C; CASTILLO-ORTEGA, M.M; BURRUEL-IBARRA, S.E; ROMERO-GARCÍA, J; RODRÍGUEZ-FÉLIX, D.E. Accelerated weathering study of extruded polyethylene/poly (lactic acid)/chitosan films. **Polymer Degradation and Stability**, v.155, p.43-51, 2018.
- LLANOS, H.R.J; TADINI, C.C. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on cassava starch or chitosan, reinforced with montmorillonite or bamboo nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p.371-382, 2018.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., LEWIS-FARR, A., RANDALL, Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p. 265-275, 1951.
- MAEGAWA, S; HASEBE, T; YAMATO, Y; BITO, K; NAGASHIMA, S; HAYASHI, T; SUZUKI, T. Time course analysis of antithrombogenic properties of fluorinated diamond-like carbon coating determined via accelerated aging tests: Quality control for medical device commercialization. **Diamond and Related Materials**, v.70, p.33–38. 2016.
- MAHMOOD, K; KAMILAH, H; SHANG, P.L; SULAIMAN, S; ARIFFIN, F; ALIAS, A.K. A review: Interaction of starch/non-starch hydrocolloid blending and the recent food applications. **Food Bioscience**, v. 19, p.110-120, 2017.
- MANTLEY, A.F. Starch: Sources and Processing. Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food and Health, p.160-164, 2016.
- MAPOUNG, S; ARJSRI, P; THIPPRAPHAN, P; SEMMARATH, W; YODKEEREE, S; CHIEWCHANVIT, S; LIMTRAKUL, P. Photochemoprotective effects of *Spirulina platensis* extract against UVB irradiated human skin fibroblasts. **South African Journal of Botany**, v. 130, p.198-207, 2020.

- MARTINS, S.A.; BORGES, L.A.; D'ALMEIDA, J.R.M. Efeitos do envelhecimento acelerado em compósito polimérico à base de PTFE. In: **10º CBPol - Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2009.
- MARTUCCI, F.J; RUSECKAITE, A.R. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. *Journal of Food Engineering*, v.99, p. 377-383, 2010.
- MARCEAUX, S; MARTIN, C; MARGAILLAN, A; BRESSY, C. Effects of accelerated ageing conditions on the mechanism of chemically-active antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v.125, p.257–265, 2018.
- MASILAMANI, D; MADHAN, B; SHANMUGAM, G; PALANIVEL, S; NARAYAN, B. Extração de colágeno a partir de resíduos de corte de curtume cru: uma abordagem de desperdício para riqueza. **Journal of Cleaner Production**, v. 113, p. 338-344, 2016.
- METZ, L.M.G. **Avaliação ambiental dos resíduos sólidos oriundos da produção de couro no Rio Grande do Sul**. Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, UNISINOS: São Leopoldo, 2016.
- MIR, S.A; DAR, B.N.; WANI, A.A; SHAH, M.A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 141-154, 2018.
- 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.
- MULITERNO, A; MOSELE, P.C; COSTA, J.A.V; HEMKEMEIER, M; BERTOLIN, T.E; COLLA, L.M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e agrotecnologia**. v.29, p. 1132-1138, 2005.
- MURALIDHARAN, V; AROKIANATHAN, M.S; BALARAMAN, M; PALANIVEL, S. Tannery trimming waste based biodegradable bioplastic: Facile synthesis and characterization of properties. **Polymer Testing**, v. 81, p.106250-106260, 2020.
- NISTICO, R; EVON, P; LABONNE, L; VACA-MEDINA, G; MONTONERI, E; VACA-GARCIA, C; NEGRE, M. Post-harvest tomato plants and urban food wastes for manufacturing plastic films. **Journal of cleaner production**, v. 167, p. 68-74, 2017.
- OCAK, B.; ASLAN, A.; GÜRBÜZ, G. Utilization of chromium-tanned leather solid wastes in microencapsulation. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 106, p. 232-238, 2010.
- OZDEMIR, G; ULKU KARABAY, N; DALAY, M.C; PAZARBASI, B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v.18, p.754-757, 2004.

PAGNUSSATT, A.F; DEL PONTE, M.E; GARDA-BUFFON, J; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.108, p.21–26, 2014.

PAGNUSSATT, F.A; DE LIMA, V.R; DORA, C.L; COSTA, J.A.V; PUTAUX, J.L; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. *LEB-18* on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, V. 2011, p. 616-623, 2016.

PEÑA-RODRIGUEZ, C; MARTUCCI, J.F; NEIRA, L.M; ARBELAIZ, A; ECEIZA, A; A RUSECKAITE, R. Functional properties and in vitro antioxidant and antibacterial effectiveness of pigskin gelatin films incorporated with hydrolysable chestnut tannin. **Food Science and Technology International**, v. 21, p.221-231, 2014.

PIACENTINI, M; COLIZZI, V. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. **Immunology Today**, v. 20, p.130-134, 1999.

PLASTICS EUROPE. **An analysis of European plastics production, demand and waste data**. Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf>. Acesso em: 26 de agosto de 2018.

PLASTICS EUROPE. **Plastics in agricultural applications**. Disponível em: <<https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/agriculture>>. Acesso em 26 de agosto de 2018.

PLASTIC OCEANS. The facts. Disponível em: < <https://plasticoceans.org/the-facts/>>. Acesso em 17 fev. 2020.

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**. Mestrado. Universidade de Santa Catarina: Santa Catarina, 2007.

PORTA, R; DI PIERRO, P; ROSSI-MARQUEZ, G; MARINIELLO, L; KADIVAR, M.; ARABESTANI, A. Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. **Food hydrocolloids**, v.50, p.102-107, 2015

REZAEI, H. Biosorption of chromium by using *Spirulina* sp. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 846-853, 2016.

RIBEIRO, R.C.K. **Hidrólise de resíduos de couro curtido ao cromo**. Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2003.

ROSTAMZAD, H; PAIGHAMBARI, S. Y; SHABANPOUR, B; OJAGH, S. M; MOUSAVI, S. M. Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, p. 1-7, 2016.

ROSSETO, M *et al.* Starch–gelatin film as an alternative to the use of plastics in agriculture: a review. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 15, p.6671-6679. 2019.

ROSSETO, M *et al.* Biodegradable Polymers: Opportunities and Challenges. In: **Bio-based Polymers**. IntechOpen, 2019.

MARQUEZ, G.R; DI PIERRO, P; MARINIELLO, L; ESPOSITO, M; GIOSAFATTO, C.V; PORTA, R. Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 124-130, 2017.

ROY, P.K; SUREKHA, P; RAJAGOPAL, C; CHATTERJEE, S.N; CHOUDHARY, V. Accelerated aging of LDPE films containing cobalt complexes as prooxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 1791-1799, 2006.

SABBAH, M; GIOSAFATTO, C. V.L.; ESPOSITO, M; PIERRO, P; MARINIELLO, L; PORTA, R. Transglutaminase Cross-Linked Edible Films and Coatings for Food Applications. **Enzymes in Food Biotechnology**, p.369-388, 2019.

SABIHA-HANIM, S.; SITI-NORSAFURAH, A. M. Physical properties of hemicellulose films from sugarcane bagasse. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1390-1395, 2012.

SAID, N.S; SARBON, N.M. Response surface methodology (RSM) of chicken skin gelatin based composite films with rice starch and curcumin incorporation. **Polymer Testing**, v. 81, p.106161-106170, 2020.

SCARINGELLI, A, M; GIANNOCCARO, G; PROSPERI, M; LOPOLITO, M. Adoption of biodegradable mulching films in agriculture: is there a negative prejudice towards materials derived from organic wastes? **Italian Journal of Agronomy**, v. 11:716, p. 96-99, 2016.

SCAGLIONI, T.P; GARCIA, O.S; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of in vitro trichothecenes production by microalgae phenolic extracts. **Food Research International**, p.6, 2018.

SCOPEL, B.S; RIBEIRO, M.E; DETTMER, A; BALDASSO, C. Cornstarch-Gelatin Films: commercial gelatin versus chromed leather waste gelatin and evaluation of drying conditions.: Commercial Gelatin Versus Chromed Leather Waste Gelatin and Evaluation of Drying Conditions. **Journal of Polymers and The Environment**, v. 26, , p. 1998-2006, 2017.

SCOPEL, B.S; RESTELATTO, D; BALDASSO, C; DETTMER, A; SANTANA, R.M.C. Steam Explosion in alkaline medium for gelatine extraction from chromium-tanned leather wastes: time reduction and process optimization: time reduction and process optimization. **Environmental Technology**, p. 1-10, 2018.

SIFUENTES-NIEVES, I; RENDÓN-VILLALOBOS, R; JIMÉNEZ-APARICIO, A; CAMACHO-DÍAZ, B.H; GUTIÉRREZ LÓPEZ, G.F; SOLORZA-FERIA, J. Physical, Physicochemical, Mechanical, and Structural Characterization of Films Based on Gelatin/Glycerol and Carbon Nanotubes. **International Journal of Polymer Science**, p.8, 2015.

SHI, BO; LIANG, L; YANG, H; ZHANG, L; HE, F. Glycerol-plasticized spirulina-poly (vinyl alcohol) films with improved mechanical performance. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, p. 8-12, 2017.

- SHI, D; LIU, F; YU, Z; CHANG, B; GOFF, H. D; ZHONG, F. Effect of aging treatment on the physicochemical properties of collagen films. **Food Hydrocolloids**, v.87, p.436-447, 2019.
- SHARMA, N; CHANG, L.P; CHU, Y.L; ISMAIL, H; ISHIAKU, U.S; ISHAK, Z.M. A study on the effect of pro-oxidant on the thermo-oxidative degradation behaviour of sago starch filled polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 71, p.381-393, 2001.
- SHARMA, R; JAFARI, S.M; SHARMA, S. Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging. **Food Control**, v. 112, p.107086-107094, 2020.
- SHAHRAMPOUR, D; KHOMEIRI, M; RAZAVI, SMA; KASHIRI, M. Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. **LWT - Food Science and Technology**, v.118, p.108758, 2020.
- SORDE, K.L; ANANTHANARAYAN, L. Effect of transglutaminase treatment on properties of coconut protein-guar gum composite film. **LWT - Food Science and Technology**, v.115, p.108422, 2019.
- SOUZA, P.M.S; MORALES, A.R; SANCHEZ, E.M.S; MEI, L.H.I. Study of PBAT Photostabilization with Ultraviolet Absorber in Combination with Hindered Amine Light Stabilizer and Vitamin E, Aiming Mulching Film Application. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p.3422-3436, 2018.
- SOUZA, M.M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande: Rio Grande, 2012.
- SOUZA, M.M; PRIETTO, L; RIBEIRO, C.A; SOUZA, D.T; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1050-1058, 2011.
- SUDERMAN, N; ISA, N.I.N; SARBON, M.N. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. *Food Bioscience*, v.24, p. 111-119, 2018.
- SUN, T; LI, G; NING, T.Y; ZHANG, Z.M; MI, Q.H; LAL, R. Suitability of mulching with biodegradable film to moderate soil temperature and moisture and to increase photosynthesis and yield in peanut. **Agricultural water management**, v. 208, p. 214-223, 2018.
- SYAHIDA, S.N; ISMAIL-FITRY, M.R; AINUN, Z.M.A; HANANI, Z.A.N. Effects of palm wax on the physical, mechanical and water barrier properties of fish gelatin films for food packaging application. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p.100437-100444, mar. 2020.
- TANG, C; JIANG, Y; WEN, O; YANG, X. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 296-307, 2005.

