

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE
QUERATINA DE PENAS DE FRANGO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado

SÍLVIA MARIA MARTELLI
Engenheira de Alimentos

Florianópolis, 03 de fevereiro de 2005.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao meu orientador, Prof. João Borges Laurindo, pela orientação, disponibilidade e dedicação prestadas durante a execução deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Antonio Francisco Machado, por sempre estar valorizando e proporcionando melhores condições para realização do meu trabalho.

Ao CNPQ, pela oportunidade de obtenção da bolsa de estudos.

Aos colegas do laboratório PROFI, Dani, Gustavo, Patrícia, Fabinho, Eduardo, Léozão, Léo, Bruno, Clarice, Kelly, Franciny, que estiveram presentes, auxiliando, incentivando e compartilhando as conquistas.

A Geovana e a Cris, pela ajuda e pelo apoio nas horas de dificuldade e pelas discussões que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho.

A Fernanda, pela amizade, apoio e ajuda, pelas extrações de sábado à noite, pelos momentos engraçados, por me ajudar nos momentos difíceis, pelas idéias e por acreditar em mim.

A Sabrina, por estar sempre me auxiliando, pelos conselhos, pelas críticas, pela compreensão, por ouvir, por falar, pelos dias difíceis e pelos dias alegres, por tudo, enfim, por ser minha amiga mesmo...

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, que mesmo distantes, sempre se mantiveram presentes na minha vida de uma forma muito especial.

Aos meus pais, Vitório Manoel Martelli e Anair Zuffo Martelli, pelo exemplo de caráter e dignidade, e pelo carinho, apoio e confiança irrestritos, em todos os momentos de minha vida.

A você, Laerte, pela maravilhosa e constante partilha de idéias e ideais, por acreditar em mim, por ser meu “Porto Seguro”. Por sua coragem, cumplicidade, amizade, amor e compreensão infinita. Pela integridade de seu caráter e pelas lições diárias de serenidade.

“Estude as frases que parecem certas e coloque-as em dúvida”

David Riesman

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	1
<i>Introdução</i>	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	4
CAPÍTULO II	5
<i>Revisão Bibliográfica</i>	5
2.1 QUERATINAS	5
2.1.1 Aspectos gerais.....	5
2.1.2 Estrutura e composição da queratina de penas.....	7
2.1.3 Pontes dissulfeto.....	8
2.1.4 Aplicações das queratinas.....	9
2.1.5 Processos de extração/solubilização de queratina.....	10
2.2 POLÍMEROS NATURAIS BIODEGRADÁVEIS	14
2.2.1 Definição.....	14
2.2.2 Principais fontes de obtenção de polímeros naturais biodegradáveis.....	15
2.2.3 Filmes protéicos.....	16
2.2.4 Aditivos utilizados na obtenção de filmes biodegradáveis.....	18
2.2.5 Aplicações dos filmes.....	19
2.2.6 Vantagens e limitações.....	20
2.3 PRINCIPAIS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES	21
2.3.1 Densidade, propriedades estruturais e mecânicas.....	21
2.3.2 Propriedades de sorção de umidade.....	21
2.3.3 Transferência de massa através de filmes biodegradáveis.....	22
2.3.4 Material solúvel em água e Intumescimento.....	25
2.3.5 Propriedades térmicas.....	25
CAPÍTULO III	27
<i>Materiais e Métodos</i>	27
3.1 MATERIAIS	27
3.2 PRÉ-TRATAMENTO DAS PENAS	27
3.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA QUERATINA	28
3.4 PREPARO DOS FILMES	28
3.5 ANÁLISES DOS FILMES	31
3.5.1 Acondicionamento, medida das espessuras e determinação dos teores de umidade dos filmes.....	31
3.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
3.5.3 Determinação das propriedades mecânicas.....	31
3.5.4 Determinação da densidade específica (g sólidos secos /cm ³).....	32
3.5.5 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA).....	33
3.5.6 Isotermas de sorção de umidade.....	34
3.5.7 Coeficiente de solubilidade (β).....	35
3.5.8 Testes de solubilidade em água (TS)/ Intumescimento (SW).....	35
3.5.9 Análise Termogravimétrica (TG).....	36
3.5.10 Estudos realizados.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

CAPÍTULO IV	39
<i>Filmes de queratina de penas</i>	39
CAPÍTULO V	41
<i>Influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina de penas</i>	41
CAPÍTULO VI	52
<i>Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films</i>	52
CAPÍTULO VII	61
<i>Characterization of feather keratin films plasticized with sorbitol</i>	61
CAPÍTULO VIII	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Oxidação de resíduos de cisteína para formação da cistina	6
Figura 2.2 -	Estrutura da pena de frango	7
Figura 2.3 -	Esquema demonstrando as quebras das ligações S-S e das pontes de hidrogênio	8
Figura 2.4 -	Esquema (a) complexo SDS-queratina com grande quantidade de SDS e (b) complexo com pequenas quantidades de SDS	13
Figura 2.5 -	Principais matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais	16
Figura 2.6 -	Estruturas químicas do sorbitol (a) e do polietileno glicol (b)	19
Figura 2.7 -	Esquema da célula de difusão utilizada na determinação gravimétrica da PVA	23
Figura 3.1 -	Pena limpa antes da etapa de trituração e desengorduramento	28
Figura 3.2 -	Fluxograma do processo de obtenção e caracterização dos filmes de queratina	30
Figura 3.3 -	Curva típica tensão-deformação utilizada na determinação das propriedades mecânicas dos filmes	32
Figura 5.1 -	Evolução do peso das células de medida de PVA em função do tempo para PEG 400	44
Figura 5.2 -	Permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina com PEG $\times 10^{10}$	45
Figura 5.3 -	Solubilidade em água e intumescimento de filmes de queratina com PEG (4000 e 6000)	47
Figura 5.4 -	Influência da temperatura (20 °C e 30 °C) nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas com PEG 400	48
Figura 5.5 -	Influência do peso molecular do plastificante nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas a 20 °C e 35 °C	49
Figura 5.6 -	Influência da concentração de PEG 6000 nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas a 20 °C e 35 °C	50
Figura 6.1 -	SEM micrographs of CFK films without plasticizer (A) and with 0.02 g sorbitol/g keratin (B) with a magnification of 3000 \times	53
Figura 6.2 -	SEM micrographs of CFK films with 0.10 g polyethylene glycol / g keratin with a magnification of 1000 \times (A) and with 0.30 g polyethylene glycol/g keratin with a magnification of 2000 \times (B)	53

Figura 6.3 -	Effect of sorbitol concentration on the equilibrium moisture content of CFK films at two temperatures 20°C and 35°C, fitted with GAB model	55
Figura 6.4 -	Effect of temperature at 20°C empty symbol and 35°C to full symbol on the sorption isotherms of CFK films with PEG fitted with GAB model	56
Figura 6.5 -	Water solubility coefficient for films without and with plasticizers	59
Figura 7.1 -	Effect of sorbitol concentration on the equilibrium moisture content of CFK films at two temperatures 20°C (a) and 35°C (b), fitted with GAB model	64
Figura 7.2 -	Micrographs of CFK/sorbitol films with an magnification of 2000 x	66
Figura 7.3 -	Water solubility and swelling of CFK/sorbitol films	67
Figura 7.4 -	Typical stress-strain curves of CFK/sorbitol films	69
Figura 7.5 -	Termogravimetric curves of CFK/sorbitol films	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Umidades relativas obtidas através de soluções salinas saturadas a 20°C e 35°C	34
Tabela 3.2 -	Análises realizada em cada estudo desenvolvido durante o mestrado	37
Tabela 4.1 -	Resistência à tração e alongamento de filmes de queratina de penas de frango	40
Tabela 5.1 -	Umidade em base úmida e espessura para os filmes estudados	43
Tabela 5.2 -	Constantes de GAB e coeficiente de correlação a 20 °C	51
Tabela 5.3 -	Constantes de GAB e coeficiente de correlação a 35 °C	51
Tabela 6.1 -	Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films with 0.05g plasticizer/g keratin at 35°C	57
Tabela 6.2 -	Constant values and correlation coefficient (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 20°C	58
Tabela 6.3 -	Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 35°C	58
Tabela 7.1 -	Moisture content and dry matter density of chicken feather keratin/sorbitol films	62
Tabela 7.2 -	Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK/sorbitol films fitted with GAB model at 20°C and 35°C	63
Tabela 7.3 -	Water vapor permeability of CFK/sorbitol films and other protein films	65
Tabela 7.4 -	Mechanical properties of chicken feather keratin plasticized with different sorbitol concentration	68

RESUMO

As penas são um importante sub-produto da indústria de aves, gerando um problema de logística na distribuição deste resíduo, uma vez que as penas representam cerca de 7% do peso total do frango. Atualmente, no Brasil, a pena é utilizada como constituinte na ração animal, porém este produto possui um baixo valor agregado. A pena de frango é constituída por aproximadamente 90 % de queratinas, responsáveis por sua rigidez e resistência. Estas proteínas podem ser utilizadas na obtenção de materiais biodegradáveis como uma alternativa para diminuir a poluição ambiental causada pelos plásticos convencionais, além de constituírem uma fonte sustentável na produção destes materiais. Filmes obtidos a partir de proteínas podem ter inúmeras aplicações, como por exemplo, polímeros para embalagens de alimentos, sacos descartáveis e filmes utilizados na agricultura. Neste trabalho, as penas de frango foram utilizadas para a obtenção de filmes, através da utilização de dispersões de queratinas com diferentes aditivos. Aditivos foram incorporados às dispersões de queratina, buscando-se obter filmes biodegradáveis com boas propriedades mecânicas e baixa permeabilidade ao vapor d'água. Os filmes foram preparados através da técnica de "casting". Foi investigada a influência do tipo e da concentração dos aditivos utilizados na obtenção dos filmes. Os filmes de queratina, quando comparados aos filmes obtidos a partir de outras fontes protéicas largamente estudadas como a caseína e as proteínas miofibrilares de peixe, mostraram melhores propriedades de barreira ao vapor d'água. A utilização de sorbitol proporcionou a obtenção de filmes com superfície mais homogênea do que os obtidos sem plastificante, ao passo que as amostras com polietileno glicol apresentaram superfícies bastante irregulares. Este estudo demonstrou que se podem obter filmes biodegradáveis a partir de queratina de penas de frango com diferentes características, através da utilização de aditivos específicos em diferentes concentrações.

Palavras-chave: queratina, penas de frango, filmes, plastificantes.

ABSTRACT

Feathers are an important by-product of the poultry industry, generating a logistics problem for the distribution of this residue, since feathers represent around 7% of the total weight of a chicken. Currently in Brazil, feathers are utilized as a constituent of animal feed, however, this product has a low aggregated value. Chicken feathers are composed of approximately 90% keratin, responsible for their rigidity and resistance. These proteins may be utilized for obtaining biodegradable materials with a view to decreasing the environmental pollution caused by conventional plastics. Also, chicken feathers provide a sustainable source for the production of these materials. Films obtained from protein may have innumerable applications, such as polymers for food packaging, disposable bags and films used in agriculture. In this study, chicken feathers were utilized to obtain biodegradable films through keratin dispersions with different additives. Additives were incorporated into the keratin dispersions, in an attempt to obtain films with good mechanical properties and low permeability to water vapor. The films were prepared through the casting technique. The influence of the type and concentration of the additive utilized in the obtention of these films was investigated. The keratin films, when compared with films obtained from other widely studied protein sources such as casein and the myofibrillar proteins of fish, revealed better properties for achieving a barrier to water vapor. The utilization of sorbitol yielded films with a more homogeneous surface which were obtained without a plasticizer, while the samples with polyethylene glycol had quite irregular surfaces. This study showed that it is possible to obtain biodegradable films, from chicken feather keratins, with different characteristics, through the utilization of specific additives in different concentrations.

Keywords: keratin, chicken feathers, films, plasticizers

CAPÍTULO I

Introdução

Estima-se que até 2009 o crescimento mundial na produção de carne de frango irá aumentar aproximadamente 56% na China e 21% no Brasil, em comparação a produção de frangos de 1999. O aumento da demanda mundial por carne de frango é de 3 a 5 % ao ano, sendo que esta demanda está vinculada a diversos fatores, como os crescimentos econômico e populacional, o preço da carne de frango em comparação aos de outras carnes e às tendências alimentares do consumidor (MARITZ, 2004). A produção global de aves domésticas passou de 7,5 milhões de toneladas em 1961 para 58 milhões em 1998, sendo que deste total, 85% podem ser atribuídos à produção de frango (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

As penas são um importante sub-produto da indústria de frangos, gerando um problema de logística na distribuição deste resíduo. Elas representam cerca de 7% do peso total do frango, o que significa que em 1998, mais de 4 milhões de toneladas de penas estavam disponíveis em todo o mundo (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

As penas são constituídas de aproximadamente 1% de gordura, 9% de água e 90% de proteínas estruturais, as queratinas (TANABE *et al.*, 2002). Atualmente, no Brasil, a pena é utilizada como constituinte na ração animal. Entretanto, como sua digestibilidade é muito baixa, a proteína precisa ser hidrolisada antes da sua utilização. A queratina é rica em cistina, treonina e arginina, mas é deficiente em quatro aminoácidos essenciais: lisina, metionina, histidina e triptofano. Assim, estes aminoácidos precisam ser adicionados à ração através de outros ingredientes. Em média, a utilização das penas hidrolisadas na ração animal varia entre 0,5-1,5% (ARAI *et al.*, 1983; DALEV, 1994; SCHROOYEN *et al.*, 2000).

As queratinas podem ser sub-divididas em α -hélices ou β -pregueadas, dependendo da sua conformação espacial. As β -queratinas das aves formam uma família de cerca de 20 proteínas, as quais possuem uma massa molecular média de aproximadamente 10 kDa. Em escala molecular, a característica mais distinta das queratinas é a alta concentração de resíduos de cisteína (cerca de 7-20% do total de aminoácidos residuais). Sendo que, a maioria destes resíduos de cisteína estão localizados nas regiões terminais das proteínas e são

responsáveis pela habilidade da queratina em formar filmes (YAMAUCHI *et al.*, 1996). Outra característica da queratina é sua alta organização molecular, o que proporciona a esta proteína excelente resistência mecânica (FEUGHELMAN e KROSCWITZ, 1985).

Por outro lado, na grande maioria dos países, a poluição ambiental causada por polímeros sintéticos assumiu proporções perigosas. Para evitar o acúmulo de lixo, países de todos os continentes vêm desenvolvendo novas legislações ambientais para o controle do uso e do descarte de materiais poliméricos após sua utilização e investindo na pesquisa de novos materiais que sejam compatíveis com o meio ambiente (AMASS *et al.*, 1998). Neste contexto, os polímeros naturais biodegradáveis surgiram como uma alternativa para diminuir a poluição ambiental causada pelos plásticos convencionais, além de utilizar fontes sustentáveis, tais como as proteínas das penas, na produção destes materiais.

Plásticos de origem petroquímica, tais como os poliésteres e as poliamidas tem sido largamente utilizados como materiais para embalagens, devido a sua disponibilidade em grandes quantidades a baixo custo e as suas características funcionais favoráveis, tais como boa elasticidade e resistência ao rompimento, boas propriedades de barreira à água, ao O₂ e a compostos aromáticos e estabilidade ao calor. Por outro lado, são não-biodegradáveis, levando a poluição ambiental e causando sérios problemas ecológicos. Desta forma, no futuro, seu uso deve ser restringido gradualmente, em favor do uso de polímeros biodegradáveis (THARANATHAN, 2003).

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi a utilização de queratina extraída de penas de frango como matéria-prima básica para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, além da incorporação de aditivos nos filmes, tais como plastificantes, visando melhorar suas propriedades como a flexibilidade, afinidade com a água (higroscopicidade) e as propriedades de barreira ao vapor d'água.

Os objetivos específicos incluíram:

- Adição de sorbitol em diferentes concentrações e caracterização dos filmes obtidos quanto as propriedades mecânicas, microestrutura, higroscopicidade e isotermas de sorção de umidade;
- Adição polietileno glicol com diferentes massas moleculares na dispersão de queratina com o objetivo de avaliar a influência da massa molecular deste plastificante na permeabilidade ao vapor d'água e isotermas de sorção de umidade das amostras.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este estudo está estruturado em capítulos. O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica referente a assuntos tais como a estrutura e a composição química da queratina, as pontes dissulfeto responsáveis pelas características singulares desta proteína, as aplicações e os principais métodos de solubilização da queratina. Além disto, a revisão aborda assuntos como a síntese de filmes biodegradáveis obtidos de fontes sustentáveis tais como amido e proteínas, aditivos utilizados na obtenção destes filmes, possíveis aplicações, limitações e suas principais propriedades como, por exemplo, a permeabilidade ao vapor d'água e propriedades mecânicas.

No terceiro capítulo estão descritos todos os materiais utilizados além dos procedimentos realizados para a obtenção dos filmes biodegradáveis, a extração/solubilização da queratina, o processo de diálise, a obtenção dos filmes e a metodologia utilizada para a caracterização das amostras.

O quarto capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos na primeira etapa do trabalho, os quais foram apresentados no Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

O quinto capítulo apresenta os resultados do estudo intitulado: Influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina de penas de frango. Submetido para a revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.

No sexto capítulo são apresentados e discutidos parte dos resultados referentes ao estudo: *Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films*. Aceito para publicação pela revista *Lebensmittel – Wissenschaft- und –Technologie*.

Os resultados do trabalho intitulado: *Characterization of feather keratin films plasticized with sorbitol*. Submetido para revista *Biomacromolecules* são apresentados e discutidos no sétimo capítulo.

No oitavo capítulo encontram-se as conclusões do trabalho e as referências bibliográficas utilizadas.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

Este capítulo foi dividido em três seções, na primeira, são apresentadas as características gerais da família das queratinas, tais como formação, estrutura, composição, ligações, métodos de extração e principais aplicações. Na seção seguinte, são descritos os aspectos gerais dos filmes biodegradáveis obtidos a partir de proteínas e os aditivos adicionados aos filmes. Na última seção são apresentadas as principais propriedades dos filmes, como as propriedades de barreira, higroscopicidade, solubilidade, propriedades mecânicas e térmicas.

2.1 QUERATINAS

2.1.1 Aspectos gerais

Nos vertebrados, as principais epidermes tais como cabelos, penas, cascos, pele, escamas e unhas são o resultado de um elaborado processo de diferenciação, ou queratinização, de células epiteliais especializadas chamadas “keratinocytes”. Durante este processo, o tecido epitelial é convertido em um material inerte, fibroso, resistente e insolúvel, com pequenas diferenciações entre diferentes espécies e que gera um ótimo revestimento de proteção externa (WOODIN, 1954; FRASER, 1969; FRASER *et al.*, 1988).

A principal característica que diferencia a queratina quando comparada a outras proteínas fibrosas tais como o colágeno, a elastina e as proteínas miofibrilares, é a ocorrência de uma grande quantidade de resíduos de cisteína (SCHROOYEN *et al.*, 2000; KATOH *et al.*, 2004), os quais constituem cerca de 7-20 % do conteúdo total de aminoácidos, sendo que a maioria destes resíduos está localizada nas regiões terminais das cadeias de proteína (YAMAUCHI *et al.*, 1996). Durante o final do estágio de biosíntese, os resíduos de cisteína são oxidados aos pares, formando o di-aminoácido cistina (Figura 2.1), no qual dois átomos de enxofre se juntam através de ligações covalentes dissulfeto, pontes dissulfeto, sendo estas ligações responsáveis pela propriedade de inércia química deste material e também de muitas outras características, tais como as boas propriedades mecânicas (WOODIN, 1954; FRASER *et al.*, 1988; YAMAMURA *et al.*, 2002).

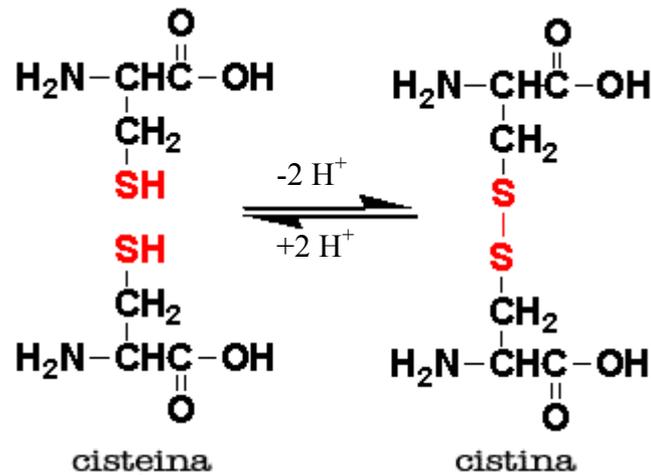


Figura 2.1 – Oxidação de resíduos de cisteína para formação da cistina

A atividade das “keratinocytes” pode levar a dois tipos diferentes de queratina, tradicionalmente classificadas como “soft” (flexível) ou “hard” (resistente). O *stratum corneum* (camada mais externa das cinco que compõem a epiderme) é composto por queratinas flexíveis, com um baixo conteúdo de pontes dissulfeto, enquanto outras estruturas tais como cabelos e penas são formados pelas queratinas resistentes, as quais possuem um alto conteúdo de ligações dissulfeto (PARRY, 1998; SCHROOYEN *et al.*, 2000).

Dependendo da predominância das estruturas secundárias presentes na cadeia da proteína, as queratinas podem ser sub-divididas em α -hélices ou β -pregueadas, cada uma mostrando um padrão diferente na difração de raio-X, sendo esta outra base de classificação das queratinas. Desta forma, as queratinas flexíveis e também as queratinas resistentes presentes em mamíferos são classificadas α -queratinas, enquanto as queratinas resistentes presentes em répteis e aves são as β -queratinas (FRASER, 1953; SCHROOYEN *et al.*, 2001). Nas α -queratinas, duas ou três cadeias em α -hélices associam-se lateralmente, formando longos cabos helicoidais que, reunidos, formam as fibrilas e as fibras. Nas β -queratinas, as fibras são formadas por empilhamento de folhas β -pregueadas (MARZZOCO e TORRES, 1999).

A importância econômica da produção de lã e o interesse médico no crescimento e reposição de pele e cabelo fizeram da família das queratinas flexíveis e resistentes de mamíferos uma das classes de proteínas estruturais mais estudadas. Desde 1934, estudos sobre a insolubilidade da queratina devido à presença de pontes dissulfeto e sua solubilidade

quando da quebra das mesmas têm sido relatados (WOODIN, 1954; DOWLING, 1991; HEARLE, 2000).

O crescimento do mercado de carne de frango e o interesse no desenvolvimento sustentável e em fontes renováveis também têm estimulado inúmeros pesquisadores na busca de possíveis aplicações para as penas, o que se reflete no aumento do número de patentes (KIKKAWA 1977; TIMMONS *et al.*, 2000) e de trabalhos publicados. Devido à família das queratinas ter essencialmente funções estruturais e mecânicas, muitas destas aplicações são relacionadas a materiais em que seja desejável boa resistência mecânica tais como filmes. O entendimento da estrutura da queratina é a base para uma melhoria nas propriedades destes novos materiais.

2.1.2 Estrutura e composição da queratina de penas

As penas distinguem os pássaros de outros vertebrados e sua função é essencialmente a regulação da temperatura corporal, o isolamento da umidade e o vôo. Há vários tipos diferentes de penas, dependendo da espécie (penas de frangos, gansos e patos possuem diferenciações entre si) e da função que desempenham (penas para vôo, função isolante e sensorial). A Figura 2.2 apresenta um esquema da pena de frango.



Figura 2.2 – Estrutura da pena de frango (SCHROOYEN *et al.*, 2000)

A pena possui partes estruturais distintas. A porção HA constitui a haste da pena que une os filamentos, enquanto CA é o tronco da pena e se localiza sob a pele do frango.

