

Rafael Kenji Nishihora

**PROPRIEDADES DE FILMES DE GELATINA RETICULADOS
POR VIA ENZIMÁTICA E FÍSICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara Gabriela Novy Quadri.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nishihora, Rafael Kenji

Propriedades de Filmes de Gelatina Reticulados por Via Enzimática e Física / Rafael Kenji Nishihora; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri – Florianópolis, SC, 2015.

96 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Filme de gelatina. 3. Reticulação. 4. Transglutaminase. 5. Ultravioleta. I. Quadri, Mara Gabriela Novy. II. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Título.

Rafael Kenji Nishihora

**PROPRIEDADES DE FILMES DE GELATINA RETICULADOS
POR VIA ENZIMÁTICA E FÍSICA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 05 de março de 2015.

Prof. Ricardo Antonio Francisco Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Prof.^a Mara Gabriela Novy Quadri, Dr.^a
Orientadora

Banca Examinadora:

Prof. Leonel Teixeira Pinto, Dr.
Membro interno

Prof.^a Regina de Fátima Peralta
Muniz Moreira, Dr.^a
Membro interno

Alexsandra Valério, Dr.^a
Membro participante

Prof. Toni Jefferson Lopes, Dr.
Membro externo

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Gilson e Rose.
Aos meus irmãos Haruo e Teruo.
E ao meu amor e companheira Gidiane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Mara Gabriela Novy Quadri por todo conhecimento compartilhado, conselhos, e paciência na orientação desta dissertação.

Aos meus pais, Gilson e Rose, pelo apoio e confiança depositado. Assim como os meus irmãos, Haruo e Teruo, que sempre acreditam na minha capacidade e potencial.

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

Ao meu sogro Dirceu e minha sogra Gislane, pelo apoio, carinho e incentivo na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Sistemas Porosos (LA-SIPO), pelos momentos de aprendizado ou pura descontração vividos.

Aos membros da banca pelo aceite e contribuições para o enriquecimento do presente trabalho.

A toda equipe responsável pela Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Laboratório de Controle de Processos e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, pela realização de diversas análises.

A todos os docentes pelos ensinamentos repassados e conselhos inestimáveis.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de Mestrado.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ao longo desses dois anos de mestrado.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

(Aldo Novak)

RESUMO

Filmes biopoliméricos têm contribuído com o setor de embalagens ecológicas e biodegradáveis. Contudo, aqueles de origem proteica são pouco aplicados nessa área devido ao caráter hidrofílico desse material. No presente trabalho, foram produzidos filmes de gelatina suína tipo A, utilizando a enzima transglutaminase (TGase) e radiação ultravioleta (UV) como agentes reticulantes. Um planejamento experimental composto central foi utilizado para determinação dos efeitos da concentração de gelatina, glicerina e enzima sobre a espessura, solubilidade de filmes em meio aquoso, permeabilidade ao vapor de água (PVA), propriedades mecânicas (Módulo de Young, tensão e alongamento) e ângulo de contato. Com base nestes resultados, foram elaborados filmes na condição ótima dos fatores, os quais foram caracterizados pelas mesmas propriedades analisadas no planejamento experimental, como também por análises de infravermelho, térmica e morfológica. Observou-se que a variação das concentrações de TGase foram pouco influentes nas respostas avaliadas. Contudo quando confrontados os filmes com e sem tratamento enzimático, observou-se que as propriedades foram afetadas devido ao tratamento enzimático. O aumento da concentração de gelatina contribuiu para o aumento da espessura, ângulo de contato, Módulo de Young (E_0) e Tensão máxima (σ). Em contrapartida a adição do plastificante hidrofílico (glicerina) incorreu no aumento da solubilidade, permeabilidade e alongamento (ϵ) dos filmes. A otimização do planejamento resultou num filme composto por $60,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de gelatina, $20,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de glicerina e $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de TGase. Foram obtidas as seguintes respostas (com os valores estimados pelo modelo entre parênteses): espessura de $0,086 \pm 0,007 \text{ mm}$ ($0,1025 \text{ mm}$), solubilidade a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ de $39,18 \pm 0,69 \%$ ($43,09 \%$), solubilidade a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ de $40,70 \pm 0,78 \%$ ($48,86 \%$), PVA de $0,3706 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ ($0,2948 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$), E_0 de $929,02 \pm 189,77 \text{ MPa}$ ($649,35 \text{ MPa}$), σ de $41,14 \pm 7,80 \text{ MPa}$ ($29,2 \text{ MPa}$) e ϵ de $14,71 \pm 0,75 \%$ ($36,1 \%$). Os filmes tratados com UV por 3 h não apresentaram diferenças significativas, porém a exposição por 8 h demonstrou efeito expressivo na solubilidade a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e redução de quase 50 % no ângulo de contato. As análises térmicas mostraram que a adição de glicerina reduz estabilidade térmica ao passo que a reticulação enzimática aumenta a estabilidade. As micrografias revelaram que o tratamento simultâneo com TGase e irradiação UV (8 h) conferiu fragilidade ao filme produzido demonstrando efeito degradativo da exposição UV prolongada.

Palavras-chave: Filme de gelatina. Reticulação. Transglutaminase. UV.

ABSTRACT

Biopolymers films have contributed to the ecological and biodegradable packaging sector. However, those protein products are poorly applied in this area due to the hydrophilic nature of this material. In this study, pigskin type A gelatin films were produced using the enzyme transglutaminase (TGase) and ultraviolet (UV) as crosslinking agents. Through a central composite design, we determined the effects of concentration of gelatin, glycerin and enzyme in thickness, film solubility in aqueous medium, water vapor permeability (WVP), mechanical properties (Young's Modulus, stress and elongation) and contact angle. Considering the results of the experimental design applied to the desirability function for drafting film with optimum condition of factors, characterized according to the properties analyzed in experimental design and infrared analysis, thermal and microscopic. It was for experimental design the variation of TGase concentrations were little influential in responses evaluated. However when comparing the film with and without enzyme treatment it was found that the properties have been affected due to enzyme treatment. The increase in the concentration of gelatin contributed to the increased thickness, contact angle, the Young's modulus (E_0) and stress (σ). However the addition of a hydrophilic plasticizer (glycerin) incurred in increased solubility, permeability and elongation (ϵ) of the films. The optimization resulted in a film composed by 60.0 mg.mL⁻¹ of gelatin, 20.0 mg.mL⁻¹ of glycerin and 4.0 mg.mL⁻¹ of TGase. The following results were obtained (the values estimated by the model in brackets): thickness of 0.086 ± 0.007 mm (0.1025 mm) solubility at 25 ° C $39.18 \pm 0.69\%$ (43.09%); solubility at 50 ° C $40.70 \pm 0.78\%$ (48.86%), PVA $0.3706 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ ($0.2948 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$) E_0 MPa 929.02 ± 189.77 (649.35 MPa) σ of 41.14 ± 7.80 MPa (29.2 MPa) and ϵ $14,71 \pm 0.75\%$ (36.1%). The films treated with UV for 3 h showed no significant differences, but the exposure for 8 h showed significant effect on the solubility at 50 °C and reduce almost in 50 % the contact angle. The thermal analysis showed that addition of glycerin reduces thermal stability while the enzyme and UV (8 h) crosslinking increases. The micrographs revealed that simultaneous treatment with TGase and UV (8 h) gave the fragile film produced showing degradative effects of prolonged UV exposure.

Keywords: Gelatin Film. Crosslinking. Transglutaminase. UV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes de materiais biopoliméricos.	25
Figura 2 – Estrutura típica de uma unidade de gelatina.	26
Figura 3 – Processo de preparação da gelatina do tipo A e B.	27
Figura 4 – Estrutura do glicerol.....	33
Figura 5 – Reação de reticulação entre resíduos de glutamina e lisina catalisadas por Transglutaminase.....	34
Figura 6 – Cinética da reação avaliada pela variação de viscosidade devido à reticulação de uma solução padrão de gelatina (100 mg.mL ⁻¹) com TGase a diferentes concentrações.	49
Figura 7 – Aspecto geral dos filmes obtidos no planejamento experimental.....	50
Figura 8 – Valores preditos pelo modelo de regressão da espessura e valores observados experimentalmente.....	52
Figura 9 – Curvas de nível para solubilidade a 25 °C por 24 h.....	54
Figura 10 – Teste de Tukey entre alguns filmes do planejamento e referência que apresentaram menor solubilidade a 25 °C.	55
Figura 11 – Curvas de nível para solubilidade a 50 °C por 1 h.....	56
Figura 12 – Curva de nível para a permeabilidade ao vapor de água (g.mm.m ⁻² .h ⁻¹ .kPa ⁻¹).	58
Figura 13 – Comportamento antagônico da permeabilidade de filmes selecionados do planejamento experimental e referência (sem tratamento com TGase).	60
Figura 14 – Curvas de nível para o Módulo de Young (E ₀) e Tensão máxima (σ) expressos em MPa, para as concentrações de 4,0 mg.mL ⁻¹ (a) e 12,0 mg.mL ⁻¹ (b) de TGase.....	63
Figura 15 – Curva de nível para o alongamento máximo na ruptura (ε em %) dos filmes obtidos no planejamento experimental.....	64
Figura 16 – Teste de Tukey para Tensão máxima (a) e Alongamento máximo na ruptura (b) de filmes com 100,0 mg.mL ⁻¹ de gelatina e 31,36 mg.mL ⁻¹ de glicerina.	65
Figura 17 – Superfície de resposta para o ângulo de contato.	67
Figura 18 – Restrições impostas as respostas avaliadas no planejamento experimental para otimização através da função desejabilidade.	68
Figura 19 – Gráficos de otimização do planejamento pela função desejabilidade.....	69
Figura 20 – Imagens do ensaio de ângulo de contato.....	73
Figura 21 – Amostras de 2x2 cm dos filmes otimizado e tratados com UV.....	73
Figura 22 – Mecanismo de reticulação da gelatina por foto-oxidação..	74

Figura 23 – Espectros de FTIR-ATR do filme de gelatina pura, filmes obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.....	74
Figura 24 – Análise termogravimétrica dos filmes de gelatina pura e obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.....	76
Figura 25 – Análise de DSC dos filmes de gelatina pura e obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.	77
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes produzidos.	79
Figura 27 – Fissuras apresentadas na análise de MEV da amostra UV-8h-enz.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aminoácidos residuais da gelatina e colágeno (resíduos por 1000 resíduos).....	28
Tabela 2 – Aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos encontrados na gelatina.....	30
Tabela 3 – Fatores e níveis de estudo do planejamento experimental... 40	40
Tabela 4 – Delineamento do planejamento experimental composto central.....	40
Tabela 5 – Filmes controle sem tratamento com transglutaminase para comparação com os filmes obtidos no planejamento experimental.	41
Tabela 6 – Filmes resultantes da otimização do planejamento por desejabilidade e condições do tratamento UV.....	43
Tabela 7 – Análise de variância dos dados de espessura dos filmes obtidos no planejamento experimental.....	51
Tabela 8 – Análise de variância dos dados de solubilidade a 25 °C por 24 h (Solub.25).....	53
Tabela 9 - Análise de variância dos dados de solubilidade a 50 °C por 1 h (Solub.50).....	56
Tabela 10 – Análise de variância da permeabilidade ao vapor de água.57	57
Tabela 11 – Análise de variância dos dados de Módulo de Young - E_0 (MPa) dos filmes obtidos no planejamento experimental.	61
Tabela 12 – Análise de variância dos dados de Tensão máxima - σ (MPa) dos filmes obtidos no planejamento experimental.	61
Tabela 13 – Análise de variância dos dados de Alongamento máximo na ruptura - ϵ (%) dos filmes obtidos no planejamento experimental.	62
Tabela 14 – Análise de variância para os dados de ângulo de contato dos filmes do planejamento experimental.....	66
Tabela 15 – Comparação entre as propriedades do filme produzido experimentalmente e os dados previstos pela função desejabilidade. ...	70
Tabela 16 – Propriedades equiparadas do filme otimizado e comercial de PEAD.	71
Tabela 17 – Teste de Tukey entre as propriedades analisadas do filme controle e os filmes tratados com ultravioleta.	71
Tabela 18 – Teste de Tukey entre as propriedades analisadas do filme controle e os filmes tratados com TGase e ultravioleta.....	72
Tabela 19 – Grupos funcionais referentes a estrutura da gelatina.	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ANOVA – Análise de variância
- ASTM – *American Society for Testing and Materials*
- ATR – Refletância total atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflectance*)
- DSC – Calorimetria diferencial de varredura (do inglês *Differential scanning calorimetry*)
- E_0 – Módulo de Young (MPa)
- σ – Tensão máxima (MPa)
- ε – Alongamento máximo na ruptura (%)
- EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboamida
- F.A. – Falta de Ajuste
- FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*)
- FV – Fonte de Variação
- gl – grau de liberdade
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MQ – Média Quadrática
- PEAD – Polietileno de alta densidade
- PVA – Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$)
- R – Coeficiente de correlação
- R^2 – Coeficiente de determinação ou variação explicada
- $R^2_{\text{máx}}$ – Coeficiente de determinação máximo ou variação máxima explicada
- Solub. – Solubilidade (%)
- SQ – Soma Quadrática
- TGA – Análise termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric analysis*)
- TGase – Transglutaminase
- UV – Ultravioleta
- UVC – Ultravioleta do tipo C
- UVB – Ultravioleta do tipo B
- UVA – Ultravioleta do tipo A
- X – Concentração de Gelatina
- Y – Concentração de Glicerina

Z – Concentração de Transglutaminase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 BIOPOLÍMERO	25
2.2 GELATINA	26
2.2.1 Composição química	28
2.2.2 Propriedades físico-químicas	28
2.2.2.1 Força gel ou Bloom	29
2.2.2.2 Viscosidade	29
2.2.2.3 Solubilidade	29
2.2.2.4 Propriedades superficiais	30
2.2.3 Formação de filme	31
2.3 FILMES BIOPOLIMÉRICOS	31
2.3.1 Técnica de <i>casting</i>	31
2.3.2 Plastificantes	32
2.3.3 Agentes Reticulantes	34
2.3.3.1 Transglutaminase	34
2.3.3.2 Tratamento com ultravioleta	35
2.3.4 Filmes de gelatina reticulados com transglutaminase	36
2.3.5 Filmes de gelatina tratados com ultravioleta	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAL UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS FILMES	39
3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	39
3.2.1 Otimização por Desejabilidade	41
3.2.2 Cinética da reação de reticulação da gelatina pela ação da transglutaminase	42
3.2.3 Preparo dos filmes	42
2.3.2.3.1 Tratamento com ultravioleta	43
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	43

3.3.1 Espessura	44
3.3.2 Teste de solubilidade.....	44
3.3.3 Permeabilidade ao vapor de água	44
3.3.4 Propriedades mecânicas	45
3.3.5 Ângulo de contato	46
3.3.6 Infravermelho com transformada de Fourier	46
3.3.7 Propriedades térmicas	46
3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 REOLOGIA DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DA GELATINA.....	49
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	50
4.2.1 Espessura	51
4.2.2 Solubilidade	52
4.2.3 Permeabilidade ao vapor de água	57
4.2.4 Propriedades mecânicas	60
4.2.5 Ângulo de contato	66
4.3 OTIMIZAÇÃO POR DESEJABILIDADE.....	68
4.3.1 Tratamento com Ultravioleta.....	71
4.3.2 FTIR – ATR	74
4.3.3 Propriedades térmicas	76
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura	78
5 CONCLUSÃO	81
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A – Tabelas com repostas do planejamento experimental e filmes de referência	93

1 INTRODUÇÃO

A demanda crescente por tecnologias, produtos e serviços ecologicamente sustentáveis, tem exigido e motivado estudos para a elaboração de produtos com caráter biodegradável.

Os filmes biopoliméricos estão inseridos em um grupo com alto potencial de aplicação industrial devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade. Apesar disso, os biopolímeros de origem proteica são pouco aplicados nessa área, devido a sensibilidade a água e baixa maleabilidade dos filmes resultantes desse material.

A gelatina constitui uma matéria-prima de origem proteica amplamente difundida e aplicada na indústria de alimentos, que além de possuir propriedades de formação de gel termorreversível, também apresenta valores nutricionais atrativos. Contudo, seu uso como filme muitas vezes se torna restrito devido ao seu caráter frágil (quebradiço) e termorreversibilidade em água a temperaturas próximas a 40 °C. Para contornar tais condições faz-se necessário o uso de plastificantes, substâncias que conferem mobilidade e extensibilidade a cadeia polimérica; e agentes reticulantes, os quais promovem a formação de ligações covalentes entre grupos funcionais da estrutura da gelatina, promovendo, assim, aumento de estabilidade térmica inibindo a dissolução em água.

A literatura científica reporta vários estudos referentes a reticulação de filmes de gelatina, sendo que por um longo período investigou-se o uso de agentes químicos como formaldeído e glutaraldeído. Apesar da alta eficiência apresentada por esses agentes, a aplicação dos mesmos incorre em toxicidade.

A aplicação de reticulantes enzimáticos e físicos, como a Transglutaminase e radiação ultravioleta é de grande interesse, portanto, tendo em vista que estes são reticulantes totalmente atóxicos. A transglutaminase é uma enzima capaz de catalisar reações de formação de ligações cruzadas entre grupos característicos das proteínas. Já o mecanismo envolvido na reticulação com ultravioleta ainda não está bem consolidado, sendo que uma das propostas envolvem o processo de foto-oxidação.

O presente trabalho objetivou produzir e caracterizar filmes de gelatina reticulados enzimaticamente com transglutaminase e fisicamente por meio da radiação ultravioleta.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal produzir e caracterizar filmes de gelatina plastificados com glicerina e reticulados com a enzima transglutaminase e radiação ultravioleta.

Fundamentado no objetivo descrito, tem-se como objetivos específicos do estudo os seguintes tópicos:

- Avaliar o efeito da reação de reticulação da enzima a partir de alterações na viscosidade de uma solução padrão de gelatina.
- Obter uma formulação filmogênica com propriedades otimizadas no que diz respeito as propriedades mecânicas, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e ângulo de contato.
- Verificar o efeito dos tratamentos com transglutaminase e ultravioleta quanto a estabilidade térmica e alteração micro estrutural de filmes produzidos em condição ótima definida.

