

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

MARÍLIA FERREIRA CORREIA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FILMES A
BASE DE COLÁGENO BOVINO, ÁGAR-ÁGAR E AGAROSE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

PONTA GROSSA

2016

MARÍLIA FERREIRA CORREIA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FILMES A
BASE DE COLÁGENO BOVINO, ÁGAR-ÁGAR E AGAROSE**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, da Coordenação de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Milleo Almeida

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kathrin Harre

PONTA GROSSA

2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa
Coordenação de Engenharia Química



TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FILMES A BASE DE COLÁGENO BOVINO, ÁGAR-ÁGAR E AGAROSE

por

Marília Ferreira Correia

Monografia apresentada no dia 08 de novembro de 2016 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca: Prof. Dr. César Arthur Martins Chornobai
Profa. Dra. Rosilene Prestes
Orientadora: Profa. Dra. Denise Milleo Almeida

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar filmes a partir de colágeno bovino, ágar e agarose, com o intuito de utilizar as melhores vantagens desses componentes, com propriedades físico-químicas satisfatórias e com grande potencial para serem aplicados na área de embalagens. Foram produzidos filmes de colágeno classificado, colágeno puro com ágar-ágar 0,5% e agarose 0,5%, colágeno classificado ágar-ágar 0,5% e agarose 0,5%, seguido de processo de laminação de colágeno classificado com ágar-ágar 0,5% e agarose 0,5%. Os filmes foram caracterizados por FTIR, índice de intumescimento, espessura e umidade. Por meio do FTIR foi possível verificar que os filmes com adição de ágar-ágar acrescido ou não de colágeno puro ou classificado apresentam maior possibilidade de absorção de umidade. O processo de laminação não interferiu na capacidade de intumescimento dos filmes. A maior variação no índice de intumescimento foi observado no filme de colágeno classificado (FCc). O processo de laminação favoreceu o aumento da espessura dos filmes, indicando menores possibilidades a permeabilidades a gases e ao vapor de água. O filme de ágar-ágar 0,5% com colágeno puro (Cp – Aa 0,5%) apresentou maior teor de umidade, indicando uma possível formação de mais canais condutores de umidade e interações com moléculas de água. A produção de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose mostrou ser satisfatória, no entanto, a adição de ágar-ágar favoreceu a formação de filmes com maior absorção de umidade.

Palavras-chaves: Filme. FTIR. Colágeno. Índice de intumescimento. Espessura. Umidade.

ABSTRACT

The main objective in this work was to produce and characterize films from bovine collagen, agar and agarose, with the purpose of using the best advantages of these components, with satisfactory physico-chemical properties and with great potential to be applied in the packaging area. Rated collagen films, pure collagen with 0.5% agar-agar and agarose 0.5%, rated collagen agar-agar 0.5% and agarose 0.5% have been produced, followed by collagen laminating process rated with agar-agar 0.5% and agarose 0.5%. These films were described by FTIR, swelling index, thickness and moisture. Through the FTIR was possible to verify that those films added with agar, with pure or classified collagen addition or not, have shown greater possibility of moisture absorption. The lamination process did not affect the films swelling capacity. The greatest variation in the swelling index was observed in rated collagen film (FCc). The lamination process enhanced the thickness increase of the films, indicating the lowest possible permeability to gases and to water vapor. The 0.5% agar film with pure collagen (Cp - Aa 0.5%) showed higher moisture content, indicating a possible formation of more moisture channels drivers and interactions with water molecules. The films production based on bovine collagen, agar and agarose has shown to be satisfactory, however, the addition of agar-agar favored the formation of higher moisture absorption film.

Keywords: Films. FTIR. Collagen. Swelling index. Thickness. Moisture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colágeno nativo Tipo I	14
Figura 2 - Produção do colágeno: (A) classificação do colágeno; (B) peneira, suporte e arado utilizado para a classificação do colágeno	15
Figura 3 - Molde de silicone para a produção dos filmes de colágeno classificado	16
Figura 4 - Corte dos filmes (A) e estrutura de silicone (B)	20
Figura 5 - Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier do ágar-ágar 0,5%	23
Figura 6 - Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier da agarose 0,5%	24
Figura 7 - Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier do ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno puro + ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno classificado + ágar-ágar 0,5% e Filme laminado de colágeno classificado + ágar-ágar 0,5 %.....	25
Figura 8 - Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier da agarose 0,5%, filmes de colágeno puro + agarose 0,5%, filmes de colágeno classificado + agarose 0,5% e Filme laminado de colágeno classificado + agarose0,5 %	26
Figura 9 - Espessura do filme de agarose 0,5% em microscópio ótico	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações das soluções de Ágar - Ágar e Agarose	16
Tabela 2- Concentrações das soluções de Ágar-ágar e Agarose para produção de filmes	17
Tabela 3- Tipos de ligações e bandas características para o Colágeno, Ágar-ágar e Agarose	21
Tabela 4- Medidas das massas e diâmetros dos filmes relacionados ao índice de intumescimento	28

Tabela 5- Espessuras dos filmes	29
Tabela 6 - Teor de umidade dos filmes pelo método de Karl Fischer	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Constituição dos filmes de ágar-agar, agarose e colágeno.....	18
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
a) Estabelecer o processo de produção de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose.	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 BIOFILMES	10
3.2 COLÁGENO.....	12
3.3 ÁGAR-ÁGAR.....	13
3.4 AGAROSE	14
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	15
3.5.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	15
3.5.2 Índice de Intumescimento.....	16
3.5.3 Espessura	17
3.5.4 Umidade.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAIS	20
4.2 PRODUÇÃO DE COLÁGENO CLASSIFICADO	20
4.3 PRODUÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO.....	21
4.4 PRODUÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO PURO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE	22
4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE.....	23
4.6 PROCESSO DE LAMINAÇÃO DOS FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE	23
4.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES.....	24
4.7.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	25

4.7.2 Índice de Intumescimento.....	25
4.7.3 Espessura	25
4.7.4 Determinação da umidade pelo método da titulação Karl-Fischer	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DOS FILMES DE COLÁGENO PURO COM ÁGAR-ÁGAR E AGAROSE	27
5.4 ÍNDICE DE INTUMESCIMENTO DOS FILMES.....	33
5.5 ESPESSURA DOS FILMES.....	35
5.6 UMIDADE DOS FILMES.....	37
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do descarte inadequado de filmes formados por polímeros, há uma crescente preocupação mundial com a geração de resíduos industriais e, conseqüentemente com a busca de matérias primas naturais biodegradáveis, que venham substituir ou reduzir a utilização de embalagens plásticas sintéticas.

Entre os materiais biodegradáveis e com potencial para formação de filmes estão as matérias primas de origem biológica, como proteínas, lipídios e polissacarídeos (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). O colágeno, uma glicoproteína presente na pele, tendões, cartilagens e ossos de mamíferos, tem sido estudada como matriz para formação de filmes, assim como o ágar-ágar e seu componente principal a agarose, sendo polissacarídeos obtidos de algas marinhas vermelhas (divisão Rhodophyta) (SILVA; PENNA, 2012). As glicoproteínas e os polissacarídeos apresentam características importantes como altas taxas de degradação a partir da ação de micro-organismos, formação de matriz para produção de filmes, com produção de uma rede tridimensional após processo de solidificação e ainda, boa estabilidade térmica, física e química (LAWSON, 1998).

Os filmes desenvolvidos com base em biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, apresentam promissoras características, como existir em abundância de fonte renovável, ser economicamente viável, capaz de formar uma matriz contínua e, com propriedades como barreira a gases, capacidade de redução da perda de água, manutenção da cor e da firmeza (ASSIS; FORATO e BRITTO; 2008).

A eficiência funcional dos filmes depende da composição, do processo de formação e de sua aplicação, sendo influenciadas por fatores como espessura, umidade, entre outros (SOBRAL, 2000). A preparação de blendas poliméricas se mostram como alternativas para melhorar as propriedades físicas, pelo uso combinado de biopolímeros (polissacarídeos, lipídeos e proteínas) (GARCÍA *et al.*, 2004). As misturas físicas entre biopolímeros de alta massa molar, incorporado com um plastificante e um solvente, tem sido eficiente, onde a mistura exalta propriedades superiores quando comparadas às propriedades de cada componente polimérico individualmente (LAURINDO e PELEG 2007; TONHI e PLEPIS, 2002).

Desta forma, este trabalho busca produção de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose, com intuito de utilizar as melhores vantagens desses componentes, com propriedades físico-químicas satisfatórias e com grande potencial para serem aplicados na área de embalagens.

O desenvolvimento deste trabalho está vinculado com a linha de pesquisa de "Filmes Biopoliméricos" desenvolvida no Laboratório de Polímeros da Universidade Tecnológica e de Ciências Aplicadas de Dresden (HTW) na Alemanha, referente ao Mestrado de Engenharia Química.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer o processo de produção de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose.

- b) Caracterizar os biofilmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose por meio de análises instrumentais e físico-químicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOFILMES

Filmes biodegradáveis ou biofilmes são produzidos a partir de compostos macromoleculares de obtenção biológica e requerem, no mínimo, o uso de um material capaz de formar uma matriz com estrutura contínua e com interações entre suas moléculas (BIERHALZ, 2010).

A escolha do material a ser utilizado para produção dos biofilmes depende diretamente da natureza do produto, propriedades físicas, função e da aplicabilidade. Entre as principais matérias-primas para a elaboração de filmes biodegradáveis estão as proteínas, lipídios e os polissacarídeos (WOLF, 2007).

Os filmes produzidos a partir de polissacarídeos apresentam boas propriedades mecânicas, além de permeabilidade seletiva a gases, como dióxido de carbono e oxigênio (ASSIS; FORATO; BRITTO; 2008).