A literatura demonstra que derivados solúveis de queratina de penas podem ser preparados por oxidação com ácido per fórmico, ácido per acético, sulfitólise ou redução e S-carboximetilação de pontes dissulfeto (WOODIN 1954; EARLAND, 1955; HARRAP 1964^a; HARRAP 1964b). As queratinas de penas são proteínas de cadeias curtas, com um tamanho uniforme e massa molar de aproximadamente 10 KDa (WOODIN 1954; FRASER, 1957; HARRAP 1964a; HARRAP 1964b; FRASER, 1965).

Queratina de diferentes partes da pena apresentam uma composição característica de aminoácidos. HARRAP (1964a) em um estudo sobre a composição de aa das partes da pena encontrou que no tronco da pena há 686 μ moles de cisteína/g enquanto nos filamentos este valor sobe para 732 μ moles de cisteína/g. Este estudo também apresenta valores de conteúdo sulfurado total de 2,47 % para a haste da pena, 2,32 % para o tronco e 2,85 % para os filamentos.

Apesar das queratinas de penas de diferentes espécies serem relativamente homogêneas quanto ao peso molecular, elas são ao mesmo tempo heterogêneas na composição de aa, especialmente no que diz respeito à quantidade de resíduos de cada aa (ARAI *et al.*, 1983; BRUSH, 1986).

2.1.3 Pontes dissulfeto

As queratinas encontradas nos materiais naturais, como as presentes nas penas, são insolúveis na maioria dos solventes e resistentes às enzimas proteolíticas. Esta característica é determinada pela grande quantidade de pontes dissulfeto, que são formadas através de ligações covalentes entre as cadeias polipeptídicas presentes na proteína, as quais são responsáveis por sua estabilização (EARLAND, 1956; CREWETHER *et al.*, 1965; FEUGHELMAN, 1985).

Para a solubilização da proteína, estas pontes devem ser quebradas. Após a quebra das ligações, os resíduos de cisteína têm uma grande tendência a se reoxidar e para evitar que os resíduos de cisteína voltem a se oxidar e reconstituir as pontes dissulfeto, eles podem ser modificados quimicamente com ácido iodo acético ou iodoacetamida (ANFENSEN, 1961) ou

isolados através da utilização de surfactantes como o lauril sulfato de sódio (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

O método mais utilizado para a redução das ligações dissulfeto é o uso de tióis como o 2-mercaptoetanol, mas estes grupos devem ser ionizados para que a reação aconteça. Esta reação é proporcional à concentração de ânions tiolato, sendo assim, é altamente dependente do pH. Os ânions tiolato são formados em pH alcalinos, sendo o pH 9,0 o melhor para a ativação do 2-mercaptoetanol, sendo que em pH ácido, esta reação não ocorre (FEUGHELMAN, 1985; SCHROOYEN *et al.*, 2000; SCHROOYEN *et al.*, 2001). Na Figura 2.3 está representado de forma esquemática onde ocorrem as quebras das ligações S-S e das pontes de hidrogênio.

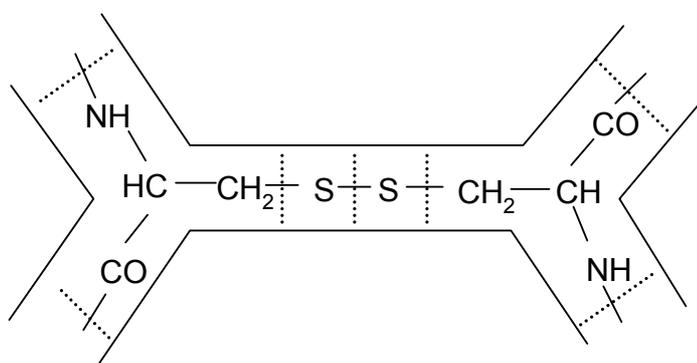


Figura 2.3 – Esquema demonstrando as quebras das ligações S-S e das pontes de hidrogênio (FRASER 1965)

2.1.4 Aplicações das queratinas

Pesquisas sobre queratina e queratina hidrolisada têm ganhado importância nos últimos anos, especialmente para a indústria de cosméticos, a qual utiliza queratina hidrolisada na produção de esmaltes, cremes, xampus e condicionadores. As aplicações para queratina são numerosas, mas basicamente envolvem a utilização da queratina como componente em formulações. Estudos e patentes onde as queratinas são utilizadas como matéria-prima para produção de filmes são menos abundantes. Filmes e coberturas produzidos a partir de proteínas, tais como proteína de soja, gelatina e proteínas do leite para aplicações em alimentos têm sido extensivamente estudadas.

Filmes de queratina podem ser utilizados como aceleradores do crescimento celular na forma de um suporte de nutrientes para a multiplicação celular (YAMAUCHI *et al.*,

2003), o que pode ser utilizado no tratamento de queimaduras e transplantes. Filmes de queratina também podem ser utilizados na medicina como base para o desenvolvimento de uma grande variedade de células, incluindo células da pele como os fibroblastos, osteoblastos e as “keratinocytes”. As películas de queratina também podem ser utilizadas como membranas de difusão e para o encapsulamento de outras substâncias (TIMMONS *et al.*, 2000, TANABE *et al.*, 2002).

Aditivos anti-microbianos, óleos e outras estruturas como o colágeno podem ser adicionados às películas de queratina (TIMMONS *et al.*, 2000). O encapsulamento pode aumentar a duração da atividade de um determinado medicamento (YAMAUCHI *et al.*, 1997, YAMAUCHI *et al.*, 2002). Microcápsulas de queratina podem ser utilizadas como carregadoras de aromas, fragrâncias, corantes e drogas. YAMAUCHI *et al.* (2002) trabalhando com microcápsulas de queratina de lã obtiveram um rendimento superior a 95% no encapsulamento de óleos e corantes, sendo que as cápsulas de queratina foram mais efetivas no encapsulamento destas substâncias do que as produzidas a partir de mioglobina e de BSA (albumina do soro bovino).

2.1.5 Processos de extração/solubilização de queratina

Desde os anos 30, vários autores têm apresentado estudos sobre a extração, a estrutura, a composição química e a conformação espacial das queratinas. Trata-se de uma das famílias de proteínas estruturais que possuem estrutura mais organizada e servem como parâmetro de comparação em estudos como difração de raios-X. Além de servirem de modelo em estudos que relacionam a estrutura das moléculas da proteína com sua função.

Extrações de queratina podem ser conduzidas de várias formas, dentre elas se podem citar: i) a cisão oxidativa das ligações S-S com ácido perfórmico ou ácido peracético, gerando as queratoses que possuem resíduos solúveis de $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{SO}_3^-)\text{CO}^-$ ao invés dos resíduos de cistina; ii) sulfitólise oxidativa para obter o sal de Bunte $[-\text{NH}-\text{CH}(-\text{CH}_2-\text{S}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+)-\text{CO}-]$ das queratinas e uma subsequente conversão dos grupos S-sulfurados em grupos SH livres através do tratamento com 2-mercaptoetanol, propiciando a redução das queratinas; iii) extração redutiva com misturas aquosas de uréia e 2-mercaptoetanol seguidas por reações dos grupos SH com iodeto de metila ou ácido α -iodoacético, gerando as queratinas modificadas (YAMAUCHI *et al.*, 1996).

WOODIN (1954) extraiu queratina de penas com uréia, tioglicolato de sódio ou bissulfito e solução tampão, utilizando diferentes pHs (5,8-9,5), com o objetivo de investigar o tamanho molecular, a forma e também o conteúdo de cistina/cisteína na molécula de queratina. Seus estudos demonstraram que o teor cistina/cisteína em soluções de uréia e bissulfito dependem do pH e da concentração de uréia, sendo que o maior teor foi encontrado em pH 8,5.

EARLAND e KNIGHT (1955) utilizaram um processo de extração brando para queratina de lã, a cisão oxidativa dos resíduos de cistina com ácido peracético, seguida de uma extração alcalina. Esse método demonstrou ser efetivo na solubilização da queratina com pequenas modificações químicas da proteína. Através desse estudo, os autores demonstraram que existem diferenças significativas no conteúdo de carbono, hidrogênio e enxofre entre as α -queratoses e β -queratoses.

ANKER (1972) descreve um processo para o preparo de filmes a partir de queratina de penas. De acordo com este método, a queratina é primeiramente isolada através da extração das penas com uma solução contendo sulfito de sódio para quebrar as ligações dissulfeto. Após a separação dos resíduos insolúveis, sulfito de sódio foi adicionado à solução de queratina. As queratinas foram precipitadas pela adição de ácido hidrocloreídrico e secadas. De acordo com o autor, este produto poderia ser rapidamente dispersado em misturas alcalinas de álcool e água sob aquecimento. Após a mistura com plastificante (glicerol, 0,2-0,6 g/g queratina), a solução foi aplicada em substratos sólidos para formar um filme.

OKAMOTO *et al.* (1978) propuseram um método de extração onde as penas foram dissolvidas em uma mistura álcool-água contendo 2-mercaptoetanol. Aparentemente, sob aquecimento, filmes de queratina foram formados na superfície desta solução. Estudos de difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho indicaram que no filme formado, a proteína ainda continha algumas estruturas secundárias β -pregueadas. O método exato para o preparo dos filmes e as condições de medida não foi mencionado.

Em outro método, descrito por KIKKAWA (1979), queratina foi isolada com uma solução aquosa alcalina de tioglicolato de sódio (pH 11,0), centrifugada, decantada e subseqüentemente dialisada. O produto insolúvel formado após a diálise foi separado das queratinas solúveis. A solução de queratina de penas foi utilizada na obtenção de filmes por “casting” após a mistura com grandes quantidades de plastificantes (1-15 g/g queratina) tais

como, glicerol, etilenoglicol e polietilenoglicol com diferentes pesos moleculares (60, 300, 600 e 1540). De acordo com o autor, as membranas de queratina formadas apresentaram boa permeabilidade a íons.

YAMAUCHI *et al.* (1996), utilizaram soluções aquosas contendo 7M de uréia, lauril sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico e 2-mercaptoetanol para extrair queratinas, durante todo o processo de extração (12 h) a solução foi mantida em pH neutro. Após a extração, a mistura foi filtrada, dialisada e armazenada para a posterior obtenção dos filmes. O SDS permitiu a estabilização da solução aquosa de queratinas após a remoção da uréia pela diálise, uma vez que o surfactante forma um complexo com a queratina e é removido lentamente durante o processo de diálise. Filmes contendo 50 % (w/w) de glicerol foram obtidos com estas soluções. Os filmes obtidos mostraram-se menos permeáveis a pequenas e grandes substâncias orgânicas e inorgânicas tais como NaCl, glicose e albumina do soro bovino do que filmes preparadas a partir de colágeno com ligações cruzadas.

TIMMONS *et al.* (2000), propuseram um método de extração de queratina de cabelo, que inclui a redução da queratina através do aquecimento do cabelo sob atmosfera de nitrogênio, em uma solução com hidróxido de amônio e tioglicolato de amônio, seguido de centrifugação e da coleta do sobrenadante contendo a fração solúvel de queratinas. Com esta solução obtiveram finos filmes de queratina que mostraram-se eficientes na aceleração do crescimento celular e como agente encapsulante de outros compostos tais como corantes.

Em publicações mais recentes, SCHROOYEN *et al.* (2000, 2001), estudaram a extração queratina de penas de frango. Para tal, realizaram a extração em atmosfera inerte de nitrogênio, em uma faixa de pH de 3,0 a 10,00. Estudaram ainda diferentes concentrações de uréia, diferentes temperaturas e a estabilização da solução formada através de modificações químicas ou através da adição de diferentes quantidades de SDS, explicando o mecanismo de ação do SDS (Figura 2.4). Este trabalho sugere que as melhores condições para extração são, pH 9,0, temperatura de 50 °C e concentração de uréia de 8M. Nestas condições, obtiveram os maiores rendimentos na extração, cerca de 80 % em base seca.

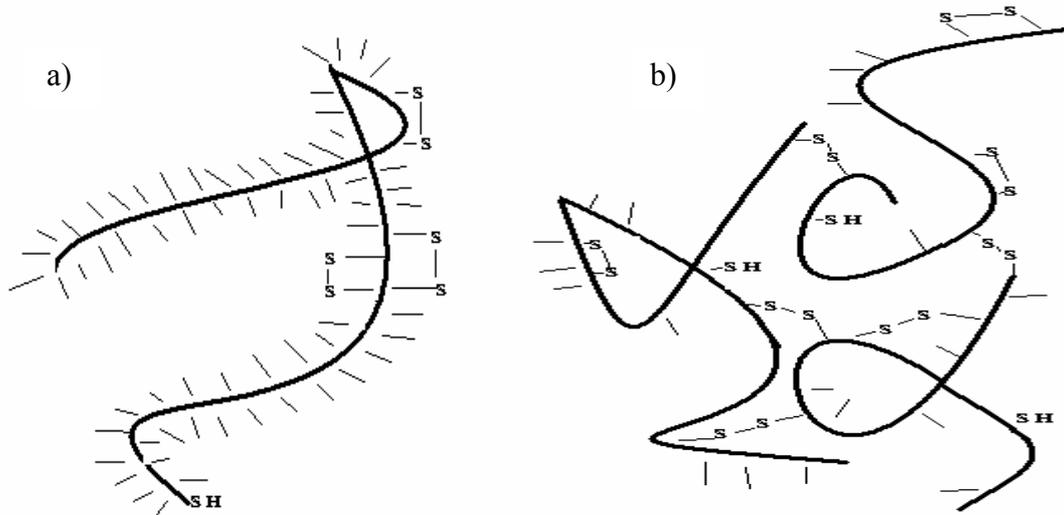


Figura 2.4 – Representação esquemática (a) complexo SDS-queratina com uma grande quantidade de SDS, resultando na formação de pontes dissulfeto intra-moleculares e (b) complexo com pequenas quantidades de SDS, resultando na formação de mais pontes inter-moleculares, aqui representadas por três cadeias de queratina (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

2.2 POLÍMEROS NATURAIS BIODEGRADÁVEIS

A utilização de polímeros sintéticos foi tecnologicamente significativa a partir da década de 40, quando a indústria de embalagens foi revolucionada através da inserção de polímeros de origem petroquímica, tais como o polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC) e o polietilenotereftalato (PET). Apesar das vantagens da síntese, manufatura e processamento destes materiais, eles originam dois graves problemas: o uso de fontes não renováveis para a produção de "commodities" poliméricas e o fato destes materiais gerarem uma enorme quantidade de lixo residual (AMASS *et al.*, 1998).

A crise ambiental iniciada no século passado devido ao esgotamento de fontes naturais e ao crescimento do lixo nas grandes cidades fez crescer a necessidade de materiais obtidos a partir de fontes sustentáveis e que, ao mesmo tempo, não agredissem o meio ambiente após sua utilização, evitando o acúmulo de lixo. Isto gerou nas últimas décadas uma grande quantidade de pesquisas voltadas para o desenvolvimento destes materiais (ORLIAC *et al.*, 2003).

2.2.1 Definição

A literatura apresenta várias definições para polímeros biodegradáveis. ROBEY *et al.* (1989) definiram polímeros biodegradáveis como polímeros naturais ou sintéticos que após sua utilização sofrem degradação pela ação específica de um ou mais componentes do meio ambiente, tipicamente enzimas secretadas por fungos e bactérias, levando a solubilização de polímeros insolúveis em água, quando estes são convertidos em fragmentos solúveis em água.

CHANDRA e RUSTGI (1998) definem biodegradação como um processo natural, no qual os compostos orgânicos naturais são convertidos em compostos simples, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares, como o ciclo do carbono ou do nitrogênio.

2.2.2 Principais fontes de obtenção de polímeros naturais biodegradáveis

Polímeros naturais ou biopolímeros são polímeros formados na natureza durante os ciclos de crescimento de todos os organismos. Sua síntese geralmente envolve catálise enzimática, reações de polimerização de cadeia de monômeros ativados, que são tipicamente formados dentro das células por complexos processos metabólicos (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

A literatura apresenta diversas revisões sobre as matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais biodegradáveis e suas potenciais aplicações (CHANDRA e RUSTGI, 1998; GENNADIOS *et al.*, 1997).

As principais fontes de polímeros naturais são os polissacarídeos e as proteínas provenientes do leite, da soja, do algodão, do amendoim e de tecidos musculares têm sido utilizadas para a obtenção de filmes biodegradáveis (GENNADIOS *et al.*, 1994; ARVANITTOYANNIS *et al.*, 1998; SOBRAL, 2000; ANKER *et al.*, 2002; SOBRAL *et al.*, 2002; BIGI *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2003). O mesmo ocorre com os polissacarídeos, como por o amido proveniente de diversas origens e a celulose (ARVANITTOYANNIS *et al.*, 1997; WELLER *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 2000; LAROTONDA, 2002; MATSUI, 2002). Por outro lado, os poliésteres de origem microbiana, como o pululan e o polihidroxibutirato (PHB) apresentam outra alternativa de interesse crescente na área de filmes biodegradáveis (HANNIGAN, 1984; SQUIO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004). Na Figura 2.5 são apresentadas as principais matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais.

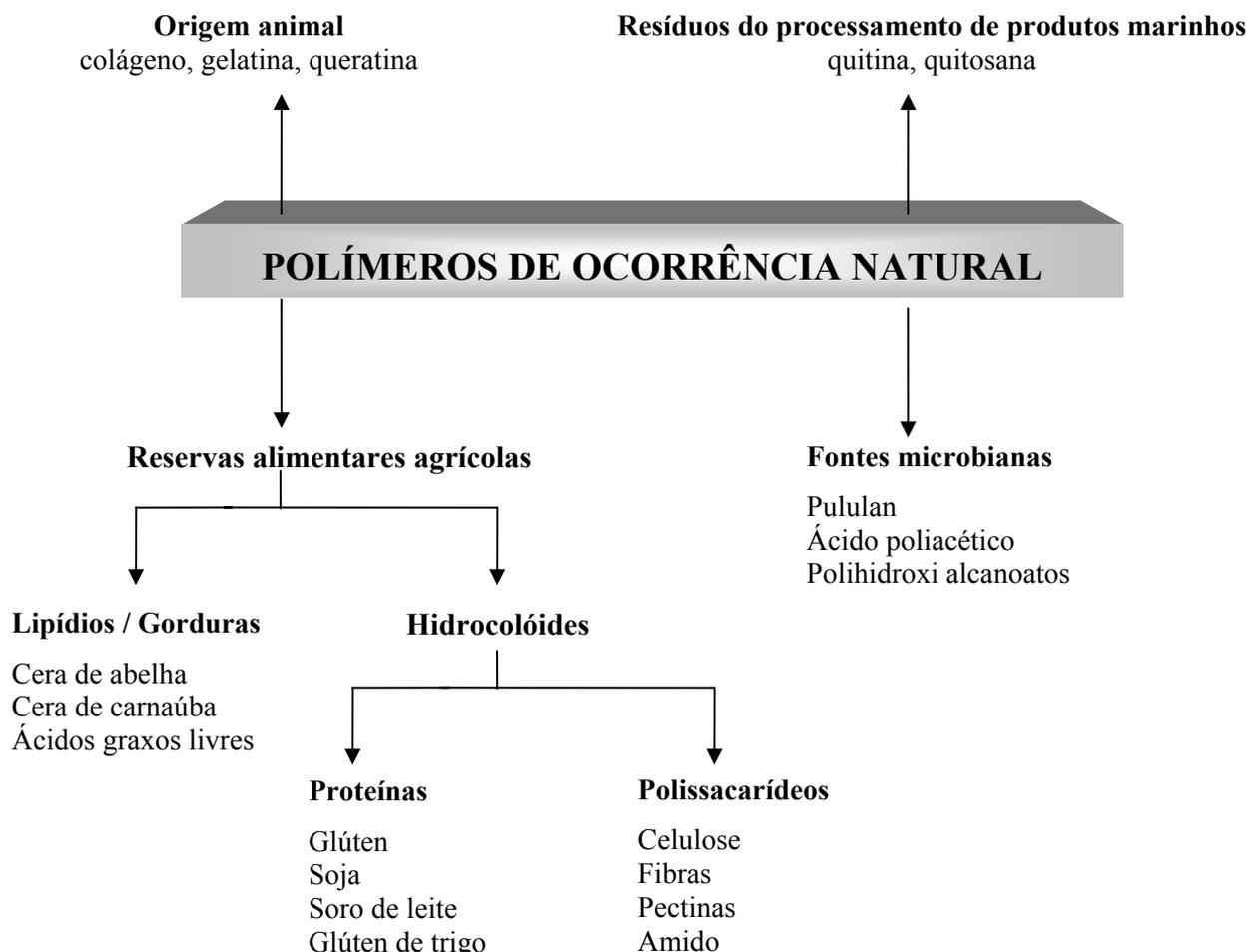


Figura 2.5 - Principais matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais (THARANATHAN 2003).

2.2.3 Filmes protéicos

Uma das principais classes de matérias-primas utilizadas na obtenção de filmes biodegradáveis são as proteínas, as quais têm sido estudadas por décadas, devido a sua habilidade de espontaneamente, tanto na forma primária, secundária e estruturas de ordem superior, exibir funções biológicas e organização protéica intermolecular em tecidos e organismos (LIU *et al.*, 2004)

A formação de uma matriz macromolecular a partir de proteínas compreende três etapas: 1) ruptura de pontes intermoleculares de baixa energia que estabilizam o polímero em seu estado natural; 2) o rearranjo e a orientação das cadeias poliméricas e 3) a formação de uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e pontes após o agente de ruptura das pontes intermoleculares ter sido removido (CUQ *et al.*, 1998).

Vários autores dedicaram-se ao estudo de filmes biodegradáveis e coberturas comestíveis obtidos a partir de proteínas de origem vegetal e animal. Dentre os materiais poliméricos derivados de proteínas de origem animal e vegetal estão o colágeno, a gelatina, as proteínas miofibrilares de peixe, as proteínas da soja, do girassol, do amendoim, do trigo, queratinas, proteína da clara do ovo, caseína e proteínas do soro de leite (GENNADIOS e WELLER, 1991; GENNADIOS *et al.*, 1996; JANGCHUD e CHINNAN, 1999; SOBRAL, 2000; SCHROOYEN *et al.*, 2000; CHIELLINI *et al.*, 2001; ORLIAC *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2003; PASCHOALICK *et al.*, 2003; BERTAN *et al.*, 2004).

Dentre as proteínas estudadas, as queratinas provenientes da lã, cabelo e penas possuem excelente capacidade de formar filmes biodegradáveis com boa resistência mecânica e boas propriedades de barreira ao vapor d'água (YAMAUCHI *et al.*, 1996; SCHROOYEN *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2003). Entretanto, a queratina de penas de frango não tem recebido atenção neste campo como as demais proteínas (SCHROOYEN *et al.*, 2000).

OKAMOTO (1978) propõem a obtenção de filmes de queratina através da dissolução de penas de frango em misturas de álcool e água, contendo 2-mercaptoetanol. Sob aquecimento, os filmes de queratina se formariam na superfície desta solução, sendo que a tensão de ruptura destes filmes foi 12 vezes superior que a de filmes obtidos a partir de proteínas do trigo utilizando o mesmo processo de obtenção.

TANABE *et al.* (2002), obtiveram filmes de queratina de lã e utilizaram blendas com quitosana para melhorar as propriedades dos filmes. Observaram que os compósitos formados possuíam características superiores às dos filmes obtidos apenas a partir de queratina ou apenas a partir de quitosana, as blendas foram mais resistentes mecanicamente e apresentaram melhores propriedades de barreira ao vapor d'água.

YAMAUCHI *et al.* (1996) estudando filmes de queratina de lã, obtiveram filmes com boa resistência mecânica, que apresentaram valores do módulo de Young de até 250 MPa. Estes mesmos filmes também mostraram-se menos permeáveis a sais e a glicose do que filmes produzidos com colágeno.

