

UNISC - UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL
MESTRADO

Ângela Maria Dullius Diehl

OBTENÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES COM
SERRAGEM DE COURO AO CROMO DIGERIDA EM MEIO ÁCIDO

Santa Cruz do Sul, outubro de 2007.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ângela Maria Dullius Diehl

**OBTENÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE SERRAGEM DE
COURO AO CROMO DIGERIDA EM MEIO ÁCIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dra. Adriane Lawisch Rodriguez
Co-orientador: Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul, outubro de 2007.

Ângela Maria Dullius Diehl

**OBTENÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE SERRAGEM DE
COURO AO CROMO DIGERIDA EM MEIO ÁCIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dra. Adriane Lawisch Rodriguez
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC
Orientadora

Dr. Valeriano Antonio Corbellini
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC
Orientador

Dr. Diosnel Rodriguez Lopez
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC
Professor

Dra. Andréa Moura Bernardes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dedico com muito amor este trabalho inteiramente ao meu esposo Celso e aos meus queridos filhos Gabriel e Rafaela, que sempre foram extremamente carinhosos e pacientes, principalmente durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho muitas foram as pessoas que me acompanharam e que sou imensamente grata. Em especial desejo agradecer:

Ao meu esposo, meus filhos, familiares e amigos pelo incentivo, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Aos professores orientadores Dr.(a) Adriane Lawisch Rodriguez e Dr. Valeriano Antonio Corbellini pela atenção e orientação recebidas.

À professora Cláudia Mählmann pela disponibilidade e eficiência nas orientações recebidas e à equipe do Laboratório do Ensino de Química pelo apoio técnico recebido.

À Universidade de Santa Cruz do Sul pela concessão da Bolsa de Estudos MTA.

RESUMO

A ação antrópica sobre o ambiente contribui para o surgimento de inúmeros poluentes encontrados na forma de efluentes líquidos, emissões atmosféricas ou resíduos sólidos. O processamento de peles em curtumes gera a serragem de couro ao cromo, um resíduo sólido considerado um grave problema ambiental quando não tratado adequadamente. O presente trabalho visa desenvolver uma metodologia de digestão da serragem de couro ao cromo e extração do colágeno para obtenção de filmes e avaliar processos de biodegradação sobre a serragem de couro ao cromo digerida, bem como sobre os filmes obtidos com a utilização de culturas de *Aspergillus* sp. A serragem de couro ao cromo foi recolhida de curtumes da região de abrangência da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Para a digestão da serragem de couro ao cromo foi utilizado ácido oxálico e a purificação do colágeno foi realizada com método de precipitação com sulfato de amônio. O sobrenadante e o colágeno obtidos no processo de purificação foram avaliados quanto ao conteúdo de cromo e o teor de proteínas. A melhor formulação de filme foi obtida com a adição de 10 % de glicerol e 2 % de formaldeído à solução de serragem de couro ao cromo digerida. Amostras deste filme foram avaliadas quanto às propriedades mecânicas de tração e de resistência ao impacto, e do teor de absorção de água, posteriormente submetidos a ensaios de biodegradação. O filme avaliado apresentou resistência à tração de 13,2 N, deformação específica de 26,9% e teor de absorção de água em torno de 47 %. Nos ensaios de biodegradação, placas de Petri contendo serragem de couro ao cromo digerida e filmes de serragem de couro ao cromo digerida foram inoculadas com fungos *Aspergillus* sp. e incubadas a 30°C por 7 dias. Foi constatada a eficiência destes fungos na biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e dos filmes.

Palavras-chave: colágeno, serragem de couro ao cromo, filme, biodegradação, *Aspergillus* sp.