Devido à sua característica de formar géis por meios químicos, os principais polissacarídeos de interesse comercial são a celulose e o amido, possuindo vasta aplicabilidade industrial na área de alimentos, podendo ser utilizado como agentes de suspensão, estabilizantes, emulsificantes e espessantes (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Os filmes produzidos a partir da matéria prima proteica apresentam propriedades físicas que influenciam na força de deformação de ruptura, estando diretamente ligadas ao pH da solução filmogênica produzida (SCHLLEMER, 2013).

Ao comparar filmes produzidos a partir de proteínas e polissacarídeos, os de origem protéicas apresentam propriedades mecânicas melhores, pois, tem em sua estrutura cerca de 20 aminoácidos diferentes com alto potencial de interações intermoleculares (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

Dentre as propriedades mecânicas relacionadas às interações moleculares, os polissacarídeos apresentam elevada resistência à tração e baixa capacidade de alongamento, enquanto que as proteínas apresentam moderada resistência à tração e elevado alongamento. Este aspecto está relacionado a sua estrutura molecular, onde as proteínas possuem uma estrutura complexa, enquanto os polissacarídeos são estruturas lineares (BIERHALZ, 2010).

De acordo com Laurindo e Peleg (2007) cada molécula apresenta características funcionais distintas, podendo ser melhorada por meio da adição de aditivos e/ou pela produção de blendas poliméricas. As blendas poliméricas são combinações físicas de biopolímeros ou copolímeros de alta massa molecular, incorporado com um plastificante e um solvente. Essa mistura tem sido eficiente, exaltando propriedades superiores quando comparadas às propriedades de cada componente polimérico individualmente.

Os filmes produzidos a partir de polímeros naturais apresentam normalmente características quebradiças e alta solubilidade em água (RABELLO *et al.*, 2000). A melhoria dessas características pode ser feita através da utilização de pequenas quantidades de aditivos, conferindo ao material maior estabilidade e manuseabilidade. A escolha do aditivo a ser utilizado pode ser definida em relação a sua eficiência nas propriedades e características desejadas, também se mostrar atóxico e de baixo custo (SOBRAL, 2000).

Entre os processos de elaboração de filmes mais utilizados em meio laboratorial está o método de *casting*, que consiste no preparo de uma solução coloidal proveniente de biomoléculas, aditivos e solventes, seguido de secagem em condições controladas de temperatura e tempo (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

A produção dos filmes poliméricos se dá a partir da formação de uma rede polimérica, envolvendo associações intermoleculares e intramoleculares, bem como, de ligações cruzadas de cadeias poliméricas, resultando em uma rede tridimensional semi-rígida (WOLF, 2007).

No entanto, para elaboração de um filme se faz necessário o conhecimento do polímero, em relação as suas propriedades funcionais, solubilidade em água e sua capacidade de interações moleculares, e propriedades estruturais (SOBRAL, 2000).

As principais aplicações dos filmes produzidos a partir de polissacarídeos e proteínas estão relacionadas como suporte no encapsulamento ou imobilização de materiais e na utilização como embalagens. Quando utilizado para esses fins, os biofilmes se apresentam como barreiras, protegendo o produto de danos físicos e biológicos, a fim de aumentar sua vida útil reduzindo a perda dos nutrientes ou princípios ativos (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

3.2 COLÁGENO

O colágeno, proteína de origem animal, compõe cerca de 6% do peso corporal de uma pessoa e 30% de sua proteína corporal total, fazendo parte da estrutura dos tecidos (SILVA e PENNA, 2012), como parte constituinte de peles, tendões, ossos, dentes, vasos sanguíneos, intestinos e cartilagens (TONHI e PLEPIS, 2002).

Os colágenos podem ser caracterizados em 26 tipos distintos de acordo com fatores como diversidade na estrutura, tipos de ligações, montagem, função e complexidade, apresentando propriedades mecânicas singulares e inatividade química (SILVA; PENNA, 2012). Suas fibras podem apresentar variação de tamanho, função e distribuição, tendo suas propriedades e características alteradas de acordo com variações nas condições de temperaturas, presença de soluções ácidas, alcalinas ou em soluções aquosas salinas (TONHI e PLEPIS, 2002).

Constituído por aminoácidos em formato de tripla-hélice, o colágeno pode ser caracterizado de acordo com sua obtenção (SILVA; PENNA, 2012). Apresentam disposição física alongada além de cadeias peptídicas formadas pelos aminoácidos lisina, alanina, hidroxilisina, glicina e prolina, e organizadas paralelamente a um eixo, proporcionando melhores índices de resistência, estabilidade e elasticidade à estrutura, e ainda impedindo a rotação da cadeia (WOLF, 2007).

A forma de apresentação do colágeno pode ser como fibras ou pó, sendo insolúvel em água devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos contidos no interior da proteína (SILVA e PENNA, 2012). A permeabilidade do vapor de água no colágeno bovino, por sua vez, é menor devido à presença de lipídios.

O meio onde se encontra é um fator que acarreta em grandes alterações estruturais do material. O mesmo, quando em tampão ácido diluído e condições normais de temperatura e pressão, apresenta grande capacidade de extensão. Quando em aquecimento, o colágeno apresenta grande diminuição do seu tamanho, além de aumento da capacidade de elasticidade. Quando em presença de ácido, álcalis ou soluções aquosas salinas, o mesmo apresenta considerável capacidade de absorção de água devido ao seu baixo peso molecular e alta solubilidade (WOLF, 2007).

Amplamente aplicados na indústria de alimentos, o colágeno pode ainda ser utilizado como complemento alimentar em produtos cárneos, de panificação,

farmacêuticos, em iogurtes, sucos, gelatinas e chás, a fim de melhorar a elasticidade e firmeza da pele, além de prevenir doenças como hipertensão e osteoporose (SILVA; PENNA, 2012). Os biofilmes a base de colágeno são amplamente aplicados em envoltórios de embutidos cárneos, com intuito de melhorar a preservação do produto (WOLF, 2007).

3.3 ÁGAR-ÁGAR

O ágar-ágar se apresenta como um fitocolóide com característica não-celulósica, que pode ser extraído da parede celular de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, as Agarófitas pertencentes à classe Rodophyta (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A composição do ágar-ágar se mostra como uma mistura heterogênea de agarose (polímero neutro) e a agarpectina (polímero com carga sulfatado). A mistura desses dois polissacarídeos confere propriedades importantes ao ágar-ágar, como o alto poder geleificante, elevada força gel, alta transparência, entre outros (VINHAS; ALMEIDA e LIMA, 2007).

Sua propriedade de formar gel atóxico ocorre devido aos três átomos de hidrogênio em sua estrutura, que limitam a formação de uma hélice pela molécula (RAPHAEL, 2010). Por ser insolúvel em água fria e capaz de absorver uma capacidade de água 20 vezes o seu peso, expandindo consideravelmente, o ágar-ágar possui em sua composição fibras, celulose, nidrogalactose, baixa quantidade de proteínas e sais minerais (FANI, 2003).

A força do gel do ágar-ágar está diretamente influenciada por fatores químicos, como concentração, pH do meio, conteúdo de açúcar e viscosidade. No entanto, a força apresentada pelo gel varia inversamente ao valor do pH, assim, quanto maior o pH do meio, menor a força apresentada pelo gel. A viscosidade de uma solução ágar-ágar depende da fonte de matéria-prima utilizada. Quando analisada em temperatura ambiente e com o decorrer do tempo, a viscosidade tende a aumentar (FANI, 2013) apresentando temperatura de fusão de 85°C a 95°C e temperatura de geleificação de 32°C a 45°C (LOPES; LOBO e COSTA, 2005).

Por apresentar uma carga levemente negativa, a solução de ágar-ágar apresenta uma estabilidade dependente da hidratação e carga elétrica. Quando em

concentrações entre 0,5% e 2,5%, os mesmos são utilizados para separação de moléculas de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos, bem como para a verificação da qualidade de DNA ou RNA de uma amostra (FANI, 2008). Para tal aplicação, antes da solidificação da mistura, há a formação de pequenos poços no gel com auxílio de um pente específico.

A vasta aplicação do ágar-ágar na indústrias alimentícias, petrolífera, farmacêutica, de papel, têxtil, cosmética e na biotecnologia se deve as suas principais características e propriedades, como grande capacidade em absorver água, difícil degradabilidade por micro-organismos e consistência gelatinosa após dissolução em água quente (FANI, 2008).

Na indústria de alimentos a aplicação do ágar-ágar pode ser na forma de gel em produtos lácteos e cárneos, gelatinas, bebidas, vinhos e vinagres doces e massa, entre outros. No entanto, sua maior aplicabilidade está em meios de cultura sólido para bactérias e fungos, e na biologia molecular, como matriz na eletroforese em gel (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

3.4 AGAROSE

A agarose, um polissacarídeo extraído de diversos gêneros e espécie de algas marinhas vermelhas da classe Rodophyta, fazendo parte da composição do ágar-ágar. Como polissacarídeo gelificante apresenta estrutura química linear, constituída de unidades repetidas de (1,3)- β -D-galactopiranosila e de (1,4)-(3,6)-anidro- α -L-galactopiranosila (FANI, 2008).

Por apresentar uma ampla gama de comprimento e fibras quase rígidas, a agarose tem sido utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como agentes estabilizantes e gelificantes (GARCIA e ANDRADE, 1991), com aplicabilidade laboratorial na separação de moléculas de grande porte em eletroforese em gel de agarose (ANDRADE; GARCIA e LOBÃO, 1996).

Quando encontrado em temperatura ambiente, a agarose se apresenta como um pó branco, podendo ser diluído em água com temperatura próxima a ebulição (SIGMA, 1996). Após resfriamento e em processo de solidificação, há a formação de uma rede tridimensional e aparência gelatinosa, como um gel (GARCIA e ANDRADE, 1991), onde essa a matriz apresenta boas condições de estabilidade

térmica, física, química, além de um baixo grau de complexidade, impedindo assim, a ocorrência interações biomoleculares (SIGMA, 1996).