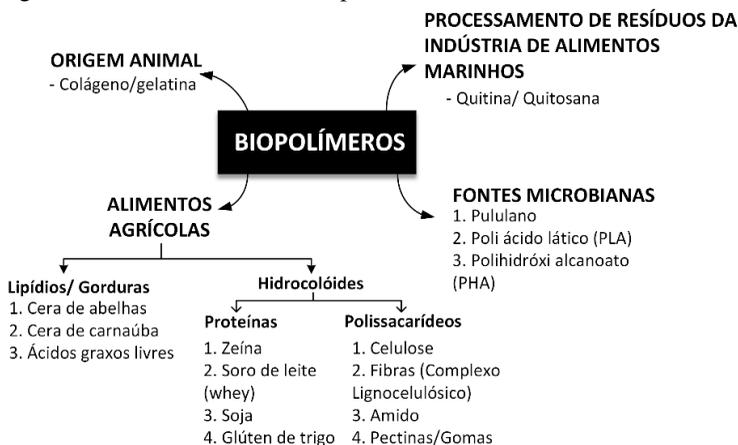
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica referente aos tópicos fundamentais para o entendimento do trabalho desenvolvido.

2.1 BIOPOLÍMERO

Os biopolímeros, assim como os polímeros, são macromoléculas constituídas por moléculas menores, os monômeros, isto é, a unidade de repetição que forma o polímero ou biopolímero (SALDIVAR-GUERRA; VIVALDO-LIMA, 2013). Diferentemente dos polímeros oriundos do petróleo (fonte não renovável), os biopolímeros são advindos de fontes de carbono renováveis, geralmente de cultivos de larga escala como milho, a batata, cana-de-açúcar, ou ainda podem derivar de origem animal como o colágeno, gelatina, quitosana, entre outros. A Figura 1 apresenta os biopolímeros mais comumente encontrados, bem como suas respectivas origens.

Figura 1 - Fontes de materiais biopoliméricos.



Fonte: adaptado de Tharanathan (2003).

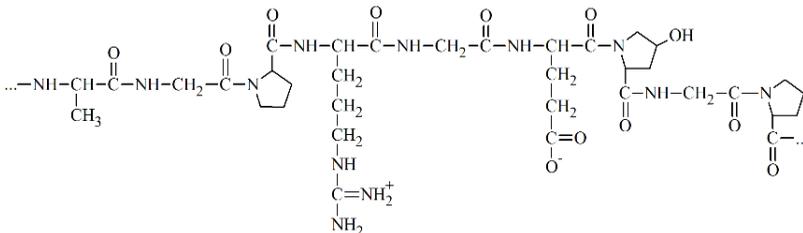
Segundo Canevarolo (2006) muitas propriedades físicas dos materiais poliméricos variam conforme o tamanho da molécula, ou seja, o peso molecular do composto. Contudo, esse comportamento é melhor expresso em polímeros de cadeia regular, haja vista que uma grande parte dos biopolímeros não apresentam tal regularidade na sua estrutura.

Dentro do grande conjunto de materiais biopoliméricos apresentados, o presente estudo tem como foco a gelatina obtida através de pele animal, geralmente extraída de bovinos e/ou suínos. Nesse contexto, o tópico a seguir é dirigido especialmente ao estudo da gelatina e seus aspectos mais relevantes ao estudo.

2.2 GELATINA

A gelatina é um polímero natural que consiste em um pó quebradiço, translúcido, incolor e quase sem sabor. É amplamente utilizado como um agente de gelificação em alimentos, produtos farmacêuticos, e indústria de cosméticos, pois constitui uma matéria prima de fácil aplicação e alta disponibilidade, cuja estrutura geral está caracterizada na Figura 2 (EBNESAJJAD, 2012).

Figura 2 – Estrutura típica de uma unidade de gelatina.



Fonte: adaptado de Chaplin (2014).

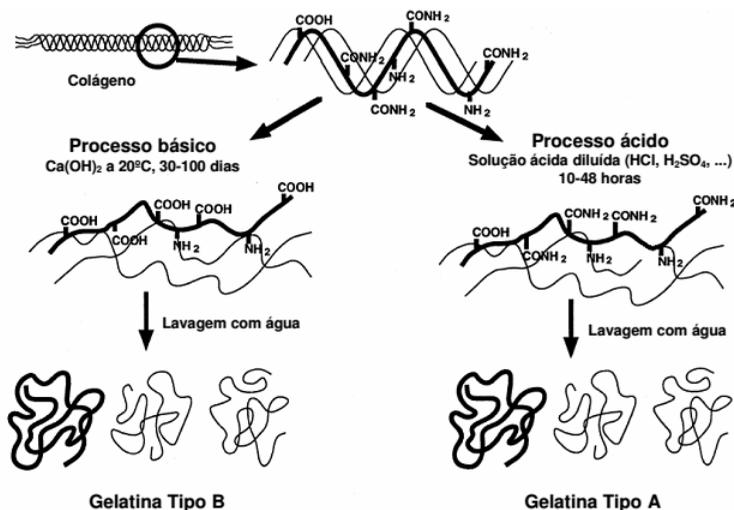
A principal fonte de obtenção da gelatina é o colágeno extraído da pele de animais (suínos e bovinos, principalmente) e ossos e escamas de peixe. Por conseguinte, o colágeno representa a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos (VARGAS; AUDÍ; CARRASCOSA, 1997).

O colágeno apresenta uma cadeia em tripla hélice com uma assinatura característica na sequência de aminoácidos, que pode ser descrita como $(\text{Gli-X-Y})_n$, no qual cada terceiro amino ácido é a glicina “Gli”, sendo o seguinte geralmente o ácido amino prolina “X” (estrutura anelar de cinco membros), e após este o aminoácido hidroxiprolina “Y” (PROCKOP, 2013).

De acordo com Kalia e Avérous (2011), a estrutura insolúvel do colágeno pode sofrer dois tipos de pré-tratamento a fim de se obter a gelatina (componente solúvel). O processo alcalino tem como alvo os grupos amida da asparagina e glutamina, hidrolisando-as em grupos

carboxílico, promovendo a conversão de muitos destes resíduos para aspartato e glutamato. Já o processo por meio ácido pouco afeta os grupos amida e a gelatina processada através do pré-tratamento alcalino possui natureza elétrica diferente da gelatina ácida. Portanto, através da rota ácida produz-se gelatina do tipo A e a rota alcalina ou básica a gelatina do tipo B, conforme Figura 3.

Figura 3 – Processo de preparação da gelatina do tipo A e B.



Fonte: Porto (2007).

No processo de clivagem do colágeno para produção de gelatina, pode-se obter três cadeias características (MARIOD; FADUL, 2013):

- Formação de três espirais randômicas independentes com massa molar da ordem de 80.000 a $125.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ – Cadeias α .
- Formação de uma cadeia β (duas cadeias α ligadas por uma ou mais ligações covalentes) e uma cadeia α , sendo que as cadeias β apresentam massa molar de 160.000 a $250.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.
- Formação de uma cadeia γ (três cadeias α ligadas por uma ou mais ligações covalentes), com massa molar de 240.000 a $375.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2.2.1 Composição química

A gelatina é composta basicamente de 50,5 % de carbono, 6,8 % de hidrogênio, 17 % de nitrogênio e 25,2 % de oxigênio (NUR HANANI; ROOS; KERRY, 2014). E como mencionado anteriormente, o tipo de gelatina obtido está intrinsecamente relacionado ao pré-tratamento utilizado na extração do colágeno, o qual infere na composição e estrutura química da biomacromolécula de gelatina (Tabela 1).

Tabela 1 – Aminoácidos residuais da gelatina e colágeno (resíduos por 1000 resíduos).

Aminoácido	Gelatina		Colágeno tipo I (bovino)
	Tipo A	Tipo B	
Alanina	112	117	114
Arginina	49	48	51
Asparagina	16	0	16
Ácido aspártico	29	46	29
Cisteína	-	-	-
Ácido glutâmico	48	72	48
Glutamina	25	0	25
Glicina	330	335	332
Histidina	4	4,2	4,4
Hidroxiprolina	91	93	104
Hidroxilisina	6,4	4,3	5,4
Isoleucina	10	11	11
Leucina	24	24,3	24
Lisina	27	28	28
Metionina	3,6	3,9	5,7
Fenilalanina	14	14	13
Prolina	132	124	115
Serina	35	33	35
Treonina	18	18	17
Triptofano	-	-	-
Tirosina	2,6	1,2	4,4
Valina	26	22	22

Fonte: adaptado de Schrieber e Gareis (2007).

2.2.2 Propriedades físico-químicas

Conforme Johnston-Banks (1990), as propriedades da gelatina são diretamente influenciadas pela fonte de obtenção, idade do animal e tipo de colágeno. Assim, a força gel, viscosidade, e ponto de fusão da

gelatina são dependentes, principalmente, da distribuição do peso molecular e da composição de aminoácidos presentes na gelatina. Isso resulta que gelatinas com altos níveis de aminoácidos tendem a apresentar valores elevados de força do gel e ponto de fusão.

2.2.2.1 Força gel ou Bloom

Uma das propriedades mais importantes da gelatina é a força gel ou “Bloom”, sendo essa uma função do peso molecular da gelatina, ou seja, da relação de componentes α e β presentes (MARIOD; FADUL, 2013).

Johnston-Banks (1990) descreve que o valor do Bloom consiste no peso, em gramas, que é necessário para um êmbolo penetrar 4 mm na superfície de um gel de gelatina, cuja concentração é de 6,67 % devendo ser mantido durante 18 horas a 10 °C. Geralmente o valor Bloom varia entre 50 a 300 g, sendo classificado da seguinte forma:

- Alto Bloom: 220 a 300 g.
- Médio Bloom: 150 a 220 g.
- Baixo Bloom: 50 a 100 g.

2.2.2.2 Viscosidade

A viscosidade da solução aquosa, formação de gel e textura resultante são propriedades expressas essencialmente pela estrutura, tamanho das moléculas e temperatura do sistema. Como a gelatina constitui uma mistura de cadeias poliméricas de diferentes comprimentos, não se tem soluções reais, mas sim as suspensões coloidais formadas com aumento da temperatura. Ao se promover o arrefecimento desta solução, observa-se a formação de um gel, cujo aquecimento retorna à condição de suspensão coloidal (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

2.2.2.3 Solubilidade

A gelatina possui um caráter higroscópico, podendo absorver água dependendo da umidade de armazenamento (NUR HANANI et al., 2014). Isso faz com que a gelatina inche quando em contato com água, na temperatura abaixo da fusão dessa proteína, adquirindo cerca de dez vezes o seu peso. Essa propriedade pode variar de acordo com a distribuição granulométrica da amostra, isto é, conforme a área superficial

disponível. Entretanto, quando aquecida acima do ponto de fusão, a gelatina hidratada irá se romper e criar uma suspensão, formando um gel quando a temperatura arrefecer (MARIOD; FADUL, 2013). Esse comportamento faz com que os filmes oriundos desse material sejam facilmente dissolvidos quando imersos em água a temperaturas acima do ponto de fusão da gelatina. Logo, tem-se a necessidade de estabilizar a estrutura dessa proteína através do uso de agentes que promovam a reticulação na cadeia polimérica.

2.2.2.4 Propriedades superficiais

A gelatina apresenta propriedades ambifílicas, isto é, apresenta grupos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos na sua estrutura (Tabela 2). No qual tanto as partes hidrofílicas quanto hidrofóbicas tendem a migrar para a superfície, reduzindo assim a tensão superficial de soluções aquosas. Isso faz com que a gelatina tenha várias propriedades aplicáveis na estabilização de espumas e emulsões (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Tabela 2 – Aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos encontrados na gelatina.

Aminoácidos	Hidrofílico	Hidrofóbico
Alanina	-	+
Arginina	+	-
Asparagina	+	-
Ácido aspártico	+	-
Ácido glutâmico	+	-
Glutamina	+	-
Glicina	-	+
Histidina	+	-
Hidroxi prolina	-	+
Hidroxilisina	+	-
Isoleucina	-	+
Leucina	-	+
Lisina	+	-
Metionina	-	+
Fenilalanina	-	+
Prolina	-	+
Serina	+	-
Treonina	+	-
Tirosina	+	-
Valina	-	+

Fonte: adaptado de Schrieber e Gareis (2007).

2.2.3 Formação de filme

Wang et al. (2007) realizaram estudo para verificar a capacidade de formação de filme de seis tipos de proteínas, dentre elas a gelatina, e seis tipos de polissacarídeos. Também foram analisadas as propriedades mecânicas e permeabilidade a vapor de água e oxigênio dos filmes obtidos. Os autores constataram que os filmes de proteína apresentaram maior resistência a solventes que os compostos por polissacarídeos. Os resultados também revelaram que o aumento da concentração das soluções de ensaio (entre 4 e 8 % de gelatina) promoveram melhora das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

2.3 FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Filmes poliméricos podem ser definidos como placas com espessura inferior a 0,254 mm (CANEVAROLO, 2006). No que tange os filmes à base de biopolímeros, pode-se observar que esses vem contribuindo com uma parcela do seguimento de embalagens ecológicas e biodegradáveis (AMIN; USTUNOL, 2007). Esses materiais possuem ainda ampla aplicação em recobrimento de superfícies bem como na produção de filmes comestíveis, pois a película formada tem capacidade de preservar as características organolépticas dos alimentos, sendo ainda possível agregar ao filme substâncias antioxidantes, conservantes ou outros aditivos (NUSSINOVITCH, 2009).

Contudo, segundo Sobral (2000), o uso desses materiais para embalagens de alimentos depende de diversos fatores, que além de custos e disponibilidade, pode-se mencionar propriedades essenciais como: propriedades mecânicas (flexibilidade e resistência), propriedades organolépticas, permeabilidade (vapor de água e gases como O₂ e CO₂) e solubilidade.

2.3.1 Técnica de *casting*

A técnica de produção de filmes por *casting* é bastante aplicada no meio científico pela sua praticidade e agilidade na obtenção das amostras de estudo. Conforme descreve Rusling (2003), essa técnica consiste na dispersão da solução polimérica sobre uma superfície (geralmente uma placa com propriedades antiaderentes), a qual é submetida a determinada condição de secagem, para formação do filme através da evaporação do solvente.

Boanini et al. (2010) produziram filmes de gelatina por *casting* em diferentes concentrações (5, 10 e 15 % em massa), variando para cada concentração as seguintes quantidades de alginato oxidado, 0, 1 e 3 % em massa. Com isso, foram avaliados os efeitos de reticulação do alginato sobre os filmes de gelatina, no qual foram observados nos filmes tratados pequenos incrementos nas propriedades mecânicas e térmicas, e redução na interação com água.

Estudo comparativo entre o método de produção de filmes de proteína concentrada de soja com glicerol por *casting* e termocompressão, foi conduzido por Ciannamea et al. (2014). Os autores observaram que de acordo com a técnica aplicada, os filmes apresentaram propriedades mecânicas, solubilidade, permeabilidade, cor e transparência distintas. Segundo os mesmos, isso se justifica pelas forças intermoleculares envolvidas na formação dos filmes. Sendo que interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio predominaram nos filmes obtidos por *casting*, enquanto que ligação dissulfureto desempenhou um papel mais relevante na formação de filmes termocomprimidos.

2.3.2 Plastificantes

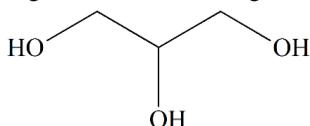
Conforme Canevarolo (2006), os plastificantes são geralmente líquidos utilizados para aumentar a flexibilidade e a distensibilidade do filme na sua temperatura de utilização. Além de alterar as propriedades mecânicas, as substâncias que atuam como plastificante também tem forte influência nas propriedades térmicas dos materiais. Dessa forma, plastificantes são, normalmente, moléculas pequenas que se alojam entre as cadeias poliméricas afastando-as umas das outras. Esse afastamento provoca a redução das forças de atração intermolecular secundária, aumentando a mobilidade das cadeias, reduzindo assim, o nível energético necessário para dar mobilidade à cadeia toda, ou seja, diminui-se a temperatura de transição vítrea.

Os plastificantes podem ser divididos em duas categorias, aqueles solúveis em água e os insolúveis (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997). Os plastificantes solúveis em água são completamente dissolvidos na fase aquosa da dispersão polimérica coloidal, e quando adicionado em altas concentrações pode levar a um aumento da difusão de água no polímero. Já os plastificantes insolúveis em água, tem que ser emulsionado na dispersão de polímero, sendo que estes podem ocupar os micros espaços vazios do filme, ocasionando uma redução na absorção de água. Contudo, plastificantes insolúveis podem provocar separação de fase ou zonas descontínuas durante a secagem do filme, e como consequência

disso, tem-se a redução de flexibilidade e aumento de permeabilidade a vapor de água (SIEPMANN; PAERATAKUL; BODMEIER, 1998).

Vieira et al. (2011) relatam que os plastificantes mais utilizados na produção de filmes biopoliméricos são os polióis, mono, di e oligosacarídeos. Os principais polióis consistem no glicerol ou glicerina (Figura 4), sorbitol, etileno glicol, polietileno glicol, propileno glicol, manitol e xilitol. E dentre os monossacarídeos pode-se citar a glucose, manose, frutose e sucrose. Os autores destacam ainda o efeito plastificante que água tem sobre os filmes biopoliméricos, haja vista que é um dos principais solventes na produção desses materiais.

Figura 4 – Estrutura do glicerol.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os polióis são considerados bastante eficazes para utilização em filmes com caráter quebradiço, como é o caso dos oriundos de matéria proteica. Dessa forma, plastificantes como o glicerol são amplamente aplicados, pois além de reduzir a fragilidade também auxilia na formação do filme (DO A. SOBRAL; DOS SANTOS; GARCÍA, 2005).

Estudo conduzido por Bergo et al. (2013), demonstraram o efeito do tipo e concentração de alguns polióis (glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol e propilenoglicol) sobre o conteúdo de umidade de filmes de gelatina. Observou-se que os filmes contendo glicerol absorveu mais água que os demais, o que pode ser atribuído a alta higroscopicidade natural desse plastificante.

Fakhour et al. (2012) desenvolveram filmes comestíveis e biodegradáveis a partir de blendas de amido e gelatina, para os quais inseriram dois plastificantes, sorbitol e glicerol. Os autores constataram que o aumento na concentração de gelatina ocasionou aumento na transparência, resistência a tensão e permeabilidade ao vapor de água. E ambos os polióis contribuíram para o aumento da elongação, permeabilidade e solubilidade dos filmes estudados.