ABSTRACT

The anthropic action on the environment contributes for the sprouting of a great number of pollutants found in the form of effluent liquids, atmospheric emissions or solid residues. The processing of hide in tanneries generates the chrome shaving, a solid residue considered a serious environmental trouble when not treated adequately. The present work aims at to develop a methodology of digestion of the chrome shaving and extration of the collagen for attainment of films and to evaluate biodegradation processes on the chrome shaving digested, as well as on the films gotten with the use of cultures of *Aspergillus* sp. The chrome shaving was collected of tanneries of the region around the Santa Cruz do Sul University - UNISC. For the digestion of the chrome shaving oxalic acid was used and the purification of the collagen was carried through with precipitation method having used ammonium sulphate. The supernadant and the collagen gotten from the purification process had been evaluated as chromium quantity and the protein. The best formularization of film was gotten with the addition of 10 % glycerol and 2 % formaldehyde in solution of chromed shaving digested. Samples of this film had been submitted to the evaluation of its mechanical properties of traction and resistance to the impact and as water absorption and, later submitted to the biodegradation assays. The evaluated film presented tensile strenght of 13,2 N, specific deformation of 26,9% and water absorption around 47 %. In the biodegradation assays, Petri plates containing chrome shaving digested and films of chrome shaving digested had been inoculated with fungos *Aspergillus* sp. and incubated at 30°C for 7 days. The efficiency of these fungos in the biodegradation of the films was evidenced.

Key Words: collagen, chrome shaving , film, biodegradation, *Aspergillus* sp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 Fluxograma das principais etapas de produção de couro com a indicação dos	
insumos químicos adicionados e dos resíduos sólidos e líquidos	17
produzidos no	20
processo.....	
..	
2 Serragem de couro ao	
cromo.....	
3 Fluxograma da metodologia empregada para avaliar	
reaproveitamento e	
biodegradação de serragem de couro ao cromo, serragem de couro ao	30
cromo	33
digerida e de filmes de serragem de couro ao cromo	
digerida.....	
4 Fluxograma das etapas da purificação do colágeno com sulfato de amônio	
40%	
5 Máquina universal de ensaios marca EMIC-DL utilizada no ensaio de	38
tração	
6 Corpos de prova utilizados no ensaio de	38
tração.....	
7 Equipamento de impacto por queda de dardo <i>Dard Drop</i>	39
.....	
8 Solução de serragem de couro ao cromo	42
digerida.....	
9 Colágeno obtido com a utilização de sulfato de	44
amônio.....	

10 Filme – (10 % glicerol, 2 % formaldeído).....	46
11 Corpos de prova após o ensaio de tração, apresentando ruptura frágil.....	48
.	50
12 Curvas Força X Deformação do ensaio de tração.....	
13 Possíveis mecanismos de organização molecular dos filmes de serragem de couro ao cromo digerida com glicerol e formaldeído.....	51

LISTA DE TABELAS

1 Concentração de reagentes utilizados na curva-padrão de proteínas.....	35
2 Valores das concentrações de solução de serragem de couro ao cromo digerida, pó de serragem de couro ao cromo e formaldeído.....	36
3 Valores de pH das soluções de serragem de couro ao cromo digerida com adição de NaOH %.....	25 43
4 Valores médios de cromo e proteínas totais obtidos nas análises de amostras do sobrenadante e precipitado no processo de purificação do colágeno.....	44

..	
5 Resultados do ensaio de tração do filme	47
6 Resultados do ensaio de impacto <i>Dard</i>	49
<i>Drop</i>.....	53
7 Padrões de assimilação de serragem de couro ao cromo digerida	58
(SCD).....	
8 Padrões de assimilação de filme de serragem de couro ao cromo digerida	
FSCD)	

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
1.1. Processamento do	15
couro.....	16
1.1.1 Resíduos gerados	19

.....	21
1.1.2 Serragem de couro ao cromo.....	22
1.2 Colágeno: estrutura e formas de extração.....	26
1.3 Utilização do colágeno em blendas.....	30
1.4 Biodegradação.....	31
2 METODOLOGIA.....	31
2.1 Extração e purificação do colágeno.....	32
2.1.1 Obtenção da serragem de couro ao cromo digerida.....	32
2.1.2 Purificação do colágeno.....	34
2.1.2.1 Purificação do colágeno com etanol.....	35
2.1.2.2 Purificação do colágeno com sulfato de amônio.....	37
2.1.3 Determinação de cromo total.....	39
2.1.4 Determinação espectrofotométrica de proteínas.....	40
2.2 Obtenção de filme com serragem de couro ao cromo digerida.....	42
2.2.1 Ensaios preliminares para obtenção do filme de serragem de couro ao cromo digerida.....	43
2.2.2 Filmes com diferentes proporções de glicerol e polietilenoglicol.....	45
2.2.3 Filmes com Glicerol, pó de serragem e formaldeído.....	46