TARANTILI, P.A; KIOSE, V. Effect of accelerated aging on the structure and properties of monolayer and multilayer packaging films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.109, p.674-682, 2008.

TILLET, G; BOUTEVIN, B; AMEDURI, B. Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p.191-217, 2011.

VERA, A; TAPIA, C; ABUGOCH, Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p.536-543, 2020.

WANG, H; WEI, D; ZHENG, A; XIAO, H. Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 116, p.14-22, 2015.

WANG, W; WANG, K; XIAO, J; LIU, Y; ZHAO, Y; LIU, A. Performance of high amylose starch-composited gelatin films influenced by gelatinization and concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p.258-265, 2017.

WANG, S; LYDON, K; WHITE, E.M; LIPP, E; LOCKLIN, J; LIPP, E.K. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate- co -3- hydroxyhexanoate) plastic under anaerobic sludge and aerobic seawater conditions: gas evolution and microbial diversity. **Environmental Science & Technology**, p.5700–5709, 2018.

WANGTUEAI, S; NOOMHORM, A; REGENSTEIN, J.M. Effect of microbial transglutaminase on gel properties and film characteristics of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. **Journal of Food Science**, v.75(9), p.C731-C739, 2010.

WINTON, D.J; ANDERSON, L.G; ROCLIFFE, S; LOISELLE, S. Macroplastic pollution in freshwater environments: focusing public and policy action.: Focusing public and policy action. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135242, 2020.

WU, X; LIU, Y; LIU, A; WANG, W. Improved thermal-stability and mechanical properties of type I collagen by crosslinking with casein, keratin and soy protein isolate using transglutaminase. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 292-301, 2017.

WU, X; LIU, A; WANG, W; YE, R. Improved mechanical properties and thermal-stability of collagen fiber-based film by crosslinking with casein, keratin or SPI: Effect of crosslinking process and concentrations of proteins. **International journal of biological macromolecules**, v.109, p.1319-1328, 2018.

XIANG, C; OKONKWO, C.A; XIONG, Q; WANG, L; JIA, L. A novel TiO₂ film photoanode decorated with *Spirulina*-derived residual groups for enhanced photocurrent in dye-sensitized solar cells. **Solar Energy**, v. 134, p.461-467, 2016.

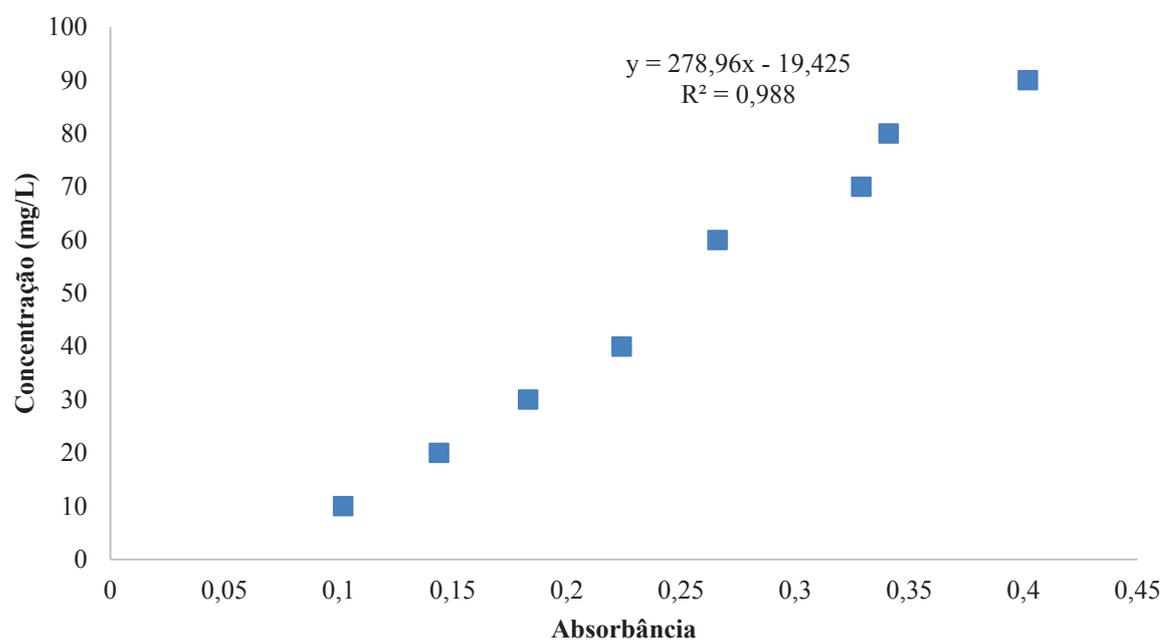
ZHANG, B; WANG, F; ZHOU, H; GAO, D; YUAN, Z; WU, C; ZHANG, X. Polymer dots Compartmentalized in Liposomes as a Photocatalyst for in Situ Hydrogen Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, p. 2744-2748, 2019.

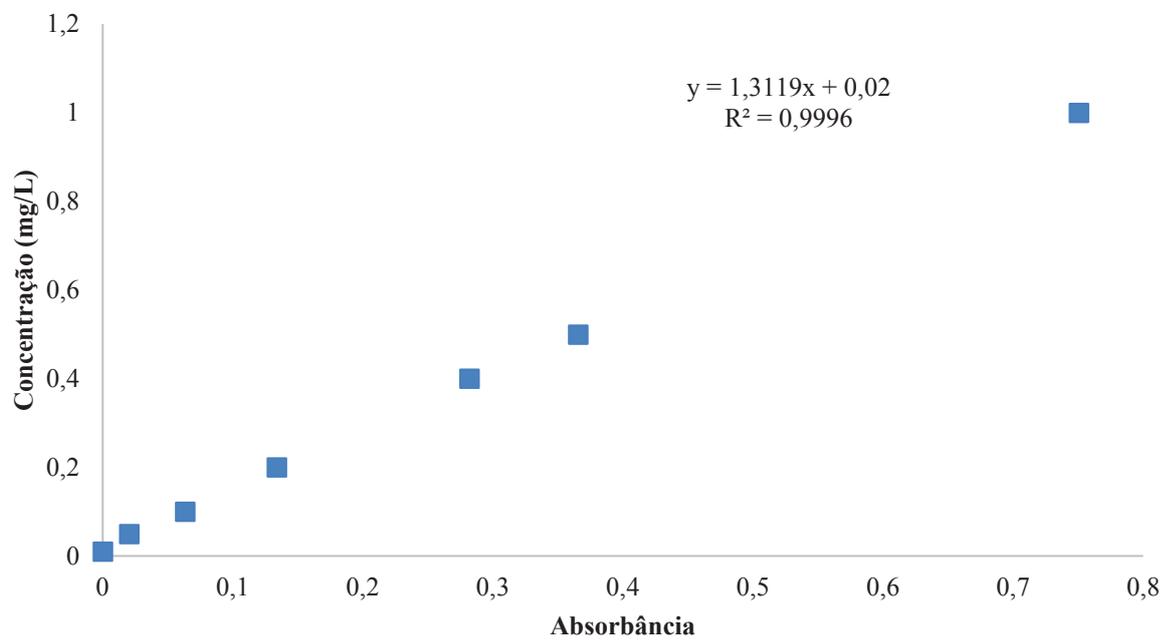
APÊNDICE A – Caracterização do amido de milho

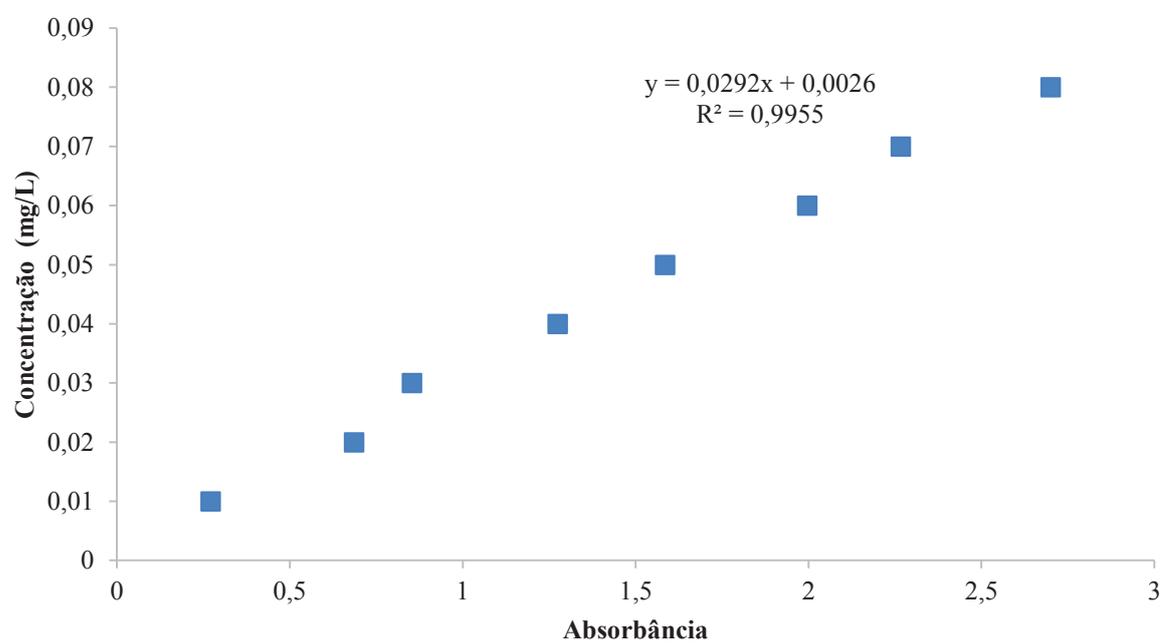
Parâmetro	Resultado	Metodologia
Amilose (%)	21,084±0,1	Martínez & Cuevas (1989)
Amilopectina (%)	78,910±0,1	Martínez & Cuevas (1989)
Umidade (%)	12,968±0,1	ASTM D3790 (2017)
Cinzas (%)	0,1331±0,2	ASTM D2617 (2015)