2.3.3 Agentes Reticulantes

Os agentes reticulantes basicamente são utilizados com o propósito de melhorar propriedades dos filmes poliméricos, como a resistência à água, coesão, rigidez, resistência mecânica e permeabilidade. Isso é possível devido a capacidade dos reticulantes de promover a formação de ligações covalente entre as cadeias dos biopolímeros. Os agentes de reticulação químicos mais comuns são o glutaraldeído, gliceraldeído, formaldeído, ácido tânico e ácido lático (BASTIOLI, 2005).

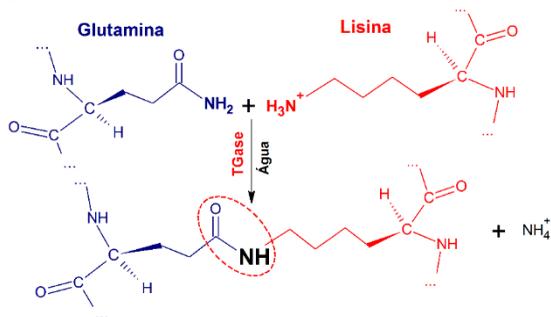
Além dos agentes reticulantes químicos é possível utilizar métodos de reticulação física, através do uso de radiação (ultravioleta, por exemplo) ou tratamento térmico. E ainda aqueles que envolvem o uso de enzimas, como o caso das transglutaminases ou peroxidases aplicadas para estabilizar materiais proteicos.

Os tópicos subsequentes tratar-se-ão dos principais mecanismos de reticulação pertinentes ao presente estudo, que correspondem ao agente de reticulação enzimático, a Transglutaminase, e o método físico por aplicação de radiação ultravioleta.

2.3.3.1 Transglutaminase

A Transglutaminase é uma enzima capaz de introduzir ligações covalentes entre proteínas. Isso ocorre através de reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e várias aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina, conforme ilustrado na Figura 5 (NONAKA et al., 1989).

Figura 5 – Reação de reticulação entre resíduos de glutamina e lisina catalisadas por Transglutaminase.



Fonte: adaptado de Orban et al. (2004)

Essa enzima já foi encontrada em mamíferos, vertebrados, invertebrados, moluscos, plantas e microrganismos. Sendo que a transglutaminase produzida por microrganismos do gênero *Streptovorticillium* são de grande interesse por gerarem enzimas independentes de íons cálcio (Ca^{2+}) (MACEDO; SATO, 2005).

Consoante a Motoki e Seguro (1998), a transglutaminase microbiana compreende, aproximadamente, 331 resíduos de aminoácidos, apresentando, assim, um peso molecular estimado de 38.000 daltons. Os autores ainda atestam que a faixa de pH considerada ótima para essa enzima é entre 5 e 8. Entretanto, mesmo em intervalos de pH de 4 e 9, a mesma ainda expressa alguma atividade. A temperatura ótima de atuação situa-se em torno de 50 °C, sendo que a 10 °C a enzima ainda apresenta-se funcional, e temperaturas acima de 70 °C provocam a inativação da mesma.

Estudos referentes a estabilidade térmica e mudanças conformacionais da transglutaminase produzida por *Streptomyces hygroscopicus*, demonstraram que a adição de polióis como o glicerol podem prover estabilidade a enzima. Esse fato foi confirmado por análise térmica de calorimetria de varredura diferencial, pois a adição de 10 % de glicerol acarretou em mudanças significativas na temperatura de fusão da solução enzimática, o que indica que os polióis podem manter a estrutura natural da enzima em alguma extensão (CUI et al., 2008).

2.3.3.2 Tratamento com ultravioleta

As proteínas reticuladas através de tratamentos térmicos, agentes reticulantes ou tratamentos que envolvam uso de radiação (UV, por exemplo), formam redes insolúveis e infusíveis, conforme a densidade de ligações covalentes formadas. Sendo que durante um tratamento físico (calor, radiação, pressão etc) as proteínas podem sofrer mudanças de composição, textura, desdobramentos, reticulação, dessulfuração e desamidação (BASTIOLI, 2005).

Conforme descrevem Bintsis et al.(2000), a radiação ultravioleta ocupa uma ampla faixa de comprimento de onda na região não-ionizante do espectro eletromagnético entre os raios X (200 nm) e a luz visível (400 nm). Essa região do espectro é subdividida em três regiões, que são:

- UVC (ultravioleta de ondas curtas) – 200 a 280 nm.
- UVB (ultravioleta de ondas médias) – 280 a 320 nm.

- UVA (ultravioleta de ondas longas) – 320 a 400 nm.

A literatura traz como benefícios do tratamento com ultravioleta em superfícies poliméricas os seguintes tópicos (BHATTACHARYA; RAWLINS; RAY, 2008):

- A possibilidade de se realizar enxertos de estruturas sobre a superfície filmogênica sem afetar o material internamente.
- Controle espacial e temporal da reação, pois a radiação pode ser direcionada para áreas de interesse do sistema.
- Em geral se pode proceder a baixas temperaturas (ambiente) sem alteração na taxa de conversão.

Bhat e Karim (2009) investigaram o impacto da radiação UVC (257,3 nm) sobre a força do gel, viscosidade e propriedades térmicas de uma amostra de gelatina de peixe comercial. Essas amostras (grânulos secos) foram irradiadas por 30 e 60 min, sendo que os autores observaram melhora significativa na força do gel, redução acentuada na viscosidade e alteração expressiva na entalpia de fusão. Portanto, os resultados observados sugerem a possibilidade de formação de ligações cruzadas por meio da aplicação da radiação UV sobre a gelatina.

2.3.4 Filmes de gelatina reticulados com transglutaminase

A literatura reporta diversos trabalhos envolvendo o uso de gelatina no preparo de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis, ou ainda aplicados no desenvolvimento de biomateriais para área médica e tecidual. Em alguns desses estudos tem-se a aplicação e investigação do potencial uso da enzima transglutaminase como agente de reticulação de filmes constituídos de materiais de origem proteica, como a gelatina.

Carvalho e Grosso (2006) produziram filmes de gelatina (tipo B – Bloom 270 g) com glicerol, 10 g de gelatina e 4,5 g de glicerol por 100 g de solução filmogênica, os quais foram tratados enzimaticamente (TGase, 10 U/g de gelatina) e termicamente. Os autores observaram os filmes reticulados com TGase a 50 °C apresentaram permeabilidade de vapor de água significativamente inferior aos filmes não tratados e aos termicamente tratados. Segundos os mesmos, esse resultado pode ser atribuído a uma melhor estruturação da matriz polimérica promovida pelo tratamento enzimático.

No entanto, em estudo similar, Piotrowska et al. (2008) constataram que a reticulação enzimática da gelatina de pele de peixe não acar-

retou em melhora nas propriedades de barreira a vapor de água dos filmes produzidos, porém houve redução expressiva na solubilidade. Foi observado também, que o glicerol tem um bom desempenho como plastificante, e em concentrações em torno de 20 % não provocou alterações significativas nas propriedades de solubilidade e permeabilidade dos filmes reticulados com TGase.

Trabalho publicado por Weng e Zheng (2015) sugerem que filmes de gelatina de peixe tratados com TGase e incorporados com proteína isolada de soja, tendem a ter maior resistência a solubilização em água. Contudo, as propriedades mecânicas dos filmes foram substancialmente alteradas apenas devido ao efeito de reticulação da enzima, sendo que a proteína isolada de soja não afetou tal propriedade.

Wang et al. (2015) estudaram a possibilidade de produção de um filme com potencial aplicação para embalagens biodegradáveis, composta por gelatina e carbonato de cálcio, no qual a TGase foi o agente de reticulação utilizado. Os autores observaram através de análises térmicas, microscopia e infravermelho, que a enzima realizou a compatibilização dos dois materiais e alterações conformacionais na estrutura da proteína

2.3.5 Filmes de gelatina tratados com ultravioleta

Apesar do uso da radiação ultravioleta, com o intuito de realizar a reticulação de proteínas, ter sido reportada em diversos trabalhos da década de 90, ainda não se tem total clareza dos mecanismos envolvidos durante a aplicação dessa técnica (WEADOCK; OLSON; SILVER, 1983; TOMIHATA et al., 1993).

Com o intuito de produzir filmes bioabsorvíveis e antiadesivos, Matsuda et al. (2002) estudaram filmes de gelatina (10 % em massa) implantados no abdome de ratos. Os filmes foram expostos a diferentes tempos a uma fonte UV, sendo que para o estudo 10 h de exposição se mostrou como melhor resultado na reticulação da amostra. O estudo demonstrou que o filme foi absorvido completamente no terceiro dia após implantado, sendo esse o tempo ótimo determinado pelos pesquisadores.

O tratamento de gelatina de pele de peixe (tipo A) com altas doses de UVB, demonstrou grande potencial de reticulação. Durante a pesquisa, observou-se que os filmes produzidos tiveram as propriedades mecânicas e permeabilidade afetadas quando submetidas a radiação. Isso pode ser decorrente da radiação ultravioleta ter induzido ligações

cruzadas interrompendo a estrutura helicoidal da proteína (OTONI et al., 2012).

Masutani et al. (2014) estudaram o efeito da radiação UVC (254 nm) sobre filmes de gelatina (tipo A) com glucose, sendo que as amostras foram irradiadas durante 2 horas e 46 minutos. Verificou-se com o estudo que a radiação acresceu a estabilidade térmica e reduziu a solubilidade em água dos filmes, o que segundo os autores possibilita o uso do material na engenharia tecidual. E ainda supõe-se que o método de reticulação aplicado requer a geração de radicais livres e formação de ditiosina entre moléculas vizinhas para que ocorram as ligações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os procedimentos adotados para elaboração dos filmes de gelatina, e as metodologias envolvidas na caracterização das amostras. Tem-se ainda, a descrição do planejamento experimental adotado e a procedência das matérias-primas usadas na confecção dos filmes.

3.1 MATERIAL UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS FILMES

Na elaboração dos filmes foram utilizadas quatro matérias-primas:

- Água destilada como solvente.
- Gelatina de pele de suíno tipo A (bloom 280), que foi gentilmente cedida pela Gelnex The Gelatin Specialists (Itá, SC, Brasil).
- Glicerina como agente plastificante, com teor de pureza 99,5 % (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda).
- Enzima Transglutaminase ACTIVA WM® (obtida do *Streptomyces mobaraense*), doada pela Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), cuja atividade nominal é 100 U.g^{-1} de acordo com a empresa.

3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi desenvolvido um planejamento fatorial composto central cujos fatores e os níveis de estudo (Tabela 3) foram determinados a partir de ensaios preliminares. As concentrações de gelatina e glicerina foram estabelecidas de modo que os filmes fossem produzidos com proporção de gelatina maior que a de glicerina, pois foi anteriormente observado que filmes com alto teor de plastificante aderiam fortemente à forma, comprometendo a integridade do mesmo durante a remoção. Além disso, os pontos correspondentes às máximas concentrações de gelatina e glicerina, foram delimitados conforme a Tabela 3 para manter espessuras inferiores aquela máxima característica de um filme polimérico ($< 0,254 \text{ mm}$).

As diferentes concentrações de enzima foram definidas de acordo com ensaios de acompanhamento do aumento da viscosidade resultante da reação de reticulação da gelatina. Os valores de concentração de

TGase adotados foram aqueles que se mostraram estar em acordo com os tempos de reação de reticulação que resultassem em valores reproduzíveis de consistência.

Tabela 3 – Fatores e níveis de estudo do planejamento experimental.

Fatores	Níveis do Planejamento				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
[Gelatina] mg.mL ⁻¹ (X)	32,73	60,00	100,00	140,00	167,27
[Glicerina] mg.mL ⁻¹ (Y)	0,00	12,71	31,36	50,00	62,71
[TGase] mg.mL ⁻¹ (Z)	1,27	4,00	8,00	12,00	14,73

A partir dos fatores e níveis mostrados, foi estabelecido então o planejamento fatorial composto central, gerando assim um planejamento fatorial completo 2³ (8 ensaios), 6 ensaios referentes aos pontos axiais, e por fim foram feitas 5 repetições do ponto central, compondo um total de 19 ensaios (Tabela 4).

Tabela 4 – Delineamento do planejamento experimental composto central.

Ensaio	Variáveis			Valores reais (mg.mL ⁻¹)		
	X	Y	Z	[Gelatina]	[Glicerina]	[TGase]
1	-1	-1	-1	60,00	12,71	4,00
2	+1	-1	-1	140,00	12,71	4,00
3	-1	+1	-1	60,00	50,00	4,00
4	+1	+1	-1	140,00	50,00	4,00
5	-1	-1	+1	60,00	12,71	12,00
6	+1	-1	+1	140,00	12,71	12,00
7	-1	+1	+1	60,00	50,00	12,00
8	+1	+1	+1	140,00	50,00	12,00
9	-1,68	0	0	32,73	31,36	8,00
10	+1,68	0	0	167,27	31,36	8,00
11	0	-1,68	0	100,00	0,00	8,00
12	0	+1,68	0	100,00	62,71	8,00
13	0	0	-1,68	100,00	31,36	1,27
14	0	0	+1,68	100,00	31,36	14,73
15	0	0	0	100,00	31,36	8,00
16	0	0	0	100,00	31,36	8,00
17	0	0	0	100,00	31,36	8,00
18	0	0	0	100,00	31,36	8,00
19	0	0	0	100,00	31,36	8,00

Foram preparados também filmes sem o tratamento enzimático, porém nas mesmas concentrações de gelatina e glicerina descritas na Tabela 4 para controle, ou seja, compostos apenas de gelatina e glicerina (Tabela 5).

Tabela 5 – Filmes controle sem tratamento com transglutaminase para comparação com os filmes obtidos no planejamento experimental.

Referência	[Gelatina] mg.mL ⁻¹	[Glicerina] mg.mL ⁻¹
A	60,00	12,71
B	140,00	12,71
C	60,00	50,00
D	140,00	50,00
E	32,73	31,36
F	167,27	31,36
G	100,00	0,00
H	100,00	62,71
I	100,00	31,36

As respostas avaliadas no planejamento foram: espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas (Módulo de Young, alongamento máximo na ruptura, tensão máxima) e ângulo de contato. Os dados foram analisados estatisticamente nos *softwares* Statsoft STATISTICA® 10 e Design Expert® 7.0, através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância a 5 % e também aplicou-se Teste de Tukey ($p < 0,05$). Para análise de variância foram avaliados modelos de regressão linear, quadrático (completo e reduzido) e cúbico reduzido, sendo que são dispostos e discutidos no trabalho apenas o modelo que melhor representou os dados analisados para cada resposta.

3.2.1 Otimização por Desejabilidade

O *software* Statistica utiliza uma abordagem de programação não linear com restrições denominada “desejabilidade” (do inglês *desirability*). Essa abordagem consiste em converter primeiramente cada resposta em uma função individual (desejabilidade) d_i , a qual varia numa faixa de 0 a 1; sendo que se a resposta for igual a 1, significa que a otimização resultou no valor ótimo requerido, porém se d_i for igual a 0 tem-se que a resposta não está na região aceitável estabelecida (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

3.2.2 Cinética da reação de reticulação da gelatina pela ação da transglutaminase

Para estudo da cinética de reação de reticulação da gelatina por ação da TGase utilizou-se um viscosímetro modelo Thermo Haake, a 30 rpm e haste número 1, o qual mediu a viscosidade (mPa.s) em função do tempo. Diferentes concentrações de enzima foram aplicadas a soluções de gelatina (100 mL a concentração de 100 mg.mL^{-1}) de modo a satisfazer os níveis do planejamento experimental proposto; a temperatura foi mantida a $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo essa a temperatura ótima para a atividade da TGase.

As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.3 Preparo dos filmes

Os filmes de gelatina foram produzidos em diferentes concentrações com diferentes quantidades de enzima e glicerina, conforme descrito no planejamento experimental (Tabela 4). O procedimento de preparo inicia-se com a hidratação da gelatina com água destilada (20 mL) a temperatura ambiente (cerca de $25 \text{ }^\circ\text{C}$) por 15 min. Após a hidratação promoveu-se o aquecimento com agitador magnético por 25 min, a $50 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ e agitação suave para solubilizar a gelatina e evitar incorporação de ar a solução. Em seguida adicionou-se a glicerina a solução mantendo agitação leve a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min, sendo que após esse período inoculou-se a enzima dissolvida em 20 mL de água destilada ($50 \text{ }^\circ\text{C}$) na solução de gelatina e glicerina, formando um montante de 40 mL de solução aquosa – gelatina, glicerina e enzima.

O tempo de reação da enzima foi definido de acordo com a cinética da reação de reticulação monitorada pela viscosidade, que foi estudada para cada faixa de concentração de enzima. Transcorrido o período de reação a solução era transferida com auxílio de seringa para placas de petri de poliestireno cristal, no qual 30 mL eram colocados em placas de 150 mm de diâmetro e 15 mm de altura, e 10 mL eram transferidos para placas de 90 mm de diâmetro e 15 mm de altura. Na sequência as placas eram acondicionadas em estufa com circulação de ar forçada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, para que então os filmes fossem removidos das placas.

Os filmes maiores foram utilizados no preparo das amostras para os ensaios mecânicos, ângulo de contato, infravermelho, microscópico e

nos ensaios térmicos. E os filmes de menor diâmetro serviram como base na avaliação da espessura e determinação da permeabilidade ao vapor de água.

3.2.3.1 Tratamento com ultravioleta

O tratamento com ultravioleta foi conduzido aos filmes com concentração de gelatina ($60,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), glicerina ($20,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e TGase ($4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) definidas pela otimização por desejabilidade do planejamento. Foram avaliados dois tempos de exposição à radiação UVC, 3 h e 8 h, esses períodos de exposição correspondem a valores próximos aos registrados em dois estudos na literatura, no qual Masutani et al. (2014) avaliaram um tempo de exposição de 2 h e 46 min, e Matsuda et al. (2002) consideraram 10 h como tempo ótimo de exposição à radiação UV. Portanto, produziram-se filmes nas condições descritas na Tabela 6, sendo que os filmes com enzima, inicialmente passaram pelo tratamento enzimático para produção do filme, e posteriormente foram expostos ao UV.