SCHROOYEN *et al.* (2001) obtiveram filmes a partir de queratina extraída de penas de frango quimicamente modificada. Em seus estudos avaliaram a influência da adição de lauril sulfato de sódio na dispersão de queratina e também a influência da concentração de

glicerol em algumas propriedades dos filmes. A tensão máxima de ruptura destes filmes variou de 5 MPa até 25 MPa, dependendo do grau de modificação da queratina. Quando utilizaram glicerol, a tensão máxima de ruptura variou de 5-35 MPa para filmes com 0,50 - 0,10 g glicerol / g queratina, respectivamente.

2.2.4 Aditivos utilizados na obtenção de filmes biodegradáveis

Filmes biodegradáveis feitos apenas com soluções ou dispersões de proteínas (glúten, caseína e proteínas de soja), sem qualquer aditivo, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plastificantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade dos filmes, devido à habilidade destes em reduzir pontes de hidrogênio internas entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças de atração inter e intramoleculares da proteína e ao mesmo tempo aumentando o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas (SCHROOYEN *et al.*, 2001). As propriedades físicas de um polímero também podem ser modificadas através da introdução de um segundo polímero que melhore as propriedades do polímero original em aspectos tais como a flexibilidade, hidrofiliabilidade e permeabilidade (ZHANG *et al.*, 2002).

O sorbitol é um álcool polihídrico com massa molecular de 180 g/mol, o qual possui um elevado ponto de ebulição. Além disso, não é tóxico, é solúvel em água, polar, não-volátil, miscível em dispersões/soluções de proteínas e altamente hidrofílico, pois possui um grupo hidroxila em cada carbono (Figura 2.6a). Estas propriedades fazem do sorbitol um plastificante apropriado para o uso com polímeros solúveis em água e em proteínas (BARRETO *et al.* 2003).

O polietileno glicol (PEG) é um polímero hidrofílico não iônico utilizado em muitas aplicações biomédicas e industriais. É formado por unidades de óxido de etileno e contém em suas extremidades dois grupos hidroxila, os quais são responsáveis por seu caráter hidrofílico, como está representado na Figura 2.6 (b). Devido a algumas de suas principais características tais como a não-toxicidade, boa solubilidade em água e em outros solventes comuns e a grande diversidade de pesos moleculares, este polímero pode ser encontrado em uma grande variedade de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (ANNUNZIATA *et al.*, 2002).

PEGs tem sido frequentemente co-polimerizados com poliésteres alifáticos lineares como o poli(ácido láctico) (PLA) para utilização em sistemas de liberação de drogas e

também tem sido utilizados como um bom plastificante na indústria de polímeros (ZHANG *et al.*, 2002).

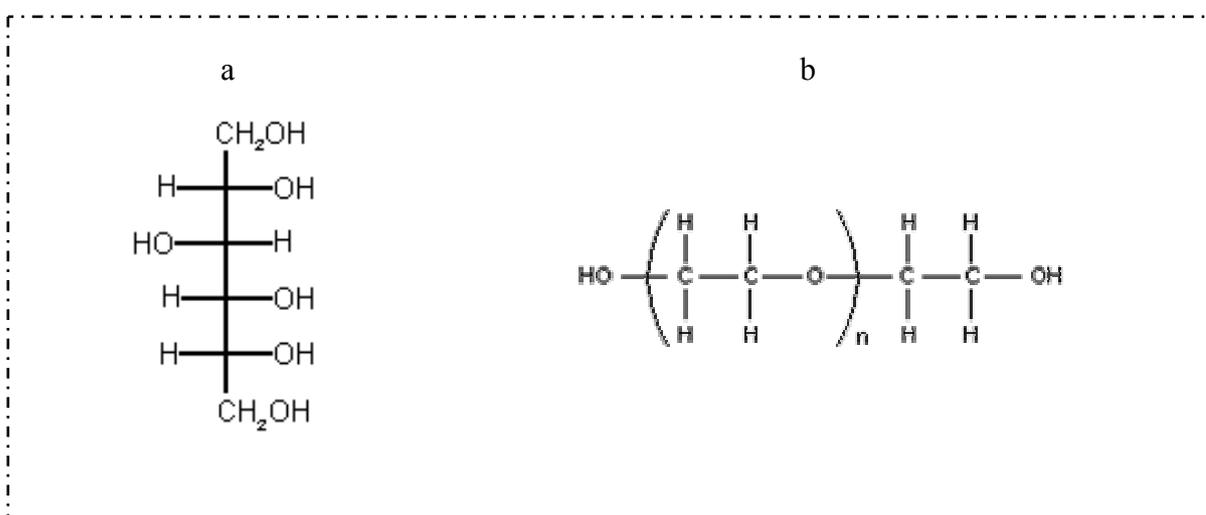


Figura 2.6 – Estruturas químicas do sorbitol (a) e do polietileno glicol (b).

2.2.5 Aplicações dos filmes

As aplicações para os filmes biodegradáveis são inúmeras, desde filmes para a agricultura, coberturas comestíveis e ainda podem ser associados com outros materiais para a obtenção de embalagens para alimentos, proporcionando a diminuição na utilização de materiais não biodegradáveis (TROPINI *et al.*, 2003; THARANATHAN 2003).

Filmes e coberturas biodegradáveis podem funcionar como excelentes barreiras à umidade, oxigênio, flavors e aromas protegendo a qualidade de alimentos e outros produtos. Além disso, podem também promover proteção mecânica a alimentos e drogas e funcionar como portadores de aditivos, tais como antioxidantes e substâncias antimicrobianas. (KESTER e FENNEMA, 1986; GENNADIOS, 1997; MILLER e KROCHTA, 1997; HAN, 2000).

Quando um filme ou cobertura biodegradável previne a troca de umidade, oxigênio e aromas entre o alimento e o meio ambiente, a qualidade e a vida-de-prateleira deste alimento são significativamente melhoradas. Além disso, após a embalagem ser aberta, uma cobertura ou filme biodegradável pode continuar a proteger o alimento (NAYAK, 1999).

2.2.6 Vantagens e limitações

Os filmes biodegradáveis obtidos a partir de proteínas aparecem como uma forma de diminuir a utilização de polímeros convencionais em diversos campos de aplicação, tais como, em embalagens para alimentos. Tais filmes podem ser utilizados como único material na produção de embalagens, ou em associação a polímeros obtidos a partir do petróleo (GENNADIOS, 2002). Outra vantagem de se obter filmes a partir de proteínas é a utilização de resíduos, que normalmente são descartados no meio ambiente ou destinados a produtos de menor valor agregado, tal como as penas de frango, as quais são um resíduo da indústria de alimentos e são utilizadas hidrolisadas na formulação de ração animal. Todo ano, milhares de toneladas de penas são disponibilizadas em todo o mundo, no entanto, pouco se têm feito para utilizar de forma proveitosa essa grande fonte de proteínas (SCHROOYEN *et al.*, 2000).

Entretanto, os filmes obtidos a partir de proteínas exibem algumas características indesejáveis, tais como valores relativamente altos de permeabilidade ao vapor d'água, aproximadamente de duas a quatro vezes maiores do que aqueles dos polímeros convencionais tais como o polietileno, o poliestireno e o polipropileno. Esta barreira limitada ao vapor d'água é atribuída à inerente hidrofobicidade das proteínas e também aos plastificantes que são incorporados aos filmes como uma forma de melhorar sua hidrofobicidade (GENNADIOS *et al.*, 1997). Por outro lado estudos têm reportado as boas propriedades de barreira ao oxigênio de filmes obtidos a partir de proteína de soja, proteínas do soro do leite, do colágeno e do glúten (LIEBERMAN e GUILBERT 1973; PÉREZ-GAGO *et al.*, 1999; GENNADIOS, 2002).

Outro aspecto a ser considerado quando se utilizam filmes que estão diretamente em contato com o alimento é o fato de que uma pequena parte da população é alérgica a uma ou mais proteínas e a formação dos filmes ou coberturas a partir de proteínas geralmente não reduz a alergenicidade (GENNADIOS, 2002).

Estudos são necessários para melhorar as propriedades destes filmes biodegradáveis, tais como as propriedades de barreira e as propriedades mecânicas. Entretanto, eles são sem dúvida uma alternativa para diminuir o impacto ambiental causado pela utilização de plásticos e também uma forma de utilização de matérias-primas sustentáveis.

2.3 PRINCIPAIS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES

2.3.1 Densidade, propriedades estruturais e mecânicas

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta que permite a obtenção de informações estruturais das amostras, tais como a homogeneidade ou a presença de rupturas e falhas. A presença de falhas pode afetar as propriedades mecânicas do material.

As propriedades mecânicas de um material estão entre as características mais estudadas, pois elas implicam diretamente em sua utilização. São elas a tensão máxima de ruptura (σ em MPa), o alongamento máximo (ϵ em %) e o módulo de Young (E em MPa). O módulo de Young é uma característica de cada material, que representa a constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação de um corpo (VANDE VELDE e KIEKENS, 2002).

As propriedades mecânicas específicas são obtidas através da divisão das propriedades originais pela densidade do polímero (g/cm^3), são úteis por exemplo no caso de se utilizar biopolímeros como elemento estrutural sem o uso de outro reforço, onde as propriedades específicas determinarão as dimensões necessárias para uma determinada firmeza e resistência desejadas. A tensão máxima específica (σ^*) é dada em Nm/g e o módulo de Young específico (E^*) em KNm/g (VANDE VELDE e KIEKENS, 2002).

A densidade do filme é definida como a razão entre a massa e o volume de uma amostra do mesmo. Ela indica o grau de compactação do filme formado e tem influência nas propriedades mecânicas e de barreira do filme. É usada no cálculo das propriedades mecânicas específicas dos materiais (VANDE VELDE e KIEKENS, 2002).

2.3.2 Propriedades de sorção de umidade

As isotermas de sorção de umidade descrevem a relação entre o conteúdo de umidade de equilíbrio de um material e sua atividade de água a uma determinada temperatura. A absorção/adsorção de moléculas de água na superfície ou interior de um material pode ser de natureza química ou física e a adsorção pode ocupar uma ou várias camadas (MATHLOUTHI e ROGÉ, 2003). O estudo das isotermas de sorção de umidade é uma ferramenta importante que permite avaliar o efeito da temperatura e da umidade relativa (que

no equilíbrio é igual à atividade de água no material) nas propriedades dos filmes, uma vez que a adição ou remoção de umidade pode causar transições de fase na estrutura macromolecular (VELÁZQUES DE LA CRUZ *et al.*, 2001).

Em plásticos obtidos a base de polímeros naturais, o efeito da absorção de água sobre as propriedades mecânicas é de grande importância, uma vez que a água age como plastificante. Em filmes a base de proteínas, a água interage com grupos carregados positiva e negativamente e forma pontes de hidrogênio com outras moléculas de água ou com outros grupos químicos como, por exemplo, os grupos carboxila e hidroxila (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

Várias equações têm sido utilizadas na literatura para ajustar os dados experimentais de sorção de umidade. Entretanto, as mais utilizadas são as equações de Brunauer-Emmett-Teller proposto em 1938, a qual fornece o valor da umidade da monocamada e a equação de Guggenheim-Anderson-de Bôer, a qual é uma extensão do modelo de BET, com três parâmetros e fornece não somente o valor de umidade da monocamada, mas também informações sobre o calor de sorção da monocamada e das multicamadas (JANGCHUD e CHINNAN, 1999; GENNADIOS, 2002). Estas equações serão representadas no capítulo de materiais e métodos.

2.3.3 *Transferência de massa através de filmes biodegradáveis*

Filmes protéicos geralmente possuem boas propriedades de barreira ao oxigênio em UR baixas e intermediárias, mas possuem uma alta permeabilidade ao vapor d'água. Esta característica está ligada ao seu caráter hidrofílico (ANKER *et al.*, 2002). Os três parâmetros mais comumente utilizados na descrição da transferência de massa através de filmes são a permeabilidade, a solubilidade e a difusividade.

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) é a medida da facilidade com que o material pode ser atravessado pelo vapor d'água. A ASTM E96-80 define a permeabilidade como a taxa de propagação de vapor d'água por unidade de área de um material plano de espessura unitária induzida por uma diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições fixas de temperatura e umidade (MCHUGH e KROCHTA, 1994). A Permeabilidade não deve ser confundida com o transporte difusivo através dos poros. O conceito de permeabilidade está associado ao processo de solubilização e difusão do soluto,

onde o mesmo se dissolve em um lado do filme e difunde através dele para o outro lado devido a um gradiente de potencial químico (DONHOWE e FENNEMA, 1994).

O transporte de vapor d'água através de filmes poliméricos ocorre em quatro etapas: (I) a adsorção do vapor d'água na superfície do polímero; (II) solubilização de vapor d'água na matriz polimérica; (III) difusão do vapor d'água através do polímero; e (IV) dessorção do vapor d'água na outra superfície do polímero (ROY *et al.*, 2000).

Os valores de permeabilidade dos filmes poliméricos podem ser utilizados em predições da vida-de-prateleira de produtos embalados e para a indicação de aplicações específicas para os mesmos (MCHUGH e KROCHTA, 1994). A permeabilidade ao vapor d'água é usualmente determinada através do método gravimétrico. A Figura 2.7 apresenta um esquema da célula utilizada na determinação gravimétrica da PVA, onde PA1 representa a pressão de vapor na superfície interna do filme, a qual é a mesma da superfície do dessecante e PA2 a pressão de vapor na superfície externa do filme, a qual é a mesma do interior da cuba produzida pelo cloreto de sódio.

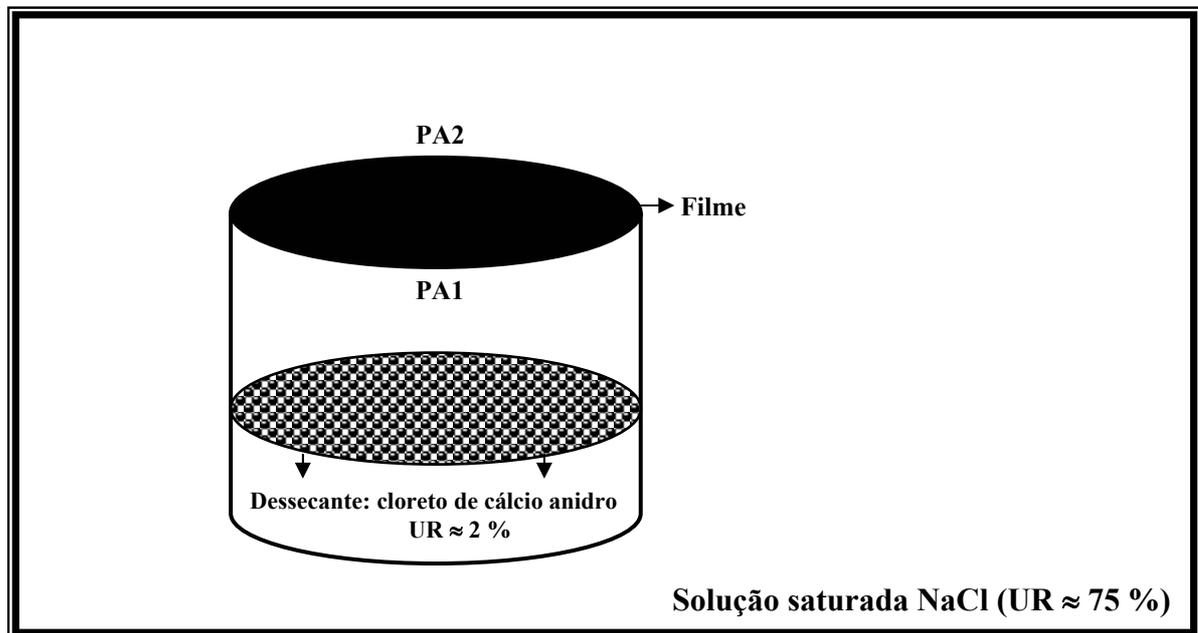


Figura 2.7 - Esquema da célula de difusão utilizada na determinação gravimétrica da PVA.

A permeabilidade ou coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água é definido como o produto entre a difusividade efetiva do soluto na matriz polimérica e a solubilidade do soluto na mesma, de acordo com a equação 2.1, onde *PVA* é o coeficiente de permeabilidade

(g/m.s.Pa); D_{eff} é o coeficiente de difusão (m^2/s); e S é o coeficiente de sorção da água no filme ($g/m^3.Pa$) (ROY *et al.*, 2000).

$$PVA = D_{eff} . S \quad (2.1)$$

Idealmente, quando não acontecem interações entre o filme polimérico e o vapor d'água permeante (filmes hidrofóbicos como o de polietileno), PVA é independente das umidades relativas utilizadas. Entretanto, a permeabilidade ao vapor d'água de filmes hidrofílicos sofre um desvio relevante do comportamento ideal. Os filmes obtidos a base de proteínas, assim como outros filmes hidrofílicos, apresentam uma permeabilidade dependente da pressão de vapor d'água, ou seja, das URs no interior e no exterior da célula de difusão (KESTER e FENNEMA, 1986, ROY *et al.*, 2000).

O coeficiente de sorção S pode ser representado pelo produto entre a densidade específica (ρ^s em g sólidos secos/ m^3) e a higroscopicidade β do filme (kg água/kg sólidos secos x Pa). A higroscopicidade (β) pode ser determinada através da diferenciação da equação de GAB em relação a a_w e dividindo o resultado por p_s (onde p_s é a pressão do vapor saturado na temperatura estudada) como está demonstrado na equação 2.2. Desta forma, é possível determinar β a partir da derivada da equação de GAB, desde que as constantes do modelo sejam conhecidas para uma dada temperatura (LAROTONDA *et al.*, 2004).

$$\beta = \frac{CkW_m}{P_s} \left[\frac{1}{(1-ka_w)(1-ka_w + Cka_w)} - \frac{a_w}{[(1-ka_w)(1-ka_w + Cka_w)]^2} [-k(1-ka_w + Cka_w) + (1-ka_w)(-k + Ck)] \right] \quad (2.2)$$

Desta forma, pode-se estimar o coeficiente de difusão D_{eff} da água no filme polimérico através da equação 2.3, a partir do conhecimento dos valores de β , da permeabilidade (PVA) e da densidade específica ρ^s (LAROTONDA *et al.*, 2004). O coeficiente de difusão (D_{eff}) descreve o movimento das moléculas que permeiam a matrix polimérica e então representa uma propriedade cinética importante do sistema polímero-permeante.

$$PVA = \rho^s \cdot \beta \cdot D_{eff} \quad (2.3)$$

As propriedades de barreira dos filmes são afetadas por diversos fatores, entre os quais destaca-se os tipos e as quantidades de aditivos (plastificantes) utilizados em sua formulação. Geralmente, aditivos de baixa massa molecular, dependendo de sua estrutura química, podem aumentar ou reduzir as propriedades de barreira dos filmes. A maioria dos filmes é plastificada com polióis como o glicerol, o sorbitol e o polietileno glicol. Estes plastificantes aumentam os espaços intermoleculares e tendem a aumentar a PVA dos filmes (MCHUGH e KROCHTA, 1994).

2.3.4 Material solúvel em água e Intumescimento

Na seção anterior, definimos o parâmetro β , representando a higroscopicidade dos filmes poliméricos. Nesta seção, vamos definir a solubilidade de um filme polimérico em água líquida. Essa solubilidade informa sobre a quantidade de material hidrosolúvel presente no filme.

A solubilidade em água define a tolerância do material a água e é determinada pela sua estrutura química (LEE *et al.*, 2004). Os filmes ou as embalagens obtidas a partir de filmes biodegradáveis devem manter os níveis de umidade no produto embalado. A umidade não deve se ligar ao filme ou material da embalagem e dissolvê-lo (KIM *et al.*, 2002). Desta forma, o conhecimento da solubilidade do material em água é importante para muitas aplicações. Os testes de solubilidade do material em água visam fornecer informações sobre a integridade da amostra após sua imersão em água, à temperatura e tempo específicos.

O índice de intumescimento de um material também é relevante, pois está diretamente relacionado com a sua solubilidade em água.

2.3.5 Propriedades térmicas

Através das propriedades térmicas pode-se determinar a mobilidade de uma cadeia polimérica, a qual está diretamente ligada com as características físicas do material (fragilidade, resistência). Os polímeros quando submetidos a um tratamento térmico podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principal e laterais ou ainda podem sofrer uma completa degradação de sua cadeia (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Dentre as análises térmicas, a termogravimetria (TG) mede o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação da temperatura (ou do tempo a temperatura constante). Na termogravimetria derivativa (DTG), o parâmetro medido é a variação de massa em função do tempo (dm/dt) (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica que permite a determinação das temperaturas de transição de fase em um polímero, tais como a transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m). A T_g é o valor médio da faixa de temperaturas que durante o aquecimento de um material permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade. Abaixo da T_g , o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação a outra por mudanças conformacionais. A T_m é o valor médio da faixa de temperatura em que, durante o aquecimento, desaparecem as regiões cristalinas com a fusão dos cristais. Neste ponto a energia do sistema atinge o nível necessário para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias na fase cristalina (CANEVAROLO e SEBASTIÃO, 2002).

CAPÍTULO III

Materiais e Métodos

Este capítulo foi dividido em duas seções, na primeira, são apresentados os materiais e as metodologias empregadas no pré-tratamento das penas, na extração da queratina e no preparo dos filmes com diferentes tipos e diferentes concentrações de plastificantes. Na seção seguinte, são descritos os procedimentos experimentais utilizados nas análises realizadas para a caracterização dos filmes preparados.

3.1 MATERIAIS

As penas de frango foram fornecidas por uma indústria local. Todos os reagentes, com grau de pureza analítica, foram adquiridos da Nuclear, exceto o 2-mercaptoetanol, o qual foi adquirido da Vetec. Foram utilizadas membranas de diálise de celulose regenerada (*Spectra/Por*) com um ponto de corte (MWCO) de 6000-8000 Da, as quais foram adquiridas da Spectrum Medical Industries (Laguna Hills, USA).

3.2 PRÉ-TRATAMENTO DAS PENAS

As penas de frango foram primeiramente separadas das impurezas maiores e depois lavadas com água pura a 60 °C e água a temperatura ambiente. As penas foram então secadas em uma estufa com ventilação forçada, marca Tecnal, modelo 398/2, a 40 °C por 72 h. Após a secagem, o material foi triturado em pequenos filamentos até uma granulometria de 75-750µm. A granulometria foi determinada utilizando um conjunto de peneiras. A pena triturada foi desengordurada em um extrator de Soxhlet com éter de petróleo como solvente, à uma temperatura de 45-50 °C por 12 h. O éter de petróleo foi evaporado e as penas secas foram estocadas a temperatura ambiente em recipientes fechados, até sua utilização. A Figura 3.1 apresenta as penas prontas para serem trituradas e desengorduradas.



Figura 3.1 – Pena limpa antes da etapa de trituração e desengorduramento.

3.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA QUERATINA

A extração da queratina de penas foi feita de acordo com os métodos propostos por SCHROOYEN *et al.* (2000) e YAMAUCHI *et al.* (1996), com pequenas modificações. Para cada extração, 35 g de penas desengorduradas foram imersas em 400 ml de uma solução contendo uréia (8M), dodecil sulfato de sódio (0,26M), trishidroximetil-aminometano (200mM, pH9,0) e 2-mercaptoetanol (1,66M). A mistura foi agitada por 1 h a 50°C sob atmosfera de nitrogênio em um reator encamisado com agitação magnética, a temperatura durante a extração foi mantida constante utilizando um banho termostático. Após a extração, a solução foi filtrada em papel filtro comercial (papel para filtrar xarope, JProLab) para remoção dos resíduos insolúveis. O filtrado foi dialisado por 72 h em uma cuba de diálise com capacidade para 35 L de água destilada utilizando membranas de diálise de celulose regenerada da Spectra/Por com MWCO 6-8000 Da, trocando-se a água diariamente. A concentração de proteína no dialisado foi dosada através do método colorimétrico do Biureto (Kit GoldAnalisa). Após a dosagem, a concentração de proteína da dispersão foi padronizada em 7 g/100 ml, exceto nos casos onde se estudou a influência da variação da concentração de proteína da dispersão nas propriedades mecânicas dos filmes. A dispersão foi armazenada a 5 °C antes da utilização.