*Análises de amilose e amilopectina realizadas de acordo com Apêndice G

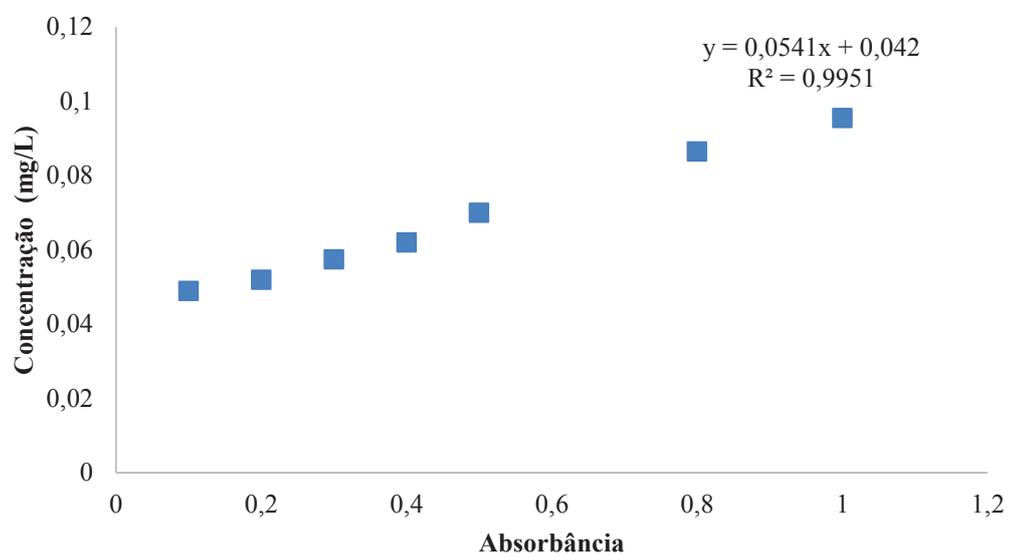
APÊNDICE B – Curva de proteína – Método Lowry



APÊNDICE C – Curva de difenil para análise de cromo

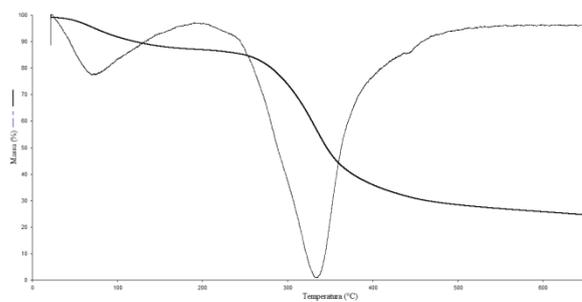
APÊNDICE D – Curva ácido gálico para análise de fenóis

APÊNDICE E – Curva de amilose e amilopectina

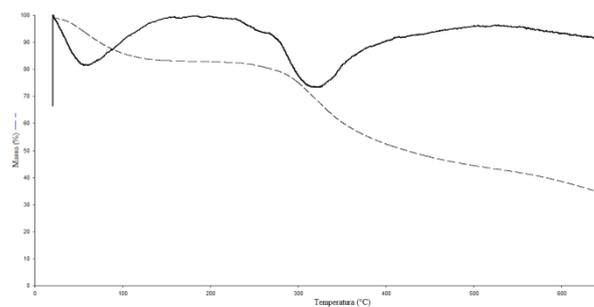


APÊNDICE F – Análise de termogravimetria dos materiais utilizados

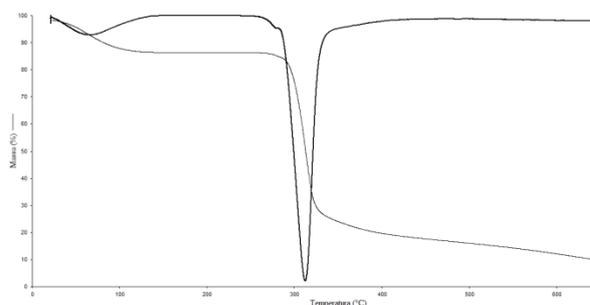
Gelatina



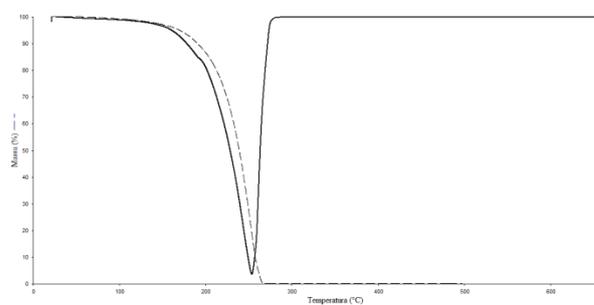
Gelatina RCCC



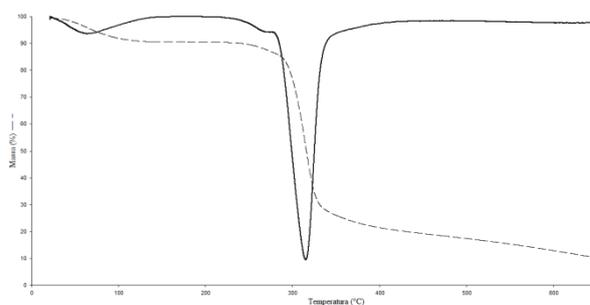
Amido



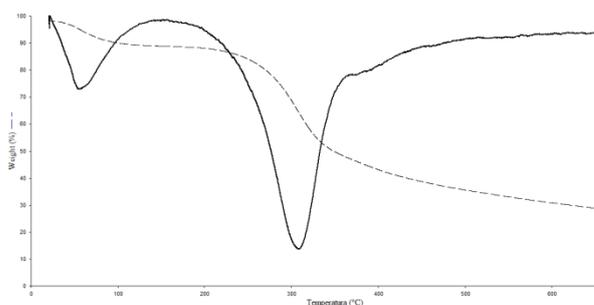
Glicerol



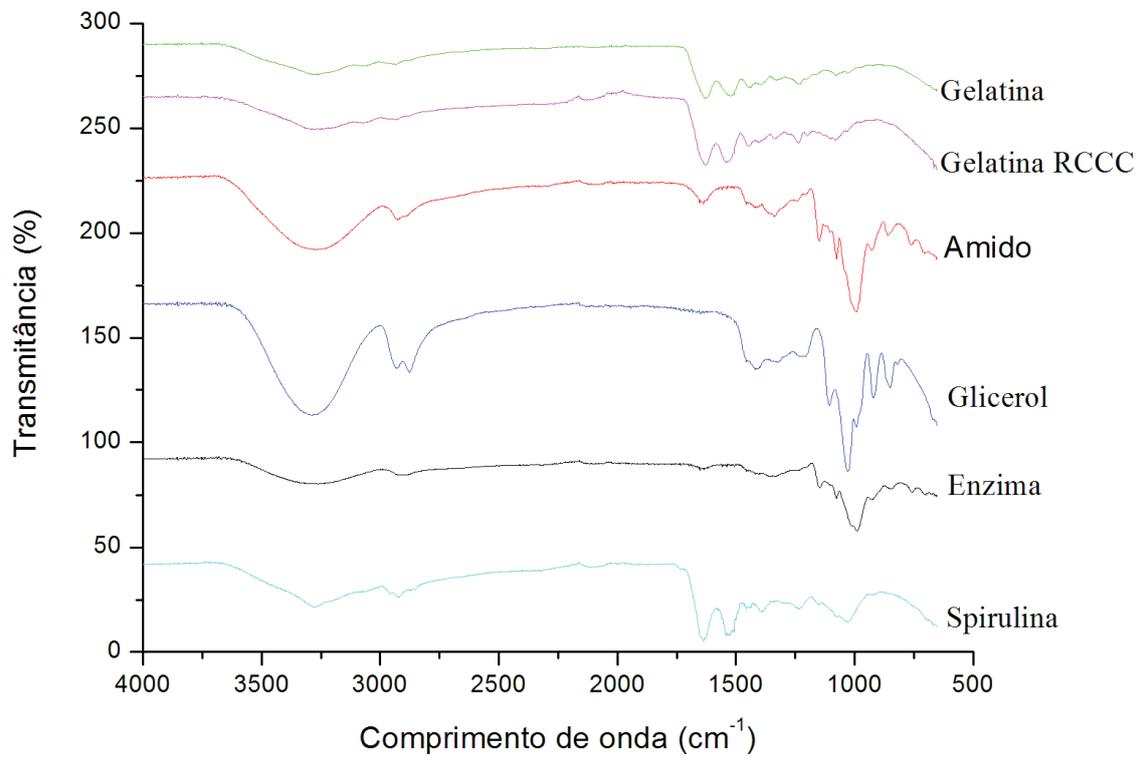
Enzima



Spirulina



APÊNDICE G – FTIR dos materiais utilizados



**APÊNDICE H – Dados diários de temperatura da estufa adaptada para
degradação dos filmes em solo**

Dia	Temperatura Mínima	Temperatura Máxima	Umidade
1	18	24	45
2	18	23	51
3	18	24	58
4	19	24	59
5	15	24	58
6	15	25	51
7	16	26	42
8	18	26	45
9	19	26	60
10	17	27	60
11	19	28	70
12	20	28	51
13	20	28	45
14	21	28	45
15	22	27	60
16	23	28	72
17	20	27	72
18	19	28	81
19	18	27	89
20	18	27	89
21	17	27	89
22	18	27	66
23	19	28	55
24	19	28	60
25	19	28	60
26	20	27	75
27	21	27	78
28	21	25	74
29	21	25	80
30	20	26	75
31	19	27	74
32	20	27	75
33	20	27	70
34	20	27	70
35	20	28	69
36	21	28	68
37	22	27	81
38	19	28	81
39	20	27	82

40	21	28	60
41	20	27	60
42	21	27	80
43	22	27	70
44	25	27	70
45	18	28	85
46	17	28	60
47	15	27	60
48	19	27	60
49	19	27	55
50	19	27	80
51	18	28	74
52	18	28	74
53	18	27	70
54	20	27	66
55	20	26	66
56	20	26	64
57	18	26	65
58	18	25	81
59	18	25	86
60	19	25	68

APÊNDICE I – Caracterização de gelatina retida e permeado

Caracterização	Ultrafiltração	Permeado Ultrafiltração	Diafiltração	Permeado Diafiltração
Umidade (%)	96,76	98,75	96,47	99,03
Cinzas (%)	10,2	48,8	6,05	39,26
Proteína (mg/L)	24019	4536	27903	4004
pH	7,99	8,06	7,65	7,92
Condutividade (mS/cm ²)	7,28	5,16	4,22	4,52
Cromo (mg/L)	0,45	0,13	0,43	0,08
Sódio (mg/L)	198	193	147	167
Magnésio (mg/L)	140	180	110	115
Cálcio (mg/L)	4	5	3	4

*Média de triplicatas

APÊNDICE J – Artigo final para publicação

Envelhecimento acelerado em filmes de amido e gelatina com tratamento enzimático

Marieli Rosseto^{a*}; César Vinicius Toniciolli Riguetto^a Daniela Dal Castel Kreina;
Lillian Ávila Massuda^b; Luciane Maria Colla^a, Aline Dettmer^{a b*}

^aFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP: 99052-900.