A câmara ultravioleta empregada dispõe de 6 lâmpadas UVC (254 nm) com potência de 8 W, sendo que três lâmpadas foram instaladas na parte superior da câmara e as outras três na parte inferior. Os filmes então foram inseridos no interior da câmara, com distância aproximada de 15 cm das lâmpadas superiores e 10 cm das lâmpadas inferiores.

Tabela 6 – Filmes resultantes da otimização do planejamento por desejabilidade e condições do tratamento UV.

Referência	[Gelatina]*	[Glicerina]*	[TGase]*	Tempo UV
Controle	60,00	20,00	0,00	0 h
Otimizado	60,00	20,00	4,00	0 h
UV-3h	60,00	20,00	0,00	3 h
UV-3h-enz	60,00	20,00	4,00	3 h
UV-8h	60,00	20,00	0,00	8 h
UV-8h-enz	60,00	20,00	4,00	8 h

* mg.mL^{-1}

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Neste tópico abordam-se os ensaios utilizados na caracterização dos filmes produzidos, como: espessura, solubilidade, permeabilidade

ao vapor de água, propriedades mecânicas, ângulo de contato, infravermelho, propriedades térmicas (TGA e DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises térmicas, infravermelho e a microscopia foram realizadas em filmes selecionados, tendo em vista a magnitude no número de amostras resultantes do planejamento. Dessa forma, essas análises foram direcionadas, essencialmente, aos filmes resultantes do processo de otimização e tratamento com ultravioleta.

3.3.1 Espessura

A espessura dos filmes foi avaliada com base nas amostras preparadas em placas de 90 mm. Os valores obtidos são resultantes da média de 10 pontos aleatórios medidos em cada filme, para o qual utilizou-se micrômetro digital do modelo Digimess IP54.

3.3.2 Teste de solubilidade

A medida do percentual de material solúvel em água foi realizada conforme método descrito por Cuq et al. (1997) com algumas adaptações. Amostras armazenadas por 48 h em dessecador com sílica gel foram recortadas no formato de quadrados com 2 cm de lado, e realizadas as medidas de massa inicial. Posteriormente, imergidas em 50 mL de água destilada e submetidas a banho termostático com agitação suave, para os quais foram avaliadas duas condições de tempo-temperatura: 24 h a 25 °C e 1 h a 50 °C. Assim que transcorrido o período de imersão para cada faixa de temperatura, as amostras foram retiradas da água e submetidas a secagem em estufa de circulação forçada de ar, por 24h a 105 °C, e então determinada a massa final. Os ensaios foram efetuados em triplicata e a equação para determinar o percentual solúvel está descrita a seguir:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{m_{\text{inicial}} - m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (1)$$

3.3.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada de acordo com adaptação do método padrão E-96 da ASTM (1995) a 25 °C com desvio de ± 1 °C. As amostras dos filmes (produzidos nas placas de 90 mm de diâmetro) foram recortadas, obtendo discos de aproximada-

mente 70 mm de diâmetro. Os filmes então foram selados em cápsulas de alumínio contendo 25 g de sílica gel, e alocados em dessecador com água destilada. O ganho de massa das cápsulas foi medido a cada 1 hora durante 9 horas, para o qual se obteve uma curva de ganho de massa por tempo. A equação que determina a permeabilidade ao vapor de água corresponde a:

$$PVA = \left(\frac{w}{t} \right) \cdot \frac{x}{A \cdot \Delta P} \quad (2)$$

Onde:

- PVA: permeabilidade ao vapor de água expresso em $\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$.
- (w/t) : ganho de massa (fluxo em $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$).
- x : espessura média do filme (mm).
- A : área de permeação ($0,003157 \text{ m}^2$, pois o diâmetro de permeação corresponde a 63,40 mm).
- ΔP : variação de pressão do sistema (3,16746 kPa a 25 °C).

3.3.4 Propriedades mecânicas

A determinação das propriedades mecânicas foi realizada em triplicata, na qual avaliaram-se as seguintes propriedades: tensão máxima (σ), alongamento máximo de ruptura (ϵ) e módulo de Young (E_0). Os testes de tração foram conduzidos em texturômetro da marca TA. HD. Plus Stable Micro Systems. As determinações foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

As condições do ensaio foram: célula de carga de 50 N, temperatura de 23 °C, distância de separação das garras de 50 mm e velocidade de deslocamento de célula de $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Os filmes foram cortados em formato padrão, retangular com 25 mm de largura por 90 mm comprimento, de acordo com a ASTM D882-12 (2012). A espessura das amostras foi determinada através de micrômetro digital (Digimess, IP54), sendo essa resultante da média de 5 medidas randômicas sobre o material.

3.3.5 Ângulo de contato

O equipamento usado para medição do ângulo de contato foi o Goniômetro Ramé-Hart Inst. Co., modelo 250-F1 (220 volts), do Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química da UFSC. As amostras foram cortadas em retângulos (40 mm por 15 mm) e mantidas em dessecador com sílica gel por 48 h antes da análise. As condições experimentais foram: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), água destilada como fluido de referência. As análises foram feitas sobre a superfície superior do filme, e foi utilizado um intervalo de 10 s com amostragem de 1 medida a cada segundo. O resultado da medida foi a média entre os ângulos direito e esquerdo da gota no tempo de 10 segundos, sendo que o ensaio foi feito em triplicata no qual o gotejamento foi feito em regiões distintas da amostra.

3.3.6 Infravermelho com transformada de Fourier

As medidas de ATR (Refletância Total Atenuada) foram feitas com um espectrômetro FTIR, Agilent modelo Carry 660 com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe). O equipamento utilizado encontra-se na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal usando ar como referência, e realizada a média de 60 varreduras para cada amostra avaliada, no intervalo 4000 a 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} foi feita para cada amostra.

3.3.7 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas foram determinadas com equipamento Netzsch STA 449F3, operando no modo DSC-TG (calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica). As análises foram conduzidas no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química da UFSC. Para a análise, as amostras foram alocadas em amostrador de alumina, utilizando cerca de 8 a 10 mg de filme. As condições experimentais estabelecidas foram: temperatura inicial de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e final $600\text{ }^{\circ}\text{C}$; a taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; e o fluxo de gás inerte (N_2) de $45\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura

O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV, o qual encontra-se no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras foram previamente preparadas através de recobrimento com ouro, e então tiveram suas superfícies (superior) e a seção transversal (resultante da fratura de ensaio mecânico) analisadas a 10 kV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

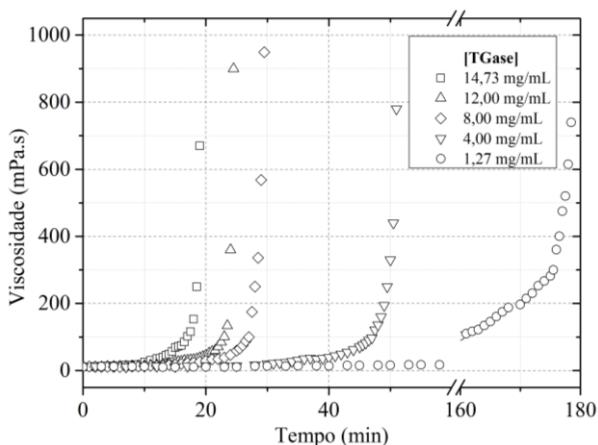
Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente tem-se o estudo de cinética de reticulação da gelatina, seguido pelo planejamento experimental e a otimização do mesmo.

No âmbito das propriedades investigadas objetivou-se com o tratamento de reticulação a redução da solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes, aumento da resistência mecânica e diminuição da interatividade do filme com água (aumento do ângulo de contato). Conferindo, ainda, maior estabilidade térmica ao filme devido ao efeito de reticulação da estrutura.

4.1 REOLOGIA DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DA GELATINA

A Figura 6 apresenta o comportamento observado na análise de viscosidade de uma solução de gelatina de concentração 100 mg.mL^{-1} e $\text{pH } 5,3 \pm 0,1$. As soluções de TGase foram elaboradas a concentrações previamente estabelecidas no planejamento experimental. Devido ao grande número de experimentos do planejamento, e ao volume massivo de matéria-prima necessária para a realização dos ensaios, fixou-se a concentração de gelatina e variou-se apenas a concentração de enzima.

Figura 6 – Cinética da reação avaliada pela variação de viscosidade devido à reticulação de uma solução padrão de gelatina (100 mg.mL^{-1}) com TGase a diferentes concentrações.



Observa-se pelo gráfico um drástico e súbito incremento da viscosidade, ou seja, um crescimento exponencial dos pontos, o que se pode atribuir ao efeito de reticulação da transglutaminase sobre os grupos glutamina, lisina e demais aminas primárias da gelatina. Portanto, o incremento na quantidade de TGase afeta marcadamente a velocidade de reticulação enzimática, o que pode intervir na conformação da matriz polimérica. Os pontos nas regiões de viscosidade mais altas não representam o término do aumento da viscosidade, mas sim o último ponto passível de detecção pelo equipamento utilizado.

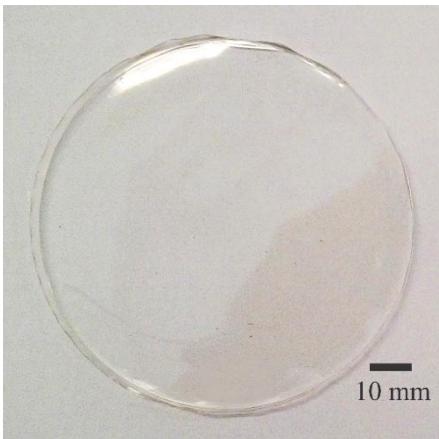
Esse mesmo comportamento foi mostrado em estudo conduzido por Kolodziejska et al. (2006) e Piotrowska et al. (2008), os quais utilizaram gelatina de peixe (*Gadus morhua*) e avaliaram, não apenas a transglutaminase, mas também o uso de reticulante químico, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboamida (EDC); este último apresentou a mesma tendência que a enzima TGase.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Devido à dimensão da tabela de resultados dos ensaios do planejamento, assim como os dados referentes aos filmes sem tratamento, ambos estão apresentados no Apêndice A ao final do trabalho.

Com relação aos filmes obtidos, os mesmos tiveram aspecto visual homogêneo (Figura 7), textura lisa, transparente e flexibilidade para os filmes com maior proporção de glicerina.

Figura 7 – Aspecto geral dos filmes obtidos no planejamento experimental.



4.2.1 Espessura

Por meio da análise de variância das medidas de espessura dos filmes (Tabela 7) é possível verificar quais fatores e interações foram significativas no intervalo de confiança adotado.

Tabela 7 – Análise de variância dos dados de espessura dos filmes obtidos no planejamento experimental.

FV	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Modelo	0,320	7	0,046	125,25	2,06	<0,0001*
Resíduo	0,067	182	3,7.10 ⁻⁴			
F.A.	0,001	7	2,1.10 ⁻⁴	0,56	2,06	0,7856
Erro Puro	0,066	175	3,8.10 ⁻⁴			
Total SQ	0,387	189				
Modelo de regressão						
$\text{Espessura(mm)} = 0,06644* - 4,41 \cdot 10^{-4} X* + 1,96 \cdot 10^{-3} Y* + 2,62 \cdot 10^{-5} XY* + 9,97 \cdot 10^{-6} X^2* - 7,84 \cdot 10^{-5} Y^2* - 3,99 \cdot 10^{-7} X^2Y* + 9,56 \cdot 10^{-7} XY^2*$						
R ² = 0,8281			R ² _{máx} = 0,8308		R = 0,91	

* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

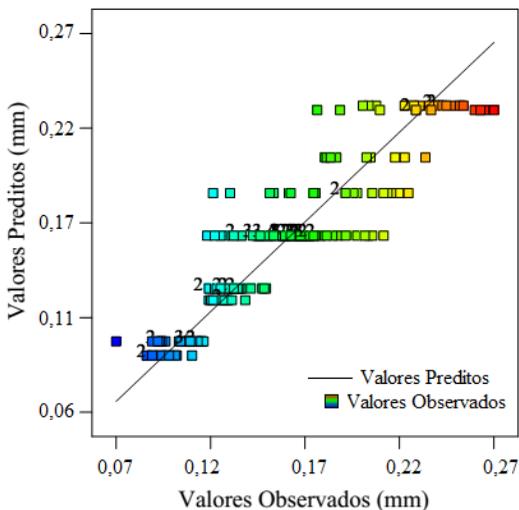
FV – Fonte de Variação; SQ – Soma Quadrática; gl – grau de liberdade; MQ – Média Quadrática.

Após a avaliação dos modelos de regressão linear, quadrático e cúbico reduzido, a Tabela 7 mostra a análise de variância com o modelo de regressão que melhor descreveu dados de espessura. O modelo de regressão cúbico reduzido obtido contempla os efeitos significativos observados a um nível p < 0,0001, portanto menor que 0,05. O valor de F calculado (125,25) foi muito maior que o valor de F tabelado (2,06), e não houve falta de ajuste (F.A.). A Tabela 7 mostra apenas os termos significativos no processo.

Os termos correspondentes a concentração de gelatina (X) e glicerina (Y) foram os fatores determinantes na variação da espessura dos filmes, visto que os mesmos representam os conteúdos majoritários na composição dos mesmos. O modelo apresentou um coeficiente de determinação alto (R = 0,91), expressando forte associação entre a variável dependente (espessura) e os fatores analisados. E ainda, tem-se um coeficiente de correlação (R²) moderado de 0,8281 de um R² máximo de 0,8308, que apesar de representar a tendência dos dados, tem-se ainda uma certa dispersibilidade dos dados observada em relação aos

valores preditos pelo modelo (Figura 8) pode ser atribuída à não homogeneidade da espessura do filme ocasionada por não uniformidade de dispersão da solução filmogênica e/ou irregularidade no processo de secagem, pois a estufa utilizada opera com circulação de ar forçada.

Figura 8 – Valores preditos pelo modelo de regressão da espessura e valores observados experimentalmente.



4.2.2 Solubilidade

A solubilidade dos filmes foi analisada em duas faixas de temperatura, cujos dados da análise de variância estão dispostos na Tabela 8 (solubilidade a 25 °C – 24 h) e na Tabela 9 (solubilidade a 50 °C – 1 h).

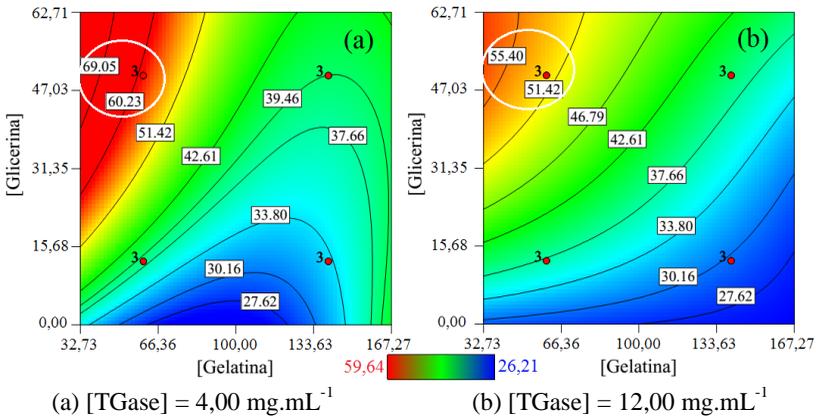
Tabela 8 – Análise de variância dos dados de solubilidade a 25 °C por 24 h (Solub.25).

FV	SQ	gl	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	p
Modelo	3714,25	11	337,66	260,63	2,01	<0,0001*
Resíduo	58,30	45	1,30			
F.A.	4,62	3	1,54	1,21	2,81	0,3196
Erro Puro	53,68	42	1,28			
Total SQ	3772,55	56				
Modelo de regressão						
$\text{Solub.25(\%)} = 58,76^* - 0,7768 X^* + 1,6428 Y^* - 2,3681 Z^* - 0,0111 XY^* + 0,0621 XZ^* - 0,0415 YZ + 4,29 \cdot 10^{-3} X^2 - 0,01013 Y^2 + 3,80 \cdot 10^{-4} XYZ - 3,53 \cdot 10^{-4} X^2Z + 7,47 \cdot 10^{-5} XY^2$						
$R^2 = 0,9845$			$R^2_{\text{máx}} = 0,9858$		$R = 0,9922$	

* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

O modelo de regressão cúbico reduzido foi o que melhor representou os dados da solubilidade na condição de menor temperatura, com alto coeficiente de determinação (0,9845) e sem falta de ajuste do modelo. As curvas de nível (Figura 9) mostram que o aumento da concentração de glicerina e redução da concentração de gelatina acarretam ao aumento acentuado da solubilidade. Isso se justifica pelo aumento da proporção do plastificante hidrofílico na composição do filme. O aumento da concentração de TGase exibido Figura 9 (a) e (b) basicamente não afetou a solubilidade a 25 °C, sendo que se observa apenas uma redução mais expressiva da solubilidade na região de maior conteúdo de glicerina e menor de gelatina (áreas circuladas no gráfico), correspondendo a um decréscimo de cerca de 10 % com aumento da concentração de enzima de 4,00 mg.mL⁻¹ (a) para 12,00 mg.mL⁻¹ (b).

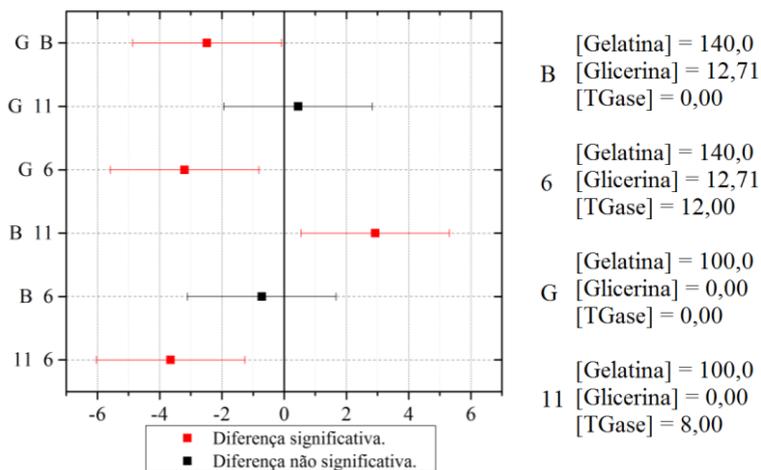
Figura 9 – Curvas de nível para solubilidade a 25 °C por 24 h.