Na formação de géis termorreversíveis, com o resfriamento ou com a adição de contra-íons, a macromolécula em conformação sofre alteração do seu arranjo espacial, resultante da rotação dos átomos em torno de uma ligação simples, adquirindo a forma de hélice dupla. Essa conformação permite uma maior coesão da rede tridimensional, pois há a agregação das hélices duplas (GARCIA e ANDRADE, 1991).

As propriedades mecânicas desse composto são frequentemente utilizadas a partir da conectividade da rede polimérica tridimensional formada no gel, pois auxilia no esclarecimento da estrutura molecular dos géis biopoliméricos (ANDRADE; GARCIA e LOBÃO, 1996).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

A caracterização de filmes poliméricos pode ser feita por meio de suas propriedades físicas, químicas, estruturais e de barreira (SOBRAL, 2000). A análise dessas características leva em consideração o tipo de polímero utilizado, bem como, o peso molecular, distribuição de cargas, polaridades das mesmas e a conformação da molécula, ou seja, o arranjo tridimensional dos átomos (SCHLLEMER, 2013).

3.5.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier objetiva a investigação de compostos, suas composições e grupos funcionais a partir da absorção de energia na região do infravermelho pelo material. A interação da radiação com a matéria ocorre com a junção do campo elétrico oscilante da vibração molecular e, o da radiação incidente (SCHLLEMER, 2013).

As ligações químicas das substâncias apresentam frequências de vibração específicas e correspondentes aos diferentes níveis de energia da molécula, que por sua vez, são resultantes da superfície de energia potencial da molécula, bem como

de sua geometria molecular e massa dos átomos constituintes (ZENEON; PASCUET e TIGLEA, 2008). Para que uma determinada molécula apresente absorção na faixa do infravermelho, há necessidade que suas vibrações moleculares resultem em uma alteração do momento dipolar da molécula e conseqüentemente, que haja a absorção de determinada quantidade de energia (FORATO *et al.*, 2010).

As análises dos espectros são feitas a partir das bandas de absorção resultantes da análise do material pelo espectrômetro de infravermelho. As bandas vibracionais reconhecidas pelo aparelho geralmente indicam os picos de absorção de acordo com o grupo funcional ou tipo de ligação ali existente, e apresentam também, valores relacionados a essas propriedades (ZENEON; PASCUET e TIGLEA, 2008).

A espectroscopia de infravermelho apresenta uma ampla faixa de aplicações, sendo capaz de analisar desde moléculas pequenas até sistemas complexos, como tecidos celulares (FORATO *et al.*, 2010), permitindo verificar mudanças tanto na sua superfície quanto no seu interior (EVORA *et al.*, 2002).

A faixa de radiação de maior interesse para a espectroscopia se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio). Nos espectros de infravermelho (IV) a intensidade das bandas de absorção permite coletar dados em termos de transmitância ou absorbância, e a posição em números de onda (cm^{-1}), sendo o inverso do comprimento de onda (FORATO *et al.*, 2010).

O grupamento amina das proteínas tem sido alvo de estudo para a adsorção de proteínas, exibindo bandas características em 1650 cm^{-1} (amida I), 1550 cm^{-1} (amida II) e em 1300 cm^{-1} (amida III). Nas estruturas secundárias de proteínas pelo infravermelho (IV) há a absorção da amida I, pois a posição dessa absorção (1600 - 1700 cm^{-1}) depende da predominância do tipo de estrutura secundária, devido ao estiramento C=O dos grupos peptídeos (FORATO; YUSHMANOV e COLNAGO, 2004). A amida II está relacionada ao estiramento da ligação CN e dobramento da ligação NH. O estiramento do grupo NH e OH dos aminoácidos das proteínas decorre da amida de bandas intensa e larga (BARTH, 2007).

3.5.2 Índice de Intumescimento

O índice de intumescimento tem sido aplicado com um método gravimétrico de característica física, baseado na determinação da capacidade de absorção de água por um material ou na capacidade de absorção de umidade. O intumescimento de um determinado material pode ainda ser definido como o umedecimento de sua superfície com posterior hidratação de suas moléculas, ocorrendo uma lenta desagregação molecular, ficando o material intumescido (BIERHALZ, 2010).

Um polímero com capacidade de intumescimento, ao entrar em contato com a água, apresenta alteração do seu estado configuracional rígido ou semirrígido para um estado maleável (LOPES; LOBO e COSTA, 2005). As modificações na matriz polimérica decorrentes desse processo influenciam na difusividade de gases ou líquidos pelo do filme (BIERHALZ, 2010).

No caso de filmes biopoliméricos formados por polissacarídeos o umedecimento está limitado por fatores característicos do polissacarídeo, como a rigidez, extensão do grau de reticulação e pelas associações intra e extramolecular (GABAS e CAVALCANTI, 2003).

As características de velocidade de intumescimento dos biofilmes também podem ser quantificadas a partir do cálculo desse índice, por meio da diferença de massa apresentada pelo material antes e depois da umidificação (GABAS e CAVALCANTI, 2003; BIERHALZ, 2010).

3.5.3 Espessura

A espessura de um dado material pode ser definida como a distância perpendicular entre as duas principais superfícies do material (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

A determinação da espessura fornece informações sobre as características específicas do material, bem como sua influência nas propriedades e funcionalidades do mesmo (SCHLLEMER, 2013), como homogeneidade, uniformidade, resistência mecânica, propriedades de barreira a gases e ao vapor de água. Variações na espessura de um material resultam em problemas no desempenho mecânico e de barreira (SOBRAL, 2000).

O controle da espessura de um filme quando produzidos pelo método de *casting* se torna complexo, tendo como principal causa a viscosidade da solução

filmogênica. A alta viscosidade da solução dificulta o espalhamento da solução em uma superfície plana, onde a secagem ocorre com a evaporação do solvente (SOBRAL, 1999).

Segundo Sobral (2000) altas concentrações de proteínas faz com que a solução filmogênica se torne muito viscosa, ou seja, ocorrendo pouca fluidez sobre a força do próprio peso. Para minimizar esse aspecto a solução deve ser espalhada com auxílio de um equipamento, buscando manter a espessura no suporte depois de seco. Essa técnica permite um controle maior, mas com a desvantagem na formação de bolhas de ar decorrente do desenvolvimento de espuma. Outra alternativa está em produzir soluções mais diluídas visando minimizar os problemas de formação de espuma. O controle da espessura pode ser realizado por meio da medida da gramatura, pelo controle rigoroso da forma do suporte e do nível da mesa da estufa, para evitar diferenças de espessura provocadas por desnível.

3.5.4 Umidade

A determinação da umidade de materiais possui um papel importante na identificação das características químicas e físicas do mesmo, bem como, no campo da produção e comercialização de produtos (THEMUDO, 1999).

Para a determinação dessas características podem ser utilizados métodos físicos, baseados no conhecimento do teor de água por meio da perda de massa do material, ou métodos químicos, que utilizam da reação específica da água com determinados compostos (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008).

O método de titulação por Karl Fischer tem sido utilizado como um dos métodos mais empregados para análise de umidade em materiais, devido à sua rapidez e especificidade (BRUTTEL e SCHLINK, 2009). Esse método volumétrico utiliza uma solução anidra de dióxido de enxofre, iodo e substâncias que reagem com o hidrogênio para determinar a umidade presente em uma amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em caso de materiais rochosos a análise pelo método Karl Fischer não é direta, há a necessidade de um aquecimento prévio da matéria, geralmente realizado em fornos, de forma que a água contida seja liberta, permitindo uma posterior titulação (THEMUDO, 1999). A titulação feita após o aquecimento do

material se mostra como uma variante do método de Karl Fischer, que envolve a combinação dos métodos físicos e químicos e pode ser chamada de titulação coulométrica da água pelo método de Karl Fischer (AQUINO, 2005).

A análise de uma amostra por meio do método coulométrico de Karl Fischer tem como base a redução do iodo pelo dióxido de enxofre, na presença de água. A utilização de um aparelho titulador específico se faz necessária devido à exigência da exclusão da influência da umidade relativa do ar, fornecendo condições ótimas para uma determinação eficiente do ponto de titulação (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foi utilizado colágeno nativo de Tipo I de pele bovina (Lote No: 20140303-000) obtido da empresa Viscofan Bioengineering, localizada na cidade de Weinheim na Alemanha.

Figura 1- Colágeno nativo Tipo I



Fonte: PÄTZOLD (2014).