^b Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP: 99052-900.

*alinedettmer@upf.br

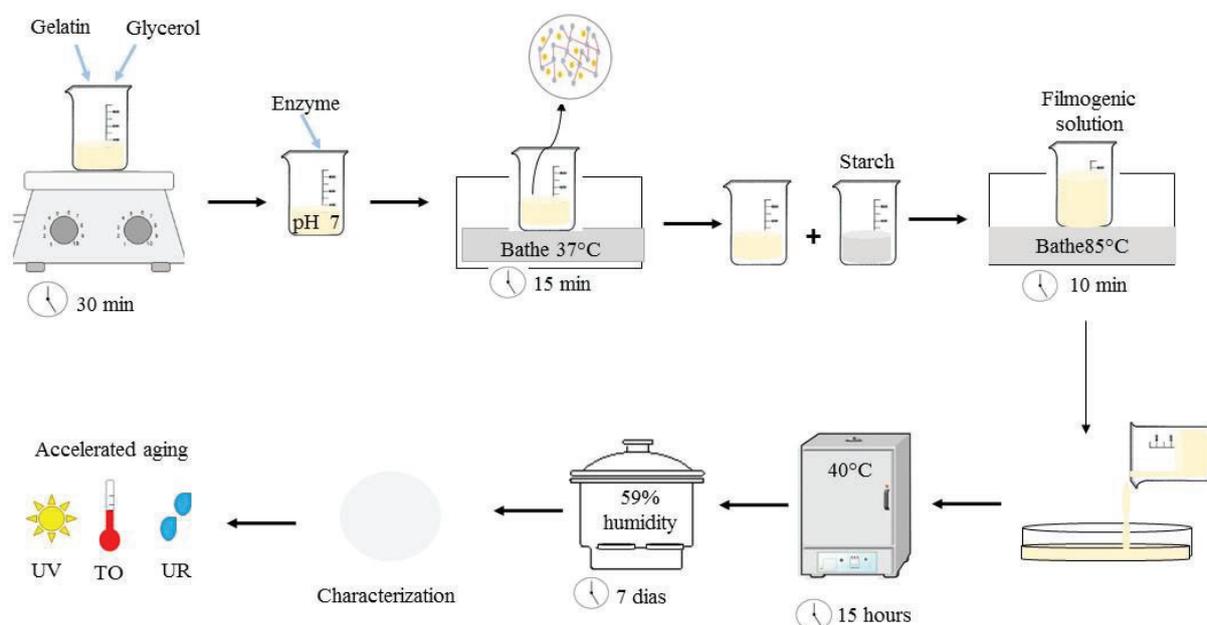
Abstract

Este estudo objetivou sintetizar e caracterizar filmes de amido de milho e gelatina com tratamento enzimático, bem como avaliar o efeito da enzima transglutaminase (TGase) no comportamento de degradação do filme. A caracterização dos filmes avaliou solubilidade em água, permeabilidade a vapor de água, propriedades mecânicas, espessura, termogravimetria (TG) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Posteriormente, os filmes foram expostos a três diferentes envelhecimentos acelerados: termo-oxidação (TO) (70°C), radiação ultravioleta (UV) (lâmpadas solares de 40 w, a 30±1°C) e umidade (UR) (75% de UR em 30°C), durante 24 horas. A degradação foi monitorada mensurando as alterações nas propriedades de resistência à tração, alongamento na ruptura, TG e FTIR. Com a adição da enzima, verificou-se melhorias nas propriedades dos filmes, tornando-os mais resistentes e menos solúveis. E quando submetidos ao envelhecimento, os filmes perderam resistência, chegando a cerca de 5% na UR para ambas as composições, enquanto a UV e a TO apresentaram queda maior nos filmes com enzima, 60% e 100% respectivamente. Isso ocorre devido à distribuição das interações intermoleculares e intramoleculares na matriz polimérica, onde a TGase criou ligações cruzadas que podem ter ocasionado perda de resistência ao longo da exposição. Para a elongação, o filme sem enzima apresentou valores maiores frente aos com enzima. Em relação à TG e FTIR não foi possível observar modificações para as exposições a UR e UV, contudo na TO houve algumas modificações nos picos envolvendo ligações de carbono, e observou-se que ao término do experimento os filmes apresentaram perda de massa em torno de 80%. Diante do exposto, conclui-se que a enzima TGase oferece melhorias nas propriedades dos filmes, indicando um aumento em sua vida útil ao torná-los menos solúveis. Porém, a aplicação de filmes deve ser monitorada, devido à sensibilidade dos filmes a UV e TO.

Destaques

- A enzima melhorou significativamente as propriedades do filme;
- Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água diminuíram, propriedades mecânicas e de permeabilidade aumentaram.
- Filmes foram mais suscetíveis as ações da temperatura (70°C, 24h)

Resumo Gráfico



Keywords: Reticulation, Properties, Life cycle, Applicability.

1 INTRODUCTION

Preocupações ambientais em relação aos problemas causados por materiais de embalagens plásticas não biodegradáveis estão em ascensão e com isso surge a necessidade de buscar abordagens alternativas (SORDE & ANANTHANARAYAN, 2019). O desenvolvimento de filmes biodegradáveis, oriundos de fontes renováveis, são vistos como uma solução atraente para substituir materiais que geram acúmulo de resíduos e causam impactos ambientais, principalmente, no solo e na água (DILKES-HOFFMAN et al., 2019). Dentre as fontes promissoras para elaboração desses materiais, o amido e a gelatina se destacam devido a sua capacidade de formação de filmes, serem oriundos de fontes abundantes e biodegradáveis (ROSSETO et al., 2019). Porém, apesar das vantagens mencionadas, os filmes biodegradáveis possuem aplicações limitadas em comparação aos polímeros de origem fóssil, devido às suas

propriedades mecânicas, de permeabilidade, solubilidade e rápida degradação (MASAMBA et al., 2016). Desta forma torna-se necessário o estudo de alternativas que permitam prolongar a vida útil desses polímeros de fontes renováveis, viabilizando sua aplicabilidade de forma a contribuir com a sustentabilidade. A reticulação da gelatina promovida pela enzima TGase surge como uma alternativa eficaz para melhorar as propriedades de filmes de amido e gelatina (JIANG et al., 2019) A TGase catalisa a reticulação entre resíduos de glutamina intra e intercadeias e de peptídeos de lisina e vem sendo utilizada para modificar a estrutura das proteínas (CHENG et al., 2019). Sua capacidade de reticulação está diretamente ligada a reestruturação da matriz polimérica (SABBAH et al., 2019). Estudos apontam que a TGase pode ser usada para modificar as propriedades da maioria dos filmes de proteína, como soja (TANG et al., 2005), ervilhaca amarga (FERNANDEZ-BATS et al., 2018), caseína (FÆRGEMAND et al. 1999), colágeno (ELANGO et al., 2017); (CHENG et al., 2019) gelatina (AL-HASSAN & NORZIAH, 2017); (KAEWPRACHU et al, 2017); (BATTISTI et al., 2017), goma guar (SORDE & ANANTHANARAYAN, 2019), pectina (ROSSI MARQUEZ et al., 2017).

As possibilidades de aplicação dos filmes biodegradáveis depende da compreensão dos mecanismos pelos quais a degradação ocorre (DILKES-HOFFMAN et al., 2019). A simulação da degradação acelerada contribui para que se tenha esta compreensão. Geralmente, estes testes são usados para acelerar a velocidade de envelhecimento de produtos sob condições agravadas adequadas de calor, umidade, luz solar e outros, simulando o ambiente ao qual o produto vai ficar exposto (MAEGAWA et al., 2016). E através dessa simulação pode-se determinar se um sistema é durável o suficiente para satisfazer sua demanda de vida útil em um curto período de tempo, otimizando sua aplicabilidade (MARCEAUX et al., 2018).

Diante disto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da enzima TGase sobre as propriedades dos filmes de amido de milho e gelatina, bem como o comportamento dos filmes frente o envelhecimento acelerado por exposição a radiação ultravioleta (UV), umidade (UR) e termo-oxidação (TO). O monitoramento foi através da análise de perda de resistência e alongação, alterações estruturais (FTIR) e termogravimetria antes e após as exposições.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados para produção dos filmes foram: gelatina comercial em pó como matriz polimérica (Refeisucos), enzima transglutaminase (Ajinomoto do Brasil, Indústria e

Comércio de Alimentos Ltda, SP, comercializada como ACTIVA® WM) como agente reticulante da matriz polimérica, amido de milho como aditivo (Refeisucos), glicerol (Dinâmica) como plastificante. Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 Preparação da solução filmogênica

Para a elaboração dos filmes (solução de 200 ml) utilizou-se a mistura de duas soluções. Para a Solução A, homogeneizou-se 8 gramas de gelatina em 100 mL de água destilada e foi adicionado 20% de glicerol em relação a massa de gelatina, para posterior solubilização a 60 °C por 30 min. Após essa etapa, corrigiu-se o pH para 7, a temperatura é reduzida a 37 °C para a adição da enzima transglutaminase, que permaneceu em ação durante 15 minutos a 37°C. Paralelo a isso diluiu-se 1 g de amido (amilose: 21,084±0,1% e amilopectina: 78,910±0,1%) em 100 mL de água destilada, denominada solução B. Em seguida homogeneizou-se a solução A com a B, e seguiu para banho maria, onde permaneceu a 85 °C durante 10 minutos. Na sequência, a solução foi vertida em placas de Petri e secas em estufa de secagem com circulação de ar (Ethik 420-4TDE) a 40 °C, por 15 horas. Os filmes, já secos foram mantidos em ambiente com solução saturada de brometo de sódio (NaBr), equivalente a 59% de umidade relativa por sete dias, para posterior caracterizações, e na sequência foram submetidos a envelhecimento acelerado.

2.3 Caracterização dos filmes

2.3.1 Aparência

Os filmes foram avaliados através da aparência global, seguindo-se os padrões estabelecidos por Gontard (1991) para selecionar os filmes homogêneos, sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças, e que possibilitem o manuseio.