Dessa forma, a análise do planejamento revela que de uma forma geral a solubilidade a 25 °C foi reduzida com o aumento da concentração de gelatina e diminuição do teor de plastificante, já diferentes concentrações de enzima tiveram pouco efeito na redução dessa propriedade. Weng e Zheng (2015) constataram que o aumento da concentração de TGase promovia reduções pouco expressivas da solubilidade a 30 °C por 24.

Analisando a tabela de planejamento e filmes de referência (Apêndice A), é claramente perceptível que na faixa de temperatura de 25 °C o tratamento enzimático foi pouco expressivo frente aos filmes sem tratamento. Todavia, para verificar se houve alguma diferença significativa na solubilidade a 25 °C entre os filmes tratados e não tratados, foram comparados os filmes tratados que apresentaram menor solubilidade (Figura 10), 6 (29,93 % ± 1,24 %) e 11 (26,28 % ± 0,12 %) e seus respectivos filmes de referência, B (29,21 % ± 0,42 %) e G (26,73 % ± 1,27 %).

Figura 10 – Teste de Tukey entre alguns filmes do planejamento e referência que apresentaram menor solubilidade a 25 °C.



Através do teste de Tukey observa-se que os pares G-11 e B-6 não apresentaram diferenças significativas na solubilidade a 25 °C. Entretanto, esses valores são condizentes com estudo dirigido por Carvalho e Grosso (2006), no qual a solubilidade de filmes de gelatina tipo B (Bloom 270), com glicerol e transglutaminase, ficaram em torno de 26 % para os filmes tratados e 30 % para os filmes nativos.

Contudo, quando confrontados os dados do planejamento e referência (Apêndice A) na solubilidade a 50 °C (1 h) vê-se que o tratamento enzimático foi efetivo na estabilização térmica dos filmes. Pois todos os filmes de referência foram completamente solubilizados, enquanto que os filmes incorporados de TGase resistiram as condições supracitadas sem completa solubilização.

Tabela 9 - Análise de variância dos dados de solubilidade a 50 °C por 1 h (Solub.50).

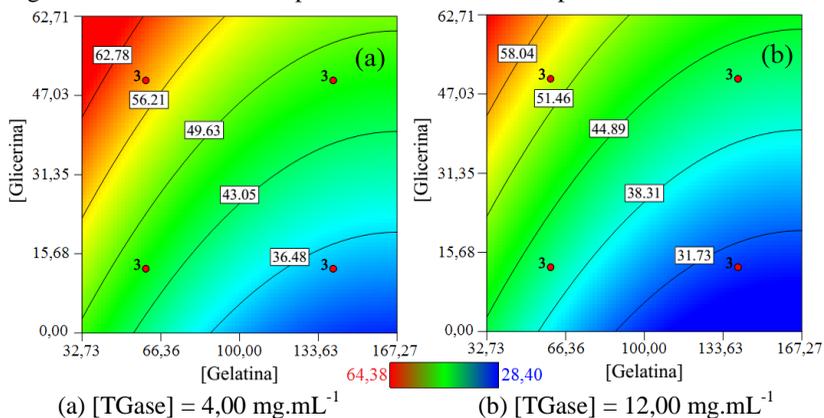
FV	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Modelo	3173,07	4	793,27	46,27	2,55	<0,0001*
Resíduo	891,58	52	17,15			
F.A.	182,72	10	18,27	1,08	2,02	0,3968
Erro Puro	708,86	42	16,88			
Total SQ	4064,65	56				

Modelo de regressão		
Solub.50(%) = 61,31* - 0,3471 X* + 0,3296 Y* - 0,5928 Z* + 1,04 . 10 ⁻³ X ² *		
R ² = 0,7807	R ² _{máx} = 0,8256	R = 0,8836

* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

O modelo estabelecido para a solubilidade a 50 °C (Tabela 9) foi quadrático reduzido em que apenas o termo quadrático da concentração de gelatina (X²) foi significativo. E os termos de interação não foram expressivos na descrição dos dados. Obteve-se um R² moderado, 0,7807, sem falta de ajuste do modelo, para o qual tem-se os seguintes gráficos de curva de nível (Figura 11).

Figura 11 – Curvas de nível para solubilidade a 50 °C por 1 h.



Similarmente à solubilidade a 25 °C, na Figura 11 observa-se que a variação da concentração de TGase teve um pequeno efeito na redução da solubilidade. O aumento de 4,00 mg.mL⁻¹ (a) para 12,00 mg.mL⁻¹ (b)

de enzima foi acompanhado por uma redução de, aproximadamente, 5 % dessa propriedade, como mostrado nas curvas de nível. As curvas denotam ainda o mesmo comportamento com relação ao efeito da variação das concentrações de gelatina e glicerina sobre a solubilidade, na qual uma redução se dá em regiões de alta concentração de matéria proteica e baixa concentração de plastificante (área azul dos gráficos).

4.2.3 Permeabilidade ao vapor de água

Devido à grande quantidade de amostra requerida para a análise de permeabilidade ao vapor de água, esse ensaio foi o único que compõe o planejamento que não foi avaliado com repetição. No entanto, as cinco repetições no ponto central denotam precisão dos resultados, mostrando que os valores obtidos são confiáveis, o que foi comprovado pela análise de variância (Tabela 10). Pois na análise do resíduo, tem-se que a parcela referente ao erro puro (SQ = 0,01) foi menor que a contribuição da falta de ajuste (SQ = 0,10), demonstrando que houve repetibilidade no ensaio realizado.

Tabela 10 – Análise de variância da permeabilidade ao vapor de água.

FV	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Modelo	1,02	5	0,20	24,48	3,02	<0,0001*
Resíduo	0,11	13	8,3.10 ⁻³			
F.A.	0,10	9	0,012	11,31	2,71	0,0162*
Erro Puro	0,01	4	1,0.10 ⁻³			
Total SQ	1,13	18				
Modelo de regressão						
$PVA = 0,3736* - 4,48 \cdot 10^{-3} X* + 8,69 \cdot 10^{-3} Y* - 1,31 \cdot 10^{-4} XY* + 3,04 \cdot 10^{-5} X2* + 2,60 \cdot 10^{-4} Y2*$						
R ² = 0,9040			R ² _{máx} = 0,9960		R = 0,9508	

* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

O modelo de regressão obtido é do tipo quadrático reduzido, no qual apenas os termos X, Y, X.Y, X² e Y² (referentes as concentrações de plastificante e glicerina) foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança adotado. Portanto, não foi detectada influência significativa da variação de concentração de enzima sobre a propriedade de permeabilidade ao vapor de água dos filmes. E embora o percentual de variação explicada pelo modelo de regressão seja alto, 90,4 % (R²) de

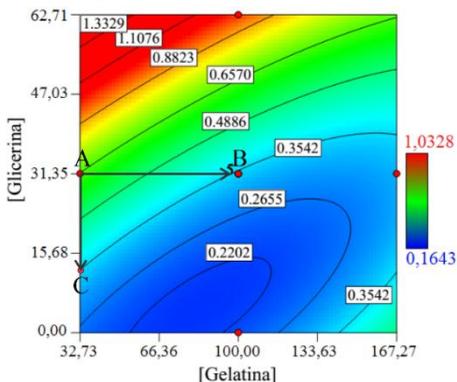
um máximo de 99,6 % ($R^2_{\text{máx}}$), assim como o coeficiente de determinação, 0,9508 (R), o mesmo não se ajustou bem aos dados, pois apresentou falta de ajuste significativa.

O gráfico das curvas de nível (Figura 12) mostra que o incremento da concentração de glicerina promove um aumento intenso da permeabilidade ao vapor de água, pois a adição de plastificante hidrofílico induz a reorganização da rede proteica do filme, o que consequentemente aumenta o volume livre da estrutura (VANIN et al., 2005). Já o aumento da concentração de gelatina está associado a redução da permeabilidade em regiões acima do ponto central da concentração de glicerina ($31,35 \text{ mg.mL}^{-1}$), pois os termos quadráticos possuem influência nas regiões abaixo do ponto central (curvas com formato elíptico).

As setas desenhadas na Figura 12 evidenciam o forte efeito da concentração de plastificante sobre a permeabilidade. Nesta figura observa-se que:

- Ponto A – condição de $[\text{Gelatina}] = 32,73 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $[\text{Glicerina}] = 31,35 \text{ mg.mL}^{-1}$, tem-se permeabilidade de $0,6570 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$.
- Ponto B – migrando do ponto A para B, tem-se mantida fixa a $[\text{Glicerina}]$ e aumentada $67,27 \text{ mg.mL}^{-1}$ da $[\text{Gelatina}]$ (para $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), para qual a permeabilidade é reduzida para $0,3542 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$.
- Ponto C – agora saindo do ponto A para C, tem-se fixada a $[\text{Gelatina}]$ em $32,73 \text{ mg.mL}^{-1}$ e reduzida a $[\text{Glicerina}]$ em $19,85 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou seja, para $11,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, a qual reduz a permeabilidade também para $0,3542 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$.

Figura 12 – Curva de nível para a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$).



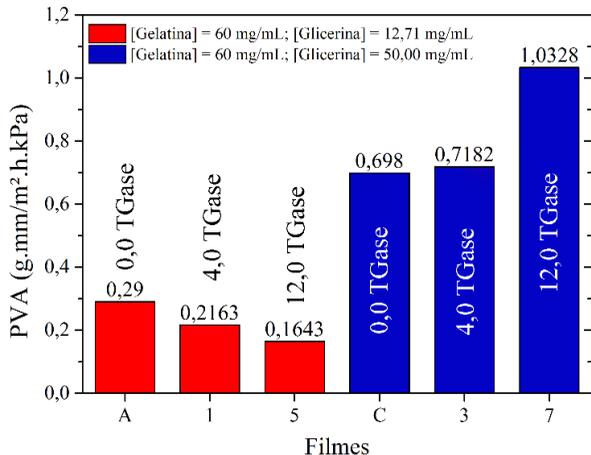
O presente trabalho mostrou que a variação da concentração de TGase não possui influência significativa sobre a permeabilidade ao vapor de água na faixa estudada. Estudo realizado por Carvalho e Grosso (2004) demonstraram que o tratamento enzimático de filmes de gelatina e glicerol conduzem a redução significativa da permeabilidade ao vapor de água, sendo que o filme não tratado apresentou $0,198 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ e o tratado com TGase $0,120 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$. Segundo os autores, isso indica mudança estrutural na matriz polimérica como uma função da reticulação, a qual pode ter influência no coeficiente de difusão de umidade na rede de gelatina.

Entretanto, trabalho realizado por Chambi e Grosso (2006) indica comportamento contrário do estudo mencionado anteriormente. Os autores observaram que o tratamento enzimático elevou a permeabilidade de $0,208 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ (sem tratamento) para $0,25 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ (com TGase). A justificativa dada para tal comportamento foi calcada na suposição de que a enzima estaria conferindo mobilidade à cadeia proteica, fato constatado pelos autores no aumento da elongação dos filmes.

Tang et al. (2005) também observaram um incremento sutil na permeabilidade de filmes de proteína isolada de soja tratada com TGase e incorporados com glicerol. Ainda que tenha ocorrido incremento de $1,24 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ para $1,33 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$, as diferenças obtidas não foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), sendo que os autores atribuíram esse aumento a pequena diferença de espessura dos filmes controle (0,105 mm) e tratado (0,115 mm).

Logo, expandindo a análise dos dados obtidos para filmes fora do planejamento experimental, isto é, avaliando os filmes controle de referência (sem tratamento enzimático) em comparação com seus respectivos filmes tratados (do planejamento), observam-se comportamentos similares aos descritos anteriormente para determinadas amostras, conforme consta na Figura 13. No qual, o grupo vermelho teve redução da permeabilidade com o aumento da concentração de TGase, ao passo que o grupo azul teve aumento da permeabilidade com o acréscimo na concentração de enzima.

Figura 13 – Comportamento antagonístico da permeabilidade de filmes selecionados do planejamento experimental e referência (sem tratamento com TGase).



Percebe-se pela Figura 13 que o grupo de menor permeabilidade compõe-se dos filmes com 60 mg.mL^{-1} de gelatina e $12,71 \text{ mg.mL}^{-1}$ de glicerina, sendo que esses apresentaram diminuição da propriedade em questão com o aumento da concentração de TGase. Porém o grupo com maior permeabilidade, caracterizado por filmes com 60 mg.mL^{-1} de gelatina e 50 mg.mL^{-1} de glicerina, teve comportamento contrário, cujo filme com teor elevado de enzima (7 – 12 mg.mL^{-1} de TGase) teve maior permeabilidade. Isso provavelmente é decorrente da grande concentração de plastificante desse grupo, o qual aliado ao tratamento enzimático pode gerar aumento no volume livre da estrutura, que por conseguinte acaba facilitando a difusão da umidade através do filme.

4.2.4 Propriedades mecânicas

A análise de variância e os modelos de regressão determinados no planejamento para as propriedades mecânicas estão contidos nas Tabelas 11 (Módulo de Young – E_0), 12 (Tensão máxima – σ) e 13 (alongamento máximo na ruptura – ϵ).

Tabela 11 – Análise de variância dos dados de Módulo de Young - E_0 (MPa) dos filmes obtidos no planejamento experimental.

FV	SQ	gl	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	p
Modelo	$2,71 \cdot 10^7$	11	$2,46 \cdot 10^6$	170,49	2,01	<0,0001*
Resíduo	$6,49 \cdot 10^5$	45	14431,01			
F.A.	$3,27 \cdot 10^5$	3	$1,09 \cdot 10^5$	14,17	2,81	<0,0001*
Erro Puro	$3,22 \cdot 10^5$	42	7683,86			
Total SQ	$2,77 \cdot 10^7$	56				
Modelo de regressão						
$E_0 \text{ (MPa)} = 2480,14^* - 0,51 X^* - 70,51 Y^* - 181,03 Z - 0,40 XY^* + 1,22 XZ^* + 2,53 YZ + 2,44 \cdot 10^{-2} X^{2*} + 0,51 Y^{2*} + 3,41 Z^{2*} - 2,53 \cdot 10^{-2} XYZ^* + 6,79 \cdot 10^{-3} XY^{2*}$						
$R^2 = 0,9766$		$R^2_{\text{máx}} = 0,9884$		$R = 0,9882$		

* significativo no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

O modelo de regressão obtido para o módulo de Young - E_0 (Tabela 11) corresponde a uma equação cúbica reduzida, para qual apenas os termos Z e YZ não foram significativos ao modelo. Embora as variáveis apresentem um alto coeficiente de correlação ($R = 0,9882$) e de determinação ($R^2 = 0,9766$), o modelo de regressão apresentou falta de ajuste, o que infere uma variabilidade dos dados experimentais não ajustada pela equação proposta.

Tabela 12 – Análise de variância dos dados de Tensão máxima - σ (MPa) dos filmes obtidos no planejamento experimental.

FV	SQ	gl	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	p
Modelo	32748,8	7	4678,4	78,16	2,20	<0,0001*
Resíduo	2933,0	49	59,86			
F.A.	717,87	7	102,55	1,94	2,20	0,0863
Erro Puro	2215,1	42	52,74			
Total SQ	35681,8	56				
Modelo de regressão						
$\sigma \text{ (MPa)} = 85,18^* - 4,52 \cdot 10^{-3} X^* - 3,23 Y^* - 2,88 Z - 4,25 \cdot 10^{-3} XY^* + 1,04 \cdot 10^{-3} X^2 + 3,75 \cdot 10^{-2} Y^{2*} + 0,17 Z^{2*}$						
$R^2 = 0,9178$		$R^2_{\text{máx}} = 0,9379$		$R = 0,9580$		

* significativo no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Para a tensão máxima – σ (Tabela 12) tem-se um modelo de regressão quadrático reduzido, sendo que neste apenas os termos Z e X² não são significativos no nível de confiança adotado. Observa-se que os coeficientes de correlação e determinação são consideráveis, 0,9580 e 0,9178, respectivamente, e não se tem falta de ajuste.

Tabela 13 – Análise de variância dos dados de Alongamento máximo na ruptura - ε (%) dos filmes obtidos no planejamento experimental.

FV	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Modelo	49443,3	7	9888,66	16,60	2,40	<0,0001*
Resíduo	30385,0	51	595,78			
F.A.	4310,6	9	478,96	0,77	2,07	0,6430
Erro Puro	26074,4	42	620,82			
Total SQ	79828,3	56				
Modelo de regressão						
$\varepsilon (\%) = - 178,22* + 3,89 X* + 9,86 Y* - 0,17 XY - 1,93 \cdot 10^{-2} X^{2*} + 8,30 \cdot 10^{-4} X^2Y*$						
R ² = 0,6194		R ² _{máx} = 0,6734		R = 0,7870		

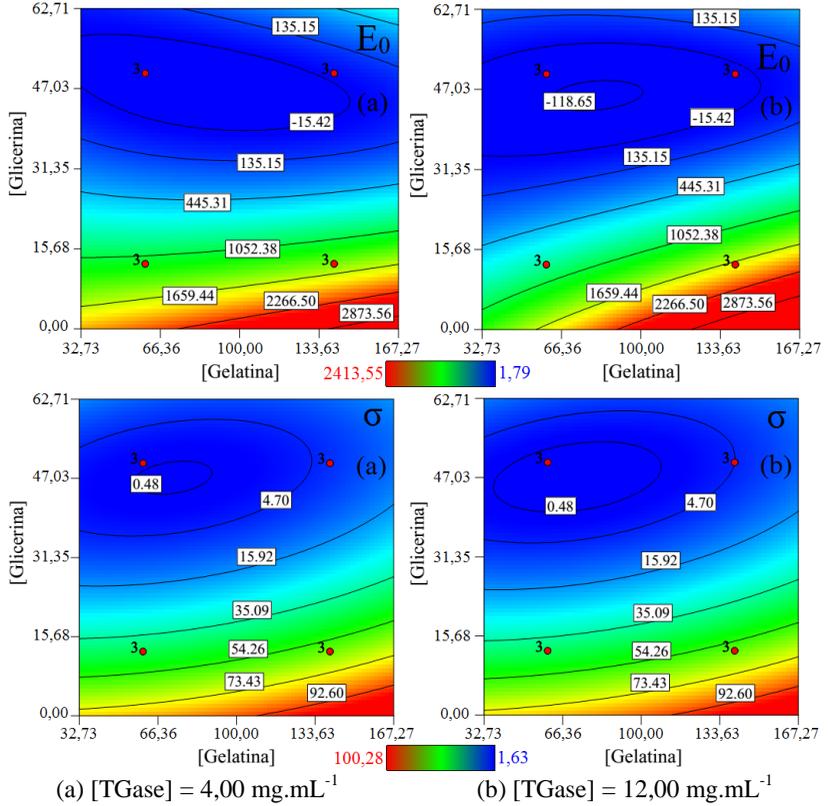
* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

Entretanto, o modelo de regressão (cúbico reduzido) que expressa o alongamento máximo na ruptura – ε (Tabela 13), apresentou baixo R² (0,6194) e um valor de R moderado (0,7870), sem falta de ajuste. Tal resultado pode ser decorrente do fato de que o equipamento não detectou alongamentos superiores a 100 %. Isso afetou diretamente a capacidade de predição do modelo de regressão, pois as amostras 3, 7, 12, C e H, (Apêndice A) não romperam no ponto de maior alongamento detectado (100%).