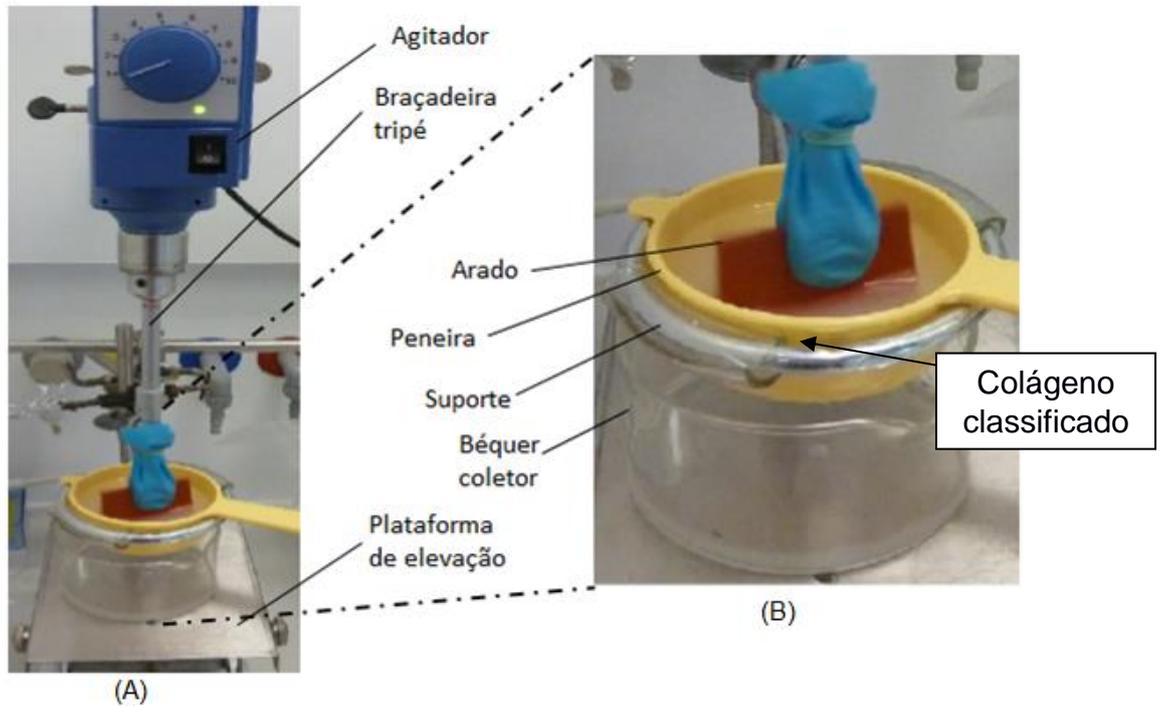
Também foi utilizado o ágar-ágar, extraído previamente de algas vermelhas pertencentes à classe Rodophyta, obtido do Laboratório de Polímeros da Universidade Tecnológica e de Ciências Aplicadas do Mestrado de Engenharia Química de Dresden (HTW). A agarose e foi obtida previamente da purificação do ágar, a partir da remoção do composto Agropectina.

4.2 MÉTODOS

Para obtenção de colágeno classificado (Cc) foram preparadas três concentrações de colágeno puro (Cp), ou seja, 22,50g, 22,52g e 22,54g, adicionados a 150 mL de água destilada. As soluções foram submetidas à agitação em banho-maria a 40°C (Agitador RW 16 básico - IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) acoplados a um raspador e um elevador, para maior homogeneização das amostras e passadas por uma peneira de 70 mesh (Figura 2). Os colágenos

tiveram uma concentração de 70% e foram denominados de Colágeno classificado (Cc).

Figura 2- Produção do colágeno: (A) classificação do colágeno; (B) peneira, suporte e arado utilizado para a classificação do colágeno.



Fonte: PÄTZOLD (2014).

4.3 PRODUÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO

O colágeno classificado (Cc) obtido no Item 4.2 foi mantido por três horas em estufa à vácuo ($P = 100$ mbar) à temperatura de 20°C , para remoção das bolhas de ar. Em seguida, 7 mL da suspensão de Cc foi transferida para um molde de silicone com 5 cm de diâmetros (Figura 3). Os moldes de silicone com a suspensão de Cc foram mantidos por 24 horas em estufa de secagem à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 3- Molde de silicone para a produção dos filmes de colágeno classificado



Fonte: PÄTZOLD (2014).

4.4 PRODUÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO PURO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE

Foram produzidos dois tipos de filmes com colágeno puro (30g), um com adição de ágar-ágar (Aa) e outro com adição de agarose (Ag). Foi utilizada concentração de ágar-ágar e agarose igual a 0,5% (Tabela 1), referente a massa molar dos compostos, acrescidos de 30 mL de água destilada. Esta solução foi mantida em banho-maria em uma manta de aquecimento a 95°C (série Electromantle EMX e EMV) por 3 horas, com posterior resfriamento a 55°C. Decorrido o tempo de resfriamento foi adicionado o colágeno puro (30 g) e homogeneizado, obtendo as soluções filmogênicas.

Tabela 1- Massa das soluções de Ágar - Ágar e Agarose

Substâncias	Massa de Ágar-Ágar e Agarose (g) a 0,5%
Ágar-ágar	0,3005
Agarose	0,3006

Fonte: Aatoria própria.

Foram colocados 7g das respectivas soluções filmogênicas em placas de Petri de 5,3 diâmetros e conduzidas a estufa de secagem a 40°C ± 2°C por 24 horas.

4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE

Foram produzidos dois tipos de filmes, com colágeno classificado (30 g) adicionados de ágar-ágar (Aa) ou de agarose (Ag). Para a produção das soluções de ágar-ágar e agarose foi utilizada a concentração indicada na Tabela 1, com acréscimo de 100 mL de água destilada. As soluções foram mantidas em banho-maria a 95°C (série Electromantle EMX e EMV) por 3 horas, com posterior resfriamento a 55°C, onde foi adicionado o colágeno classificado (30g) e homogeneizado, obtendo as soluções filmogênicas.

Foram colocados 7g das respectivas soluções filmogênicas em placas de Petri de 5,3 cm de diâmetro e conduzidas a estufa de secagem a 40°C ± 2°C por 24 horas.

4.6 PROCESSO DE LAMINAÇÃO DOS FILMES DE COLÁGENO CLASSIFICADO COM ÁGAR-AGAR E AGAROSE

Foram produzidos filmes puros de ágar-ágar e agarose, conforme concentração descrita na tabela 2, acrescidos de 100 mL de água destilada. As soluções foram mantidas em banho-maria a 95°C (série Electromantle EMX e EMV) por 3 horas. Também foram produzidos filmes de colágeno classificado (FCc), como apresentado no Item 4.3. Em seguida, foram adicionados 7g das respectivas soluções em placas de Petri de 5,3 cm de diâmetro e, conduzidas à estufa de secagem a 40°C ± 2°C por 24 horas.

Tabela 2- Massa das soluções de Ágar-ágar e Agarose para produção de filmes

Substâncias	Massa de Ágar-Ágar e Agarose (g) a 0,5%
Ágar-ágar	0,5233
Agarose	0,5039

Fonte: Autoria própria.

Decorrido o tempo de secagem de todos os filmes, os mesmos foram divididos em dois grupos: filmes sem laminação (filmes puros de ágar-ágar e de

agarose), filmes de soluções de ágar-ágar e agarose acrescidos de colágeno puro ou colágeno classificado e, filmes puros de ágar-ágar e agarose sendo conduzidos ao processo de laminação. Os filmes sem laminação foram mantidos em dessecador a umidade relativa de 55%.

Para o processo de laminação, os filmes de colágeno classificado (FCc), produzidos conforme o item 4.3, foram assentados sobre uma folha de silicone onde foram colados filmes puros de ágar-ágar a agarose, como descrito no item 4.4. Os filmes de colágeno classificado foram umidificados com água destilada e acrescentados aos filmes de ágar-ágar e agarose, separadamente. Na sequência, foram retiradas as bolhas de ar com auxílio de um bastão de vidro e conduzidos à secagem, em estufa (Marconi - Linha MA 032/1) a 40°C por 24 horas.

4.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES

Os filmes produzidos nos itens 4.4, 4.5 e 4.6, conforme apresentado no Quadro 1, foram caracterizados segundo espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), índice de intumescimento, espessura e umidade.

Quadro 1- Constituição dos filmes de ágar-agar, agarose e colágeno

Constituição dos filmes	Abreviações
Ágar-ágar 0,5 %	Aa 0,5 %
Agarose 0,5 %	Ag 0,5 %
Colágeno puro + Ágar-ágar 0,5 %	Cp – Aa 0,5 %
Colágeno puro + Ágarose 0,5 %	Cp – Ag 0,5 %
Colágeno classificado + Ágar-ágar 0,5 %	Cc – Aa 0,5 %
Colágeno classificado + Ágarose 0,5 %	Cc – Ag 0,5 %
Filme laminado de colágenoclassificado + Agarose 0,5 %	Ag 0,5 % + FCc
Filme laminado de colágeno classificado + Ágar-ágar 0,5 %	Aa 0,5 % + FCc
Filme de colágeno classificado	FCc

Fonte: Autoria própria.

4.7.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os filmes foram analisados por meio da espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), com objetivo de verificar as bandas características de cada material, detectar mudanças na estrutura e a interação entre os polímeros dos filmes. Foram realizadas varreduras de 60 scans na região espectral entre 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 2 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro acoplado modelo Varian AA240Z com tensor 27 (Bruker Optik GmbH), revestido de sulfeto de zinco e com ponta de diamante.

4.7.2 Índice de Intumescimento

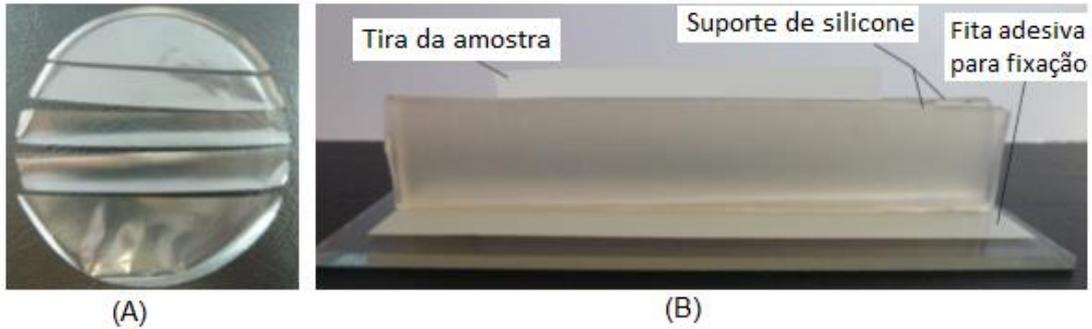
O índice de intumescimento foi realizado segundo método gravimétrico para determinar a capacidade de absorção de água dos filmes (GABAS e CAVALCANTI, 2003).