2.3.2 Espessura

A espessura dos filmes foi avaliada com auxílio de um micrômetro externo digital (Digimess, 110.284 new). Esta análise foi realizada em toda a área do filme (verificando 6 pontos) a fim de evidenciar se a espessura se encontrava uniforme.

2.3.3 Propriedades mecânicas

A resistência à tração e a porcentagem de alongação na ruptura foi determinada utilizando o texturômetro (TA.XT*plus* Texture Analyser), operando de acordo com (ASTM D882, 2002), com separação inicial de garras de 40 mm e velocidade do teste de $0,8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. As amostras foram cortadas em tamanho padronizado, de $85 \times 25 \text{ mm}$.

2.3.4 Solubilidade em água

Para a análise de solubilidade, utilizou-se metodologia sugerida por (CUQ et al., 1997), onde amostras de $2 \times 2 \text{ cm}$ foram cortadas e secas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h para determinar a massa seca inicial. Após a pesagem, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação por 24 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, as amostras foram secas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h para determinação da massa seca final.

2.3.5 Permeabilidade ao vapor de água

Para análise de permeabilidade ao vapor de água as amostras foram colocadas sobre cápsulas de alumínio contendo 20 g de sílica gel e área de 5 cm, de modo que a transferência de massa fosse somente através do filme. As cápsulas de alumínio foram colocadas em dessecador com umidade relativa controlada de 75% através de solução de cloreto de sódio. A quantidade de vapor de água que migra através do filme foi determinada indiretamente pelo ganho de massa da sílica gel, pesando a cápsula de alumínio a cada hora, durante 10 h. A taxa de transmissão de vapor (TVA) foi determinada através de regressão linear, utilizando como dados o tempo e as pesagens que ocorreram no período especificado (ASTM E96/96M, 2013).

2.3.5 FTIR

Os ensaios de FTIR foram realizados no Parque Tecnológico da Universidade de Passo Fundo (UPF Parque), em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Modelo Cary 630, Argilent Technologies, EUA). O equipamento foi operado no modo de reflexão total atenuada (ATR) utilizando cristal de diamante, onde foram realizadas 48 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} na faixa de comprimento de onda de $4000 \text{ a } 6500 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.6 Termogravimetria (TG) e Derivada (DTG)

A termogravimetria dos filmes foi realizada em instrumento de análise térmica simultânea (Modelo STA 6000, PerkinElmer, EUA) disponível no UPF Parque. Alíquotas de 10 mg de amostra, mantidas por 5 dias em dessecador antes da análise, foram moídas e submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 min^{-1} em atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) de 20 a $700 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.7 Envelhecimento acelerado

Nesta etapa os filmes foram avaliados quanto à degradação em: luz ultravioleta (UV), umidade (UR) e termo-oxidação (TO) durante 24 horas, para posteriores análises de FTIR, TG e propriedades mecânicas, visando identificar as alterações que ocorreram no filme durante esse período.

O teste TO é realizado de acordo com (Sharma et al., 2001), onde os filmes foram dispostos em estufa (De Leo) a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Já o ensaio de degradação por UR foi realizado em Câmara climática (Tecnal – Modelo TE 4001) de acordo com (ASTM D7444-18, 2018), onde a temperatura de exposição foi única (30°C), assim como a UR (75%). E para o envelhecimento UV, seguiu-se metodologia proposta por (Roy et al., 2006) utilizando lâmpadas solares de 40 W (Philips make) em câmara de fotoestabilidade (Ethiktechnology) com controle de temperatura, que se manteve a $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o experimento.

2.3.8 Análise estatística

Os dados referentes a caracterização foram avaliados através do software Statística 7.0, com 95% de confiança, a fim de avaliar o efeito da adição da enzima transglutaminase sobre as propriedades de espessura, resistência à tração, alongação, solubilidade e permeabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos filmes

A caracterização quanto à aparência apresentou homogeneidade, sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças, possibilitando o manuseio com facilidade para ambas as composições.

A Tabela 1 traz a caracterização dos filmes modificados com enzima TGase (ME) e o controle, sem modificação enzimática (WE).

Tabela 1: Caracterização dos filmes com e sem adição de enzima

Variável de resposta ^a	Tipo de Variável	Resultados (médias)		Valor de P
		ME	WE	
Espessura (mm)	Menor/melhor	0,192±0,01	0,263±0,03	0,023682*
Resistência à tração (MPa)	Maior/melhor	30,121±0,18	14,504±0,04	0,000007*
Elongação (%)	Maior/melhor	147,334±1,11	121,748±1,15	0,000003*
Solubilidade (%)	Menor/melhor	40,740±0,74	44,353±1,14	0,010093*
Permeabilidade (g mm / m ² d kPa)	Menor/melhor	24,978±6,69	30,116±6,56	0,396278

^a médias e desvio padrão de análises em triplicatas

* significativo (p < 0,05)

Após a caracterização foi realizada análise estatística, e percebeu-se uma melhora significativa (p < 0,05) oriunda da reticulação enzimática nas propriedades de espessura, resistência a tração, alongação e solubilidade. Enquanto a permeabilidade em vapor de água não apresentou melhora significativa (p > 0,05).

A espessura dos filmes ME diminuiu cerca de 40% quando comparado com os WE, indicando que a interação entre a gelatina e a TGase estão associadas a mudanças na estrutura dos filmes, que provavelmente levaram a formação de uma rede polimérica mais compacta, diminuindo a espessura (CHENG et al., 2019); (KAEWPRACHU et al., 2017). É interessante monitorar a espessura, pois através dela pode-se definir o tempo necessário para a biodegradação completa de um polímero, quando menor, se espera que a biodegradação ocorra de maneira mais rápida que em materiais mais espessos, devido à propensão à formação de fissuras, o que aumenta a área superficial e permite incrustações e fragmentações mais rápidas (WANG et al., 2018); (DILKES-HOFFMAN et al., 2019).

A resistência à tração para o filme ME apresentou um aumento cerca de 48%, podendo ser atribuído à ligação cruzada covalente de constituintes da proteína alcançada pela adição da TGase, o que facilitou a polimerização intramolecular dos peptídeos na gelatina, aumentando assim a resistência à tração. E quanto maior o grau de reticulação alcançado no filme, maior vai

ser a resistência à tração devido a rigidez e ao peso molecular (WANG et al., 2015); (JIANG et al., 2019); (CHENG et al., 2019). Já a alongação aumentou cerca de 17% no filme ME, essa melhoria ocorre devido a distribuição e densidade homogêneas das interações intermoleculares e intramoleculares na rede que produz o filme, fator promovido através das ligações cruzadas promovidas pela TGase (CHAMBI & GROSSO, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por (SORDE & ANANTHANARAYAN, 2019) onde a resistência à tração e alongação do filme à base de goma guar aumentou significativamente após o tratamento com Tgase, e o resultado foi atribuído pela reação entre o resíduo de glutamina da enzima com a lisina e as aminas primárias na proteína, que formam uma matriz mais complexa que fortalece o filme. Propriedades mecânicas abrangendo resistência à tração, alongamento na ruptura são características importantes para a compreensão da interação interna dos biomateriais, pois os materiais de embalagem devem ser resistentes e flexíveis (JIANG et al., 2019).

A solubilidade em água diminuiu cerca de 8% com a adição da enzima, esse resultado é interessante, pois a baixa solubilidade em água é essencial para melhorar a integridade do filme em ambientes úmidos (Jiang et al., 2019), visto que é considerada um indicador da resistência à água (Rostamzad et al., 2016), além de ser um fator determinante na definição da aplicabilidade do filme. Devido a adição da TGase formou uma compacta estrutura de rede espacial, reduzindo assim o espaço intermolecular, inibindo a difusão de moléculas de água e reduzindo a solubilidade dos filmes, o que faz com que o tratamento enzimático seja visto como uma abordagem eficaz para reduzir a suscetibilidade dos filmes a umidade (AL-HASSAN & NORZIAH, 2017); (ZHANG et al., 2016); (CHENG et al., 2019).

No que se refere a permeabilidade dos filmes, que está geralmente associada a taxa de transmissão de moléculas de água contra a força matriz de pressão a vapor (WANG et al., 2015), a análise estatística em relação à adição da enzima não teve efeito significativo.

3.2 Envelhecimento acelerado

3.2.1 Propriedades mecânicas

O processo de degradação afeta quase todas as propriedades do polímero, porém as mais importantes são as mecânicas: resistência a tração e alongamento (Qureshi,2006). As Figuras 1 e 2 representam o efeito da exposição UV, UR e TO nas propriedades mecânicas (resistência à tração e alongamento) das diferentes formulações investigadas (ME e WE).

Figura 1 – Resistência a tração de filmes com e sem enzima submetidos a testes de envelhecimento

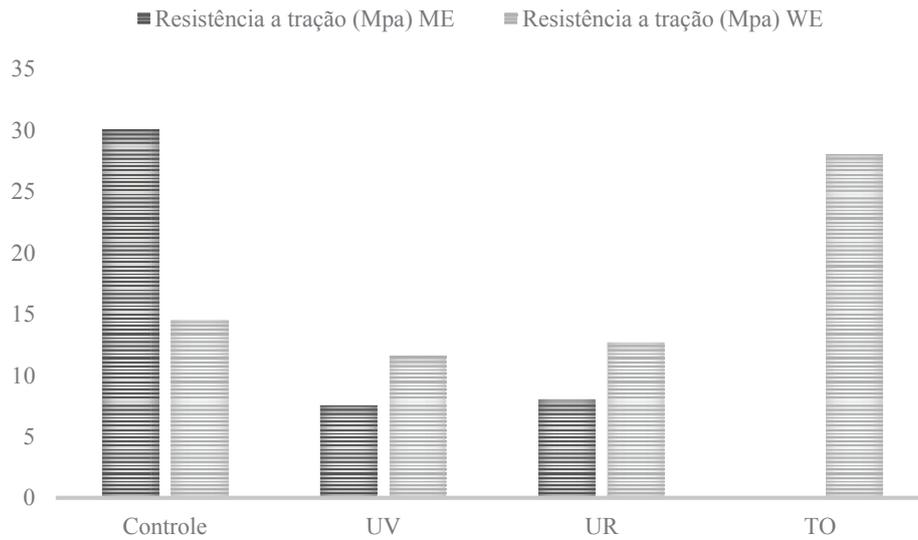
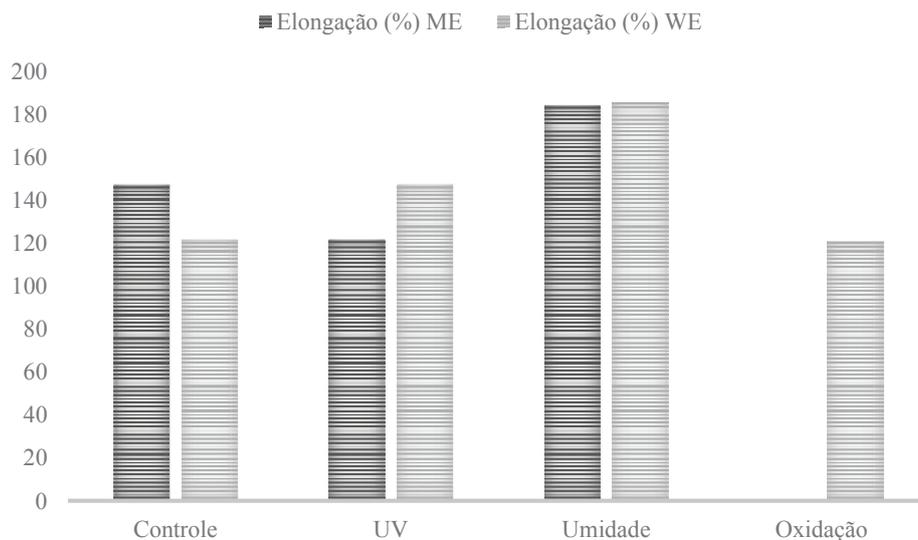


Figura 2 – Alongamento de filmes com e sem enzima submetidos a testes de envelhecimento acelerado.