3.4 PREPARO DOS FILMES

Todos filmes foram preparados por “casting”. Para cada filme, 50 ml de dispersão de queratina (pH 7,0) foram misturadas com sorbitol ou polietilenoglicol (PEG) com diferentes pesos moleculares (400, 1500, 4000 e 6000), em diferentes concentrações (0,00, 0,02 0,05 0,10 0,20 e 0,30 g plastificante/g queratina). A escolha dos plastificantes foi feita por estes estarem entre os mais utilizados no preparo de filmes biodegradáveis (IRISSING-

MANGATA *et al.*, 2001, KESTER e FENNEMA 1986). As concentrações utilizadas permitiram comparar os resultados com outros trabalhos da literatura (SCHROOYEN *et al.*, 2001). Todas as dispersões foram preparadas com agitação mecânica constante por 1 h, para promover a completa homogeneização dos plastificantes. Após a homogeneização, cada dispersão foi espalhada em uma placa de Petri de poliestireno de 0,177 m² de área e então secadas em estufa com ventilação forçada (velocidade do ar de secagem 0,3-0,4 m/s) a 30°C por aproximadamente 24 h. Após este tempo, os filmes foram removidos das placas de Petri e estocados para as análises posteriores. A espessura dos filmes foi controlada através do volume de dispersão colocado em cada placa de Petri. Os filmes formados com a dispersão contendo uma concentração de 7 g proteína/100 ml possuíam aproximadamente 19,8 g queratina/m². A Figura 3.2 apresenta um fluxograma do processo de obtenção dos filmes de queratina de penas, o qual compreende três etapas, o preparo da pena, a extração da queratina e a obtenção e caracterização dos filmes formados. O tempo demonstrado no fluxograma está relacionado a primeira etapa do processo, ou seja, a obtenção de 35 g de penas prontas para o uso e a quantidade de dispersão e filmes obtidos a partir desta quantidade de pena desengordurada.

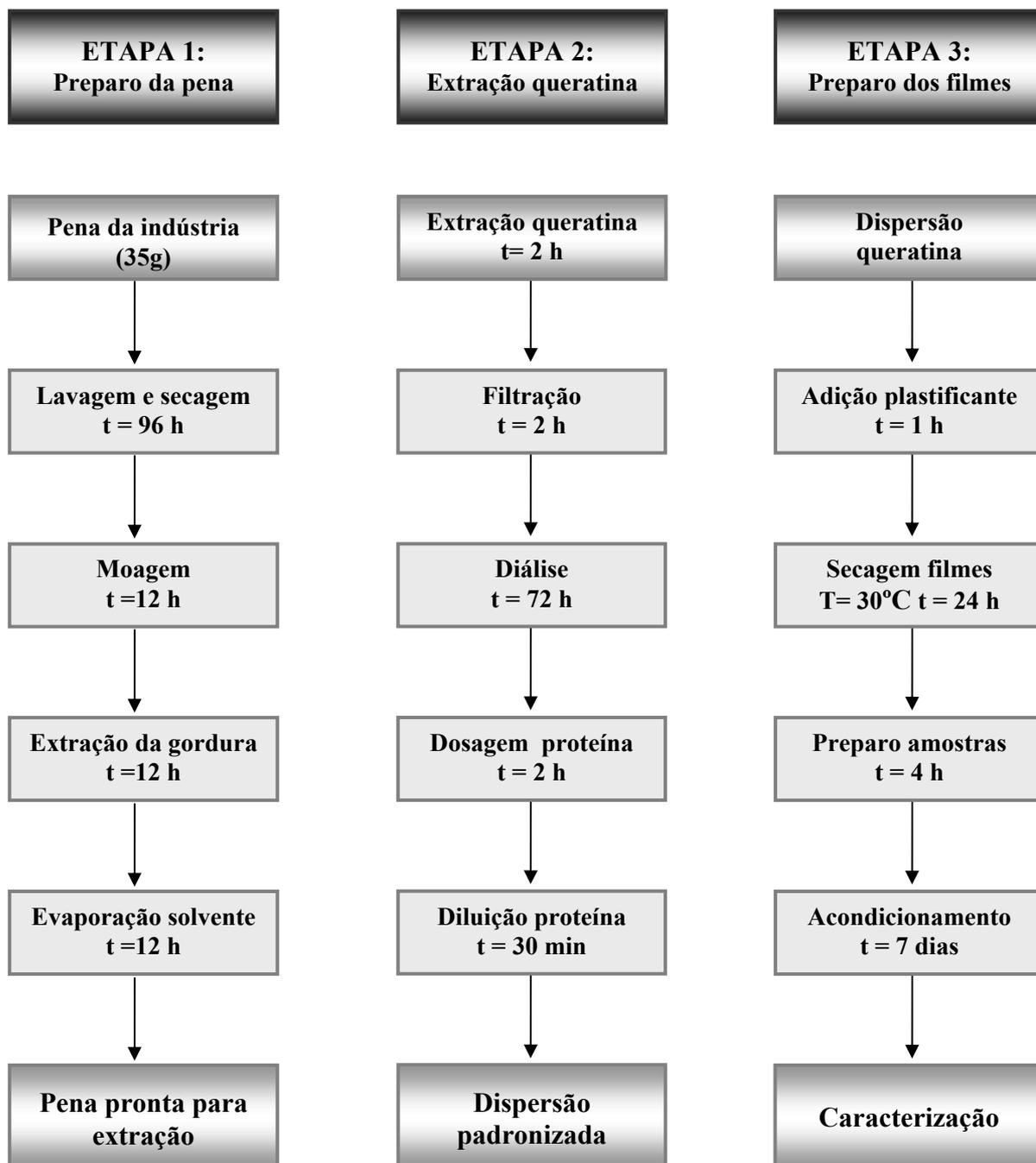


Figura 3.2 – Fluxograma do processo de obtenção e caracterização dos filmes de queratina.

3.5 ANÁLISES DOS FILMES

3.5.1 Acondicionamento, medida das espessuras e determinação dos teores de umidade dos filmes

Todos os filmes de queratina foram acondicionados a 35 °C e umidade relativa (UR) de 75 % por no mínimo 48 h, exceto nos casos onde os filmes foram acondicionados para a determinação das propriedades mecânicas, quando o acondicionamento se deu por 7 dias. A espessura de cada amostra foi medida utilizando um micrometro digital (Mitutoyo Co., Japão) com uma precisão de $\pm 0,001$ mm. As medidas de espessura foram feitas em quatro diferentes pontos de cada amostra e estes valores foram utilizados para o cálculo da média e do desvio padrão, os quais foram utilizados nos cálculos das demais propriedades. Os teores de umidade dos filmes foram determinados em triplicata pelo método gravimétrico a 105 °C por 48 h.

3.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a influência do tipo de plastificante na microestrutura dos filmes. As micrografias das amostras foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico Philips XL-30 (Laboratório de Materiais – LabMat, Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC) com fonte de elétrons de tungstênio e detector de elétrons secundários e retroespalhados. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador, marca BAL – TEC, modelo SCD 005, antes da obtenção das micrografias. Todas as amostras foram analisadas utilizando uma voltagem de aceleração de 10 kV.

3.5.3 Determinação das propriedades mecânicas

Para a determinação das propriedades mecânicas se utilizou um texturômetro (TA-TX2, Stable Micro Systems, England). Foram utilizados corpos de prova com 25 mm de largura e 100 mm. O módulo de Young (E) foi calculado a partir da parte linear da curva tensão x deformação, entre 0,00 e 1,00 % de alongamento (Figura 3.3). A resistência do material foi calculada como sendo a área abaixo da curva tensão x deformação. A separação inicial das garras foi de 70 mm e a velocidade do teste de 0,3 mm/s. As propriedades específicas foram calculadas como através da divisão de cada propriedade (tensão, (E), alongamento máximo) pela densidade específica. Cada tensão de ruptura (σ), alongamento

máximo, resistência e módulo de Young foram a média de no mínimo 10 amostras e no máximo de 14 amostras obtidas a partir do mesmo filme. As amostras foram medidas dentro de 20 min após sua remoção da cuba de acondicionamento para minimizar os efeitos devidos a absorção/adsorção ou desorção de água.

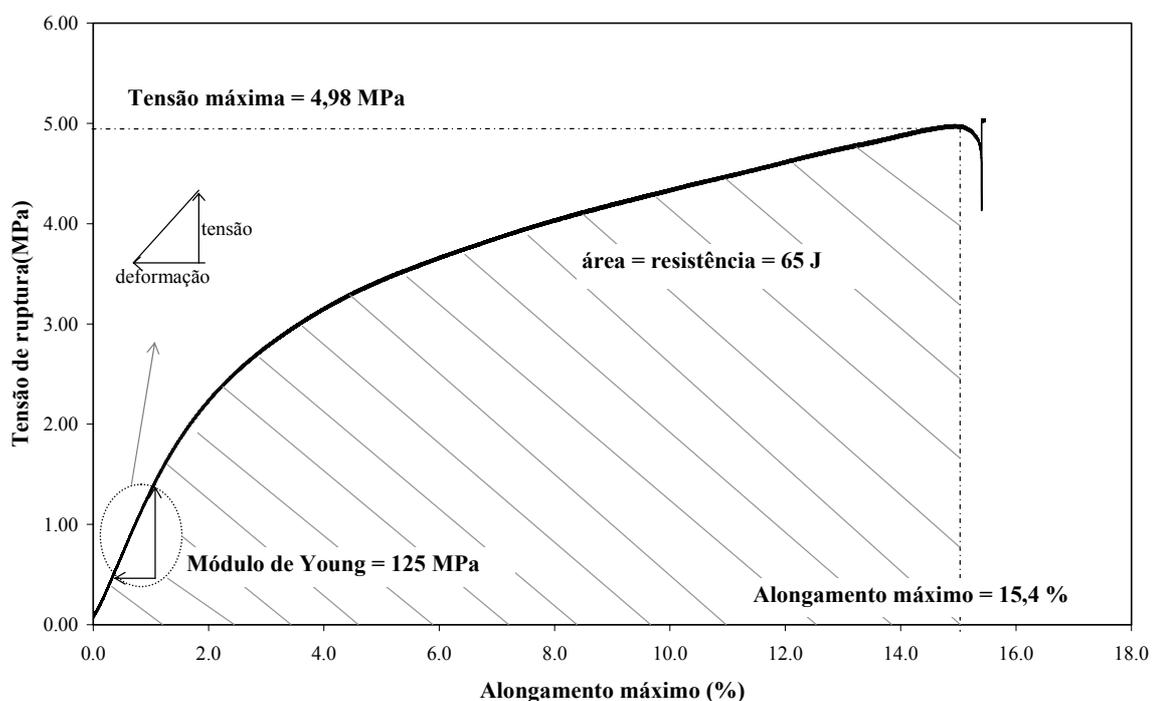


Figura 3.3 – Curva típica tensão-deformação utilizada na determinação das propriedades mecânicas dos filmes.

3.5.4 Determinação da densidade específica ($\text{g sólidos secos}/\text{cm}^3$)

Para a determinação da densidade específica ρ^s ($\text{g sólidos secos}/\text{cm}^3$), a área das amostras foi fixada em 6 cm^2 com um molde e a espessura foi determinada com um micrômetro digital, como descrito acima. Cada amostra foi mantida em uma umidade relativa de 0 % em um dessecador contendo pentóxido de fósforo (P_2O_5) por 20 dias, após este período as amostras foram pesadas em uma balança semi-analítica. O volume dos corpos de prova foi determinado pela equação 3.1 e a densidade específica dos mesmos foi calculada através da equação 3.2:

$$V = A \cdot \delta \quad (3.1)$$

$$\rho^s = \frac{m}{V} \quad (3.2)$$

onde A é a área de cada amostra (cm^2); δ é a espessura de cada amostra (cm); m é a massa seca de cada amostra (g); ρ^s é a densidade específica de cada filme (g/cm^3).

3.5.5 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada de acordo com a ASTM E96-80 (1980). As amostras (discos com $0,005 \text{ m}^2$) foram fixados em células abertas de alumínio contendo em seu interior cloreto de cálcio anidro (CaCl_2). O cloreto de cálcio anidro foi previamente secado em estufa a $140 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e cerca de 5 g de CaCl_2 anidro foram utilizadas em cada célula. As células foram acondicionadas em uma cuba hermética contendo em seu interior cloreto de sódio, a qual foi mantida em uma estufa a temperatura constante de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Desta forma se determinou o ganho de peso (umidade) de cada célula com o tempo ocasionado pelo gradiente de UR de 2-75 %.

As células foram pesadas a cada 30 min em uma balança semi-analítica por 12 h e a relação linear entre a quantidade de água transferida por unidade de área e tempo foi obtida. A PVA foi calculada de acordo com a equação 3.3 (Sarantópoulos et al. 2002):

$$WVP = \frac{G}{t} \cdot \frac{e}{A \cdot p_s \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad (3.3)$$

onde e é a espessura média de cada filme (mm); A é a área de permeação ($0,005 \text{ m}^2$); UR_1 é a umidade relativa no interior da cuba (75 %); UR_2 é a umidade relativa no interior das células (2 %); p_s é a pressão de saturação do vapor a temperatura do ensaio (kPa); e o termo G/t (g água/dia) foi calculado a partir da regressão linear obtida pelo ganho de massa em função do tempo.

3.5.6 Isotermas de sorção de umidade

Soluções saturadas de sais foram preparadas para se obter uma faixa de umidade relativas de 6-97%, como apresentado na Tabela 3.1. Primeiramente se determinou a umidade das amostras. Amostras de filmes foram então acondicionadas em dessecadores com as UR desejadas (Tabela 3.1) e pesadas periodicamente até atingirem peso constante. Isto implicou que os filmes estavam em equilíbrio em cada UR desejada. Para cada UR, três amostras de um mesmo filme foram utilizadas.

Tabela 3.1 – Umidades relativas obtidas através de soluções salinas saturadas a 20 °C e 35 °C

Soluções Salinas	UR (%) 20 °C	UR (%) 35 °C
Hidróxido de potássio (KOH)	7	6
Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	33	32
Carbonato de Potássio (K ₂ CO ₃ .2H ₂ O)	44	41
Nitrato de magnésio (MgNO ₃ .6H ₂ O)	52	51
Nitrito de sódio (NaNO ₂)	62	62
Cloreto de sódio (NaCl)	75	75
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	79	79
Cloreto de potássio (KCl)	86	84
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	97	96

Fonte: ROCKLAND *et al.*, (1960).

Os dados experimentais de sorção de umidade para os filmes de queratina de penas de frango foram obtidos em duas temperaturas (20°C e 35°C) e ajustados com quatro modelos: Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Brunauer-Emmett-Teller (BET), Iglesias-Chirife e Smith), os quais estão apresentados nas equações 3.4 a 3.7 e as constantes foram calculadas utilizando um programa de análise estatística. O modelo de GAB é amplamente utilizado para ajustar isotermas de sorção de filmes. Ele é uma extensão do modelo de BET levando em consideração as propriedades de calor de sorção em todas as camadas através da introdução de um terceiro parâmetro, *k*.

Modelo de GAB:

$$W = \frac{W_m \cdot (C \cdot k \cdot a_w)}{(1 - k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)} \quad (3.4)$$

Modelo de BET:

$$W = \frac{W_m \cdot C \cdot a_w}{(1 + C \cdot a_w)} + \frac{W_m \cdot a_w}{1 - a_w} \quad (3.5)$$

Modelo de Iglesias-Chirife:

$$W = B_1 \left[\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right] + B_2 \quad (3.6)$$

Modelo de Smith:

$$W = A - B \cdot \ln(1 - a_w) \quad (3.7)$$

onde a_w = atividade de água (UR/100); W = conteúdo de umidade no equilíbrio em base seca; W_m = conteúdo de umidade de equilíbrio em base seca relativo a umidade na monocamada; C = constante de Guggenheim relativa ao calor de sorção na primeira camada; k = constante relacionada ao calor de sorção total das multicamadas; A , B , B_1 e B_2 são constantes.

3.5.7 Coeficiente de solubilidade (β)

O coeficiente de solubilidade (β) para os filmes de queratina de penas em [g água / sólidos secos x Pa] foi calculado de acordo com equação 2.2.

3.5.8 Testes de solubilidade em água (TS)/ Intumescimento (SW)

A solubilidade total em água das amostras foi determinada como descrito por LEE *et al.* (2004). Primeiramente, três amostras de filmes foram secadas a 105 °C por 48 h em estufa com ventilação forçada para a determinação da massa inicial de sólidos de cada amostra. A solubilidade em água (g amostra/g totais) foi definida como a quantidade de sólidos solúveis em relação a quantidade inicial de sólidos secos (equação 3.8), depois de 24 h

imersos em água. Amostras de filmes com 6 cm² foram pesadas. As amostras foram imersas em 30 ml de água destilada em Erlenmeyers de 125 ml e colocadas em um banho termostático a 25 °C com agitação suave. Após 24 h as amostras foram removidas e secadas a 105 °C por 48 h. O conteúdo de sólidos foi então determinado. Cada determinação foi realizada em triplicata.

$$TS = \frac{\text{massa sólidos solubilizados}}{\text{massa sólidos inicial}} \quad (3.8)$$

O intumescimento da amostras foi determinado de acordo com LEE *et al.* (2004). Amostras de filmes com 6 cm² foram pesadas e imersas em água destilada a 25 °C por 6 h. A superfície dos filmes foi secada suavemente com papel filtro Whatman por 1 minuto para remoção da água em excesso, cada corpo de prova foi colocado entre 2 folhas de papel filtro. O intumescimento foi determinado como a quantidade de massa (água) ganha pela amostra em relação à massa inicial de sólidos secos (equação 3.9). Os testes foram feitos em triplicata.

$$SW = \frac{\text{massa água}}{\text{massa sólidos inicial}} \quad (3.9)$$

3.5.9 Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas em uma termobalança de alta sensibilidade da Shimadzu TGA-50, acoplada a um microprocessador para programação dos modos de aquecimento e resfriamento, interfaciado ao sistema “data station” TA50-WSI. A temperatura de aquecimento foi de 15-700 °C, em atmosfera de argônio, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A massa da amostra utilizada para cada filme foi de 3,0 mg.

3.5.10 Estudos realizados

Na Tabela 3.2 são apresentados os trabalhos desenvolvidos neste estudo e as análises realizadas em cada estudo.

Tabela 3.2 – Análises realizada em cada estudo desenvolvido durante o mestrado

Análises	Primeiro estudo	Segundo estudo	Terceiro estudo	Quarto estudo
Espessura e teor de umidade	X	X	X	X
MEV			X	X
Propriedades mecânicas	X			X
Densidade específica				X
PVA		X		X
Isotermas de sorção de umidade		X	X	X
Coefficiente de solubilidade			X	
Solubilidade em água		X		X
Intumescimento		X		X
Termogravimetria				X

Primeiro estudo: *Filmes de queratina de penas.*

Segundo estudo: *Influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina de penas.*

Terceiro estudo: *Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films.*

Quarto estudo: *Characterization of feather keratin films plasticized with sorbitol.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos capítulos IV ao VII são apresentados e discutidos os resultados, os quais estão organizados na forma de artigos. No capítulo IV está o primeiro estudo apresentado no XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos aborda a influência da concentração de queratina na dispersão filmogênica nas propriedades mecânicas dos filmes.

No capítulo V estão apresentados os resultados pertencentes ao segundo artigo, o qual foi submetido para a revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Este artigo apresenta um estudo sobre a influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina.

Os resultados do terceiro artigo são apresentados no capítulo VI. Este estudo foi aceito para publicação pela revista *Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie* e trata do estudo da influência de diferentes plastificantes nas propriedades de filmes de queratina.

Os resultados pertencentes ao quarto artigo são apresentados no capítulo VII. Este artigo foi submetido para a *Biomacromolecules* e apresenta um estudo sobre a influência de diferentes concentrações de sorbitol nas propriedades de filmes de queratina. Foram estudadas as propriedades mecânicas, térmicas e de barreira ao vapor d'água, além da influência deste plastificante na microestrutura das amostras.

CAPÍTULO IV

Filmes de queratina de penas

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados do trabalho intitulado: *Filmes de queratina de penas* publicado no XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife. **Anais do XIX CBCTA**, 2004. v.1. p.1 – 4.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da concentração de proteína na tensão de ruptura e na elasticidade dos filmes e, a partir destes resultados, definir a concentração padrão de queratina que foi utilizada nos estudos posteriores.

Na Tabela 4.1, apresenta-se os resultados dos ensaios mecânicos de tração dos filmes obtidos a partir de dispersões filmogênicas com diferentes concentrações de queratina.

Tabela 4.1 – Resistência à tração e alongamento de filmes de queratina de penas de frango

[proteína] (g/100 ml)	V. dispersão (ml)	g proteína/m ²	Espessura (mm)	σ (MPa)	ϵ (%)
3	50	8,5	-	-	-
5	50	14,2	0,065 ± 0,007	4,18 ± 0,41	18,24 ± 2,02
7	50	19,8	0,091 ± 0,016	4,53 ± 0,16	15,23 ± 1,17
9	50	25,4	0,092 ± 0,010	6,11 ± 0,03	11,18 ± 1,75
11	50	31,1	0,108 ± 0,018	5,78 ± 0,21	7,06 ± 0,16

Os filmes obtidos com a dispersão com 3g queratina/100 ml dispersão mostraram-se frágeis e quebradiços, impossibilitando a análise de suas propriedades mecânicas. Os resultados da Tabela 4.1 mostram que quando se aumenta a concentração de proteína na dispersão, há um aumento na espessura do filmes e também na tensão de ruptura dos mesmos, sendo que a tensão máxima de ruptura atingida foi de 6,11 MPa para os filmes obtidos a partir de dispersão com 9 g proteína/100 ml dispersão. Paralelamente há uma diminuição no alongamento máximo dos filmes.

CAPÍTULO V

Influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina de penas

Neste capítulo serão apresentados e analisados os resultados do trabalho intitulado: *Influência da massa molecular do polietileno glicol na sorção de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água de filmes de queratina de penas de frango*. Submetido para a revista Brazilian Journal of Chemical Engineering.

Este estudo teve como objetivo analisar a influência da massa molecular do plastificante utilizado na higroscopicidade e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes.

Na Tabela 5.1 estão apresentados os valores de umidade em base úmida e espessura para todas as amostras utilizadas. Para todos os casos estudados, a espessura dos filmes aumentou com o aumento da concentração de plastificante, o que pode ser interpretado como sendo um aumento do espaço livre entre as cadeias polipeptídicas causado pela adição de polietileno glicol. De acordo com Cuq *et al.* (1998), o plastificante modifica o modo de organização tridimensional das cadeias poliméricas, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumentando assim o espaço livre e a mobilidade das cadeias. O teor de umidade dos filmes aumentou com o aumento da concentração de plastificante sendo mais pronunciado para o PEG 6000.