O peso inicial dos filmes foi obtido após secagem em estufa (Marconi - Linha MA 032/1) a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, com posterior medida do diâmetro ($\varnothing_{\text{seco}}$), com auxílio de uma régua. Na sequência, os filmes foram imersos em placas de Petri com água destilada com pH 6,2, por 5 minutos. Após, os filmes foram colocados em papel absorvente, para retirada do excesso de água superficial, sendo conduzidos a novas pesagens e medições dos diâmetros ($\varnothing_{\text{umido}}$). Os resultados foram expressos em diâmetro (\varnothing) (cm).

4.7.3 Espessura

Para determinar a espessura dos filmes foi utilizado o programa Leica Application Suíte v3.2.0, acoplado ao microscópio ótico digital (AMSCOPE 40X-1000X). Os filmes foram cortados em corpos de prova de 0,5 cm x 10 cm, fixados em placas de silicone (Figura 4 A e B) e conduzidos ao microscópio. O resultado foi expresso em micrômetros (μm).

Figura 4- Corte dos filmes (A) e estrutura de silicone (B)



Fonte: PÄTZOLD (2014).

4.7.4 Determinação da umidade pelo método da titulação Karl-Fischer

A umidade dos filmes foi determinada pelo método da Titulação Karl-Fischer, segundo a técnica coulométrica de Bruttel e Schlink (2009). O teor de água foi calculado conforme a equação 1 e o resultado expresso em porcentagem, relacionando os pesos em gramas das amostras secas e úmidas.

$$m = \frac{M \cdot Q}{z \cdot F} \quad (1)$$

Onde:

m – massa da substância (g)

M – massa molar da substância (g)

Q – quantidade de carga medida (A/s)

z - número de elétrons trocados (núm. equivalência, núm. de carga)

F – equivalente eletroquímico (1F = 96.485 Coulomb/mol)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DOS FILMES DE COLÁGENO PURO COM ÁGAR-ÁGAR E AGAROSE

As análises dos espectros obtidos, a partir das bandas de absorção vibracionais e seus valores reconhecidos, indicam picos de absorção de acordo com o grupo funcional ou tipo de ligação ali existente. Os comprimentos de onda (cm^{-1}) observados nas estruturas dos filmes estão descritos na Tabela 3, de acordo com as bandas vibracionais características de cada tipo de ligação.

Tabela 3 - Tipos de ligações e bandas características para o Colágeno, Ágar-ágar e Agarose

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tipo de ligação
3425 - 3295	NH – valência
2925 - 2926	CH_2 – deformação
1658 - 1653	C=O – valência
1552 - 1541	NH – deformação
1456 - 1454	CH_2 - deformação
1338	CH_2 – deformação
1242 - 1240	NH – deformação
1205	CN - valência
1083 - 1080	C-O- valência
1032	C-O- valência

Fonte: PÄTZOLD (2014).

O grupamento amina das proteínas apresenta bandas características com comprimentos de onda em $1658 \dots 1653 \text{ cm}^{-1}$ (amida I), $1552 \dots 1541 \text{ cm}^{-1}$ (amida II) e em $1242 \dots 1240 \text{ cm}^{-1}$ (amida III). Nas estruturas secundárias de proteínas pela análise de infravermelho por Transformada de Fourier (IV) há a absorção da amida I, no intervalo de 1600 a 1700 cm^{-1} , sendo essa diretamente relacionada ao tipo de estrutura secundária, como por exemplo, o estiramento C=O dos grupos. A amida II está relacionada ao estiramento da ligação CN e também ao dobramento da ligação NH. Segundo Pätzold, (2014) o estiramento do grupo NH e OH dos aminoácidos das proteínas decorre da amida I e pode ser identificada devido à presença de bandas intensas e largas.

As bandas características apresentadas pelos materiais analisados podem apresentar alterações quanto aos seus comprimentos de onda observados. Essas alterações referentes à presença da molécula de água estão indicadas para os comprimentos de onda existente nas faixas de 3000 a 3500 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} , relativos aos estiramentos de NH-valência e NH-deformação (LEITE, 2008), como mostra a Tabela 3.

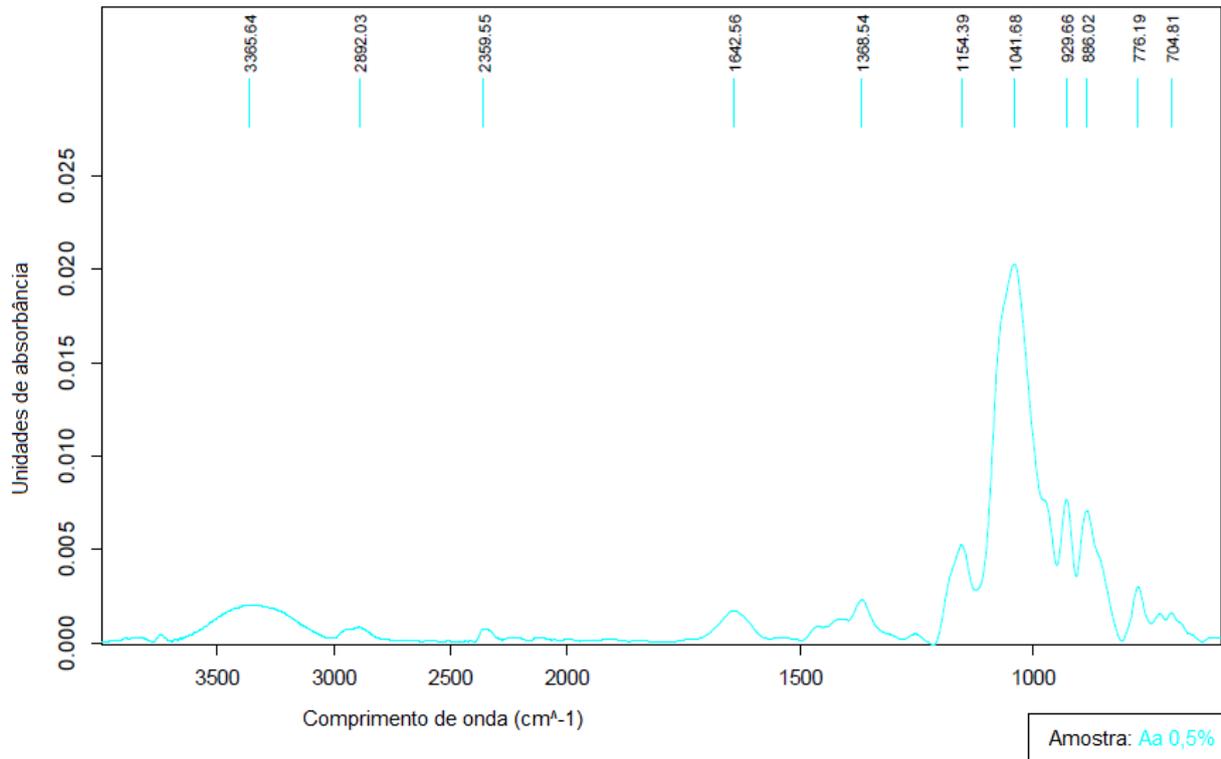
A presença da molécula de água pode alterar essas bandas de forma que existam combinações e ressonâncias, bem como, a existência de vibrações que apresentem as mesmas energias e, por tanto, as mesmas bandas (LEITE, 2008).

Por sua vez, os picos observados nas amostras de ágar-ágar e agarose indicam a constituição desses materiais a partir de subunidades de galactose, que, por sua vez, são formados por ligações entre átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. As amostras de ágar-ágar com bandas vibracionais na faixa de 1620 a 1650 cm^{-1} indicam maior adsorção de água pela molécula (PÄTZOLD, 2014).

5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DOS FILMES DE ÁGAR-ÁGAR 0,5% E AGAROSE 0,5%

Os espectros obtidos dos filmes de ágar-ágar 0,5% e agarose 0,5%, apresentados nas figuras 5 e 6, respectivamente, mostram que os comprimentos de onda registrados estão aproximados. Porém, quando se trata das intensidades de absorbância registradas, a agarose 0,5% apresenta bandas de absorção mais intensas, para os mesmos picos, que do ágar-ágar, entre as intensidades de 3360 e 1041.53 cm^{-1} .

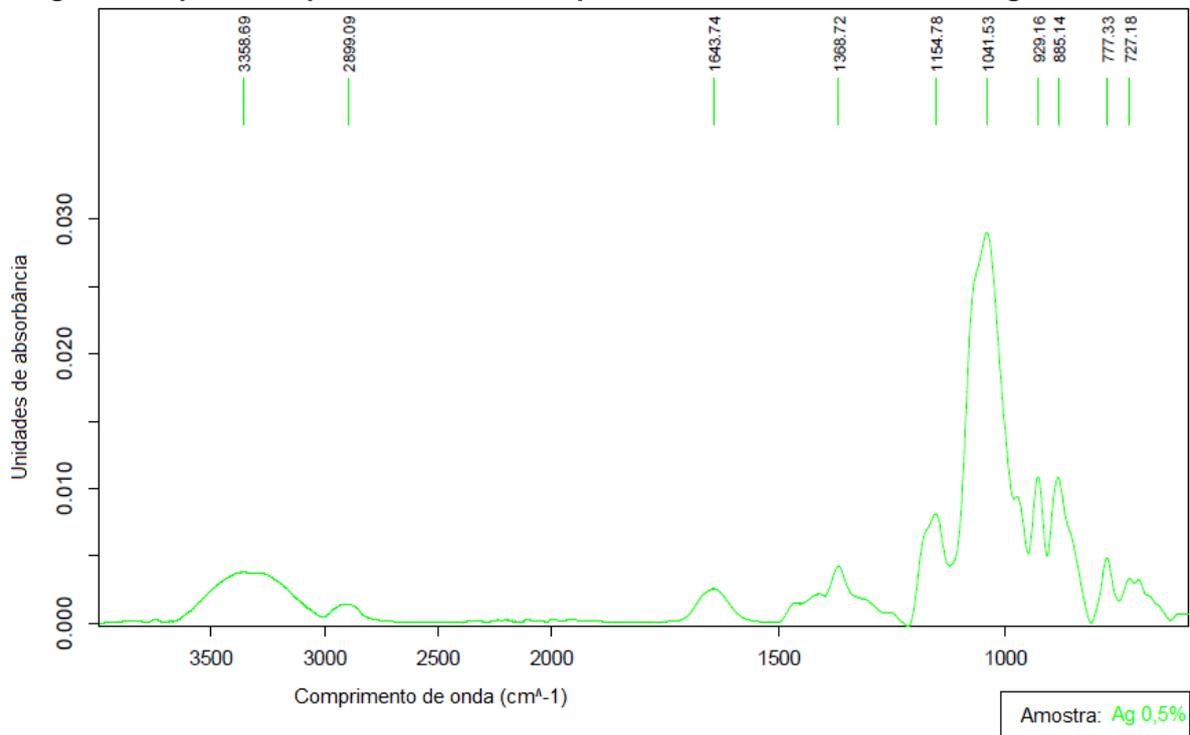
Figura 5- Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier do ágar-ágar 0,5%