Percebe-se que as formulações exibiram diferenças tanto de resistência quanto de alongação antes da exposição. O filme ME apresentava resistência maior, mas essa característica não se manteve após as exposições a envelhecimento acelerado, onde houve perda de resistência para todos os tipos de envelhecimento, especialmente na TO, visto que impossibilitou a análise no tempo final, por se apresentar completamente frágil após 24 horas de tratamento.

Já para para alongação, não foi possível realizar a análise do filme ME quando exposto a TO, por estar muito frágil ao final do envelhecimento, enquanto a exposição UV diminui cerca de 20 % a UR aumentou na mesma proporção. E os filmes WE quando expostos a UV e UR aumentaram cerca de 25% para UV e 35% para UR, enquanto para TO se manteve estável.

Através desses dados pode-se evidenciar que as propriedades mecânicas ao longo da exposição UV tem uma queda maior nos filmes ME quando comparados aos WE, e que a TO causa maior perda de resistência quando comparada a outras exposições. Este resultado pode ser explicado levando-se em consideração que as propriedades mecânicas dos materiais estão amplamente associadas tanto à distribuição quanto à densidade das interações intermoleculares e intramoleculares dos biopolímeros determinantes da rede de filmes (Fernandez-Bats et al., 2018). Neste caso, a transglutaminase criou ligações isopeptídicas intermoleculares e intramoleculares, o que pode ter ocasionado perda de resistência ao longo da exposição.

Estudo realizado copolímero de maleato de cobalto estireno e estearato de cobalto avaliou o efeito desses complexos no comportamento de degradação de filmes de polietileno de baixa densidade através de envelhecimento acelerado TO e UV, e obteve resultados similares a este estudo, onde o envelhecimento por UV foi menos acentuado do que o TO, e os filmes não mostraram nenhuma alteração na aparência física após a exposição à luz UV, mesmo após 600 h, enquanto para os filmes expostos a TO impossibilitou a análise final. Os autores atribuem o acontecimento a cisão da cadeia dos filmes, onde a fase desordenada é removida e como resultado há a criação de superfícies modificadas com maior cristalinidade. (Roy et al., 2006).

3.1.2 FTIR

Para observar a combinação dos polímeros utilizados para a confecção dos filmes, a análise de FTIR foi realizada, conforme Figuras 3 e 4.

Figura 3 – FTIR de filmes com modificação enzimática (ME)

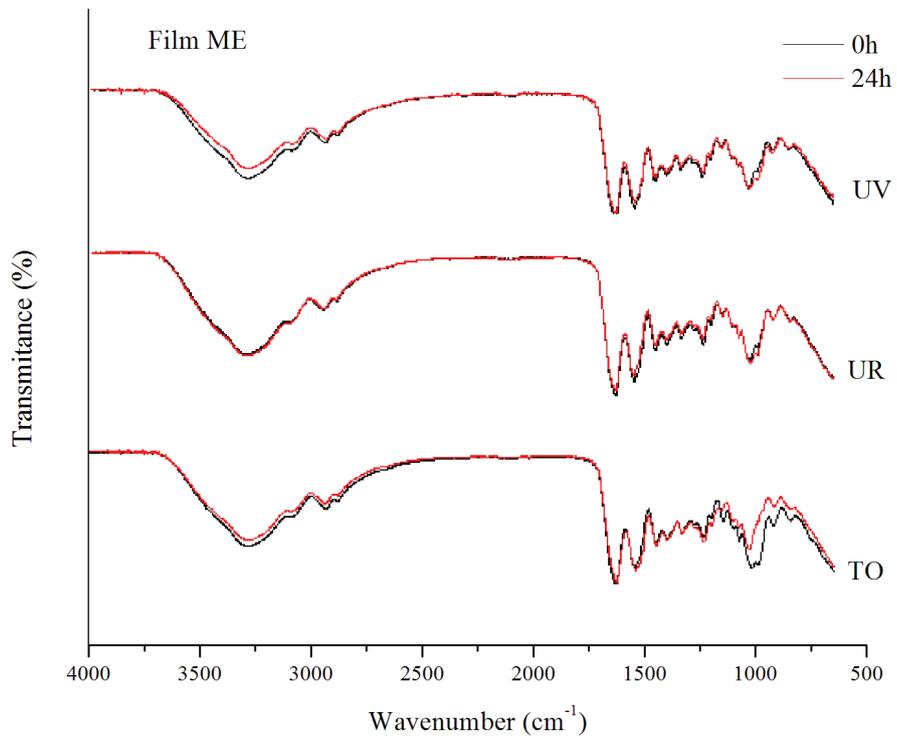
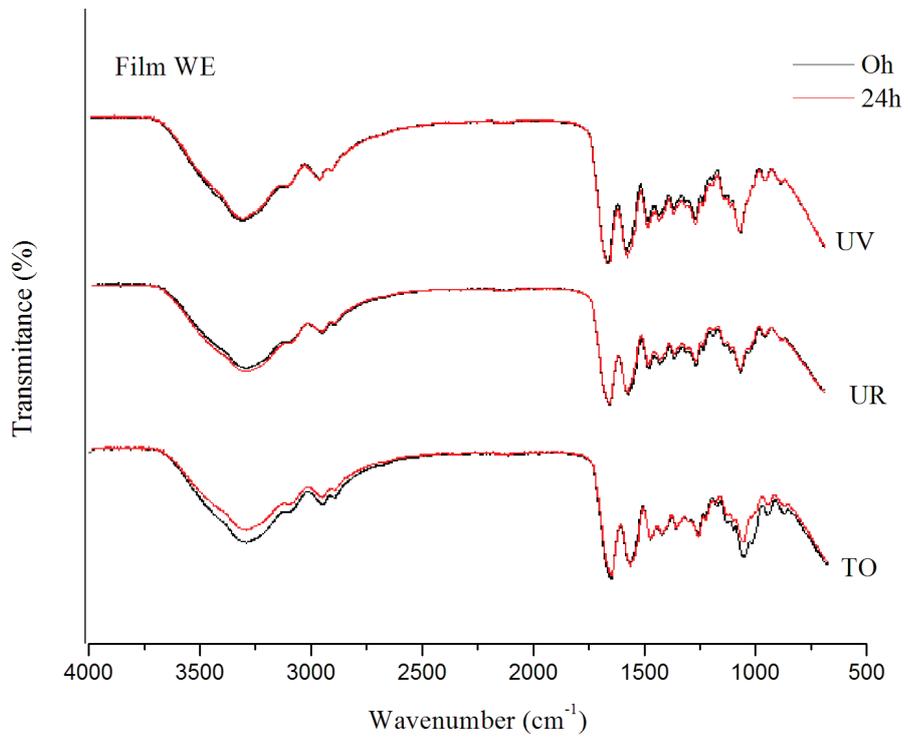


Figura 4 - FTIR de filmes sem modificação enzimática (WE)



Bandas características dos materiais que compõe o filme podem ser notadas, como o pico entre 3400 e 3250 cm^{-1} , associado a ligações O-H, presentes na estrutura da água, glicerol e amido (JAMRÓZ, JUSZCZAK, & KUCHARZEK, 2018). Ainda, este pico pode representar a presença de amins primárias, resultado do estiramento de ligações N-H (Wu et al., 2018).

Percebe-se que os filmes com e sem enzima apresentam as mesmas bandas, exceto entre os comprimentos 1150 e 950 cm^{-1} , onde o pico do filme ME é mais intenso.

A diferença de intensidade entre os filmes, pode estar associada a TGase, já que esta região de comprimento de onda é característico da enzima, ocasionando um pico mais intenso (Wu et al., 2017), respectivo a vibração da ligação C-N e C-O (CHENG et al., 2019).

Observou-se que para os filmes envelhecidos por radiação UV e umidade não ocorreu nenhuma modificação nas ligações durante o período de 24 horas de exposição, considerando que essas condições e tempo de análise não tem energia suficiente para causar deformações nos picos.

Já para filmes com e sem enzima expostos a oxidação, após 24 horas, foi possível evidenciar uma redução no pico entre 1030 e 980 cm^{-1} , causando deformação entre C-H, C-O e/ou C-C, ligações estas que podem ser relacionadas a molécula de amido (SCOPEL et al., 2018). E há alterações no pico entre 1200 e 1130 cm^{-1} , que sugere que as ligações entre C-O e C-N, sofreram oxidação (MOO-TUN et al., 2018). Para ambos os filmes, percebe-se uma redução na intensidade do pico próximo a 3250 cm^{-1} , devido a interações entre moléculas de O-H, dando início a evaporação de componentes, como a água.

Estudos geralmente utilizam o índice de carbonila como parâmetro para monitorar a degradação dos materiais. A banda característica de absorção do grupo carbonila, quando sofre alongamento, é centrada em torno de 1714 cm^{-1} (ROY et al., 2006). Entretanto, no presente estudo não foi observada nenhuma mudança nesse pico.

3.1.3 Termogravimetria (TG) e derivada (DTG)

A termogravimetria demonstra a estabilidade térmica dos materiais através de uma relação entre perda de massa e temperatura. Pela DTG das amostras, conforme a Figura 5 e 6, pode-se visualizar em que temperaturas houve maior degradação.