A Figura 5.1 apresenta a evolução dos pesos das células de medida de PVA em função do tempo para filmes plastificados com PEG massa molecular 400. Pode-se observar que o aumento de peso foi linear desde o início do processo. O mesmo comportamento foi observado para todos os plastificantes estudados, obtendo-se coeficientes de correlação satisfatórios. Este comportamento linear indica que a permeação ocorreu em regime permanente, ou seja, a mesma quantidade de moléculas de água que foi absorvida no lado externo do filme foi desorvida no lado interno do filme e que isto se deve ao pré-condicionamento das amostras antes dos testes (Sobral *et al.*, 2000). Os resultados obtidos para a PVA para todos os filmes com o respectivo desvio padrão, tanto em função da massa molecular como também da concentração de PEG estão apresentados na Figura 5.2, os resultados foram a média entre triplicatas. Os filmes que apresentaram maiores valores de PVA foram os obtidos com PEG de menor peso molecular (PEG 400). Isto pode ser parcialmente explicado pelo modo como o PEG 400 se liga à cadeia da proteína, diminuindo a densidade da mesma e facilitando assim a passagem das moléculas de água. Tal efeito pode ser comprovado através da análise da espessura das amostras.

Considerando-se que a $PVA = D_{\text{eff}} \times \beta$, sendo D_{eff} o coeficiente de difusão e β o coeficiente de solubilidade da água no filme, tanto um aumento de β como do coeficiente de difusão efetivo D_{eff} influenciam o valor desta propriedade de barreira. A presença do PEG 400 pode ter aumentado os espaços intermoleculares da cadeia protéica e assim incrementado o valor de D_{eff} .

Tabela 5.1 - Umidade em base úmida e espessura para os filmes sem plastificante e para as amostras plastificadas com polietileno glicol de massa molecular 400, 1500, 4000 e 6000.

Plastificante	g/g queratina	Umidade (g água/ g totais)	Espessura (mm)
Sem plastificante	0,00	0,132 ± 0,002	0,132 ± 0,020
PEG 400	0,02	0,061 ± 0,011	0,117 ± 0,017
	0,05	0,120 ± 0,030	0,135 ± 0,018
	0,10	0,185 ± 0,002	0,118 ± 0,019
	0,20	0,202 ± 0,025	0,159 ± 0,026
	0,30	0,211 ± 0,021	0,175 ± 0,026
	PEG 1500	0,02	0,091 ± 0,013
PEG 1500	0,05	0,115 ± 0,008	0,085 ± 0,008
	0,10	0,142 ± 0,012	0,112 ± 0,019
	0,20	0,159 ± 0,009	0,132 ± 0,020
	0,30	0,186 ± 0,029	-----
PEG 4000	0,02	0,069 ± 0,004	0,100 ± 0,008
	0,05	0,091 ± 0,004	0,130 ± 0,009
	0,10	0,128 ± -----	0,138 ± 0,021
	0,20	0,210 ± 0,022	0,175 ± 0,023
	0,30	0,233 ± 0,012	0,191 ± 0,028
PEG 6000	0,02	0,141 ± 0,001	0,106 ± 0,022
	0,05	0,204 ± 0,010	0,132 ± 0,019
	0,10	0,260 ± 0,006	0,148 ± 0,031
	0,20	0,289 ± 0,022	0,153 ± 0,026
	0,30	0,302 ± 0,009	-----

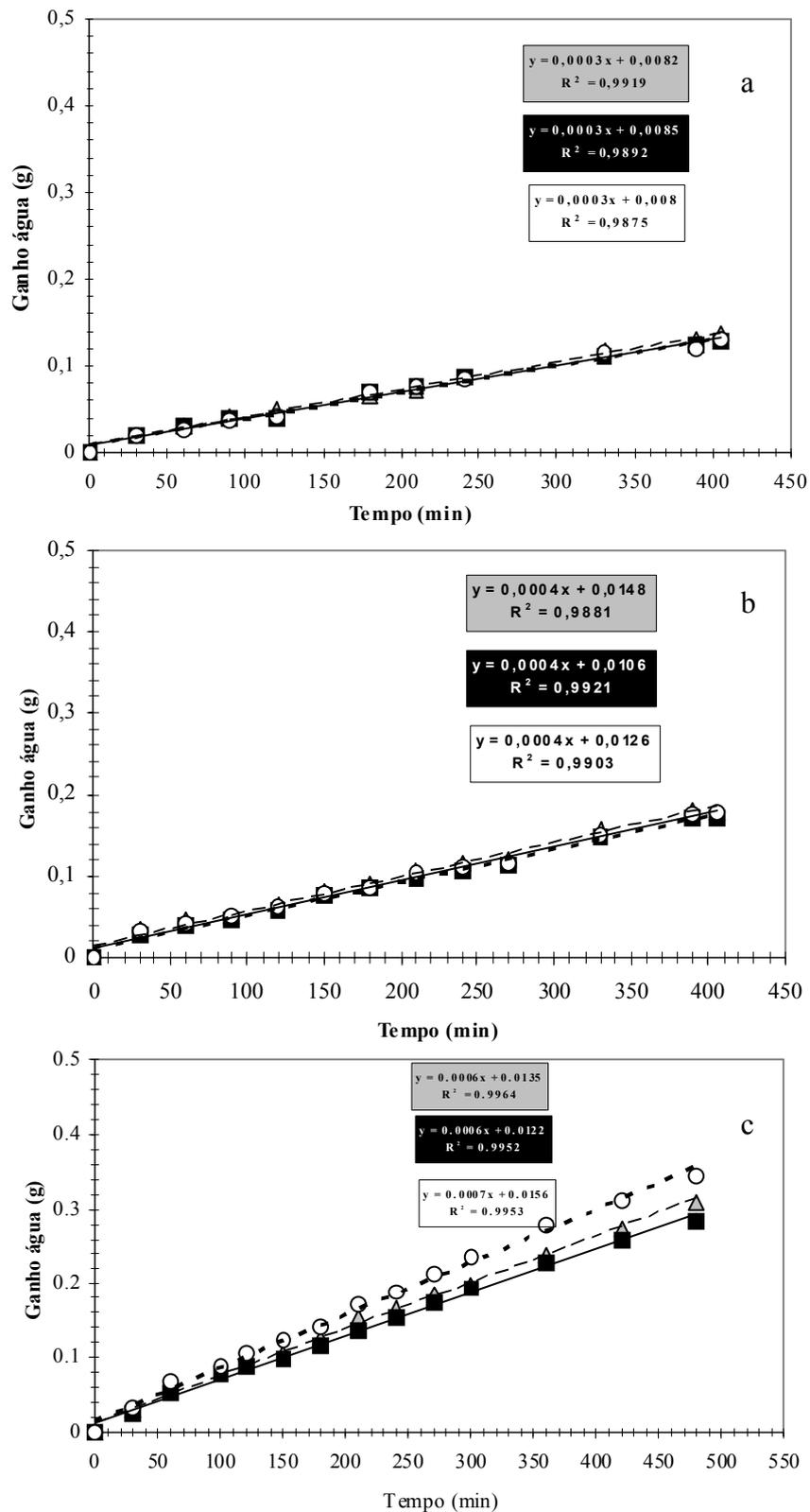


Figura 5.1 – Triplicatas da evolução do peso das células de medida de PVA em função do tempo. Primeira (\blacktriangle), segunda (\blacksquare) e terceira medida (o) para filmes plastificados com 0,02(a), 0,05(b) e 0,10(c)g PEG 400/g queratina utilizadas, para o cálculo da permeabilidade ao vapor d'água.

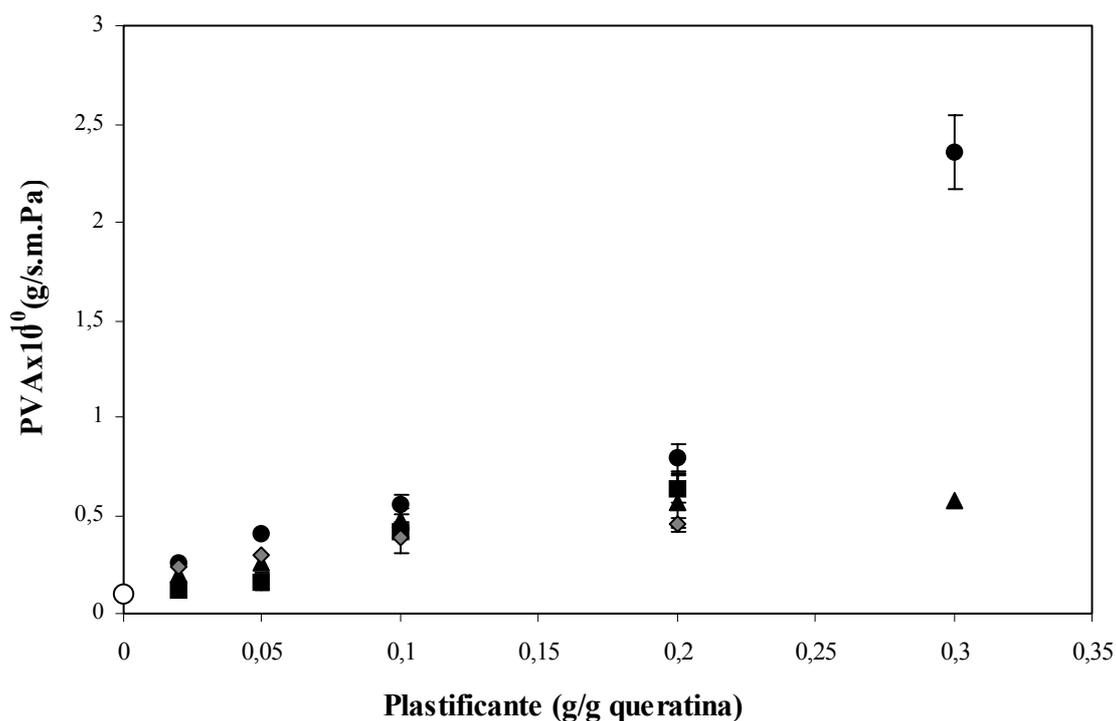


Figura 5.2 – Permeabilidade ao vapor d’água de filmes de queratina sem plastificante (o) e plastificados com PEG de massa molecular 400 (●), 1500 (■), 4000 (▲) e 6000(●).

Em todos os casos, os filmes feitos sem plastificante obtiveram a menor PVA ($0,096 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa). A PVA para os filmes plastificados com PEG 400 variou entre $0,262 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (0,02 g plastificante/g queratina) até $2,358 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (0,30g plastificante/g queratina). Tais valores são aproximadamente 3,5 vezes superiores aos maiores valores de PVA encontrados para os filmes obtidos com PEGs com massa molecular de 1500, 4000 e 6000. A diferença entre a PVA de filmes com PEG 400 e a PVA dos demais filmes pode ser atribuída a sua hidrofiliçidade, uma vez que em uma mesma concentração de plastificante, o PEG 400 possui mais grupos hidroxila do que os demais PEGs utilizados. Filmes de queratina de penas com glicerol (Martelli *et al.*, 2004), apresentaram valores de PVA na faixa de $0,117 \times 10^{-10}$ até $1,066 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (0,09g glicerol / g queratina). Ainda trabalhando com filmes de queratina, Martelli *et al.* (2004) publicaram valores de PVA entre $0,99 \times 10^{-10}$ e $8,098 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa, para filmes com 0,02 e 0,30 g sorbitol/ g queratina, respectivamente (Martelli *et al.*, 2004). Turhan *et al.* (2004), trabalhando com filmes de metilcelulose feitos com PEG 400 obtiveram valores de PVA na faixa de $0,232 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (filmes sem plastificante) até $0,697 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa para filmes com 0,66 g PEG

400/100 ml de solvente. Neste mesmo estudo variando o PM do PEG entre 1450, 4000 e 8000, o autor não encontrou uma diferença significativa nas PVA de filmes de metilcelulose, as quais foram de $0,747 \times 10^{-10}$, $0,732 \times 10^{-10}$ e $0,667 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa respectivamente. Aumentando a concentração de PEG 400 nestes filmes, Turhan (2004) observou um aumento na espessura dos mesmos, que variou entre 0,017 e 0,019 mm. Gennadios *et al.* (1996), estudando filmes obtidos a partir de albumina de ovos plastificados com PEG 400 encontraram valores de PVA de $17,3 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (filmes com 50% w/w PEG 400) e de $1,72 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa (filmes com 60% w/w PEG 400).

A solubilidade em água e o intumescimento pelo contato direto com água líquida são propriedades importantes dos filmes biodegradáveis, uma vez que para várias aplicações é necessário conhecer a resistência do material à água. A Figura 5.3 apresenta a solubilidade em água e o intumescimento de filmes de queratina. Após 24 h de imersão em água, os filmes de queratina com polietileno glicol não se dispersaram e aparentemente não perderam sua integridade. A presença de ligações covalentes intermoleculares como as pontes dissulfeto podem ser responsáveis pela insolubilidade parcial dos filmes de queratina. A solubilidade total em água dos filmes aumentou com o aumento da concentração de plastificante, sendo que a maior solubilidade foi de 0,607 g /g sólidos secos para filmes sem plastificante. Para filmes feitos com PEG 4000, a solubilidade ficou entre 0,296 – 0,558 g/ g sólidos secos para 0,02 e 0,30 g PEG 4000/ g queratina. Valores similares foram encontrados para PEG 6000 (0,251 – 0,607 g/ g sólidos secos). Resultados da literatura sobre filmes de queratina de penas plastificados com sorbitol indicam que estes são mais solúveis, com solubilidade de 0,8 g/ g sólidos secos para uma concentração de 0,30 g sorbitol/ g queratina (Martelli *et al.*, 2004). Esta diferença provavelmente está relacionada a hidroflicidade do plastificante. Uma vez que o sorbitol possui um grupo hidroxila em cada carbono, ele é mais hidrofílico do que o PEG, aumentando a solubilidade dos filmes. Através da Figura 5.3 percebe-se claramente o efeito inibidor do PEG 4000 e 6000, no intumescimento das amostras, até uma concentração de 0,10 g/g proteína. O plastificante aumentou a quantidade de água absorvida pelo polímero. A partir desta concentração (0,10 g/g proteína), o efeito é o contrário, provavelmente devido a grande cadeia do polímero cerca de 60 % da cadeia da proteína, o mesmo se liga e ocupa um espaço grande no interior da molécula, impedindo que as moléculas de água se liguem. Turhan (2004) observou que aumentando o PM do PEG, em filmes de metilcelulose, houve uma pequena diminuição em sua solubilidade em água. Galietta *et al.*(1998), trabalhando com filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite e glicerol, obtiveram valores de

solubilidade entre 0,3 e 0,50 g/g sólidos secos com diferentes concentrações de glicerol. A parcial insolubilidade dos filmes foi explicada pela presença das pontes dissulfeto intermoleculares. Segundo Galletta *et al.* (1998), o material solubilizado em água é basicamente constituído por plastificante e por algumas proteínas de baixo peso molecular. A diferença entre o material solubilizado e o conteúdo de plastificante está associado ao conteúdo de proteínas de cadeias com baixo peso molecular (cadeias de baixo peso molecular que não estão covalentemente ligadas através de ligações cruzadas nos filmes), as quais podem ser solubilizadas em água. Filmes de queratina de penas com PEG 4000 e PEG 6000 em baixas concentrações mostraram-se menos solúveis do que os filmes sem plastificante. Isto pode ser relacionado com a forma de ligação do plastificante nas cadeias da proteína, o qual pode se ligar a cadeias de baixo peso molecular, criando ligações entre estas cadeias menores e as maiores nos filmes e diminuindo assim sua solubilidade.

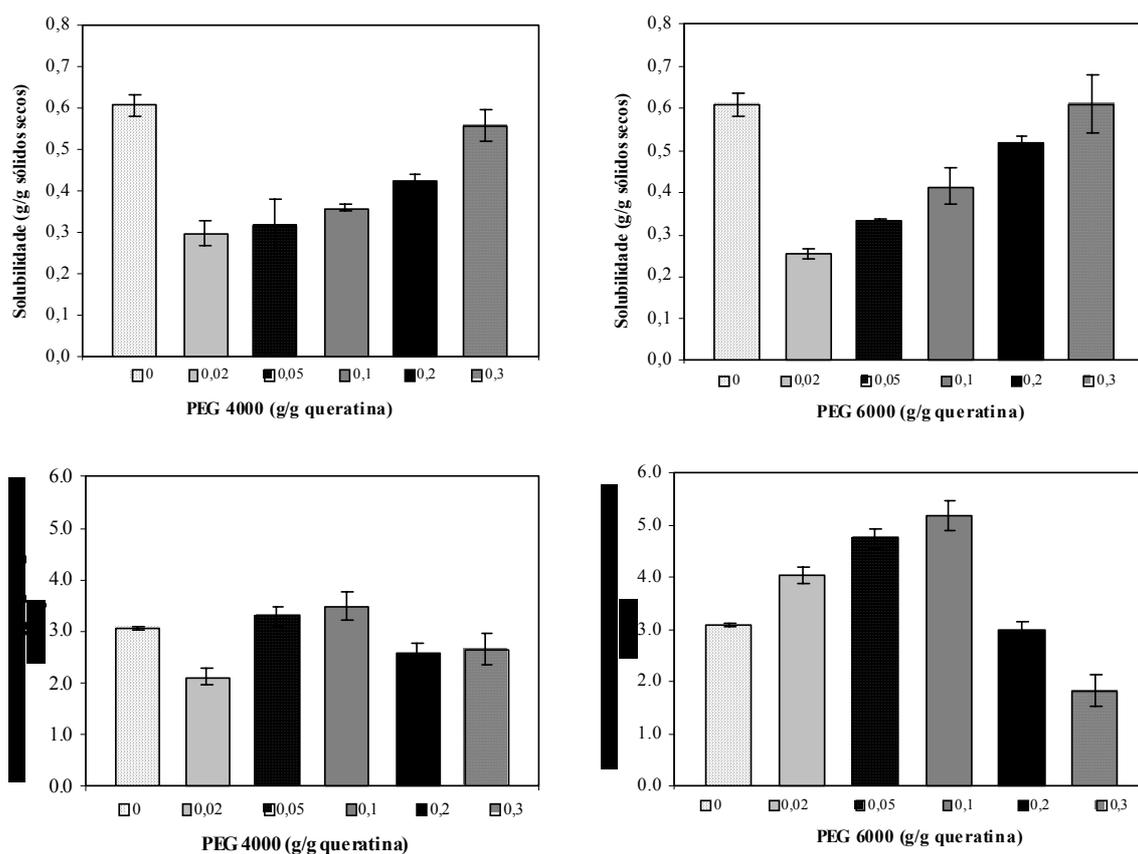


Figura 5.3 – Solubilidade em água e intumescimento de filmes de queratina plastificados com diferentes concentrações de PEG de massa molecular 4000 e 6000.

As isotermas de sorção de umidade descrevem a relação entre a umidade relativa de equilíbrio e o conteúdo de umidade no filmes a uma determinada temperatura. As

isotermas de sorção de umidade para filmes de queratina de penas estão apresentadas nas Figuras 5.4-5.6. A influência da temperatura (20°C e 35°C) nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas com PEG 400 em diferentes concentrações está apresentada na Figura 5.4. A influência do peso molecular do polietileno glicol nas isotermas e a influência da concentração e temperatura para filmes com PEG 6000 estão apresentadas nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente. Todas as curvas apresentaram forma sigmoideal, típicas de materiais com alto conteúdo de proteínas, indicando que a água é adsorvida em multicamadas de acordo com a teoria de Brunauer-Emmet-Teller (Cuq *et al.*, 1997). O modelo de GAB foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais, sendo que os valores preditos pelo modelo ficaram próximos aos obtidos experimentalmente. Como esperado, um aumento na temperatura causou uma diminuição na umidade de equilíbrio dos filmes (Figuras 5.4 e 5.6). O maior valor de umidade da monocamada encontrado foi a 20 °C para o PEG 6000 (0,185 g água/g sólidos secos), a uma concentração de 0,30 g/g proteína. Para filmes com PEG 400 o valor de umidade da monocamada variou de 0,037 – 0,133 g água/g sólidos secos a 20 °C.

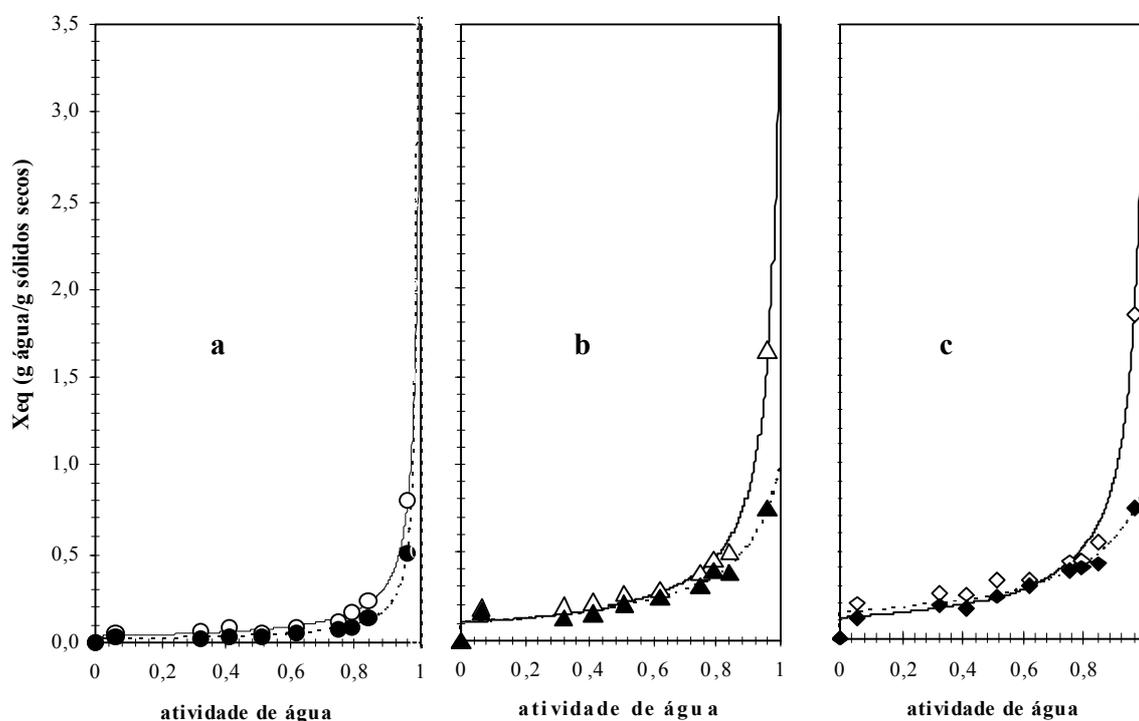


Figura 5.4 - Influência da temperatura (20°C: símbolo vazio e 35°C: símbolo cheio) nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas plastificadas com 0,02 (a), 0,10 (b) e 0,20 (c) gPEG 400/g queratina.