Os gráficos de curvas de nível para o módulo de Young e tensão máxima (Figura 14) denotam comportamentos similares entre si, o que já é de se esperar visto a relação de proporcionalidade dada pela equação (3) do módulo de Young, a qual é obtida em regiões de baixa deformação (CANEVAROLO, 2006).

$$E_0 = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (3)$$

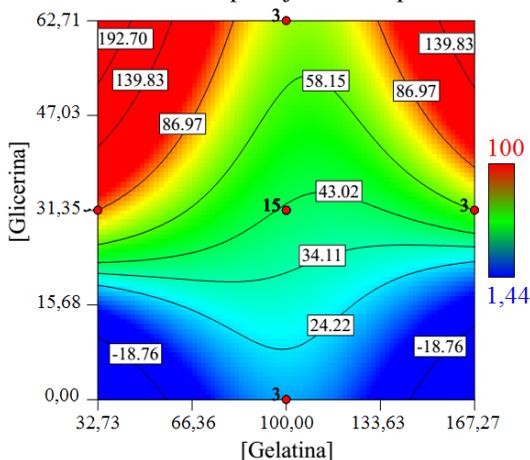
Figura 14 – Curvas de nível para o Módulo de Young (E_0) e Tensão máxima (σ) expressos em MPa, para as concentrações de 4,0 mg.mL⁻¹ (a) e 12,0 mg.mL⁻¹ (b) de TGase.



Observa-se pela inclinação das curvas (Figura 14) que o conteúdo de glicerina é o fator com maior influência sobre as propriedades de módulo de Young e tensão máxima. O aumento da concentração de glicerina reduz de maneira expressiva E_0 e σ , ao passo que o aumento da concentração de gelatina produz um pequeno acréscimo dessas propriedades. Observa-se ainda, que o aumento da concentração de TGase implica em pequenas alterações no comportamento das curvas de E_0 e σ , porém as regiões delimitadas são muito próximas entre si. Dessa forma, baixas concentrações de glicerina (0,00 a 12,71 mg.mL⁻¹) resultam em um material rígido, ou seja, alto módulo de Young e alta resistência a tração. Já para altas concentrações de glicerina (>12,71 mg.mL⁻¹) o filme começa a se tornar mais maleável e menos resistente a tração.

A curva de nível que caracteriza o alongamento máximo na ruptura está disposta na Figura 15.

Figura 15 – Curva de nível para o alongamento máximo na ruptura (ϵ em %) dos filmes obtidos no planejamento experimental.

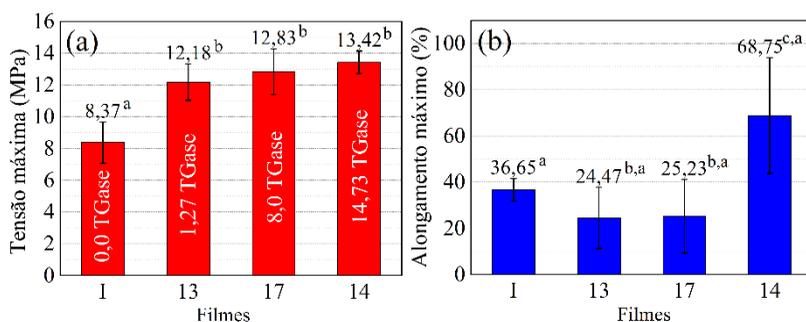


A curva de nível expressa na Figura 15 denota a influência das concentrações de gelatina e glicerina sobre o alongamento, sendo que a concentração de TGase não se demonstrou significativa na variação dessa propriedade. Percebe-se que as regiões de maior alongamento (zona vermelha do gráfico) são àquelas com alta concentração de plastificante (> 31,35 mg.mL⁻¹) e nas concentrações de gelatina menores que 60,00 mg.mL⁻¹ e maiores que 140,00 mg.mL⁻¹. Já as regiões de menor alongamento (zona azul do gráfico) que caracteriza materiais de caráter

quebradiço, são aquelas de baixa concentração de plastificante ($< 12,71 \text{ mg.mL}^{-1}$) e nas concentrações de gelatina menores que $60,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ e maiores que $140,00 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Conduzindo uma análise sobre os dados do planejamento experimental para a tensão máxima e o alongamento máximo na ruptura em comparação com os resultados obtidos para os filmes de referência (sem tratamento enzimático), observou-se um comportamento atípico para os filmes I, 13, 17 e 14, todos com as mesmas concentrações de gelatina (100 mg.mL^{-1}) e glicerina ($31,36 \text{ mg.mL}^{-1}$), e diferentes concentrações de TGase, $0,00 \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,27 \text{ mg.mL}^{-1}$, $8,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $14,73 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Como mostra a Figura 16, tem-se um aumento da resistência a tração (tensão máxima) acompanhada por um aumento do alongamento máximo na ruptura, sendo que, geralmente, quando há um aumento na propriedade de alongamento há a redução da tensão dos filmes poliméricos. O efeito observado pode estar associado com o incremento da concentração de TGase dos filmes avaliados, o qual foi similar ao comportamento demonstrado por Chambi e Grosso (2006), Tang e Jiang (2007), Wang et al. (2015) e Weng e Zheng (2015).

Figura 16 – Teste de Tukey para Tensão máxima (a) e Alongamento máximo na ruptura (b) de filmes com $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de gelatina e $31,36 \text{ mg.mL}^{-1}$ de glicerina.



Valores com os mesmos sobrescritos não apresentam diferença significativa a $p < 0,05$.

Chambi e Grosso (2006) observaram que o tratamento enzimático conferiu um ganho no alongamento de aproximadamente 5 % em relação ao filme não tratado. Os autores ainda relatam um ganho pouco expressivo na tensão máxima de ruptura, de 35 MPa para 37 MPa, o qual remete a um conflito nos resultados, pois geralmente um ganho de tensão é seguido por diminuição do alongamento. Contudo, pesquisa

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

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

4.2.5 Ângulo de contato

A análise de variância do modelo de regressão obtido para o ângulo de contato está disposta na Tabela 14.

Tabela 14 – Análise de variância para os dados de ângulo de contato dos filmes do planejamento experimental.

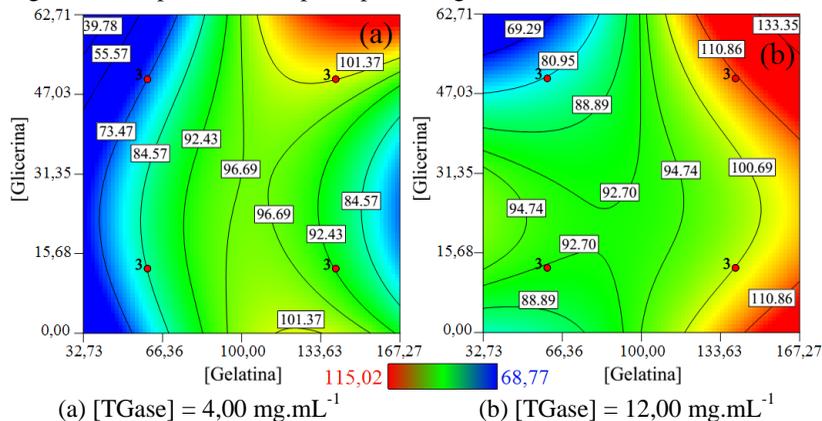
FV	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	P
Modelo	3643,40	9	404,82	8,52	2,09	<0,0001*
Resíduo	2234,48	47	47,54			
F.A.	588,80	5	117,76	3,01	2,41	0,0208*
Erro Puro	1645,68	42	39,18			
Total SQ	5877,88	56				
Modelo de regressão						
$\hat{\text{Ângulo de Contato}} = -20,69^* + 2,15 X + 1,88 Y + 8,73 Z - 1,98 \cdot 10^{-2} XY^* - 0,18 XZ - 9,41 \cdot 10^{-3} X^2 - 4,13 \cdot 10^{-2} Y^2 + 9,34 \cdot 10^{-4} X^2Z^* + 4,24 \cdot 10^{-4} XY^2^*$						
R ² = 0,6198		R ² _{máx} = 0,7200		R = 0,7873		

* significativo no intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05).

Embora o modelo obtido tenha sido significativo ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), ainda assim foi pouco expressivo, pois de uma máxima variação explicada ($R^2_{\text{máx}}$) de 0,72, o mesmo atinge uma variação explicada (R^2) de 0,6198. O baixo coeficiente de determinação pode ser decorrente de erro experimental, visto que a análise não é automatizada, ficando sujeita a erro operacional. E ainda vale ressaltar que a técnica não é sensível

as irregularidades apresentadas pela superfície dos filmes, isto é, o ângulo de contato tende a sofrer o efeito de histerese devido a rugosidade e heterogeneidade química na superfície (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997).

Figura 17 – Superfície de resposta para o ângulo de contato.



A Figura 17 (a) e (b) mostram que o aumento da concentração de TGase promove um deslocamento da região de menor ângulo de contato (área azul do gráfico). Verifica-se que regiões de alta concentração de plastificante e baixa concentração de gelatina tendem a diminuir o ângulo de contato para valores inferiores a 90°, caracterizando uma superfície com comportamento hidrofílico, em concordância com a natureza higroscópica da glicerina. Nos gráficos (a) e (b) vê-se a influência do reticulante, o qual em maior concentração tende a aumentar o caráter hidrofóbico do material. Tang e Jiang (2007) também observaram que o tratamento enzimático em filme de gelatina incorre num pequeno aumento do ângulo de contato, porém no estudo os autores não obtiveram nenhuma diferença estatisticamente significativa em tal propriedade.

Em suma o aumento da concentração de gelatina foi o fator mais influente no acréscimo do ângulo de contato, sendo que pode-se interpretar que grupos hidrofóbicos da cadeia de gelatina tendem a se concentrar na superfície do filme. Trabalho desenvolvido por Cristiano (2009) mostrou que o ângulo de contato de filmes de gelatina reticulados com EDC ficaram em torno de $94,7 \pm 4,5^\circ$, valor que está em conformidade com os encontrados no presente estudo.

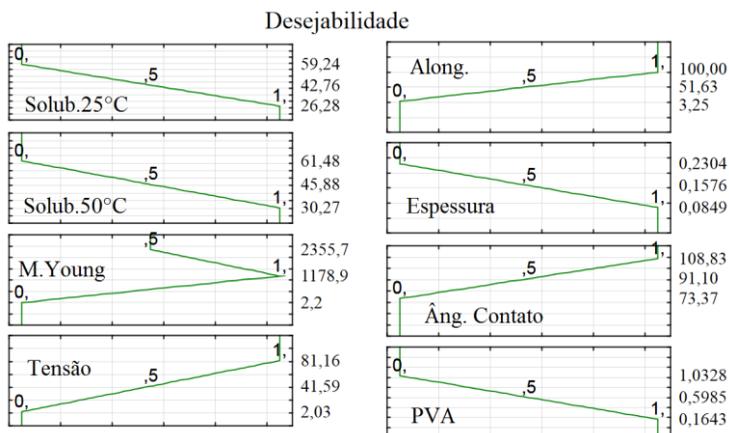
4.3 OTIMIZAÇÃO POR DESEJABILIDADE

A partir do planejamento realizado foi possível utilizar a ferramenta de otimização pela função desejabilidade, tomando como referência algumas características alvo para o filme biopolimérico. São elas:

- Baixa interatividade com água, ou seja, diminuição da solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, além do aumento do ângulo de contato.
- O módulo de Young em valores intermediários a fim de evitar filmes de rigidez muito elevada. Valores elevados para tensão máxima e alongamento máximo de ruptura com o objetivo de obter filmes com boa maleabilidade e resistência mecânica.
- Menor espessura visando redução de custos com a matéria-prima para elaboração do filme.

Considerando as características descritas, a Figura 18 mostra as restrições para função desejabilidade impostas para as repostas avaliadas no planejamento experimental. Os valores do eixo vertical exibidos na lateral esquerda, correspondem ao valor mínimo, médio e máximo observado experimentalmente nas repostas avaliadas. E a linha verde do gráfico consiste na restrição imposta a função para cada resposta, no qual 0 é o valor indesejável e 1 o máximo desejável para otimização.

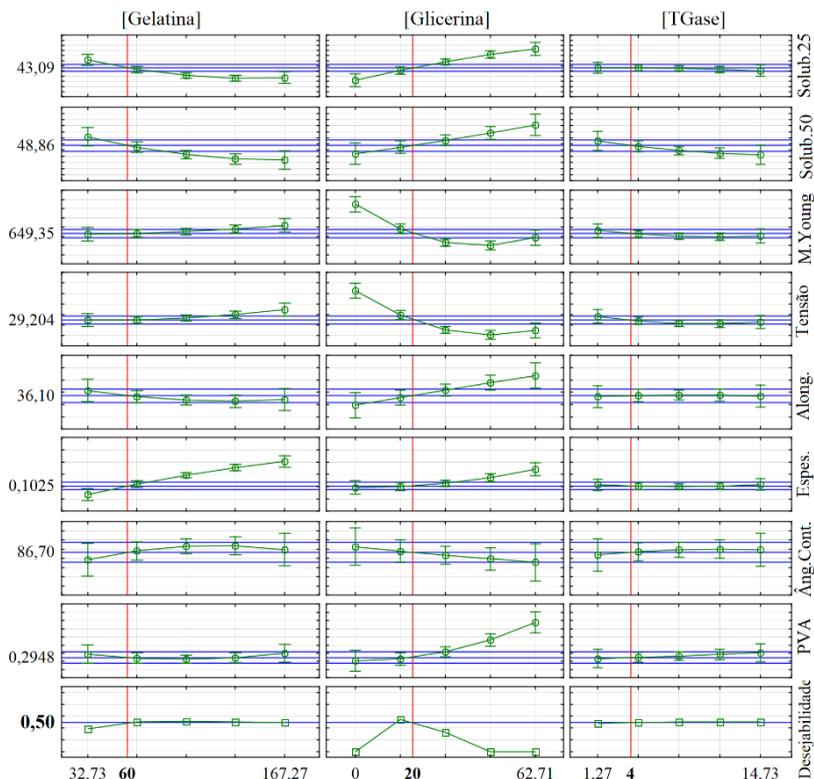
Figura 18 – Restrições impostas as repostas avaliadas no planejamento experimental para otimização através da função desejabilidade.



Portanto, após delimitadas as restrições da função desejabilidade, realizou-se a otimização do problema com base nas médias das respostas, pois os dados não são homogêneos, ou seja, nem todas as análises contam com o mesmo número de repetições. Como pode-se observar pela Figura 19, a desejabilidade atingiu um máximo de 0,50, o qual considerando as restrições impostas é um valor considerável. Porque como visto no tópico de propriedades mecânicas, altas tensões tendem a baixo alongamento, e estipulou-se na otimização que os dois valores fossem os maiores possíveis. Dessa forma, foram determinadas as concentrações que compõem o filme otimizado:

- [Gelatina] = 60,00 mg.mL⁻¹.
- [Glicerina] = 20,00 mg.mL⁻¹.
- [TGase] = 4,00 mg.mL⁻¹.

Figura 19 – Gráficos de otimização do planejamento pela função desejabilidade.



Tomando como base as propriedades otimizadas, realizaram-se os respectivos ensaios com o filme obtido, o qual teve algumas propriedades equiparadas entre o filme produzido e as respostas previstas pela função desejabilidade (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação entre as propriedades do filme produzido experimentalmente e os dados previstos pela função desejabilidade.

Propriedades	Controle	Otimizado	Desejabilidade	Desvio %
Espessura (mm)	0,090 ± 0,0113	0,086 ± 0,0074	0,1025	16,09
Solub.25°C (%)	42,30 ± 0,64	39,18 ± 0,69	43,09	9,07
Solub.50°C (%)	100,00 ± 0,00	40,70 ± 0,78	48,86	16,70
PVA (g.mm/m ² .h.kPa)	0,4311	0,3706	0,2948	-25,71
E ₀ (MPa)	1077,21 ± 202,92	929,02 ± 189,77	649,35	-43,07
σ (MPa)	49,17 ± 8,53	41,14 ± 7,80	29,20	-40,90
ε (%)	11,69 ± 3,82	14,71 ± 0,75	36,10	59,25
Âng. Contato (°)	93,40 ± 2,47	96,19 ± 4,88	86,70	-10,94

Observa-se que o desvio entre os valores preditos pela função desejabilidade e o filme produzido nas condições ótimas (Tabela 15) foi expressivo para as propriedades mecânicas e permeabilidade. Tal fato pode ser decorrente de ter sido utilizado apenas as médias dos resultados para realização da otimização por desejabilidade, pois nem todas as caracterizações feitas contam com o mesmo número de repetições. Logo, a carência das repetições, possivelmente afetou o poder de predição dessas propriedades pela função de otimização aplicada.

Apesar da defasagem de alongamento e os altos valores de E₀ e σ apresentados pelo filme otimizado, tem-se que algumas dessas propriedades podem ser igualadas a um filme sintético comumente aplicado, o polietileno de alta densidade (PEAD), como mostrado na Tabela 16, a seguir. Isso é um forte indício da possibilidade de obtenção de um filme totalmente biodegradável de fonte de matéria-prima renovável, com propriedades equivalentes às aquelas observadas em polímeros provenientes de fontes não renováveis.

Tabela 16 – Propriedades equiparadas do filme otimizado e comercial de PE-AD.