Figura 5: Curva de TG e DTG para filme sem enzima (WE)

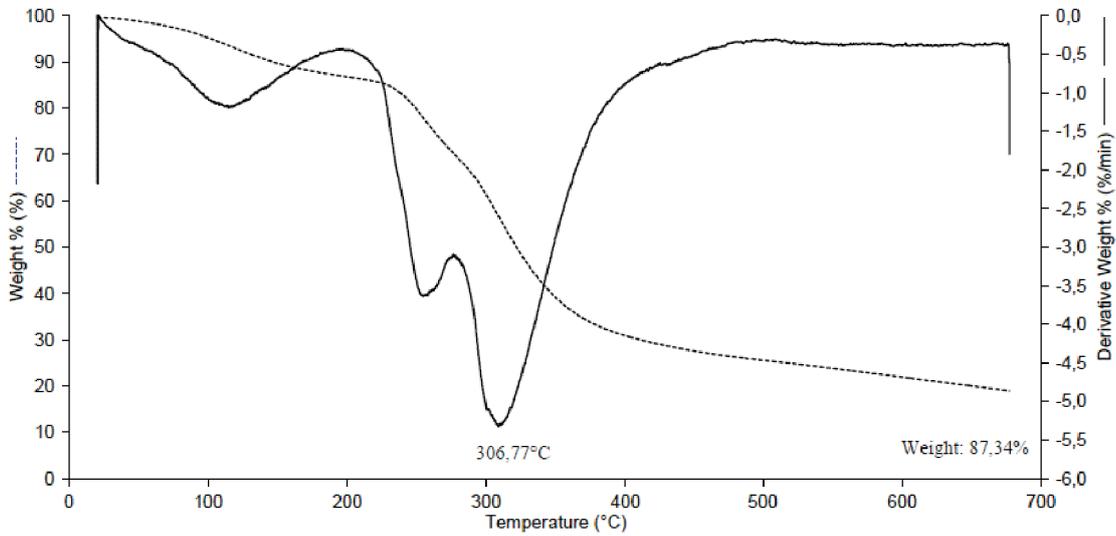
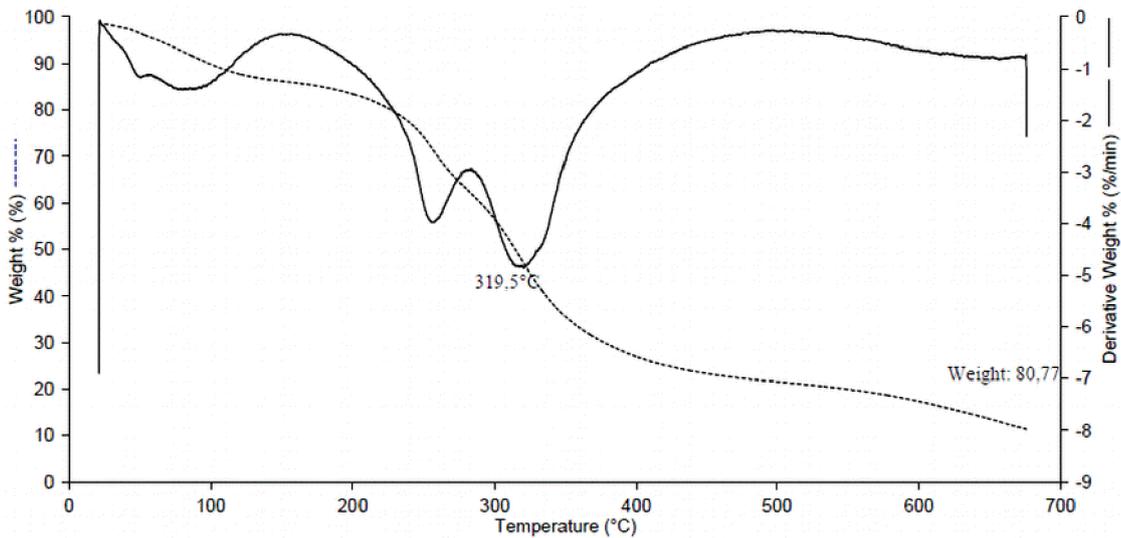


Figura 6: Curva de TG e DTG para filme com enzima (ME)



Através das curvas DTG, é possível notar que ocorrem três etapas de decomposição térmica.

O filme ME apresenta a primeira etapa com maior intensidade próximo aos 120°C, enquanto o filme WE apresenta uma maior intensidade próximo aos 100°C. Esta

diferença pode ser justificada pela atuação da TGase, que é responsável por melhorar o desempenho das proteínas quando expostas ao calor, promovendo melhor termoestabilidade, devido a formação de ligações cruzadas entre proteína e a enzima (WU et al., 2018; WU et al., 2017).

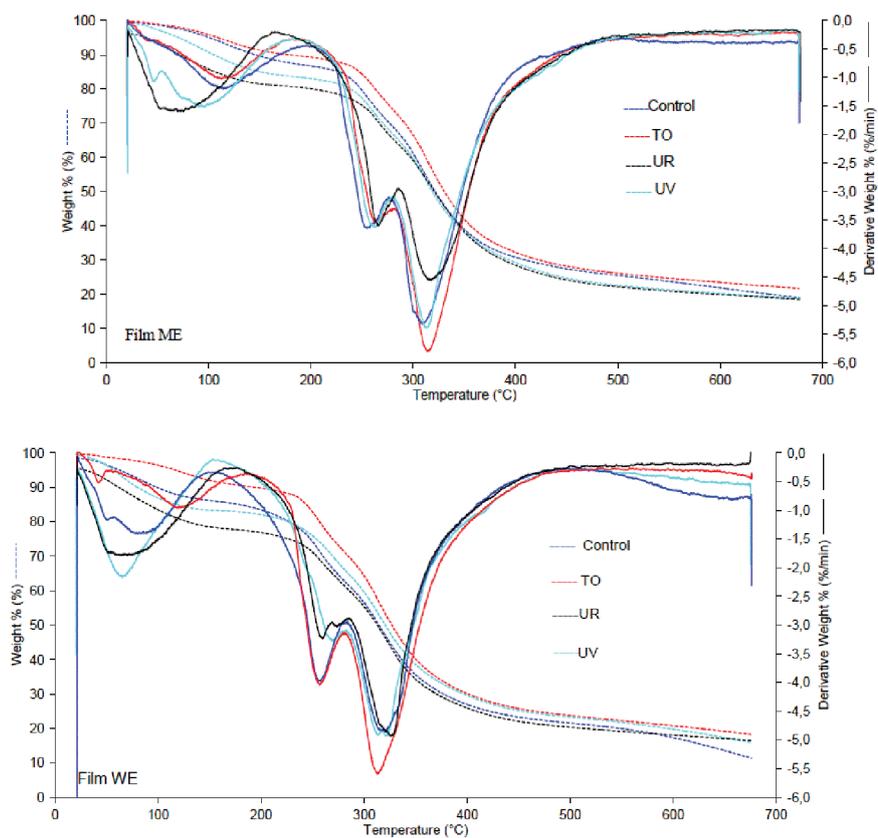
A segunda etapa ocorre em aproximadamente 250°C em ambos os filmes, e é responsável pela degradação de componentes menos estáveis, como o glicerol, por exemplo (SILVA et al. 2019). Nesta etapa, se dá início a modificação molecular dos materiais presentes nos filmes (WANG et al. 2017)

A última etapa, se refere a degradação de proteínas e polissacarídeos (WANG et al. 2017), através da despolimerização de macromoléculas. Contudo, percebe-se uma diferença maior que 10°C, quando se comparam as temperaturas máximas de degradação dos filmes ME e WE. Isso pode ser justificado pelo fato de que nos filmes WE houve maior interação entre amido-gelatina através de ligações de hidrogênio, que conseqüentemente, necessitam de uma temperatura mais alta para degradar a estrutura da gelatina (WANG et al. 2017; AHMAD et al. 2015).

A variação de massa no filme ME foi de 87,3 % enquanto o filme WE apresentou uma perda de massa de 80,7 %.

A Figura 7 apresenta as curvas de TG e DTG dos filmes frente os diferentes tipos de exposição ao envelhecimento acelerado, visando compará-las com o controle a fim de compreender o comportamento das propriedades térmicas do filme.

Figura 7: Curva de TG e DTG dos filmes submetidos ao envelhecimento acelerado



Através das curvas é possível evidenciar que a maior perda de massa se dá pela exposição TO para ambos os filmes, o que significa que quando exposto o filme a temperaturas altas, há maior degradação.

Conclusão

Com o estudo pode-se concluir que com a adição da enzima, houve uma melhoria significativa nas propriedades dos filmes, indicando um aumento em sua vida útil ao torná-los menos solúveis, mais resistentes e estáveis a temperatura.

Os testes de envelhecimento acelerado apresentaram efeitos marcantes em ambos os filmes, especialmente nas propriedades mecânicas após 24 horas, pois apresentou perda de resistência para todos os tipos de exposições. Enquanto em relação à TG e FTIR foi possível observar modificações somente para a exposição TO, onde ao término do teste a amostra apresentou-se totalmente quebradiça, além de ser o único envelhecimento acelerado que apresentou diferenças no FTIR e nas propriedades térmicas, devido à degradação que a alta temperatura causou nos filmes.

Diante do exposto, conclui-se que a enzima TGase oferece melhorias nas propriedades dos filmes, indicando um aumento em sua vida útil ao torná-los menos solúveis. Porém, a aplicação de filmes deve ser monitorada, devido à sensibilidade dos filmes a UV e TO.