Fonte: Espectrômetro (Varian AA240Z), (2014).

Os valores de comprimentos de onda, 1642,56, 1154,39, 1041,68 e 929,66 cm⁻¹ observados nas figuras 5 e 6, indicam respectivamente a presença das ligações NH – deformação, CN – valência, C-O-C- valência e NH – deformação para as amostras de Aa e Ag puras na concentração de 0,5%.

Figura 6- Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier da agarose 0,5%



Fonte: Espectrômetro (Varian AA240Z), (2014).

Dessa forma, o ágar-ágar, constituído de agarose mais agarpectina, apresenta as menores intensidades vibracionais, devido à constituição neutra da agarose e à carga levemente negativa do polímero agarpectina.

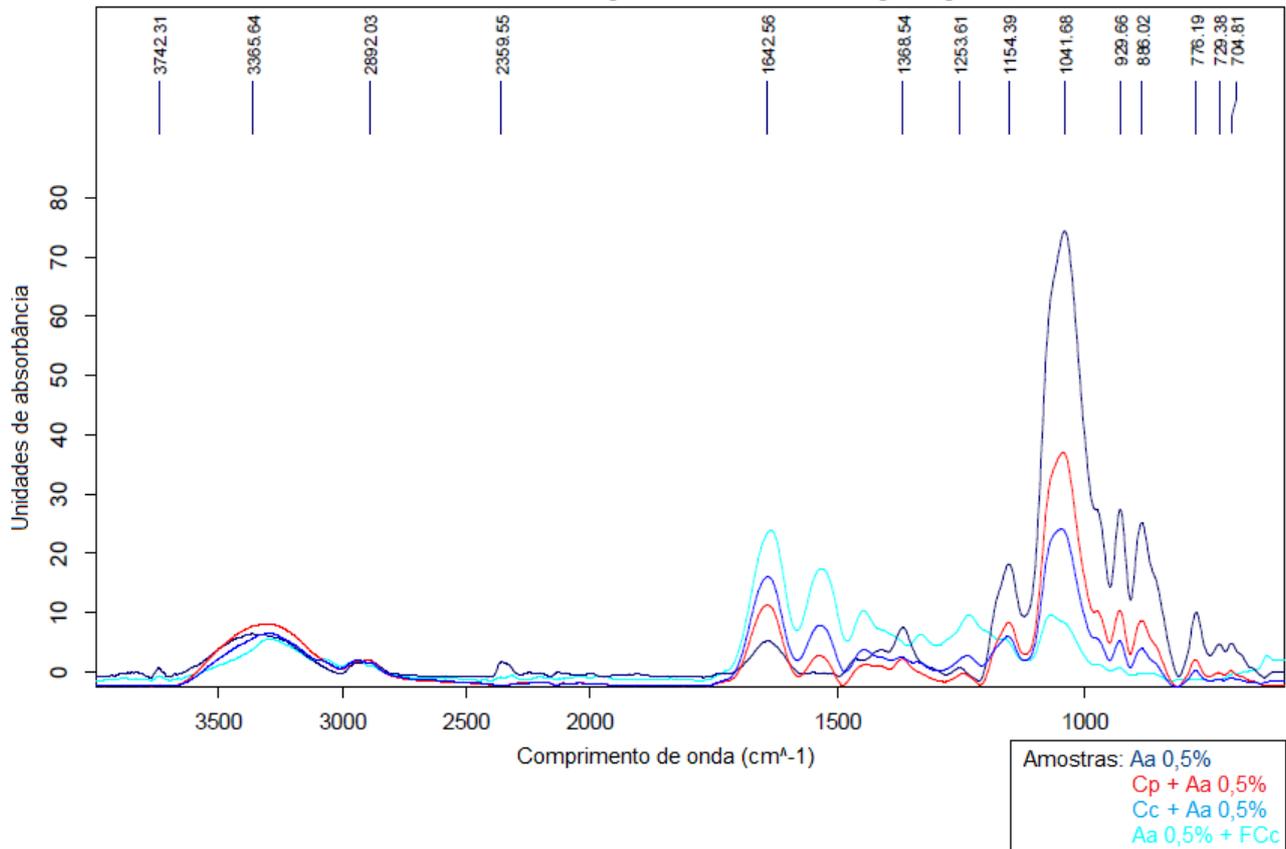
Estudos realizados por Pätzold (2014) comprovam que, para um mesmo perfil espectral, existem diferenças referentes às intensidades de absorção dos grupos funcionais presentes no ágar-ágar e na agarose. Essas diferenças de intensidade de absorção ocorrem devido às bandas vibracionais dos grupos funcionais dos aditivos, como no caso, colágeno puro ou classificado.

5.3 COMPARAÇÃO DOS FILMES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

As figuras 7 e 8 mostram a comparação entre os espectros de infravermelho dos filmes de ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno puro acrescidos de ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno classificado acrescidos de ágar-ágar 0,5% e filme

laminado de colágeno classificado acrescidos de ágar-ágar 0,5 %. Os espectros demonstram que o ágar-ágar e a agarose puros, para os mesmos comprimentos de onda, possuem bandas vibracionais mais intensas, em relação aos outros filmes.

Figura 7-Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier do ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno puro + ágar-ágar 0,5%, filmes de colágeno classificado + ágar-ágar 0,5% e Filme laminado de colágeno classificado + ágar-ágar 0,5 %



Fonte: Espectrômetro (Varian AA240Z), (2014).

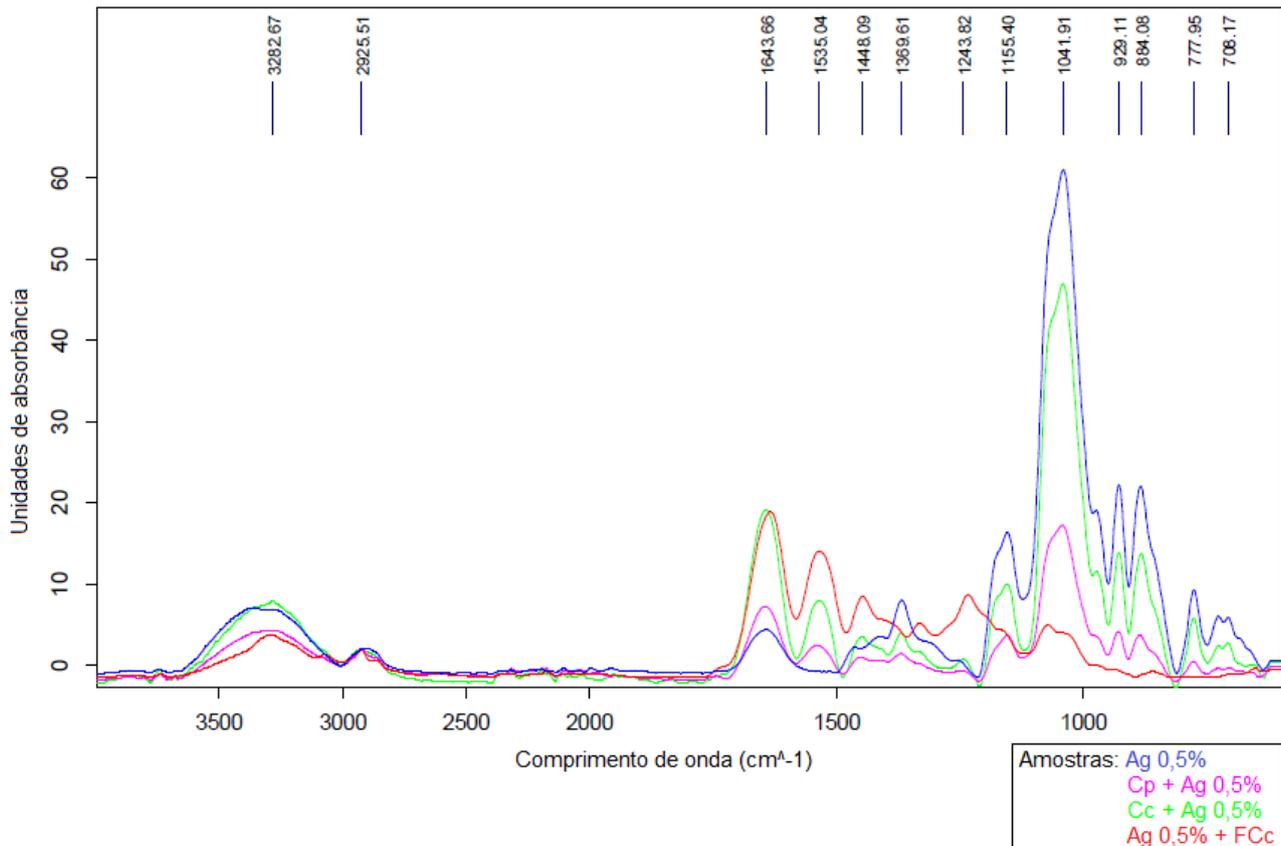


Figura 8- Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier da agarose 0,5%, filmes de colágeno puro + agarose 0,5%, filmes de colágeno classificado + agarose 0,5% e Filme laminado de colágeno classificado + agarose 0,5 %

Fonte: Espectrômetro de Absorção Atômica (Varian AA240Z), (2014).