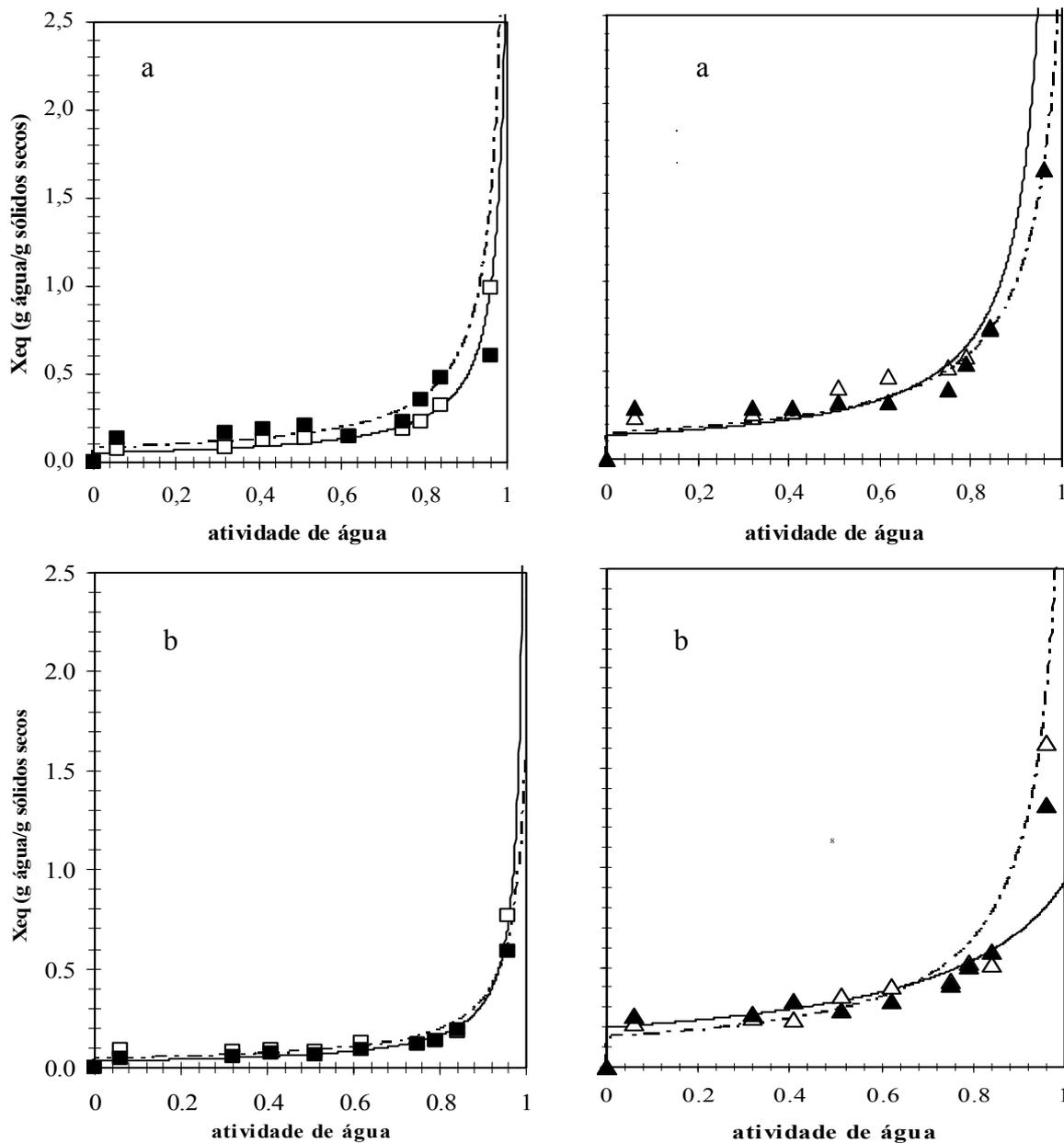


Figura 5.5 – Influência da concentração 0,05 (■) e 0,30 (▲) g PEG/g queratina e da massa molecular do plastificante (400: símbolo vazio e 4000: símbolo cheio) nas isothermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas a 20°C (a) e 35°C (b).

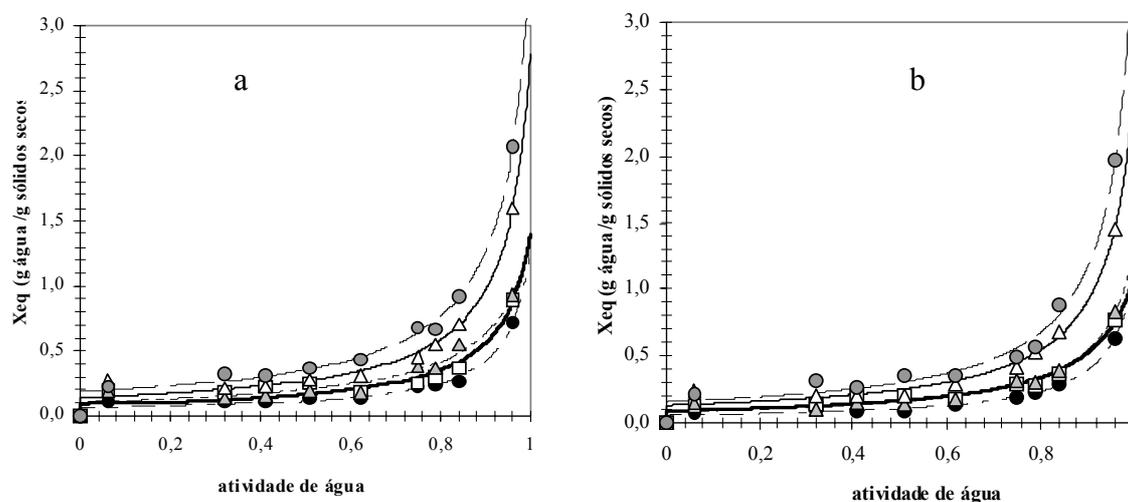


Figura 5.6 - Influência da concentração 0,02(●), 0,05(□), 0,10(▲), 0,20(△) e 0,30(●) g PEG 6000/g queratina nas isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina de penas a 20 °C (a) e 35 °C (b).

As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam as constantes do modelo de GAB a 20 °C e 35 °C, respectivamente.

Pode-se observar através da análise das Tabelas 5.2 e 5.3, que o modelo de GAB fornece um bom ajuste para os dados experimentais, obtendo-se bons coeficientes de correlação. Um aumento na concentração de plastificante aumentou o valor da umidade na monocamada para todos os casos estudados. Por outro lado, como esperado, um aumento na temperatura diminuiu os valores de umidade na monocamada.

Tabela 5.2 - Constantes de GAB e coeficiente de correlação para amostras sem plastificante e plastificadas com PEG 400, 4000 e 6000 a 20 °C.

Polietileno Glicol	Plastificante (g/g queratina)	20 °C			
		Wm	C	k	R
Sem plastificante	-	--	--	--	--
PEG 400	0,02	0,037	1785943	0,994	0,997
	0,05	0,055	3183555	0,984	0,998
	0,10	0,105	3197624	0,975	0,995
	0,20	0,116	2272538	0,976	0,991
	0,30	0,133	1989659	1,000	0,997
PEG 4000	0,02	0,058	740524	0,921	0,992
	0,05	0,079	2327611	0,984	0,995
	0,10	0,082	2049343	0,933	0,992
	0,20	0,115	2518419	0,932	0,997
	0,30	0,099	2859672	0,944	0,989
PEG 6000	0,02	0,060	3929707	0,953	0,998
	0,05	0,088	4678369	0,937	0,984
	0,10	0,110	6262489	0,919	0,991
	0,20	0,141	4581244	0,949	0,990
	0,30	0,185	4521490	0,948	0,995

Tabela 5.3 - Constantes de GAB e coeficiente de correlação para amostras sem plastificante e plastificadas com PEG 400, 4000 e 6000 a 35 °C.

Polietileno Glicol	Plastificante (g/g queratina)	35 °C			
		Wm	C	k	R
Sem plastificante	-	0,060	4923930	0,955	0,999
PEG 400	0,02	0,020	1204843	1,001	0,997
	0,05	0,034	1862521	0,996	0,996
	0,10	0,104	6383457	0,895	0,993
	0,20	0,110	2113562	0,840	0,989
	0,30	0,131	4633716	0,957	0,989
PEG 4000	0,02	0,042	2273462	0,974	0,997
	0,05	0,043	2988024	0,973	0,998
	0,10	0,066	3067441	0,958	0,991
	0,20	0,079	3148365	0,848	0,979
	0,30	0,088	6351291	0,957	0,991
PEG 6000	0,02	0,056	5907920	0,950	0,999
	0,05	0,089	2178623	0,918	0,994
	0,10	0,084	9817267	0,935	0,997
	0,20	0,130	6610014	0,950	0,992
	0,30	0,157	2408060	0,959	0,995

CAPÍTULO VI

Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films

Neste capítulo serão apresentados parte dos resultados do trabalho intitulado: *Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films*. Aceito para publicação pela revista Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie.

Este estudo teve por objetivo analisar a influência de diferentes plastificantes em diferentes níveis de concentração em filmes de queratina extraída de penas de frango.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM of keratin films carried out without and with different plasticizer concentrations can be seen in Figures 6.1 to 6.2. Figure 6.1a shows the SEM of a keratin film without plasticizer while in Figure 6.1b we can see the SEM of keratin films with 0.02g sorbitol/ g keratin. The magnifications were 3000 \times . Figure 6.2a shows the micrograph of CFK films with 0.10 g polyethylene glycol/g keratin with a magnification of 1000 \times and Figure 6.2b shows films with 0.30 g polyethylene glycol/g keratin with a magnification of 2000 \times . It can be seen from Figures 6.1 and 6.2 that the plasticizers have a great influence on the microstructure of feather keratin films. With the use of sorbitol, the film surfaces showed a more uniform aspect.

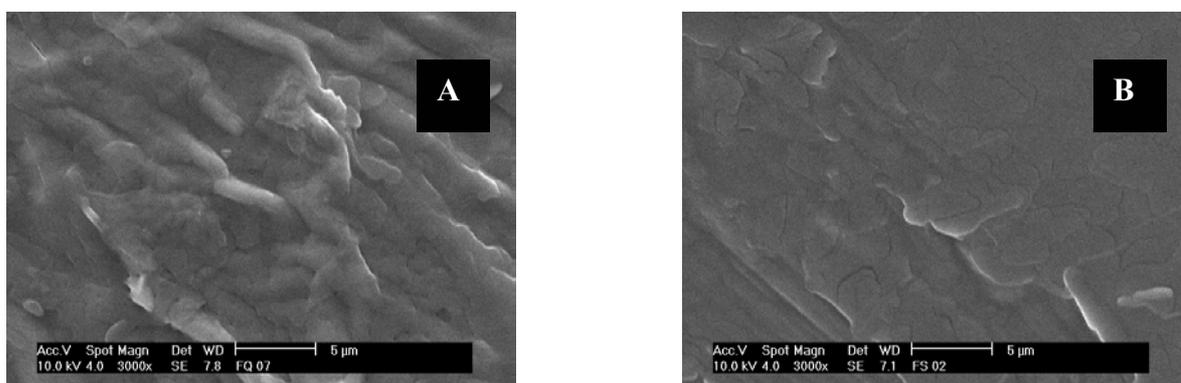


Figure 6.1 – SEM micrographs of CFK films without plasticizer (A) and with 0.02 g sorbitol /g keratin (B) with a magnification of 3000 \times .

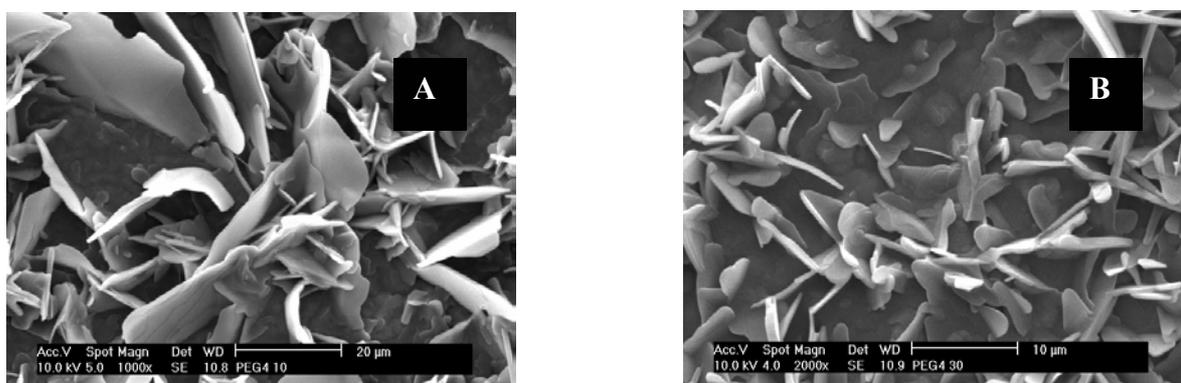


Figure 6.2 – SEM micrographs of CFK films with 0.10 g polyethylene glycol 4000/g keratin with a magnification of 1000 \times (A) and with 0.30 g polyethylene glycol 4000/g keratin with a magnification of 2000 \times (B).

The films made with sorbitol appear to be more flexible compared with the CFK film made with PEG 4000. This is probably because sorbitol have low molecular weight. Besides the integrity of CFK films made with 0.30 g polyethylene glycol has being affected, they had a lower stiffness and were more difficult to handle compared with films made with sorbitol.

Moisture sorption isotherms

Moisture sorption isotherms of CFK films at 20°C and 35°C within the 6-97% RH range are presented in Figures 6.4-6.5. Estimated parameters and quality of fit for the four fitted moisture sorption models are shown in Table 1 for CFK films with 0.05 g plasticizer/g keratin. It can be seen from Table 6.1 that the GAB model gives the best fit for all curves. Thus, only the GAB model was used to fit other curves. The GAB model showed a remarkable fit over a wide range of a_w values and a better evaluation of content of water tightly bound by the primary adsorption sites (Roy *et al.*, 2000). All the curves have the characteristic sigmoidal shape of sorption isotherms obtained for soluble products and show an asymptotic trend as water activity tends toward 1.

Results from Table 6.2 suggest that the monolayer moisture content increased around five-fold when the sorbitol concentration ranged from 0.02 to 0.30 g/g keratin. For PEG 4000, this value increased by a factor of around 1.7 when its concentration ranged from 0.02 to 0.30 g/g keratin. PEG 4000 decreased the monolayer moisture content.

Figure 6.3 shows the effect of sorbitol concentration on moisture content of CFK films. It can be seen from Figure 6.3 that increasing the sorbitol concentration causes an increase in the equilibrium moisture content. An increase in PEG concentration also causes an increase in the equilibrium moisture content. This behaviour is to be expected, since films with a higher concentration of plasticizer absorb more moisture at a given a_w , because plasticizer molecules provide more active sites to bind water molecule hydroxyl groups. The equilibrium moisture contents of CFK films with sorbitol were higher than with PEG 4000, which is probably related to how easily it is incorporated into the keratin chain and associates with the hydrophilic amino acids like serine residues and tyrosine residues.

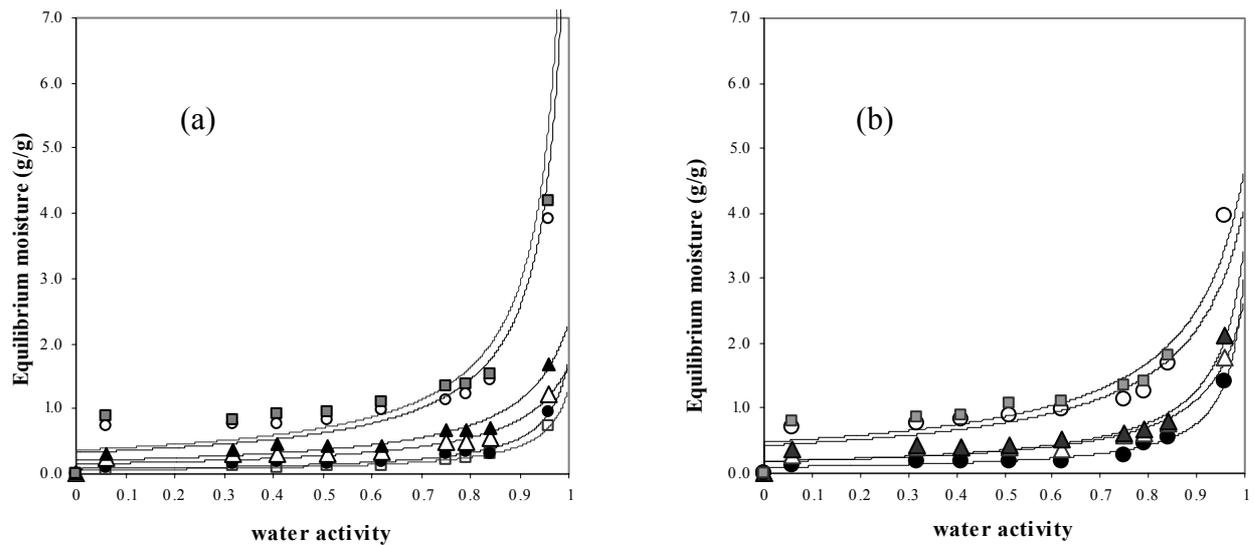


Figure 6.3 – Effect of sorbitol concentration 0.00(□), 0.02(●), 0.05(△), 0.10(▲), 0.20(○) and 0.30(■) g sorbitol/g keratin) on the equilibrium moisture content of CFK films at two temperatures 20°C (a) and 35°C (b), fitted with the GAB model.

The effect of temperature (20°C and 35°C) on the moisture content of CFK films plasticized with polyethylene glycol MW 4000 at three concentration levels (0.02, 0.10 and 0.30 g/g keratin) can be seen in Figure 6.4. The effect obtained was as expected, since an increase in the temperature causes a decrease in the equilibrium moisture content, for almost all materials.

Moisture sorption isotherms for CFK films as a function of temperature (Figure 6.4) and plasticizer concentration (Figure 6.3) showed a behavior typical of hydrophilic materials. Equilibrium moisture content decreased with temperature and increased with the amount of plasticizer.

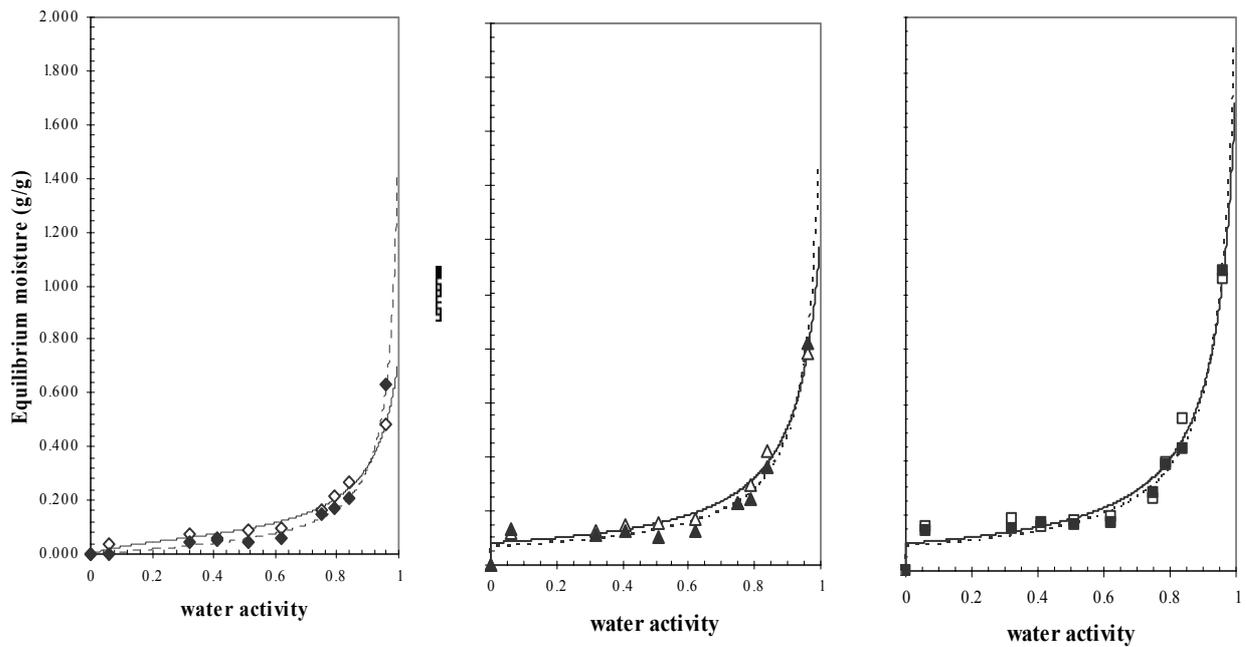


Figure 6.4 – Effect of temperature at 20°C empty symbol and 35°C to full symbol on the sorption isotherms of CFK films with 0.02 (\diamond \blacklozenge), 0.10 (\triangle \blacktriangle), and 0.30 (\square \blacksquare) PEG/g keratin fitted with GAB model.

Calculated constants for all the models are shown in Table 6.1 for films at 35°C and with 0.05g plasticizer/g keratin and the calculated GAB model constants are shown in Tables 6.2 and 6.3 for films at 35 °C and 20 °C, respectively, for different plasticizer concentrations.

The GAB model was found to fit moisture sorption data extremely well for all films. The sigmoid-shaped curves are typical of high protein content material and indicate that water is adsorbed in multimolecular layers according to the Brunauer-Emmet-Tellet theory (Cuq *et al.*, 1999).

Table 6.1 – Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films with 0.05g plasticizer/g keratin at 35°C.

Model	Constant and R^2	Without plasticizer	Sorbitol	PEG 4000
GAB	Wm	0.059	0.151	0.043
	C	5923930	3856226	2988024
	k	0.954	0.910	0.973
	R^2	0.994	0.963	0.996
BET	Wm	0.032	0.043	0.027
	c	1744251	1120329	1964973
	R^2	0.876	0.874	0.970
Iglesias-Chirife	B_1	0.027	0.036	0.026
	B_2	0.092	0.130	0.042
	R^2	0.949	0.959	0.973
Smith	A	-0.011	-0.005	-0.050
	B	0.199	0.263	0.183
	R^2	0.922	0.912	0.890

It can be seen that the monolayer moisture content of CFK films increases with an increase in plasticizer concentration and is dependent on the type of plasticizer. Also, a temperature influence can be noted mainly for the monolayer moisture content, which decreases at higher temperatures.

The monolayer value indicates the amount of moisture that was adsorbed in a single layer by binding sites in the film. The addition of plasticizer provides more active sites where moisture molecules can be adsorbed, with hydrophilic hydroxyl groups being present at the film surface (Cho & Rhee, 2002).

Table 6.2 – Constant values and correlation coefficient (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 20°C.

Plasticizer	Plasticizer concentration (g/g keratin)	20°C			
		Wm	C	k	R ²
Without Plasticizer	-	--	--	--	--
Sorbitol	0.02	0.098	1355715	0.970	0.988
	0.05	0.182	12391200	0.933	0.973
	0.10	0.189	1965224	0.948	0.967
	0.20	0.429	15534200	0.896	0.968
	0.30	0.482	3334891	0.898	0.965
Polyethylene Glycol (4000)	0.02	0.058	740524	0.921	0.989
	0.10	0.082	2049343	0.933	0.987
	0.30	0.099	2859672	0.944	0.976

Table 6.3 – Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 35°C.

Plasticizer	Plasticizer concentration (g/g keratin)	35°C			
		Wm	C	k	R ²
Without Plasticizer	-	0.060	4923930	0.955	0.994
Sorbitol	0.02	0.076	923087	0.958	0.978
	0.10	0.200	5587832	0.915	0.961
	0.20	0.324	2976854	0.970	0.967
	0.30	0.364	5249142	0.972	0.962
	0.02	0.042	2273462	0.974	0.995
Polyethylene Glycol (4000)	0.10	0.066	3067441	0.958	0.984
	0.30	0.088	6351291	0.957	0.991

The monolayer moisture content of myofibrillar protein-based films may be associated with the number of hydrogen-binding amino acids that could interact with water in myofibrillar proteins (Cuq *et al.*, 1999). The k parameter of the GAB model was found to be

independent of composition. In all cases studied the CFK films showed lower monolayer moisture contents than those of the peanut protein films studied by Jangchud *et al.* (1999), which had monolayer moisture contents in the range of 21.42 to 24.51 on a dry weight basis.

Water Solubility Coefficient

The behavior of the water solubility coefficient (β) of keratin/plasticizer films in relation to water activity is presented in Figure 6.5.