Propriedade	PEAD*	Otimizado
E_0 (MPa)	900 – 1200	929,02 ± 189,77
σ (MPa)	25 – 45	41,14 ± 7,80
ε (%)	50 – 900	14,71 ± 0,75
Ângulo de Contato (°)	105,1	96,19 ± 4,88

* (COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003).

4.3.1 Tratamento com Ultravioleta

A fim de aprimorar o efeito de reticulação conferido pelo tratamento enzimático com TGase, realizou-se reticulação adicional a partir da exposição ao UVC de filmes com composição otimizada pela função desejabilidade. Os resultados apresentados nas Tabela 17 correspondem ao comparativo entre o filme controle (não reticulado) e os filmes tratados com UV.

Tabela 17 – Teste de Tukey entre as propriedades analisadas do filme controle e os filmes tratados com ultravioleta.

Propriedades	Controle	UV-3h	UV-8h
Espessura (mm)	0,090 ^a ± 0,0113	0,079 ^a ± 0,0212	0,086 ^a ± 0,0155
Solub.25°C (%)	42,30 ^a ± 0,64	46,67 ^b ± 1,40	37,63 ^c ± 1,18
Solub.50°C (%)	100,00 ^a ± 0,00	100,00 ^a ± 0,00	36,28 ^b ± 1,81
PVA (g.mm/m ² .h.kPa)	0,4311	0,3655	0,3586
E_0 (MPa)	1077,21 ^a ± 202,92	1118,87 ^a ± 103,07	572,21 ^b ± 134,45
σ (MPa)	49,17 ^a ± 8,53	44,98 ^a ± 2,35	29,04 ^b ± 4,27
ε (%)	11,69 ^a ± 3,82	9,39 ^a ± 2,36	7,08 ^a ± 2,93
Âng. Contato (°)	93,40 ^a ± 2,47	96,17 ^a ± 5,13	52,53 ^b ± 4,20

Valores da linha com os mesmos sobrescritos não apresentam diferença significativa a $p < 0,05$.

Observa-se que o tratamento UV por 8 h afetou consideravelmente as propriedades mecânicas e de interação com água do filme. Visto que, a solubilidade foi reduzida significativamente nas duas faixas de temperatura para a amostra UV-8h. A permeabilidade também foi reduzida, assim como o ângulo de contato, o que indica que o efeito de reti-

culação da exposição UV por 8 h acarretou na inserção de grupos hidrofílicos sobre a superfície do material. De uma forma geral, as propriedades mecânicas foram reduzidas, demonstrando que o tratamento UV prolongado implica na degradação da estrutura de aminoácidos da gelatina.

A Tabela 18 apresenta a comparação entre o filme controle e os filmes que foram tratados com a TGase e radiação ultravioleta.

Tabela 18 – Teste de Tukey entre as propriedades analisadas do filme controle e os filmes tratados com TGase e ultravioleta.

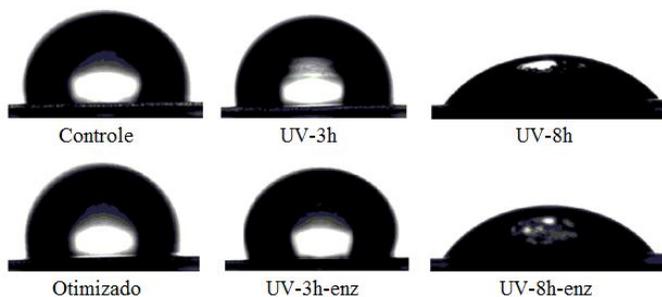
Propriedades	Controle	UV-3h-enz	UV-8h-enz
Espessura (mm)	0,090 ^a ± 0,0113	0,102 ^a ± 0,0112	0,102 ^a ± 0,0181
Solub.25°C (%)	42,30 ^a ± 0,64	40,17 ^b ± 0,41	40,82 ^b ± 0,52
Solub.50°C (%)	100,00 ^a ± 0,00	40,70 ^b ± 0,41	41,72 ^c ± 1,84
PVA (g.mm/m ² .h.kPa)	0,4311	0,3705	0,4022
E ₀ (MPa)	1077,21 ^a ± 202,92	905,58 ^a ± 347,69	545,15 ^a ± 39,66
σ (MPa)	49,17 ^a ± 8,53	35,68 ^{b,a} ± 11,64	26,64 ^{c,b} ± 0,82
ε (%)	11,69 ^a ± 3,82	6,40 ^a ± 1,39	8,45 ^a ± 3,78
Âng. Contato (°)	93,40 ^a ± 2,47	100,40 ^a ± 7,64	53,93 ^b ± 3,00

Valores da linha com os mesmos sobrescritos não apresentam diferença significativa a $p < 0,05$.

As diferenças observadas na Tabela 18 expressam, basicamente, a mesma interpretação que as constatadas para a Tabela 17. No qual a amostra que sofreu maior exposição UV (UV-8h-enz) teve a tensão máxima e ângulo de contato reduzidas de maneira significativa. A amostra UV-3h-enz exibiu valores próximos dos vistos no filme controle para a maioria das propriedades, apresentando apenas reduções significativas na solubilidade a 25 e 50 °C devido ao tratamento enzimático, pois a amostra UV-3h (Tabela 17) foi 100 % solubilizada a 50 °C.

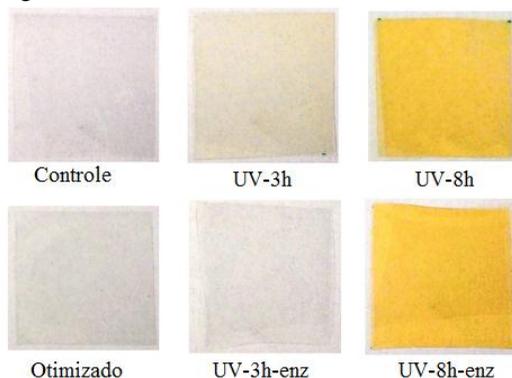
A Figura 20 ilustra a redução observada no ângulo de contato das amostras que foram tratadas com radiação UV por 8 h. Isso é reflexo do acréscimo de grupos hidrofílicos na superfície do material, que por sua vez promovem o aumento da energia superficial livre, tornando o material mais interativo com a água (TAUBERT; MANO; RODRIGUEZ-CABELLO, 2013).

Figura 20 – Imagens do ensaio de ângulo de contato.



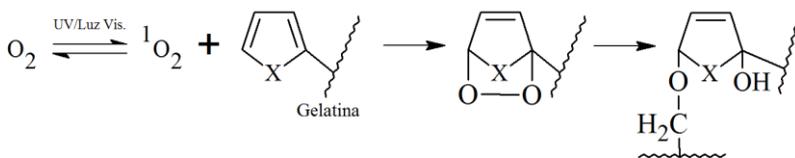
Além da alteração observada no ângulo de contato, os filmes expostos 8 h à radiação ultravioleta tiveram sua coloração intensificada e escurecida, conforme ilustrado na Figura 21, sendo isso efeito do processo de foto-oxidação sobre o filme.

Figura 21 – Amostras de 2x2 cm dos filmes otimizado e tratados com UV.



Son et al. (2010) demonstraram que o mecanismo envolvido no processo de foto-oxidação da gelatina (Figura 22) consiste na fotossensibilização da molécula de oxigênio (O_2) para o oxigênio singlete (1O_2), sendo esse último um estado mais reativo da molécula responsável pela reticulação da estrutura da gelatina.

Figura 22 – Mecanismo de reticulação da gelatina por foto-oxidação.

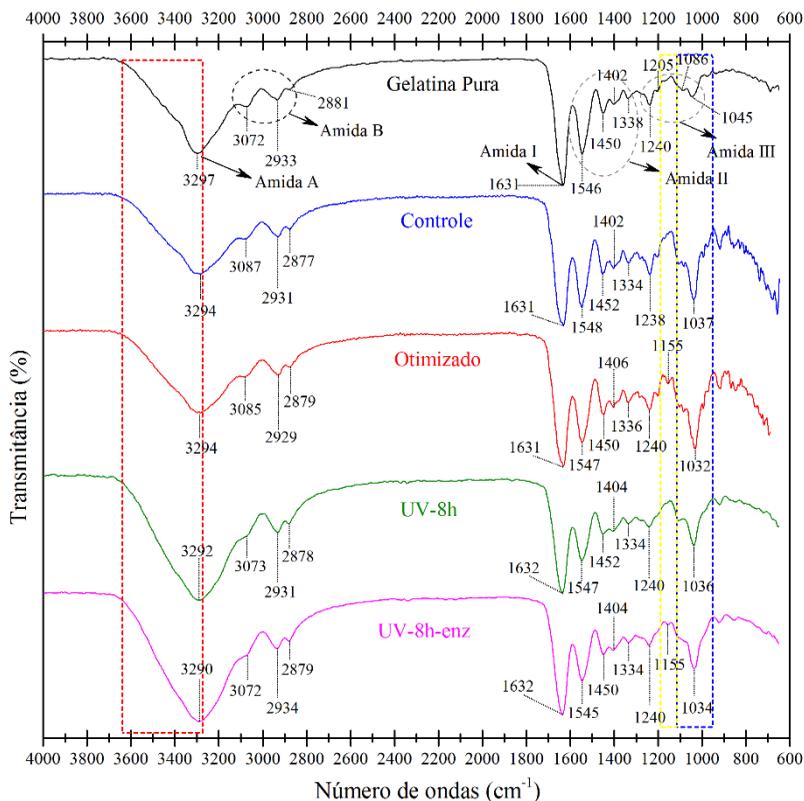


Fonte: adaptado de Son et al. (2010).

4.3.2 FTIR – ATR

O espectro obtido para gelatina pura (Figura 23) mostra os picos de amida característicos desse material, que também foram pronunciados nas demais amostras analisadas.

Figura 23 – Espectros de FTIR-ATR do filme de gelatina pura, filmes obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.



A descrição dos grupos funcionais referentes aos picos de amida evidenciados na Figura 23 estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19 – Grupos funcionais referentes a estrutura da gelatina.

Amida	Grupo Funcional	Número de onda (cm^{-1})
A	NH	3300
	OH	
B	NH	3078
	CH ₂	2944
I	C=O	1630
	NH	
II	NH	1541
	C-N	
	C-C	
	CH ₂	1450
III	COO	1334
	COO	1410
	CN	1240
III	NH	1086
	CO	1045

Fonte: Hoque et al. (2011) e Staroszczyk et al. (2012).

Observa-se pelos espectros que as amostras analisadas apresentam as bandas características das amidas definidas para gelatina, porém é perceptível que algumas bandas foram alteradas, tanto pela incorporação do plastificante quanto pelos tratamentos com TGase e UV.

Na região do gráfico (Figura 23) demarcada em vermelho, nota-se a presença de um “ombro” delineado no espectro do filme de gelatina pura na região de 3350 e 3400 cm^{-1} , que nos demais filmes são encobertos, fato atribuído, principalmente, aos grupos OH da glicerina que se expressam nessa região do espectro. Contudo, nos filmes que foram expostos ao tratamento UV esse efeito é mais pronunciado, visto que tiveram essa banda mais intensificada, e o pico expresso na gelatina pura em 3072 cm^{-1} também foi relativamente encoberto. Isso pode ser relacionado ao acréscimo de grupos OH oriundos do processo de fotooxidação mencionado no tópico anterior.

O pico situado na região delimitada em azul apresenta um deslocamento de 1045 cm^{-1} no filme de gelatina pura para valores em torno de 1035 cm^{-1} nos filmes que contém glicerina na composição. De acordo

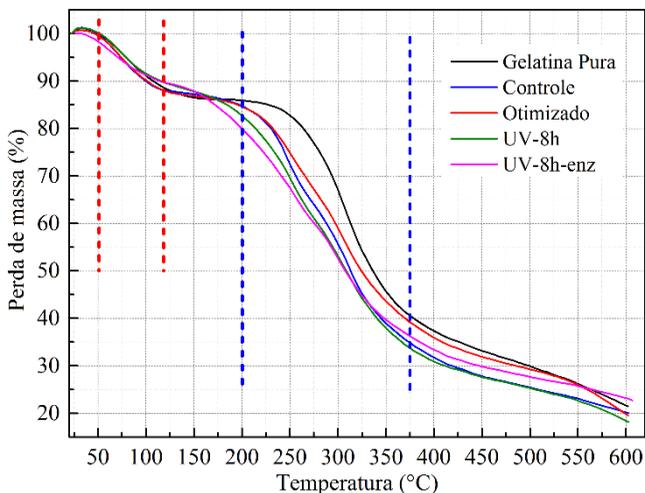
com Bergo e Sobral (2007) esse deslocamento está associado diretamente com a presença do plastificante, sendo que os autores ainda ressaltam uma possível interação da glicerina com a estrutura do filme.

As amostras tratadas enzimaticamente (Otimizado e UV-8h-enz) exibiram um pico de baixa intensidade em 1155 cm^{-1} no espectro (região delimitada em amarelo), que não se pronunciou nas outras amostras analisadas. Segundo Silverstein e Webster (1998) esse sinal está compreendido na faixa das ligações C-N de amins alifáticas (1300 a 800 cm^{-1}), podendo ser decorrente da formação de ligações cruzadas advindas do efeito da TGase sobre os resíduos de glutamina, lisina e amins primárias.

4.3.3 Propriedades térmicas

A análise termogravimétrica (Figura 24) revela os estágios de degradação característicos dos filmes estudados, conferindo também uma ideia da estabilidade térmica do material.

Figura 24 – Análise termogravimétrica dos filmes de gelatina pura e obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.

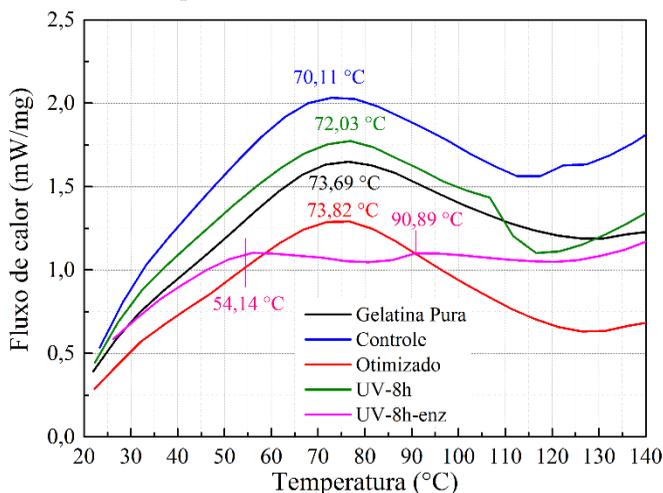


Todas as amostras perderam cerca de 13 % de massa no intervalo de temperatura entre $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse estágio está relacionado com a perda de água livre adsorvida nos filmes ou umidade residual (NAGARAJAN et al., 2013). Para o filme de gelatina pura tem-se um

segundo estágio de perda de massa iniciado em 230 °C e mudando de comportamento em 350 °C (ponto de inflexão) a partir do qual a degradação se torna mais lenta. De acordo com Barreto et al. (2003), o segundo estágio de perda de massa está associado com a degradação da proteína, a qual corresponde a uma redução aproximada de 45 %. Nos filmes com glicerina na composição, observou-se uma redução da temperatura de degradação para valores em torno de 200 °C, caracterizando uma diminuição da estabilidade térmica devido à presença de plastificante. Ao final do aquecimento a 600 °C, todas as amostras exibiram massa residual de cerca de 20 %.

A estabilidade térmica dos filmes produzidos também está discriminada na Figura 25, a partir da qual é possível notar algumas alterações conferidas pelo tratamento enzimático e UV.

Figura 25 – Análise de DSC dos filmes de gelatina pura e obtidos na otimização e tratamento UV por 8 h.



Verifica-se que os filmes com plastificantes apresentam picos endotérmicos em temperaturas inferiores a apresentada pelo filme de gelatina pura. Quando comparadas as temperaturas para o filme controle e otimizado, percebe-se um ganho de quase 4 °C, inferindo num aumento da estabilidade térmica devido ao tratamento enzimático. Wang et al. (2015) relataram que o aumento da concentração de TGase promoveu um deslocamento positivo de 5,18 °C do pico endotérmico, variando de

69,79 °C (não tratado) para 74,97 °C (8 U.g⁻¹), sendo valores próximos aos encontrados no presente estudo.

A diferença entre a intensidade dos picos, no qual os filmes tratados apresentam picos menores que os filmes não tratados, é justificada pelo fato de que os filmes reticulados apresentam uma redução na densidade de ligações de hidrogênio na sua estrutura, sendo que essas se quebram endotermicamente (BIGI et al., 2002; BIGI et al., 2001; BIGI; PANZAVOLTA; RUBINI, 2004).

Apenas a curva que descreve o filme UV-8h-enz exibiu um comportamento atípico do esperado, no qual delinear-se dois picos pouco expressivos a 54,14 °C e 90,89 °C, sendo geralmente associado a uma separação de fase de blendas poliméricas ou de polímero e plastificante (ARVANITOYANNIS et al., 1997). E esse comportamento pode caracterizar também, o efeito degradativo que a exposição prolongada a radiação UV teve sobre a estrutura biopolimérica da gelatina.