Referências

- AL-Hassan, A. A., & Norziah, M. H. (2017). Effect of transglutaminase induced crosslinking on the properties of starch/gelatin films. *Food Packaging and Shelf Life*, 13(May), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.006>
- ASTM. (2002). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM D882-02. *American Society for Testing and Materials*, Vol. 14, pp. 1–10.
- ASTM. (2013). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials E96/E96M. *Annual Book of ASTM Standards*, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1520/E0096>
- ASTM D7444-18. (2018). Standard Practice for Heat and Humidity Aging of Oxidatively Degradable. *American Society for Testing and Materials*, (March 2011), 1–6. <https://doi.org/10.1520/D7444-11>. Copyright
- Battisti, R., Fronza, N., Vargas Júnior, Á., Silveira, S. M. da, Damas, M. S. P., & Quadri, M. G. N. (2017). Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.009>
- Chambi, H., & Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39(4), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>
- Cheng, S., Wang, W., Li, Y., Gao, G., Zhang, K., Zhou, J., & Wu, Z. (2019). Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. *Food Chemistry*, 271(July 2018), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.223>
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films as Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622–626. <https://doi.org/10.1021/jf960352i>
- Dilkes-Hoffman, L.S., Pratt, S., Lant, P. A., & Laycock, B. (2019). The Role of Biodegradable Plastic in Solving Plastic Solid Waste Accumulation. In *Plastics to Energy* (pp. 469–505). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813140-4.00019-4>
- Dilkes-Hoffman, Leela Sarena, Lant, P. A., Laycock, B., & Pratt, S. (2019). The rate of

- biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 142, pp. 15–24). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.020>
- Elango, J., Bu, Y., Bin, B., Geevaretnam, J., Robinson, J. S., & Wu, W. (2017). Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films. *Food Bioscience*, 17(November 2016), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.12.002>
- Færgemand, M., Murray, B. S., Dickinson, E., & Qvist, K. B. (1999). Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 343–346. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00085-0)
- Fernandez-Bats, I., Di Pierro, P., Villalonga-Santana, R., Garcia-Almendarez, B., & Porta, R. (2018). Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloids*, 82, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.041>
- Jamróz, E., Juszczak, L., & Kucharek, M. (2018). Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.014>
- Jiang, S. Juan, Zhang, T., Song, Y., Qian, F., Tuo, Y., & Mu, G. (2019). Mechanical properties of whey protein concentrate based film improved by the coexistence of nanocrystalline cellulose and transglutaminase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1266–1272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.254>
- Kaewprachu, P., Osako, K., Tongdeesontorn, W., & Rawdkuen, S. (2017). The effects of microbial transglutaminase on the properties of fish myofibrillar protein film. *Food Packaging and Shelf Life*, 12(January), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.002>
- Kojima, Y., & Suzuki, S. (2011). Evaluation of wood-based panel durability using bending properties after accelerated aging treatments. *Journal of Wood Science*, 57(2), 126–133. <https://doi.org/10.1007/s10086-010-1146-x>
- Laycock, B., Nikolić, M., Colwell, J. M., Gauthier, E., Halley, P., Bottle, S., & George, G. (2017). Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 71, 144–189. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004>
- Lizárraga-Laborín, L. L., Quiroz-Castillo, J. M., Encinas-Encinas, J. C., Castillo-Ortega, M. M., Burruel-Ibarra, S. E., Romero-García, J., ... Rodríguez-Félix, D. E. (2018). Accelerated weathering study of extruded polyethylene/poly (lactic acid)/chitosan films. *Polymer Degradation and Stability*, 155, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.06.007>
- Maegawa, S., Hasebe, T., Yamato, Y., Bito, K., Nagashima, S., Hayashi, T., ... Suzuki, T. (2016). Time course analysis of antithrombogenic properties of fluorinated diamond-like carbon coating determined via accelerated aging tests: Quality control for medical device commercialization. *Diamond and Related Materials*, 70, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.09.021>
- Marceaux, S., Martin, C., Margaillan, A., & Bressy, C. (2018). Effects of accelerated ageing conditions on the mechanism of chemically-active antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 125(May), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.09.004>
- Masamba, K., Li, Y., Hategekimana, J., Ma, J., & Zhong, F. (2016). Effect of drying temperature and pH alteration on mechanical and water barrier properties of transglutaminase cross linked zein-oleic acid composite films. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.030>
- Moo-Tun, N. M., Valadez-González, A., & Uribe-Calderon, J. A. (2018). Thermo-oxidative aging of low-density polyethylene blown films in presence of cellulose nanocrystals and

- a pro-oxidant additive. *Polymer Bulletin*, 75(7), 3149–3169. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2204-y>
- O.A. Silva, M.G. Pellá, M.G. Pellá, et al. (2019). Technological Department Environmental Management, Federal Technological. *International Journal of Biological Macromolecules*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.132>
- Rosseto, M., Krein, D. D. C., Balbé, N. P., & Dettmer, A. (2019). Starch-Gelatin Film as an Alternative to the Use of Plastics in Agriculture – A Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9944>
- Rossi Marquez, G., Di Pierro, P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.017>
- Rostamzad, H., Paighambari, S. Y., Shabanpour, B., Ojagh, S. M., & Mousavi, S. M. (2016). Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.10.001>
- Roy, P. K., Surekha, P., Rajagopal, C., Chatterjee, S. N., & Choudhary, V. (2006). Accelerated aging of LDPE films containing cobalt complexes as prooxidants. *Polymer Degradation and Stability*, 91(8), 1791–1799. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.11.010>
- Sabbah, M., Giosafatto, C. V. L., Esposito, M., Di Pierro, P., Mariniello, L., & Porta, R. (2019). Transglutaminase Cross-Linked Edible Films and Coatings for Food Applications. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 369–388). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00021-9>
- Scopel, B. S., Ribeiro, M. E., Dettmer, A., & Baldasso, C. (2018). Cornstarch-Gelatin Films: Commercial Gelatin Versus Chromed Leather Waste Gelatin and Evaluation of Drying Conditions. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(5), 1998–2006. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1097-z>
- Sharma, N., Chang, L. P., Chu, Y. L., Ismail, H., Ishiaku, U. S., & Ishak, Z. A. M. (2001). A study on the effect of pro-oxidant on the thermo-oxidative degradation behaviour of sago starch filled polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 71, 381–393.
- Sorde, K. L., & Ananthanarayan, L. (2019). Effect of transglutaminase treatment on properties of coconut protein-guar gum composite film. *LWT - Food Science and Technology*, 115(February), 108422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108422>
- TANG, C.-H., WU, H., YU, H.-P., LI, L., CHEN, Z., & YANG, X.-Q. (2005). COAGULATION AND GELATION OF SOY PROTEIN ISOLATES. *Journal of Food Biochemistry*, 30(2006), 35–55.
- Wang, H., Wei, D., Zheng, A., & Xiao, H. (2015). Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. *Polymer Degradation and Stability*, 116, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.03.007>
- Wang, S., Lydon, K., White, E. M., Iii, J. B. G., Lipp, E., Locklin, J., ... Lipp, E. K. (2018). Biodegradation of Poly (3-hydroxybutyrate- co -3- hydroxyhexanoate) Plastic under Anaerobic Sludge and Aerobic Seawater Conditions: Gas Evolution and Microbial Diversity. *Environ. Sci. Technol.*, 5700–5709. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06688>
- Wang, W., Wang, K., Xiao, J., Liu, Y., Zhao, Y., & Liu, A. (2017). Performance of high amylose starch-composited gelatin films influenced by gelatinization and concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.014>
- Wu, X., Liu, A., Wang, W., & Ye, R. (2018). Improved mechanical properties and thermal-

stability of collagen fiber based film by crosslinking with casein , keratin or SPI : Effect of crosslinking process and concentrations of proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.144>

Wu, X., Liu, Y., Liu, A., & Wang, W. (2017). Improved thermal-stability and mechanical properties of type I collagen by crosslinking with casein , keratin and soy protein isolate using transglutaminase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.127>

Zhang, P., Hu, T., Feng, S., Xu, Q., Zheng, T., Zhou, M., & Chu, X. (2016). Effect of high intensity ultrasound on transglutaminase-catalyzed soy protein isolate cold set gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.014>

Zhou, Z., Shi, Z., Cai, X., Zhang, S., Corder, S. G., Li, X., ... Tao, T. H. (2017). The Use of Functionalized Silk Fibroin Films as a Platform for Optical Diffraction-Based Sensing Applications. *Advanced Materials*, 29(15), 1–7. <https://doi.org/10.1002/adma.201605471>

APÊNDICE L – Artigo de revisão



Review

Starch–gelatin film as an alternative to the use of plastics in agriculture: a review

Marieli Rosseto ✉, Daniela DC Krein, Naiana P Balbé, Aline Dettmer ✉

First published: 22 July 2019 | <https://doi.org/10.1002/jsfa.9944>

APÊNDICE M – Artigos provenientes deste estudo publicados em congressos



CARACTERIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE GELATINA EXTRAÍDA DE RESÍDUO DE COURO CURTIDO AO CROMO (III)

D. D. C. KREIN¹, M. ROSSETO², A. DETTMER¹, B. I. S. DAMIN¹

¹ Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Curso de Engenharia Química

² Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: kreindaniela@gmail.com



Envelhecimento sob radiação ultravioleta em filmes de amido e gelatina com tratamento enzimático

Marieli Rosseto^{1*}, Daniela D. C. Krein², Naiana P. Balbé², Lillian Avila Massuda², Cesar Vinicius Tonicilli Riguetto¹, Aline Dettmer¹

¹ Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS. Email: mmarielirossetto@hotmail.com

² Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS.



AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ENVELHECIMENTO POR OXIDAÇÃO TÉRMICA EM FILMES DE AMIDO E GELATINA

Daniela D. C. Krein^{1*}, Marieli Rosseto², Naiana P. Balbé¹, Lillian A. Massuda¹, Cesar V. T. Riguetto², Aline Dettmer²

¹ - Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS. E-mail: kreindaniela@gmail.com

² - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.



EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A SOLUBILIDADE DE FILMES DE AMIDO E GELATINA

Marieli Rosseto^{1*}, Daniela D. C. Krein², Naiana P. Balbê², Cesar Vinicius Tonicioilli Riguetto¹, Aline Dettmer²

¹ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS. Email: mmarielirossetto@hotmail.com

² Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS.



ENVELHECIMENTO ACELERADO DE FILMES DE AMIDO E GELATINA EM AMBIENTE COM UMIDADE CONTROLADA

Marieli Rosseto¹, Daniela D. C. Krein², Naiana P. Balbê², Cesar Vinicius Tonicioilli Riguetto¹, Aline Dettmer²

¹ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS. Email: mmarielirossetto@hotmail.com

² Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS.



ANÁLISE DE PROPRIEDADES FÍSICA E TÉRMICA DE FILMES DE AMIDO E GELATINA

Daniela D. C. Krein^{1*}, Marieli Rosseto², Naiana P. Balbê¹, Aline Dettmer¹, Cesar V. T. Riguetto²

¹ – Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS. E-mail: kreindaniela@gmail.com

² – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS.



15º Congresso Brasileiro de Polímeros
27 a 31 de outubro de 2019

ESTUDO REOLÓGICO DA SOLUÇÃO GELATINA-ENZIMA TRANSGLUTAMINASE

Naiana Pereira Balbé ^{2*}, Daniela Dal Castel Krein², Marieli Rosseto¹, Cesar Riguetto¹, Aline Dettmer¹

1 - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS

2 - Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS.

154481@upf.br



ACCELERATED AGING OF STARCH- GELATIN FILMS WITH ENZYMIC TREATMENT



13 SLACA
Simposio Latino Americano
de Ciência de Alimentos
O FUTURO DOS ALIMENTOS

10 a 12 de Novembro de 2019

Marieli Rosseto^{1*}, Daniela D.C. Krein², Cesar V. T. Riguetto¹, Naiana P. Balbé, Lillian A. Massuda², Bárbara B. Zanela², Aline Dettmer¹.

** mmarielirossetto@hotmail.com*

¹ University of Passo Fundo, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine (FAMV), Postgraduate Program in Food Science and Technology (PPGCTA), Passo Fundo- RS