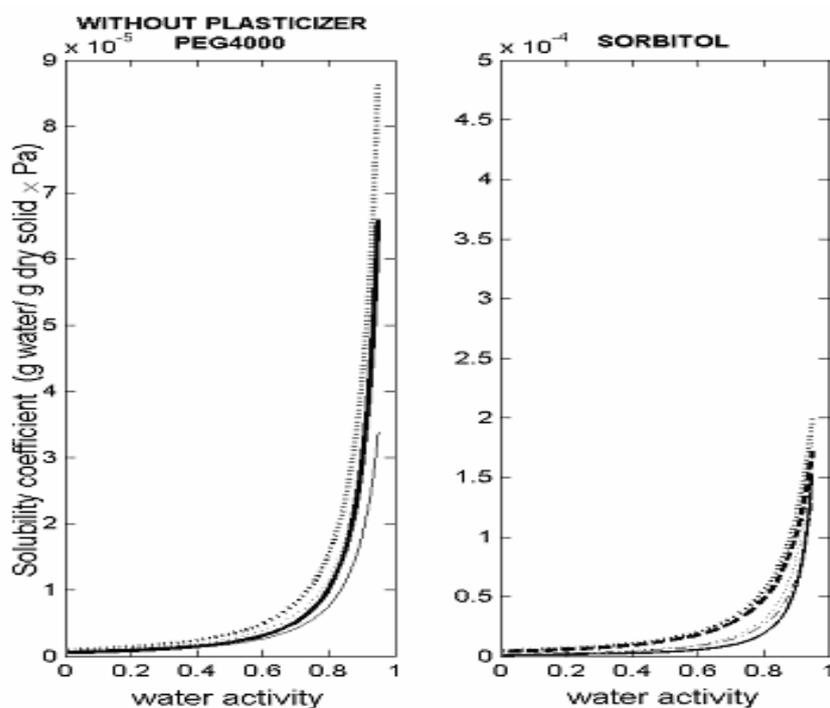


Figure 6.5 – Water solubility coefficient for films without plasticizer and with plasticizers .

Without plasticizer and with PEG 4000(— Without plasticizer; — 0.02; 0.10; 0.30 g/g keratin); Sorbitol (— 0.02; - - 0.05; 0.10; - - 0.20; 0.30 g/g keratin)

The solubility of keratin films without plasticizer is presented in figure 6.5a, together with results obtained for the CFK plasticized with PEG 4000. For $a_w = 0.9$ films without plasticizer the β value was 3.3×10^{-5} [g water/g dry solid x Pa], while film plasticized with 0.02 g PEG 4000/g keratin presented a β value close to 2×10^{-5} [g water/g dry solid x Pa], suggesting a reduction in the keratin film solubility. The β value increased only for PEG concentrations greater than 0.10 g PEG/g keratin. The solubility of keratin films plasticized with sorbitol is presented in figures 6.5b. The β values increased with plasticizer concentration in all cases. These data will be useful in identifying the relative influence of β on the water vapor permeability of keratin films.

CAPÍTULO VII

Characterization of feather keratin films plasticized with sorbitol

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados do trabalho intitulado: *Characterization of feather keratin films plasticized with sorbitol*. Submetido para revista *Biomacromolecules*.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da adição de sorbitol em diferentes concentrações na caracterização dos filmes de queratina. As amostras foram caracterizadas através da análise das propriedades mecânicas, higroscopicidade, permeabilidade ao vapor d'água, microestrutura e termogravimetria.

Moisture content (MC) and dry matter density(ρ^s)

The humidity was expressed on a dry weight basis as g water/g dry matter and as g water/g total matter. The values for MC and ρ^s can be seen in Table 7.1. The water content of films increased with an increase in plasticizer concentration while the dry matter density didn't change significantly, varying between 0.86-0.89 g/cm³ for films without plasticizer and with different sorbitol concentrations.

Table 7.1 – Moisture content and dry matter density of chicken feather keratin/sorbitol films

Sorbitol (g/g keratin)	MC (g water / g total mass)	MC (g water / g dry matter)	Dry matter density (g dry matter/cm ³)
0.00	0.132 ± 0.032	0.152 ± 0.003	0.883 ± 0.024
0.02	0.267 ± 0.013	0.377 ± 0.029	0.894 ± 0.137
0.05	0.271 ± 0.005	0.364 ± 0.015	0.883 ± 0.113
0.10	0.301 ± 0.004	0.391 ± 0.070	0.890 ± 0.090
0.20	0.464 ± 0.076	0.589 ± 0.150	0.874 ± 0.092
0.30	0.474 ± 0.042	0.750 ± 0.069	0.863 ± 0.014

Water vapor permeability (WVP)

Table 7.2 shows the WVP of keratin films made with different sorbitol concentrations. As expected, the WVP increased with an increase in the sorbitol concentration. The highest value was 8.098 g/m.s.Pa for films with 0.30 g sorbitol/g keratin, which is 84 times higher than the value for the CFK films without plasticizer. These values were greater than those found for keratin films plasticized with glycerol, for which the maximum value found was 1.066 g/m.s.Pa for films with 0.09 g glycerol/g keratin (Martelli *et al.*, 2004).

Comparing films made with 0.05g sorbitol/g keratin and 0.05g glycerol/g keratin, it can be seen that the values are 3.150 and 0.622 g/m.s.Pa, respectively. This is probably because sorbitol is more hydrophilic than glycerol, since it has a hydroxyl group on each carbon and consequently it provides more active groups to bind water molecules. Based on water sorption equilibrium date, the plasticizers were ranked for increasing hydrophilicity as follows: sorbitol higher than glycerol (Gennadios *et al.*, 1996).

Table 7.2 – Water vapor permeability of CFK/sorbitol films and other protein films

Sorbitol concentration (g/g keratin)	Thickness (mm)	WVP ^a (g/m.s.Pa) × 10 ¹⁰	Reference
0.00	0.132±0.020	0.096 ± 0.006	This work
0.02	0.099 ± 0.015	2.416 ± 0.053	
0.05	0.108 ± 0.009	3.150 ± 0.139	
0.10	0.115 ± 0.123	3.647 ± 0.068	
0.20	0.139 ± 0.020	5.167 ± 0.159	
0.30	0.206 ± 0.032	8.098 ± 0.109	
0.01 g glycerol/g keratin	0.094 ± 0.013	0.117 ± 0.000	<i>Martelli et al., 2004</i>
0.03 g glycerol/g keratin	0.106 ± 0.006	0.390 ± 0.008	
0.05 g glycerol/g keratin	0.106 ± 0.014	0.622 ± 0.016	
0.07 g glycerol/g keratin	0.134 ± 0.014	0.820 ± 0.081	
0.09 g glycerol/g keratin	0.138 ± 0.012	1.066 ± 0.070	
WGF	0.127 ± 0.011	0.560 ± 0.030	<i>Gennadios et al., 1993d</i>
WGF/ mineral oil	0.125 ± 0.011	0.410 ± 0.010	
WGF/ sodium sulfite	0.128 ± 0.008	0.610 ± 0.040	
WGF/ hydrolyzed keratin	0.119 ± 0.009	0.430 ± 0.030	
SPI films/DAS (0%)	0.067 ± 0.003	15.000 ± 0.194	<i>Rhim et al., 1998</i>
SPI films/DAS (5%)	0.070 ± 0.004	16.800 ± 0.806	
SPI films/DAS (10%)	0.073 ± 0.005	16.500 ± 0.889	
SPI films/DAS (15%)	0.073 ± 0.004	15.900 ± 0.195	
SPI films/DAS (20%)	0.068 ± 0.006	16.100 ± 0.500	
SPI films/SDS (0%)	0.072 ± 0.002	28.100 ± 1.389	<i>Rhim et al., 2002</i>
SPI films/SDS (5%)	0.084 ± 0.003	28.300 ± 2.222	
SPI films/SDS (10%)	0.084 ± 0.001	23.900 ± 0.833	
SPI films/SDS (20%)	0.086 ± 0.008	21.700 ± 2.500	
SPI films/SDS (30%)	0.079 ± 0.002	17.800 ± 2.778	
SPI films/SDS (40%)	0.083 ± 0.008	15.600 ± 1.111	

^a Means of three replicates ± standar deviations

WGF: Wheat gluten films

SPI: soy protein isolate

DAS: dialdehyde starch

Furthermore, even films made with 0.30 g sorbitol/g keratin were much less permeable to moisture of those prepared with soy protein isolate (SPI) and with dialdehyde starch (DAS), which can be evidenced in Table 7.2, where SPI/DAS/SDS films had WVP values varying between 15.00-28.300 g/m.s.Pa (Rhim *et al.*, 2002).

Water sorption isotherms

Water sorption isotherms were determined primarily in order to know the water contents of the films under tensile experiments. Moisture sorption isotherm data of CFK/sorbitol films at 20 °C and 35 °C within the 0.06 -96.0 % RH range are presented in Figure 7.1 and constants values for GAB model in Table 7.3.

On investigating the CFK films without sorbitol, it was found that these samples were less hydrophilic than those plasticized with different sorbitol concentrations. CFK films without sorbitol had a monolayer moisture content of 0.060 g water/g dry matter at 35 °C, while for films with sorbitol the monolayer moisture content varied from 0.076 to 0.364 g water/g dry matter depending on the concentration, at the same temperature. The equilibrium moisture of films at 20 °C and in a water activity (a_w) of 0.96 was in the range of 1.420-3.491 for films with 0.02 -0.30 g sorbitol/g keratin.

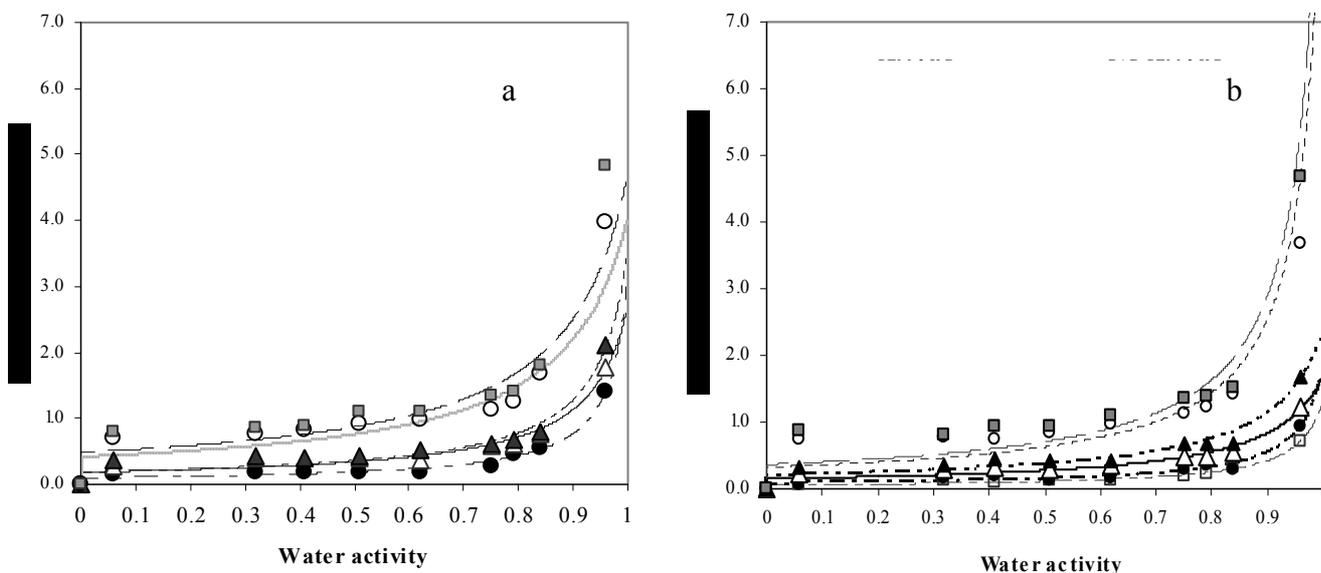


Figure 7.1– Effect of sorbitol concentration 0,00 (□), 0,02(●), 0,05(Δ), 0,10(▲), 0,20(o) e 0,30(■) g/g keratin on the equilibrium moisture content of CFK films at two temperatures 20°C (a) and 35°C (b), fitted with the GAB model.

Table 7.3 – Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK/sorbitol films fitted with GAB model at 20°C and 35°C

Plasticizer	Plasticizer concentration (g/g keratin)	20°C				R^2
		Wm	C	k		
Without Plasticizer	-	--	--	--	--	
Sorbitol	0.02	0.098	1355715	0.970	0.988	
	0.05	0.182	12391200	0.933	0.973	
	0.10	0.189	1965224	0.948	0.967	
	0.20	0.429	15534200	0.896	0.968	
	0.30	0.482	3334891	0.898	0.965	
35°C						
Without Plasticizer	-	0.060	4923930	0.955	0.994	
Sorbitol	0.02	0.076	923087	0.958	0.978	
	0.05	0.151	3856226	0.910	0.963	
	0.10	0.200	5587832	0.915	0.961	
	0.20	0.324	2976854	0.970	0.967	
	0.30	0.364	5249142	0.972	0.962	

SEM

Micrographs of samples with 0.00, 0.02, 0.10 and 0.20 g sorbitol/g keratin are shown in Figure 7.2 (A), (B), (C) and (D), respectively, with a magnification of 2000 x. The results demonstrated clearly that sorbitol made the surface of CFK films more homogeneous.

Comparing films without plasticizer with films made with 0.30 g sorbitol/g keratin, it can be noted that sorbitol caused a significant change in the film surfaces. This is to be expected, since sorbitol made the polymeric matrix relax, opening the protein chain, and consequently causing this homogeneous effect.

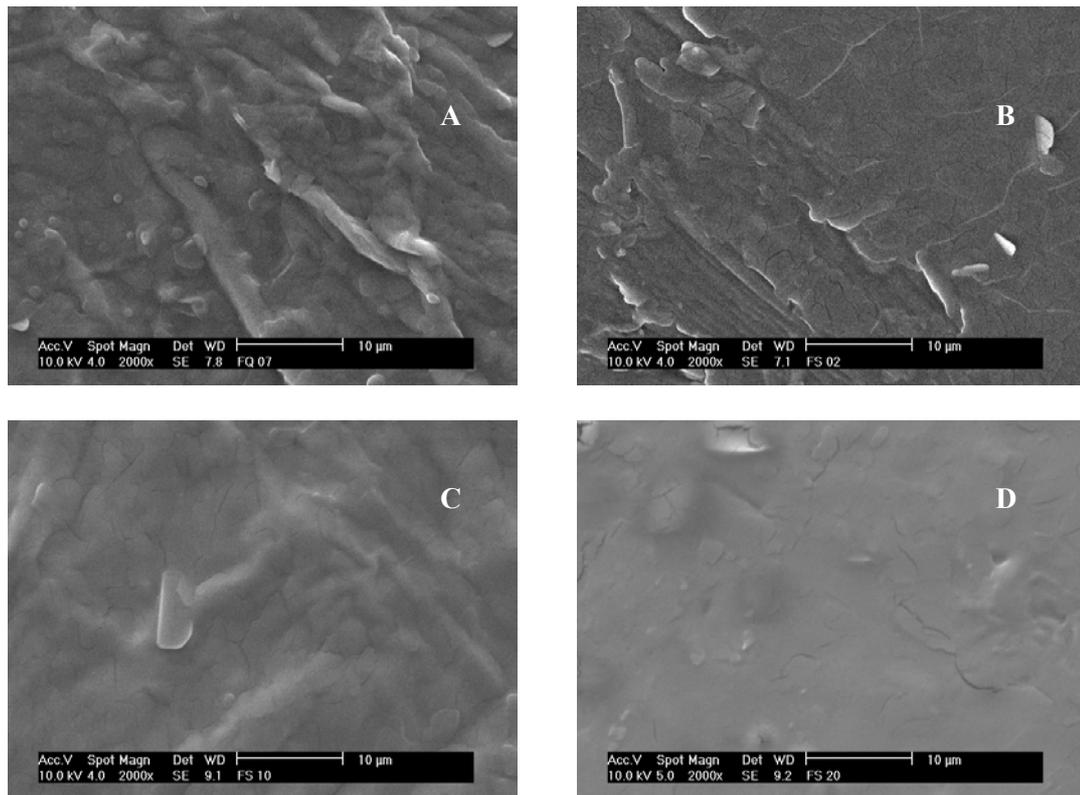


Figure 7.2 – Micrographs of CFK films plasticized with 0,00 (a), 0,02 (b), 0,10 (c) and 0,20 (d) g sorbitol/g keratin with an magnification of 2000 ×.

Film solubility/ Swelling(SW)

Solubility in water is an important property of biodegradable films. Potential applications may require water insolubility to enhance product integrity and water resistance (Turhan & Sahbaz, 2004).

The water solubility defines the tolerance to water and is determined by the chemical structure of the materials unlike the water permeability (Lee *et al.*, 2004). The resistance to water is very important because the stability of biodegradable polymers will be poor if they have a high water solubility. SW defines the amount of water absorbed by films and is an important property of protein films. Biopolymer films made from proteins initially swell when they absorb water and this results in changes in their structure. Thus, examination of SW is necessary for the efficient application of biopolymer films.

Water solubility and SW of keratin/sorbitol films are shown in Figure 7.3. Water solubility ranges between 32–78%, increasing as a function of plasticizer concentration. These values are higher than those found for gellan/gelatin films, which have a water solubility

between 30-52% (Lee *et al.*, 2004). Wheat gluten films with different cross-linkings showed a range of solubility between 46-70% (Tropini *et al.*, 2004).

Probably CFK/sorbitol films have higher solubility due to the high quantity of hydroxyl groups of sorbitol. In this study the SW followed the trend of the water solubility, increasing with an increase in sorbitol concentration, this is understandable since SW is the first indication of solubility of a material.

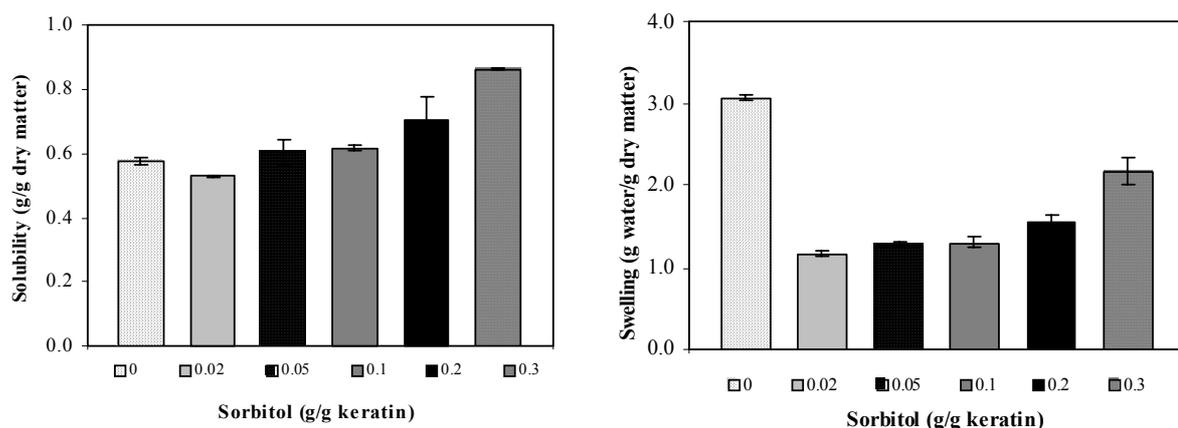


Figure 7.3 – Water solubility and swelling of CFK films plasticized with different sorbitol concentration.

Mechanical properties

The mechanical properties of films and coatings depend on the type of film-forming material and especially on its structural cohesion. Cohesion is the result of a polymer's ability to form strong and/or numerous molecular bonds between polymeric chains, thus hindering their separation. This ability depends on the structure of the polymer and in particular its molecular strength, geometry, molecular weight distribution and the type of position of its lateral groups (Guilbert *et al.*, 1996). The degree of cohesion affects film properties such as resistance, flexibility, permeability, etc. Strong cohesion reduces flexibility, gas and solute barrier properties and increases porosity (Guilbert *et al.*, 1996).

Mechanical properties of materials are largely associated with distribution and concentration of inter- and intramolecular interactions allowed by the primary and spatial structures. Cohesion of protein-based materials depends mainly on type and density of intra- and intermolecular interaction, but also results from interactions with other constituents. Thus,

it is expected that addition of sorbitol decreases the mechanical properties of CFK films (Cuq *et al.*, 1998).

Table 7.4 shows the mechanical properties of CFK films plasticized with sorbitol and in Figure 7.4 the typical stress-strain curves of CFK/sorbitol films can be seen. Films prepared from proteins such as gluten, casein and soy as well as keratin are very brittle and need plasticization because of the presence of extensive hydrogen bonding with ionic and hydrophobic interactions (Arvanitoyannis *et al.*, 1997; Arvanitoyannis *et al.*, 1998). Addition of a plasticizer to a polymer generally results in a decreased elasticity modulus and tensile strength and an increased elongation at break.

Table 7.4 – Mechanical properties of chicken feather keratin films plasticized with different sorbitol concentration

Sorbitol (g/g keratin)	Tensile strength* (MPa)	Elongation at break* (%)	E-modulus* (MPa)	Toughness* (J)
0.00	5.13 ± 0.17	16.25 ± 2.00	125.0 ± 23.0	65.82 ± 9.36
0.02	3.35 ± 0.46	52.75 ± 5.64	28.0 ± 8.0	108.56 ± 21.58
0.05	1.78 ± 0.09	42.73 ± 3.38	19.0 ± 4.0	49.94 ± 3.06
0.10	1.18 ± 0.10	38.41 ± 3.78	9.0 ± 1.0	29.31 ± 3.77
0.20	0.83 ± 0.11	39.53 ± 2.48	5.0 ± 2.0	20.72 ± 2.81
0.30	0.45 ± 0.04	31.74 ± 3.46	3.0 ± 0.0	9.00 ± 1.54

* Means of ten replicates ± standar deviations

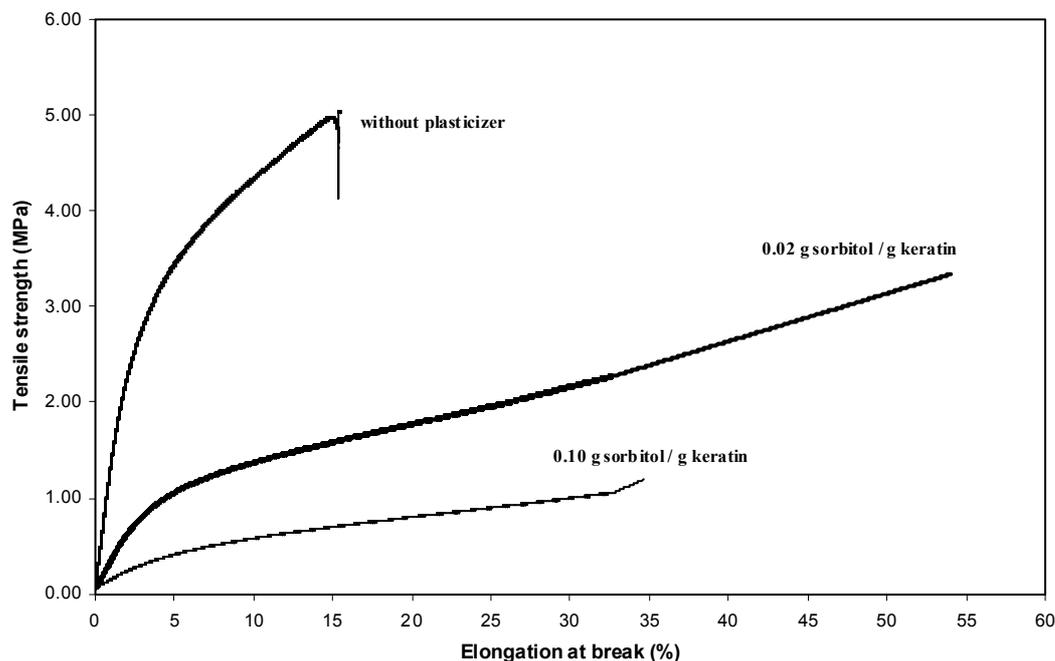


Figure 7.4 – Typical stress-strain curves of CFK/sorbitol films.