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

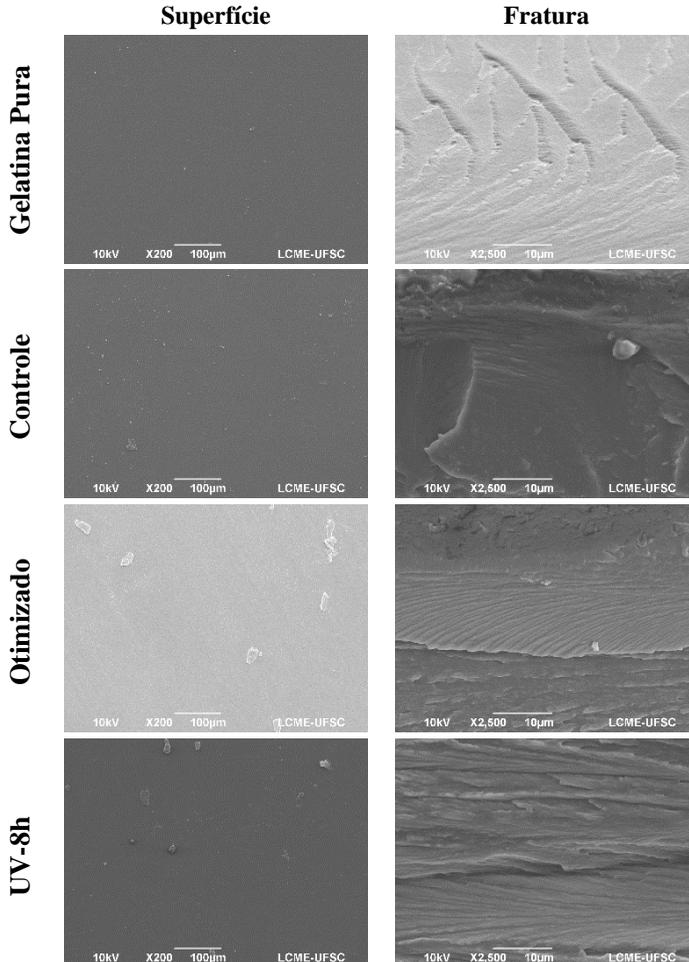
De forma geral a superfície da maioria dos filmes exibiu um aspecto liso, compacto, com ausência de poros, para os quais não foram observadas alterações às quais possam ser atribuídas a presença de plastificante (

Figura 26 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Pequenos grânulos podem ser vistos na superfície, especialmente nos filmes tratados com TGase e UV, o que pode ser decorrente de pontos de reticulação da gelatina (WANG, Y. et al., 2015; WENG; ZHENG, 2015). Verificou-se no filme UV-8h-enz zonas de fragilidade com fissuras aparentes (Figura 27), fato que explica a diminuição da tensão de ruptura demonstrada em tópico anterior.

A região de fratura do filme de gelatina pura e controle apresentaram menos rugosidades que as demais amostras. Os filmes reticulados mostram estruturas fibrilares, o que possivelmente constitui zonas de ligação, com aparente decréscimo do volume livre (DE CARVALHO; GROSSO, 2004). Na região de fratura do filme UV-8h-enz também nota-se uma zona de fragilidade caracterizada por uma fissura (Figura 27). Portanto, o tratamento enzimático aliado à exposição UV por 8 h aparenta ter provocado zonas fibrilares frágeis devido à reticulação conjunta provida pelas duas técnicas. Fato que justifica o comportamento observado na análise de DSC descrita anteriormente, no qual a curva da

amostra UV-8h-enz demonstrou a tendência degradativa do tratamento, assim como a redução ocorrida nas propriedades mecânicas avaliadas.

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes produzidos.



UV-8h-enz

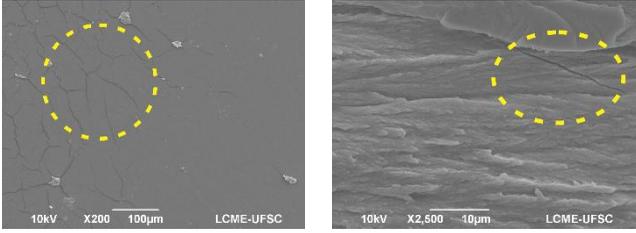
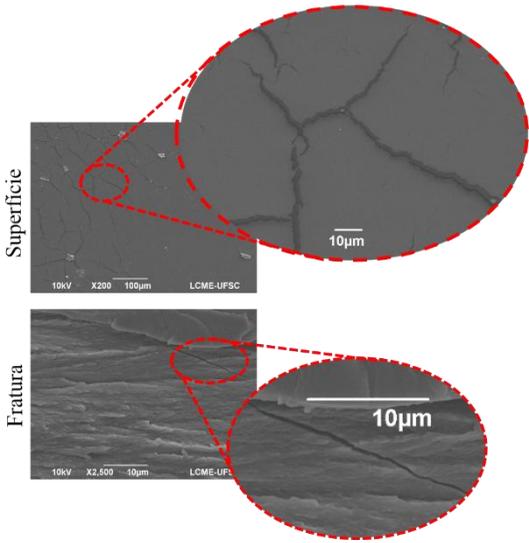


Figura 27 – Fissuras apresentadas na análise de MEV da amostra UV-8h-enz.



5 CONCLUSÃO

A avaliação da cinética da reação de reticulação acompanhada pela viscosidade mostrou que a transglutaminase tem efeito reticulante sobre a estrutura da gelatina, no qual o aumento de viscosidade foi um indicativo da aplicabilidade da enzima com intuito de estabilizar o filme proteico.

A análise estatística realizada a partir do planejamento experimental mostrou que houve pouca diferença na variação das propriedades estudadas devido às diferentes concentrações de enzima. Contudo, quando expandida a análise para comparação dos filmes tratados e não tratados com enzima, o tratamento com transglutaminase mostrou ter impacto significativo na estabilização térmica e na melhora das propriedades mecânicas de filmes de gelatina.

O uso da técnica estatística de otimização pela função desejabilidade encontrou-se uma formulação filmogênica com algumas propriedades similares às encontradas em filmes de polietileno. Sugere-se, assim, a possibilidade de obtenção de um material de caráter biodegradável de fontes naturais com propriedades próximas às observadas em materiais sintéticos não biodegradáveis.

A exposição à radiação ultravioleta por período de 3 h não apresentou diferenças expressivas nas propriedades analisadas. Exposição prolongada (8 h) ao UV, no entanto, diminuiu significativamente a solubilidade, porém mostrou ação degradativa sobre a estrutura do filme quando aplicada isoladamente ou quando combinada com reticulação com a transglutaminase.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram o potencial de aplicação e produção de filmes de gelatina como substitutos a materiais com caráter não biodegradável. Entretanto, ainda há a necessidade de aprimoramento da composição filmogênica, com o intuito de aprimorar as propriedades de mecânicas e redução adicional da solubilidade e da permeabilidade ao vapor de água para uma efetiva utilização substitutiva de materiais poliméricos não biodegradáveis.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar diferentes tempos de exposição UV.
- Utilizar UV sobre a solução na presença de fotossensibilizadores.
- Aplicar diferentes plastificantes.
- Avaliar o efeito da espessura nas propriedades dos filmes.
- Estudar gelatinas de diferentes fontes e blooms.

REFERÊNCIAS

AMIN, S.; USTUNOL, Z. Solubility and mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with that of collagen and natural casings. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 149-153, 2007.

ARVANITOYANNIS, I. et al. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 593-604, 1997.

ASTM-D882-12. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. ASTM International, 2012.

ASTM-E96-95. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. ASTM International, 1995.

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

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Rapra Technology, 2005. ISBN 9781859573891.

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

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1285-1289, 2007.

BHAT, R.; KARIM, A. A. Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1160-1164, 2009.

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

BIGI, A. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4827-4832, 2002.

BIGI, A. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763-768, 2001.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, 2004.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

BOANINI, E. et al. Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 383-388, 2010.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 152, n. 1, p. 17-26, 1997.

CALADO, V.; MONTGOMERY, V. C. D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. E-PAPERS, 2003.

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

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

CHAMBI, H.; GROSSO, C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 458-466, 2006.

CHAPLIN, M. Water structure and science. **Gelatin**, Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/gelatin.html>>, 2014. Acesso em: 12/12/2014.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, n. 0, p. 193-204, 2014.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARIA, L. C. D. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros**, v. 13, p. 01-13, 2003.

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

CUI, L. et al. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3794-3800, 2008.

CUQ, B. et al. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

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

DO A. SOBRAL, P. J.; DOS SANTOS, J. S.; GARCÍA, F. T. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 1, p. 93-100, 2005.

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

FAKHOURY, F. M. et al. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 149-154, 2012.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry, Third Edition, Revised and Expanded**. Taylor & Francis, 1997. ISBN 9781420001297.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 82-90, 2011.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatine. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**: Springer Netherlands, 1990. cap. 7, p.233-289. (Elsevier Applied Food Science Series). ISBN 978-94-010-6825-3.

KALIA, S.; AVÉROUS, L. **Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications**. Wiley, 2011.

KOŁODZIEJSKA, I. et al. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin–chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 404-409, 2006.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimento e Nutrição Araraquara**, v. 16, 2005.

MARIOD, A. A.; FADUL, H. Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment**, v. 12, n. 2, p. 135-147, 2013.

MASUTANI, E. M. et al. Increasing Thermal Stability of Gelatin by UV-Induced Cross-Linking with Glucose. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 9, 2014.

MATSUDA, S. et al. Evaluation of the antiadhesion potential of UV cross-linked gelatin films in a rat abdominal model. **Biomaterials**, v. 23, n. 14, p. 2901-2908, 2002.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

NAGARAJAN, M. et al. Film forming ability of gelatins from splendid squid (*Loligo formosana*) skin bleached with hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1101-1108, 2013.

NONAKA, M. et al. Polymerization of Several Proteins by Ca²⁺-Independent Transglutaminase Derived from Microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

NUR HANANI, Z. A.; ROOS, Y. H.; KERRY, J. P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 0, 2014.

NUSSINOVITCH, A. CHAPTER 10 - Biopolymer Films and Composite Coatings. In: STEFAN, K.; IAN, T. N., *et al* (Ed.). **Modern Biopolymer Science**. San Diego: Academic Press, 2009. p.295-326.

ORBAN, J. M. et al. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 68A, n. 4, p. 756-762, 2004.

OTONI, C. G. et al. Ultraviolet-B radiation induced cross-linking improves physical properties of cold- and warm-water fish gelatin gels and films. **J Food Sci**, v. 77, n. 9, p. E215-23, 2012.

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

PORTO, L. C. **Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante, e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água** 2007. 95 f (Mestrado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PROCKOP, D. J. Collagens. In: LANE, W. J. L. D. (Ed.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Waltham: Academic Press, 2013. p.545-549. ISBN 978-0-12-378631-9.

- RUSLING, J. F. **Biomolecular Films: Design, Function, and Applications**. Taylor & Francis, 2003. ISBN 9780824747664.
- SALDIVAR-GUERRA, E.; VIVALDO-LIMA, E. **Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing**. Wiley, 2013.
- SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**. John Wiley & Sons, 2007.
- SIEPMANN, J.; PAERATAKUL, O.; BODMEIER, R. Modeling plasticizer uptake in aqueous polymer dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 165, n. 2, p. 191-200, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. Wiley, 1998. ISBN 9780471134572.
- SOBRAL, P. J. D. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1251-1259, 2000.
- SON, T. I. et al. Visible light-induced crosslinkable gelatin. **Acta Biomater**, v. 6, n. 10, p. 4005-10, 2010.
- STAROSZCZYK, H. et al. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 335-343, 2012.
- TANG, C.-H.; JIANG, Y. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. **Food Research International**, v. 40, n. 4, p. 504-509, 2007.
- TANG, C.-H. et al. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 3, p. 296-307, 2005.
- TAUBERT, A.; MANO, J. F.; RODRIGUEZ-CABELLO, J. C. **Biomaterials Surface Science**. Wiley, 2013. ISBN 9783527330317.
- THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TOMIHATA, K. et al. Cross-Linking and Biodegradation of Native and Denatured Collagen. In: (Ed.). **Polymers of Biological and Biomedical Significance**: American Chemical Society, v.540, 1993. cap. 24, p.275-286. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-2732-2.

VANIN, F. M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 5, p. 899-907, 2005.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 367-370, 1997.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

WANG, L. Z. et al. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 9, p. 1128-1138, 2007.

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

WEADOCK, K.; OLSON, R. M.; SILVER, F. H. Evaluation of collagen crosslinking techniques. **Biomater Med Devices Artif Organs**, v. 11, n. 4, p. 293-318, 1983.

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

APÊNDICE A – Tabelas com repostas do planejamento experimental e filmes de referência

Ensaio	Espessura (mm)	Solubilidade 25°C - 24 h (%)	Solubilidade 50°C - 1 h (%)	Permeabilidade (g.mm/m ² .h.kPa)	Módulo de Young (MPa)	Tensão máxima (MPa)	Alongamento (%)	Ângulo de Contato (°)
1 ^(e1-e1)	0,100 ± 0,0103	38,63 ± 1,16	48,66 ± 2,51	0,21632	1205,11 ± 33,02	51,99 ± 1,53	9,57 ± 1,67	78,83 ± 2,77
2 ^(e1-e1)	0,179 ± 0,0402	33,56 ± 1,37	37,66 ± 7,07	0,23364	1520,25 ± 114,52	63,03 ± 6,37	5,39 ± 0,54	89,79 ± 9,68
3 ^(e1-e1)	0,131 ± 0,0086	59,24 ± 0,56	61,48 ± 3,79	0,71818	6,60 ± 3,10	2,03 ± 0,28	100,00 ± 0,00	73,37 ± 4,68
4 ^(e1-e1)	0,230 ± 0,0127	39,67 ± 0,46	45,36 ± 1,00	0,53850	87,75 ± 10,10	7,52 ± 0,13	53,29 ± 18,05	97,64 ± 14,61
5 ^(e1-e1)	0,098 ± 0,0131	37,40 ± 0,95	39,68 ± 3,82	0,16430	898,12 ± 326,64	39,27 ± 10,46	10,05 ± 8,03	91,01 ± 7,83
6 ^(e1-e1)	0,183 ± 0,0189	29,93 ± 1,24	31,50 ± 1,47	0,18928	1789,09 ± 36,43	64,68 ± 1,84	3,25 ± 0,14	95,82 ± 5,71
7 ^(e1-e1)	0,126 ± 0,0092	52,44 ± 1,26	53,45 ± 2,99	1,03277	2,17 ± 0,54	2,05 ± 0,62	100,00 ± 0,00	76,66 ± 3,22
8 ^(e1-e1)	0,229 ± 0,0186	39,54 ± 0,92	40,95 ± 0,12	0,47168	56,31 ± 33,92	7,65 ± 3,04	89,70 ± 17,83	108,83 ± 10,55
9 ^(e0-e0)	0,092 ± 0,0072	57,57 ± 0,56	54,85 ± 0,68	0,74066	2,39 ± 0,46	2,18 ± 0,38	96,24 ± 6,52	85,13 ± 8,37
10 ^(e0-e0)	0,202 ± 0,0238	34,85 ± 0,18	37,91 ± 1,71	0,34050	248,95 ± 48,43	20,84 ± 4,87	51,13 ± 3,98	95,67 ± 3,87
11 ^(e0-e0)	0,123 ± 0,0057	26,28 ± 0,12	30,27 ± 2,18	0,34118	2355,71 ± 75,67	81,16 ± 29,48	3,63 ± 2,01	102,50 ± 3,23
12 ^(e0-e0)	0,228 ± 0,0328	47,41 ± 1,29	54,16 ± 1,47	0,97597	16,01 ± 3,52	2,79 ± 0,42	100,00 ± 0,00	98,02 ± 3,92
13 ^(e0-e0)	0,168 ± 0,0342	37,08 ± 0,61	44,79 ± 11,59	0,37333	217,01 ± 64,58	12,18 ± 1,15	24,47 ± 13,24	99,94 ± 5,03
14 ^(e0-e0)	0,157 ± 0,0150	40,40 ± 0,93	41,94 ± 2,81	0,44564	122,14 ± 34,50	13,42 ± 0,71	68,75 ± 25,11	93,58 ± 4,76
15 ^(e0-e0)	0,155 ± 0,0179	39,21 ± 1,07	40,59 ± 1,53	0,34821	88,34 ± 21,18	6,94 ± 0,81	49,34 ± 18,51	91,67 ± 5,87
16 ^(e0-e0)	0,159 ± 0,0095	40,97 ± 0,17	47,56 ± 4,80	0,36570	112,59 ± 19,61	7,50 ± 1,36	32,01 ± 5,45	95,87 ± 2,85
17 ^(e0-e0)	0,154 ± 0,0166	38,03 ± 0,90	41,96 ± 2,93	0,34614	205,75 ± 61,37	12,83 ± 1,44	25,23 ± 15,93	96,58 ± 0,51
18 ^(e0-e0)	0,149 ± 0,0196	39,82 ± 1,01	39,30 ± 0,14	0,35461	134,52 ± 50,28	10,80 ± 1,68	44,08 ± 32,69	93,88 ± 1,99
19 ^(e0-e0)	0,164 ± 0,0088	41,40 ± 0,10	39,31 ± 0,19	0,28423	76,42 ± 40,14	8,37 ± 1,84	76,02 ± 25,97	99,37 ± 3,80

Referência	Espessura (mm)	Solubilidade 25 °C – 24 h (%)	Solubilidade 50 °C – 1 h (%)	Permeabilidade (g.mm/m ² .h.kPa)	Módulo de Young (MPa)	Tensão máxima (MPa)	Alongamento (%)	Ângulo de Contato (°)
A	0,091 ± 0,0056	35,96 ± 0,06	100,00 ± 0,00	0,29001	735,13 ± 307,82	34,89 ± 9,87	16,56 ± 14,21	101,20 ± 6,40
B	0,173 ± 0,0128	29,21 ± 0,42	100,00 ± 0,00	0,39403	1515,44 ± 124,74	70,37 ± 7,89	13,55 ± 4,04	101,74 ± 9,67
C	0,134 ± 0,0030	55,19 ± 1,91	100,00 ± 0,00	0,69801	11,13 ± 1,32	1,91 ± 0,15	100,00 ± 0,00	90,13 ± 6,82
D	0,224 ± 0,0051	44,76 ± 0,41	100,00 ± 0,00	1,08785	88,07 ± 4,44	8,05 ± 1,26	77,95 ± 16,78	92,18 ± 6,74
E	0,079 ± 0,0065	62,17 ± 1,52	100,00 ± 0,00	0,49517	7,99 ± 3,28	2,31 ± 0,32	91,44 ± 14,83	90,95 ± 2,33
F	0,206 ± 0,0102	35,21 ± 0,88	100,00 ± 0,00	0,53282	467,64 ± 41,22	24,89 ± 1,12	25,45 ± 11,67	96,73 ± 0,71
G	0,125 ± 0,0045	26,73 ± 1,27	100,00 ± 0,00	0,38896	2033,38 ± 171,69	88,95 ± 4,47	5,60 ± 0,52	92,57 ± 2,74
H	0,199 ± 0,0151	52,09 ± 0,42	100,00 ± 0,00	0,90004	10,48 ± 1,07	1,73 ± 0,11	100,00 ± 0,00	94,02 ± 2,49
I	0,146 ± 0,0114	41,22 ± 0,33	100,00 ± 0,00	0,53288	127,80 ± 25,36	8,37 ± 1,30	36,65 ± 4,89	93,12 ± 2,90