Nos filmes com adição de colágeno puro ou classificado foram observados maiores bandas vibracionais, como mostram as figuras 7 e 8. Isso pode ter ocorrido devido à presença de maiores cadeias e do resultado de uma maior interação entre as unidades estruturais, presentes nas moléculas de colágeno puro, do ágar-ágar e da agarose.

Os picos de absorção iguais a 2925,51, 1643,66, 1535,04, 1448,09, 1243,82, 1154 e 929 cm^{-1} , encontrados nos filmes apresentados nas figuras 7 e 8, indicam ligações do tipo NH_2 – deformação, NH – deformação, CH_2 – deformação, NH – deformação e C-O-C – valência. Também se observa que para um mesmo comprimento de onda, 1643, 1155, 1041 e 929 cm^{-1} , há maiores intensidades de absorbância nos filmes laminados de Ag 0,5% + FCc, comparados com os filmes laminados de Aa 0,5% + FCc, indicando que a ocorrência de maiores taxas de absorção para bandas vibracionais características, observadas nos filmes, podem sugerir deformações angulares da ligação C-H, bem como, estiramentos

assimétricos dos grupos hidroxila O-H, participantes das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, segundo Schillemer (2013).

De modo geral, os filmes laminados de colágeno classificado (FCc) apresentaram menores bandas vibracionais em relação ao ágar-ágar. O ágar-ágar é constituído por uma mistura heterogênea de agarpectina e agarose, onde ambas apresentam bases diferentes, e a presença de uma carga neutra e um menor grau de complexidade química da agarose a torna menos suscetível a interações com outras biomoléculas, segundo Raphael (2010).

O ágar-ágar acrescido ou não de colágeno puro ou classificado apresentou maior possibilidade de absorção de umidade, pois o mesmo apresenta uma capacidade de absorção de água de cerca de até vinte vezes seu próprio peso, podendo expandir consideravelmente (RAPHAEL, 2010).

5.4 ÍNDICE DE INTUMESCIMENTO DOS FILMES

Com base nas variações de diâmetro observadas, os filmes com adição de colágeno classificado, e entre os filmes laminados aderidos a um filme de colágeno classificado, o processo de laminação não interferiu na capacidade de intumescimento dos filmes (Tabela 4).

O filme com maior variação de umidade ($\Delta\emptyset = 1,3$ cm) foi o filme de colágeno classificado (FCc) (Tabela 4), o que o torna com maior capacidade de absorção de umidade. O colágeno, sendo uma proteína, possui aproximadamente 35% dos aminoácidos hidrofílicos, o que favorece a grande afinidade com as moléculas de água, tendo alta capacidade de absorção (WOLF, 2007).

De modo geral, a adição do ágar-ágar favoreceu a absorção de água pelos filmes (Tabela 4), sendo confirmada pela análise de FTIR (figuras 7 e 8).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para as pesagens de massa seca (m_{seca}), massa úmida ($m_{úmida}$) e variação de massa (Δ_m) em gramas, bem como os diâmetros das amostras secas (\emptyset_{seca}), úmidas ($\emptyset_{úmida}$) e as variações dos mesmos ($\Delta\emptyset$) em centímetros.

Tabela 4 - Medidas das massas e diâmetros dos filmes relacionados ao índice de intumescimento

Filmes	m_{seca}(g)	m_{úmida}(g)	Δ_m(g)	Ø_{seca}(cm)	Ø_{úmida}(cm)	Δ_Ø (cm)
Aa 0,5 %	0,0405	0,2438	0,2033	5,4	5,5	0,1
Ag 0,5 %	0,0504	0,2039	0,1535	4,9	5,2	0,3
Cp – Aa 0,5%	0,4187	0,7120	0,2933	5,5	5,5	0,0
Cp – Ag 0,5%	0,0718	0,4075	0,3357	4,9	5,0	0,1
Cc – Aa 0,5%	0,0493	0,4071	0,3578	5,4	5,5	0,1
Cc – Ag 0,5%	0,0576	0,3501	0,2925	5,1	5,2	0,1
Aa 0,5% + FCc	0,0699	0,5155	0,4456	5,5	5,7	0,2
Ag 0,5% + FCc	0,0654	0,3739	0,3085	5,1	5,3	0,2
FCc	0,0399	1,0510	1,0111	5,6	6,9	1,3

Nota: Aa 0,5% = Ágar-ágar 0,5%; Ag 0,5% = Agarose 0,5%; Cp-Aa 0,5%= Colágeno puro + Ágar-ágar 0,5%; Cp- Ag 0,5%= Colágeno puro + Agarose 0,5%; Cc – Aa 0,5% = Colágeno classificado + Ágar- ágar 0,5%; Cc – Ag 0,5% = Colágeno classificado + Agarose 0,5%; Aa 0,5% + FCc = Ágar-ágar 0,5% + Folha de colágeno classificado; Ag 0,5% + FCc = Agarose 0,5% + Folha de colágeno classificado; FCc = Folha de colágeno classificado.

Segundo Bierhalz (2010), o grau de intumescimento do filme está relacionado à força osmótica da rede polimérica, sendo igualada à força elástica do material. A força elástica dos segmentos se mostra inversamente proporcional à capacidade de intumescimento do filme, sendo limitada pela rigidez do polissacarídeo, pelo grau de reticulação e por associações intra e intermoleculares. Dessa forma, se pode afirmar que, quanto menor a variação do diâmetro do material após o intumescimento, maior é a força reticular da rede polimérica, e menor a capacidade de absorção de água pelo mesmo.

As menores taxas de absorção de água foram observadas nos filmes produzidos a partir de ágar-ágar 0,5% e agarose 0,5% (Tabela 4), o que favorece a formação de filmes para armazenar produtos que requeiram proteção à umidade.

Para Lopes, Lobo e Costa (2005), uma maior capacidade de absorção de água e altas taxas de degradação, proporcionam filmes com propriedades mecânicas insatisfatórias, sendo desvantagens apresentadas por polímeros obtidos de fontes renováveis. Para minimizar este aspecto, uma forma simples e de baixo custo, seria a utilização de blends poliméricas, como confirmam os dados obtidos nos filmes com a adição de colágeno puro (Cp) ou colágeno classificado (Cc) durante sua produção.

Bierhalz (2010) afirma em seu estudo que, o elevado grau de intumescimento dos filmes, ocorre de forma geral nos primeiros minutos em que o mesmo entra em contato com a água, afetando propriedades como difusividade. O mesmo não pode ser constatado nesse estudo, pois não foi considerado o tempo em que os filmes ficaram expostos ao contato com o meio aquoso.

5.5 ESPESSURA DOS FILMES

A espessura dos filmes apresentam variações entre 12 μm e 29,69 μm , como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Espessuras dos filmes

Filmes	Espessura (μm)
Aa 0,5%	12,07
Ag 0,5%	14,02
Cp - Aa 0,5%	27,93
Cp - Ag 0,5%	28,67
Cc - Aa 0,5%	13,82
Cc - Ag 0,5%	12,07
Aa 0,5% + FCc	29,69
Ag 0,5% + FCc	29,69
FCc	28,53

Nota: Aa 0,5% = Ágar-ágar 0,5%; Ag 0,5% = Agarose 0,5%; Cp-Aa 0,5%= Colágeno puro + Ágar-ágar 0,5%; Cp- Ag 0,5%= Colágeno puro + Agarose 0,5%; Cc – Aa 0,5% = Colágeno classificado + Ágar- ágar 0,5%; Cc – Ag 0,5% = Colágeno classificado + Agarose 0,5%; Aa 0,5% + FCc = Ágar-ágar 0,5% + Folha de colágeno classificado; Ag 0,5% + FCc = Agarose 0,5% + Folha de colágeno classificado; FCc = Folha de colágeno classificado.

A Figura 9 mostra espessuras do filme de agarose 0,5%, determinadas com auxílio do microscópio ótico.

Figura 9- Espessura do filme de agarose 0,5% em microscópio ótico



Fonte: PÄTZOLD (2014).

Segundo Gabas e Cavalcanti (2003), características como a concentração e quantidade dos materiais utilizados na elaboração dos filmes, produzidos a partir de polissacarídeos, são de fundamental importância pois interferem diretamente no arranjo molecular do filme.

Os filmes com ágar-ágar e agarose a 0,5% e os adicionados de colágeno classificado apresentaram menores valores de espessura. Este aspecto pode estar relacionado ao processo de produção do colágeno classificado, onde o mesmo foi peneirado, obtendo com a homogeneização, maior compactação do arranjo molecular.

As maiores espessuras foram observadas nos filmes laminados, Aa 0,5% + FCc e Ag 0,5% + FCc (Tabela 5), devido o processo de laminação.

Entre os filmes com colágenos, foi verificado que o colágeno puro favoreceu o aumento da espessura, em relação aos outros filmes produzidos com colágeno classificado. Isso pode ter ocorrido pois o colágeno puro não foi submetido a um processo de homogeneização da mistura, como foi feito com os filmes de colágeno classificado.