As expected the sorbitol concentration influences the mechanical properties of the samples and an increase in the amount of plasticizer causes a decrease in the tensile strength. The maximum tensile strength was 5.13 MPa for films without plasticizer and which decreased to 0.83 MPa and 0.45 MPa for samples with 0.20 and 0.30 g sorbitol/g keratin, respectively. The highest ϵ was 52.75% for films made with 0.02 g sorbitol/g keratin, which also had the highest toughness, about 108.56 MPa while the E-modulus varied between 1.25 – 0.03 MPa.

CFK films made with a 52 % chemical modification of cysteine and 0.20-0.30 g glycerol/g keratin gave values from 30 MPa–18 Mpa, respectively, while the elongation at break was in the range of 6-8 %. Also, the maximum ϵ was about 12.5 % for films with 0.48 g glycerol/ g keratin, which is 4.22 times lower than the value found in this work (Schrooyen *et al.*, 2001).

Values for σ in the range of 0.235-0.433 MPa have been reported for wheat flour protein films using different types of flour, while the ϵ was between 490-640 % and the E-modulus was in the range of 0.368-0.783 Mpa (Rayas *et al.*, 1997). For films made with

wheat gluten and hydrolyzed keratin values for tensile strengths were between 2.6 MPa and 1.7 MPa and ϵ values were in the range of 237.9-313.5% (Gennadios et al., 1993d).

Thermal properties

Thermogravimetric results are shown in Figure 7.5. Depending upon the film composition, the TG thermograms showed upper or lower residual mass, indicating that sorbitol affects the protein chain, causing the polymeric matrix to open, decreasing the inter- and intramolecular forces between polymeric chains, increasing the mobility chain and decreasing thermal stability. In Figure 7.5 it can be seen that sorbitol influences the stability of the samples. The residual mass was 19.073% for films without plasticizer and 18.32%, 13.76% and 10.18% for films plasticized with 0.02 g, 0.10 and 0.30 sorbitol/g keratin, respectively. The declined of residual mass also could be related with the addition of sorbitol, once that, when sorbitol was added in the samples the residual mass decline at the same level of sorbitol added, indicating that this residual mass loosed could be the sorbitol mass added. Also, all runs showed two stages of mass loss. The first stage started at temperatures between 71-76 °C, which may be related to free water loss. The second stage started at temperatures from 220 °C to 270 °C for films with 0.00 and 0.30 g sorbitol/g keratin.

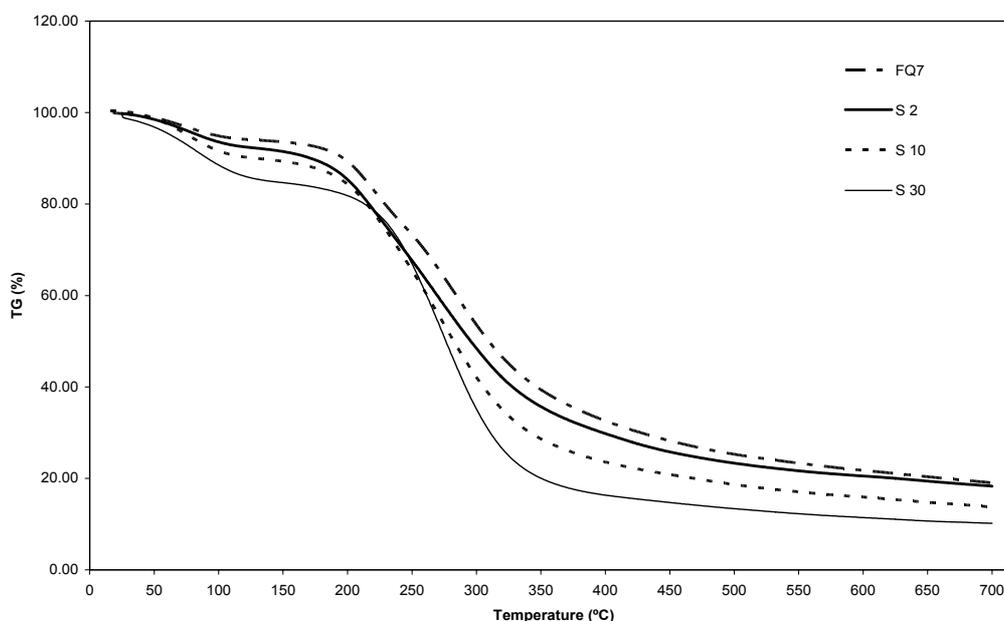


Figure 7.5 – Termogravimetric curves of CFK films plasticized with 0,00 (FQ7), 0,02 (S2), 0,10 (S10) and 0,30 (S30) g sorbitol/g keratin.

CAPÍTULO VIII

Conclusões

Em todos os casos estudados houve um aumento da espessura das amostras com um aumento na concentração do plastificante utilizado, no caso do sorbitol, este efeito foi mais pronunciado. O mesmo aconteceu para o teor de umidade dos filmes. Já a densidade específica das amostras manteve-se constante com a variação da concentração de plastificante utilizada.

A permeabilidade ao vapor d'água foi influenciada de acordo com o tipo e a quantidade de plastificantes utilizados. Em todos os casos, a permeabilidade ao vapor d'água aumentou com um aumento na concentração de plastificantes. Filmes obtidos com sorbitol obtiveram os maiores valores para permeabilidade do que as demais amostras. Nos filmes obtidos com polietileno glicol a permeabilidade ao vapor d'água só foi afetada para PEG com baixas massas moleculares (PEG 400), para PEGs com massas moleculares superiores, não houve diferença significativa entre a permeabilidade das amostras.

No estudo das isotermas de sorção de umidade o modelo de GAB foi o que melhor ajustou os pontos experimentais. A adição de plastificantes aumentou a umidade relativa de equilíbrio das amostras, sendo que dentre os plastificantes utilizados, o sorbitol foi o que causou o maior aumento na umidade de equilíbrio das amostras. Quanto ao estudo sobre a influência da temperatura, temperaturas menores proporcionaram maiores valores para umidade de equilíbrio nas amostras. A higroscopicidade (β) seguiu o mesmo comportamento que o teor de umidade. Aumento na concentração do plastificante aumentou a higroscopicidade dos filmes.

A solubilidade total em água dos filmes e o índice de intumescimento foram influenciados pelo tipo e pela concentração de plastificantes. O sorbitol foi o que causou uma maior solubilidade dos filmes, sendo que um aumento na concentração de plastificante também causou um aumento na solubilidade total e no índice de intumescimento das amostras.

As propriedades mecânicas dos filmes foram modificadas pela presença de plastificante. Grandes quantidades de sorbitol diminuíram a tensão máxima de ruptura das amostras e aumentaram sua flexibilidade em comparação aos filmes sem plastificante. O módulo de Young diminuiu quando se aumentou a concentração de sorbitol.

A microestrutura dos filmes de queratina sofre grande influência dependendo do plastificante utilizado em sua obtenção. Amostras mais homogêneas foram obtidas quando se utilizou sorbitol em diferentes concentrações. Com a utilização de polietileno glicol as amostras apresentaram uma superfície mais escamosa e irregular.

As curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de queratina com diferentes concentrações de sorbitol apresentaram comportamento semelhante. Sendo que, dependendo da composição dos filmes, os mesmos demonstraram maiores ou menores valores de massa residual. Quanto maior a concentração de sorbitol presente, menor a massa residual das amostras.

Este estudo demonstrou que se podem obter filmes biodegradáveis a partir de queratina de penas de frango com diferentes características, através da utilização de aditivos específicos em diferentes concentrações. Por outro lado, o melhoramento de uma característica específica sempre ocorre em detrimento de outra. Como por exemplo, no caso das propriedades mecânicas, onde um aumento na concentração de sorbitol melhora a flexibilidade dos filmes, mas diminui sua tensão máxima de ruptura. Dependendo da característica desejada, pode-se escolher o aditivo e a quantidade adequada do mesmo para se obter uma amostra específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 47, p. 89-144, 1998.
- ANDRADE, C.T.; SOUZA, T.C.R.; BARBOSA, L.C.; SILVA, K.M.P. Use of chitin as reinforcing material in biodegradable thermoplastic starch. **Natural Polymers and Composites**, v. 1, p. 218-221, 2000.
- ANFINSEN, C. B.; HABER, E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 5, p. 1361-1363, 1961.
- ANKER, C. A. Method of preparing keratin-containing films and coatings. **USA Patent nº 364.249.8**, 1972.
- ANNUNZIATA, O.; ASHERIE, N.; LOMAKIN, A.; PANDE, J.; OGUN, O.; BENEDEK, George B. Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions. **PNAS**, v. 99, p. 14165-14170, 2002.
- ARAI, K.M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. **European Journal Biochemical**, v. 132, p. 501-510, 1983.
- ARVANITTOYANNIS, I. S.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 593-604, 1997.
- ARVANITTOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymer**, v. 37 p. 371-382, 1998.
- ARVANITTOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. **Carbohydrate Polymer**, v. 36 p. 105-119, 1998.

- ARVANITTOYANNIS, I. S.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. **Food Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 333-342, 1998.
- ASTM. **Standard test methods for water vapor transmission of materials**. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American society for testing and materials, p. 771-778, 1980.
- AYRANCI, E.; BÜYÜKTAS, S.; CETIN, E. E. The effect of molecular weight of constituents on properties of cellulose-based edible films. **Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie**, v. 30, p. 101-104, 1997.
- BALDWIN, E. A.; BAKER, R. A. **Use of proteins in edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables**. In: Protein-based films and coatings Florida, USA: CRC Press. p. 501-513, 2002.
- BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-152, 2003.
- BARRETO, P.L.M.; ROEDER, J.; CRESPO, J.S.; MACIEL, G.R.; TERENCEZI, H.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. **Food Chemistry**, v. 82, p. 425-431, 2003.
- BERTAN, L.C.; TANADA-PALMU, P.S.; SIANI, A.C.; GROSSO, C.R.F. Effect of fatty acids and brazilian elemi on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 73-82, 2005.
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, p. 4827-4832, 2002.
- BIGI, A.; COJAZZIM G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 25, p. 4827-4832, 2002.
- BRUSH, Alan H. Tissue specific protein heterogeneity in keratin structures. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 5, p. 547-551, 1986.

- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.
- CHAPLEAU, N.; DE LAMBALLERIE-ANTON, M. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 273-280, 2003.
- CHIELLINI, E.; CORTI, A.; D'ANTONE, S.; SOLARO, R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 963-1014, 2003.
- CHO, S.Y.; RHEE, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. **Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie**, v. 35, p. 151-157, 2002.
- CREWETHER, W. G.; FRASER, R. D. B.; LENNOX, F. G.; LINDLEY, H. The chemistry of keratins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 20, p. 191-346, 1965.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymer for packaging production. **Cereal Chemistry**, v. 75, p. 1-9, 1998.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Effects of thermomoulding process condition on the properties of agro-materials based on fish myofibrillar proteins. **Lebensmittel – Wissenschaft- und –Technologie**, v. 32, p. 107-113, 1999.
- DALEV, P. G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 48, p. 265-267, 1994.
- DONHOWE, G; FENNEMA, O. **Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions, and testing methods**. In: *Edible Films and Coatings to Improve Food Quality*. p. 1-21, 1994.
- DOWLING, L.M.; SPARROW, L. G. Sequences of wool keratin proteins. **CSIRO**, p. 115-118, March 1991.
- EARLAND, C.; KNIGHT, C. S. Studies on the structure of keratin: I the analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 17, p. 457-461, 1955.

- EARLAND, C.; KNIGHT, C.S. Studies on the structure of keratin: II the amino acid content of fractions isolated from oxidized wool. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 22, p. 405-411, 1956.
- EARLAND, C.; RAVEN, D.J. Studies on the structure of keratin: III the reaction of wool and horn keratins with solutions of sodium hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 27, p. 41-45, 1958.
- ELSHIMI A. F.; PRINCEN H. M. Water-vapor sorption and desorption behaviour of some keratins. **Colloid and Polymer Science**, v. 256, p. 105-114, 1978.
- FERNANDES, E. G.; PIETRINI, M.; CHIPELLINI, E. Bio-based polymeric composites comprising wood flour as filler. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1200-1205, 2004.
- FEUGHELMAN, M.; KROSCHWITZ, J.I. **Keratin**. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, v. 8, p. 566-600, 1985.
- FRASER, R.D.B. The chain configuration of wool keratin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 12, p. 1-2, 1953.
- FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P.; SIMMONDS. Models of α -keratin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, p. 654-655, 1957.
- FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P. Molecular organization in feather keratin. journal of molecular biology. **Journal of Molecular Biology**, v. 1, p. 387-397, 1959.
- FRASER, R.D.B.; SUZUKI, E. Polypeptide chain conformation in feather keratin. **Journal of Molecular Biology**, v. 14, p. 279-282, 1965.
- FRASER, R.D.B. Keratins. **Sci. Am.**, v. 223, n. 2, p. 87-96, 1969.
- FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P.; PARRY, D.A.D.; SUZUKI, E. The structure of β -keratin. **CSIRO**, p. 810-826, 1969.
- FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P. The structure of α -keratin. **Polymer**, v. 14, p. 61-67, 1973.

- FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P.; SPARROW, L.G. Disulphide bonding in α -keratin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 10 p. 106-111, 1988.
- FRASER, R.D.B.; PARRY, D.A.D. The molecular structure of reptilian keratin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 207-211, 1996.
- GALIETTA, G.; DI GIOLA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3123-3130, 1998.
- GAUDIN, S; LOURDIN, D.; LE BOTLAN, D.; ILARI, J. L.; COLONNA, P. Plasticisation and mobility in starch-sorbitol films. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 273-284, 1999.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. **Cereal Foods World**, v. 36, p.1004-1009, 1991.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L., TESTIN, R.F. Property modification of edible wheat, gluten-based films. **Transactions ASAE**, v. 36, p. 465-470, 1993c.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**, v. 40, p. 426-429, 1993d.
- GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; PARK, J. W.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. **Industrial Crops and Products**, v. 2, p. 189-195, 1994.
- GENNADIOS, A.; SÉLLER, C. L.; GOODING, C. H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 21, p. 395-409, 1994.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANNA, M.A.; FRONING, G.W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 585-589, 1996.

- GENNADIOS, A.; HANNA, MILFORD A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. **Lebensmittel – Wissenschaft Und – Technologie**, v. 30, p. 337-350, 1997.
- GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, 2002. 650 p.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.
- GOSWAMI, T. H.; MAITI, M. M. Biodegradability of gelatin resin blends by soil burial method. **Polymer Degradation and Stability**, v. 61, p. 355-359, 1998.
- GUEGUEN, J.; VIROBEN, G.; NOIREAUX, P.; SUBIRADE, Muriel. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films for pea proteins. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 149-157, 1998.
- GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G.M. Prolongation of the shelf-life of perishable food product using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie**, v. 29, p. 10-17, 1996.
- HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, p. 56-65, 2000.
- HANNIGAN, K. Edible plastic. **Food Engineering**, march, p. 98-99, 1984.
- HARRAP, B. S.; WOODS, E. F. Soluble derivatives of feather keratin. 1 Isolation, fractionation and amino acid composition. **Biochemical Journal**, v. 99, p. 8-18, 1964a.
- HARRAP, B. S.; WOODS, E. F. Soluble derivatives of feather keratin. 2 Molecular weight and conformation. **Biochemical Journal**, v. 92, p. 19-26, 1964b.
- HEARLE, J.W.S.; A critical review of the structural mechanics of wool and hair fibres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 123-138, 2000.
- HELLER, J.; DOMB, A. J. Recent developments with biodegradable polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 445-446, 2003.
- IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1533-1541, 2001.

- JANGCHUD, A.; CHINNAN, M. S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie**, v. 32, p. 89-94, 1999.
- KATOH, K.; TANABE, T.; YAMAUCHI, K. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. **Biomaterials**, v. 25, p. 4255-4262, 2004.
- KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible Films and Coatings: A Review. **Food Technology**, December, p. 47-59, 1986.
- KIKKAWA, M. Keratin membrane. **USA Patent nº 4.135.942**, 1979.
- KIM, K. M.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; GENNADIOS, A. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. **Lebensmittel – Wissenschaft Und – Technologie**, v. 35, p. 140-145, 2002
- KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**, Technomic Publishing Company: Pennsylvania, 1994.
- KURIMOTO, A.; TANABE, T.; TACHIBANA, A.; YAMAUCHI, K. Keratin sponge: immobilization of lysozyme. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 307-309, 2003.
- LAROTONDA, F. D. S., MATSUI, K. N., SOBRAL, P. J. A., LAURINDO, J. B. Hygroscopicity and water vapor permeability os kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, (in press).
- LAROTONDA, Fabio Donato Soares. **Desenvolvimento de biofilmes a partir da fécula de mandioca**. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- LEE, K. Y.; SHIM, J.; LEE, H. G. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 251-254, 2004.

- LIEBERMAN, E.R.; GUILBERT, S.G. Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture and plasticizer content. **Journal Polymer Science**, v. 41, p. 33-43, 1973.
- LIM, L.T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 616-622, 1999.
- LIU, Chin-Chi; TELLEZ-GARAY, Angela M.; CASTELL-PEREZ, Elena. Physical and mechanical properties of peanut protein films. **Lebensmittel – Wissenschaft Und – Technologie**, v. 37, p. 731-738, 2004.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Fundamentos básicos da análise térmica**. In: Caracterização de Polímeros, E-papers, Rio de Janeiro, p. 213-245, 2001.
- MARITZ, Jannie. World broiler industry overview. Disponível em:
<http://www.afma.co.za/AFMA_Template/1,2491,8156_3487,00.html> acesso em 10/11/2004.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Segunda edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1999. p. 11-36.
- MATHLOUTHI, M.; ROGÉ, B. Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. **Food Chemistry**, v. 82, p. 61-71, 2003.
- MATSUI, Kátia Nicolau. **Desenvolvimento de materiais biodegradáveis a partir do bagaço de mandioca**. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. **Permeability properties of edible films**. In: Edible coatings and films to improve food quality. p. 139-187, 1994.
- McHUGH, T. Habig; AVENA-BUSTILLO, R.; KROCHTA, J.M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation on thickness effects. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 899-903, 1993.

- MIDDLEBROOK, W.R. The chain weight of wool keratin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 7, p. 547-562, 1951.
- MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 228-237, 1997.
- NAGAI, Y.; NISHIKAWA, T. Alkali Solubilization of chicken feather keratin. **Agricultural Biology Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 16-22, 1970.
- NAYAK, P. L. Biodegradable polymers: Opportunities and challenges. *J.M.S. – Rev. Macromol. Chem. Phys*, v. 39 n.3, p. 481-505, 1999.
- OKAMOTO, S. Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**, v. 23, p. 256-262, 1978.
- ORLIAC, O.; ROUILLY, A.; SILVESTRE, F.; RIGAL, L. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. **Polymer**, v. 43, p. 5417-5425, 2002.
- ORLIAC, O.; ROUILLY, A.; SILVESTRE, F.; RIGAL, L. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 91-100, 2003.
- PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, v. 25, p. 497-507, 1995.
- PARRY, D. A. D. Hard α -keratin intermediate filament chains: substructure of the n- and c-terminal domains and the predicted structure and function of the c-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, v. 122, p. 67-75, 1998.
- PASCHOALICK, T.M.; GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile tilapia. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 419-427, 2003.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1034-1037, 1999.

- RAYAS, L. M.; HERNANDEZ, R. J.; PERRY, K.W. Development and characterization of biodegradable/edible wheat protein films. **Journal of Food Science**, v. 62, n.1, p. 160-189, 1997.
- RHIM, J.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; CEZEIRAT, C.; HANNA, M. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v. 8, p. 195-203, 1998.
- RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films form soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 199-205, 2002.
- ROBEY, M.J.; FIELD, G.; STYZINSKI, M. Degradable plastics. **Materials Forum**, v. 13, p. 1-10, 1989.
- ROCKLAND, L.B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5 °C and 40 °C. **Analytical Chemistry**, v. 32, p. 1375-1376, 1960.
- ROSSINI, P.; COLPO, P.; CECCONE, G.; JANDT, K.D.; ROSSI, F. Surfaces engineering of polymeric films for biomedical applications. **Materials Science & Engineering**, v. 23, p. 353-358, 2003.
- ROUILLY, A.; ORLIAC, O.; SILVESTRE, F.; RIGAL, L. DSC Study on the thermal properties of sunflower proteins according to their water content. **Polymer**, v. 42, p. 10111-10117, 2001.
- ROY, S.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. **Industrial Crops and Products**, v. 22, p. 43-50, 2000
- SARANTÓPOULUS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Taxa de permeabilidade ao vapor d'água de filmes e embalagens flexíveis por método gravimétrico**. In: Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas, Brasil: CETEA/ITAL. p. 189-195, 2002.

- SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. properties in aqueous systems. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 48, p. 4326-4334, 2000.
- SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 30-39, 2001.
- SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. thermal and mechanical properties of films. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 49, p. 221-230, 2001.
- SEBASTIÃO, V.; CANEVAROLO, J. **Comportamento térmico dos polímeros**. In: Ciência dos Polímeros. Art Líber Editora, p. 115-117, 2002.
- SOBRAL, Paulo José do Amaral. **Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes**. Pirassununga: USP, 2000. Tese de Livre-Docência, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2000.
- SOBRAL, P.J.A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; HABITANTE, A.M.Q.B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, n. 2, 499-504, 2002.
- SQUIO, C. R.; MARANGONI, C.; VECCHI, C. S.; ARAGAO, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. USA: , v. 61, p.257 - 260, 2003.
- TACHIBANA, A.; FURUTA, Y.; TAKESHIMA, H.; TANABE, T.; YAMAUCHI, K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 165-170, 2002.
- TANABE, T.; OKITSU, N.; TACHIBANA, A.; YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. **Biomaterials**, v. 23, p. 817-825, 2002.

- TANAKA, M.; IWATA, K.; SANGUANDEEKUL, R.; HANDA, A.; ISHIZAKI, S. Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v. 67, p. 346-351, 2001.
- THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Food Science e Technology**, v. 14, p. 71-78, 2003.
- TIMMONS, S. F.; BLANCHARD, C. R. S.; ROBERT, A. Porous and bulk keratin biopolymers. **USA Patent nº 6.159.495**, 2000.
- TROPINI, V.; LENS, J.P.; MULDER, W.J.; SILVESTRE, F. Wheat glúten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and n-hydroxysuccinimide. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 281-289, 2004.
- TURHAN, K. N.; SAHBAZ, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 459-466, 2004.
- VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, v. 21, p. 433-442, 2002.
- VELÁZQUEZ DE LA CRUZ, G.; TORRES, J.A.; MARTÍN-POLO, M.O. Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 91-94, 2001.
- WELLER, C. L.; GENNADIOS, A.; SARAIVA, R. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. **Lebensmittel – Wissenschaft Und –Technologie**, v. 31, p. 279-285, 1998.
- WOODIN, A.M. Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 99-109, 1954.
- WORTMANN, F.J.; AUGUSTIN, P.; POPESCU, C. Temperature dependence of the water-sorption isotherms of wool. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, p. 1054-1061, 2001.

- YAMAUCHI, K.; YAMAUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KOHDA, A.; KONISHI, Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 31, p. 439-444. 1996.
- YAMAUCHI, K.; KOHDA, A. Novel proteinous microcapsules from wool keratins. **Colloids and Surfaces**, v. 9, p. 117-119, 1997.
- YAMAUCHI, A.; YAMAUCHI, K. **Formation and properties of wool keratin films and coatings**. In: Protein-Based Films and Coatings. CRC Press, p. 253-273, 2002.
- YAMAUCHI, K.; HOJO, H.; YAMAMOTO, Y.; TANABE, T. Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film. **Materials Science & Engineering**, v. 23, p. 467-472, 2003.
- ZHANG, M.; LI, H. X.; GONG, Y.D.; ZHAO, N.M.; ZHANG, X.F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. **Biomaterials**, v. 23, p. 2641-2648, 2002.