No estudo realizado por Bierhalz (2010), assim como neste trabalho, foi possível observar que as medidas de espessura do material estão diretamente relacionadas com as tensões internas e de ruptura do mesmo, sendo inversamente

proporcionais à permeabilidade aos gases O₂ e CO₂ e ao vapor d'água. Considerando estes aspectos, há indicativo de que os filmes Cc + Aa 0,5%, Cc + Ag 0,5%, e os filmes laminados de Aa 0,5% + FCc e Ag 0,5% + FCc com maiores espessuras podem apresentar características de menores permeabilidades à gases e ao vapor de água.

5.6 UMIDADE DOS FILMES

Pela titulação de Karl Fischer foram obtidos os teores de umidade dos filmes, por meio dos pesos das massas, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Teor de umidade dos filmes pelo método de Karl Fischer

Amostra	m_{P1}(g)	m_{P2}(g)	m_{P3}(g)	Teor de umidade (%)
Aa 0,5 %	10,0012	9,9890	0,0122	17,2
Ag 0,5 %	9,8362	9,8230	0,0132	17,2
Cp – Aa 0,5%	10,0375	10,0137	0,0238	31,6
Cp – Ag 0,5 %	9,9532	9,9346	0,0186	22,1
Cc – Aa 0,5%	9,8481	9,8299	0,0182	22,3
Cc – Ag 0,5 %	10,0273	10,0111	0,0162	21,2
Aa 0,5 % + FCc	9,9014	9,8807	0,0207	24,4
Ag 0,5 % + FCc	10,0196	10,0110	0,0086	24,5
FCc	10,0519	10,0346	0,0173	20,2

Nota: Aa 0,5% = Ágar-ágar 0,5%; Ag 0,5% = Agarose 0,5%; Cp-Aa 0,5%= Colágeno puro + Ágar-ágar 0,5%; Cp- Ag 0,5%= Colágeno puro + Agarose 0,5%; Cc – Aa 0,5% = Colágeno classificado + Ágar- ágar 0,5%; Cc – Ag 0,5% = Colágeno classificado + Agarose 0,5%; Aa 0,5% + FCc = Ágar-ágar 0,5% + Folha de colágeno classificado; Ag 0,5% + FCc = Agarose 0,5% + Folha de colágeno classificado; FCc = Folha de colágeno classificado.

Os filmes de ágar-ágar a 5% e agarose 5% apresentaram menores teores de umidade 17,2% e com maior teor, 31,6%, foi verificado no filme de colágeno puro + ágar-ágar 5% (Cp – Aa 0,5%), confirmada pelo índice de intumescimento (Item 5.4)

Segundo Ferreira (2015) o formato e a capacidade de um material de absorver água são resultantes da formação de canais condutores, que influenciariam na umidade da matriz filmogênica. Com a diminuição desses canais condutores de umidade, a transferência do vapor d'água pela espessura do filme apresenta um comprometimento.

De acordo com um estudo realizado por Banker (1996), o grau de afinidade de um material proteico pela água pode influenciar no transporte de massa pelo filme, alterando o fator de umidade do mesmo. Segundo Assis, Forato e Britto (2008), os filmes formados por proteínas, como o colágeno, apresentado nesse trabalho, podem apresentar propriedades significativas para proteção do produto embalado da ação do oxigênio.

6 CONCLUSÃO

Os filmes com adição de ágar-ágar acrescido ou não de colágeno puro ou classificado apresentam maior possibilidade de absorção de umidade.

O processo de laminação não interferiu na capacidade de intumescimento dos filmes. A maior variação no índice de intumescimento foi observada no filme de colágeno classificado (FCc).

O processo de laminação favoreceu o aumento da espessura dos filmes, indicando menores possibilidades a permeabilidades a gases e ao vapor de água.

O filme de ágar-ágar 0,5% com colágeno puro (Cp – Aa 0,5%) apresentou maior teor de umidade, indicando uma possível formação de mais canais condutores de umidade e interações com moléculas de água.

A produção de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose mostrou ser satisfatória. No entanto, é possível afirmar que os biofilmes produzidos a partir de ágar-ágar favorecem a absorção de umidade devido à sua grande capacidade de absorção de água. Dessa forma, os mesmos não poderiam ser utilizados como embalagens para produtos que requerem proteção contra a umidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Cristina T.; GARCIA, Rosangela B.; LOBÃO, Marcos W. N.. **Aplicação de modelo matemático às propriedades reológicas de géis mistos de agarose e de goma guar**. Programa de Engenharia Química, Rio de Janeiro. 24 out. 1996.

AQUINO, Emerson V. de. **Titulação em Fluxo Monossegmentado, 2005**. 140 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ASSIS, G.; FORATO, A.; BRITTO, A.de. Revestimentos comestíveis protetores em frutos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, v.22, n.160, p. 99-106, 2008.

BARTH, A. Review: Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimicaet Biophysica Acta, Amsterdam**, v. 767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BANKER, G. S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmacology Science**, v. 55, p. 81, 1966.

BIERHALZ, Andréa K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina btm e de pectina btm/alginato reticulados com cálcio**.137 f. Tese (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia de Processos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRUTTEL, P; SCHLINK, R. **Wasserbestimmungdurch Karl-Fischer-Titration**.2003. 81 f. Herisal, Suíça, 2009.

EVORA, Maria; GONÇALEZ, L.; DUTRA, Rita; DINIZ, M.; WIEBECK, H.; SILVA, L. Comparação de Técnicas FTIR de Transmissão, Reflexão e Fotoacústica na Análise de Poliamida-6, Reciclada e Irradiada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 12, n. 1, p.60-68, mar. 2002.

FANI, Márcia. Agar Agar - Origem e diversidade de aplicações. **Aditivos & Ingredientes**. São Paulo: Editora Insumos Ltda., v. 95. fev. 2003.

FANI, Márcia. Agar-Agar - O mais antigo fitocolóide. **Aditivos & Ingredientes**. São Paulo: Editora Insumos Ltda., v.56, mai/jun. 2008. 31p.

FERREIRA, Diana M. O. **Extração de ágar de algas vermelhas do gênero Gracilaria**.112 f. Tese Mestrado–Engenharia de Processos, Engenharia de processos químicos e biológicos, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, 2015.

FORATO, L. A.; YUSHMANOV, V. E.; COLNAGO, L. A. **Interaction of two prolamins with 1-13C oleic acid by 13C NMR+**. *Biochemistry*, Washington v. 43, n. 22, p. 7121- 7126, 2004.

FORATO, Lucimara; FILHO, Rubens; OSIRO, Denise; BICUDO, Tatiana; COLNAGO, Luiz. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010. 14 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos 51, ISSN 1518-7179; 51).

FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO, José Carlos. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.811-816, 2006.

GABAS, Victor; CAVALCANTI, Osvaldo. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 4, n. 39, p.441-448, 2003.

GARCÍA, M; *et al.*. Characterization of composite hydrocolloid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 339-345, 2004.

GARCIA, Rosângela B.; ANDRADE, Cristina T. **Propriedades mecânicas de hidrogéis de misturas agarose-k-carragenana e agarose-guar**. Instituto de Macromoléculas, 6 p. 1991.

HENRIQUE, Celina Maria; CEREDA, MarneyPascoli; SARMENTO, Silene Bruder Silveira. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de

amidos modificados de mandioca: Physical characteristics of cassava modified starch films. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p.231-240, 2008.

LAURINDO, J. B.; PELEG, M. Mechanical measurements in puffed Rice. **Journal of Texture Studies**, v.38, p.619-634, 2007.

LAWSON, A. C.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-Calcium phosphate composites. **Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, p. 413 – 425, 1998.

LEITE, Joana G.. **Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património**. 76 f. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2008.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto, v. 41, n. 2, p.143-155, abr. 2005. Trimestral.

MONTERREY-QUINTERO, Ednelí; SOBRAL, Paulo. Preparo E Caracterização De Proteínas Miofibrilares De Tilápia-Do-Nilo Para Elaboração De Biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p.179-189, 2000.

OLIVEIRA, Isaac Porfírio de *et al.* **Determinação do equilíbrio de fases para o sistema gasolina e álcool**. 4o PDPETRO, Campinas, São Paulo. 21-24 out. 2007.

PÄTZOLD, Antje. **Präparation und Untersuchung von Kollagenfolien**, p. 116. Masterarbeit. HTW, Dresden, 2014.

RABELLO F., *et al.* **Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis**. 2005. J. Dairy Sci. 88:3211-3219. Rio de Janeiro.

RAPHAEL, Ellen. **Estudo de eletrólitos poliméricos à base de ágar para aplicação em dispositivos eletrocromáticos**. 2014. 147 f. Curso de Físico-química Orgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SCHLLEMER, Magalí. **Preparação e caracterização de biofilmes à base de manipueira para imobilização de caulinita intercalada com ureia**. 2013. 103 f. Tese - Curso de Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

SIGMA. Productinformation: **agarose**. 1996. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a9539pis.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

SILVA, Tatiane; PENNA, Ana. **Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais**. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2012, vol.71, n.3, p. 530-539. ISSN 0073-9855.

SOBRAL, P. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, v. 8, n.1, p.60-67, 1999.

SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre as suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.1-14, 2000.

THEMUDO, Marta. **Aplicação do método de Karl Fischer a materiais que só libertam água a temperaturas elevadas**. 1999. 85 f. Tese - Doutorado em Química, Departamento de Química, Faculdade de Ciências Universidade do Porto, Porto, 1999.

TONHI, Edivan; PLEPIS, Ana Maria. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**. v. 25, n. 6, p.943-948, 2002.

VINHAS, Glória ; ALMEIDA, Yêda ; LIMA, Maria. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1584-1588, 2007.

WOLF, Kleber. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 2007. 103 f. Tese – Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1º edição digital, p. 489- 501.