2.3 Ensaio mecânico de tração e resistência ao impacto.....	2.4 Avaliação do teor de absorção do filme.....	
2.5		
Biodegradação.....		
2.5.1 Biodegradação de serragem de couro ao cromo digerida e do filme de serragem de couro ao cromo com amostras de <i>Aspergillus</i> sp.....		
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		
3.1 Obtenção de serragem de couro ao cromo digerida.....		
3.2 Extração e purificação do colágeno.....		
3.3 Obtenção de filmes com serragem de couro ao cromo digerida.....		
3.3.1 Avaliação das propriedades mecânicas de tração e resistência ao impacto.....		
3.3.2 Avaliação do filme quanto à absorção de água.....		
3.4.		52
Biodegradação.....		
3.4.1 Biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e do filme obtido da serragem de couro ao cromo digerida.....		52
		66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		68
REFERÊNCIAS.....		

INTRODUÇÃO

O homem há milênios interage com o ambiente retirando dele os elementos essenciais para sua existência. Inicialmente essa interação era exclusivamente para sua sobrevivência, passando mais tarde à utilização de matéria-prima disponível na natureza para confecção de produtos para melhoria de sua qualidade de vida. Dessa forma a natureza tem sido explorada em nome do bem estar do *Homo sapiens*.

O desenvolvimento agrícola, populacional e industrial contribui para o surgimento de problemas ambientais decorrentes da ação antrópica sobre o ambiente natural, a partir da retirada de recursos naturais para obtenção de matéria-prima e do acúmulo de subprodutos das atividades humanas consideradas poluentes.

Durante muitos séculos, as tecnologias foram desenvolvidas sem que se expressasse uma preocupação com os recursos naturais. Entretanto, com o aumento da produção industrial surgiram problemas ambientais quanto à quantidade de resíduos sólidos, de efluentes líquidos e de emissões gasosas que eram gerados nesses processos.

A indústria do couro é considerada altamente poluidora, pois em seus processos de transformar a pele em couro, utiliza grande quantidade de água e substâncias químicas sendo responsável pela geração de grande quantidade de

poluentes. Dentre os resíduos sólidos deste processo industrial destaca-se a serragem de couro ao cromo, proveniente da etapa de rebaixamento do couro, sendo considerada como um dos mais problemáticos, devido ao grande volume de resíduo que é gerado nesta etapa e pela presença do Cr trivalente (Cr^{3+}) em altas concentrações é classificada como Resíduo Classe I segundo a Norma NBR-10004.

O avanço tecnológico tem possibilitado o crescimento de alternativas para prevenção e remediação de problemas ambientais que afetam a qualidade do ambiente. Recentemente, processos de reciclagem e reutilização de materiais considerados resíduos de um processo passaram a ser usados como matéria-prima em outros processos industriais, tendo assim ainda valor de mercado.

A reutilização da serragem de couro ao cromo está sendo amplamente estudada. Resultados satisfatórios foram obtidos na fabricação de solas e palmilhas, compensados de couro, paredes divisórias e incorporação em materiais cerâmicos. Estudos recentes demonstraram a viabilidade de extração da proteína fibrosa colágeno da serragem de couro ao cromo para aplicação.

Nas últimas décadas novas tecnologias estão surgindo no desenvolvimento de blendas com polímeros sintéticos e naturais e que apresentam boas propriedades mecânicas. Dentre os polímeros naturais o colágeno vem se destacando na elaboração de biomateriais, principalmente na área médica. A utilização de blendas com incorporação de polímeros naturais vem contribuindo na aplicação de tecnologias mais limpas e redução da carga poluidora dos resíduos sólidos gerados pelos curtumes

A utilização da biodegradação é uma tecnologia que vem demonstrando eficiência no tratamento de efluentes e de resíduos sólidos. Muitos estudos têm sido desenvolvidos quanto à utilização de microrganismos em processos de remediação de ambientes poluídos por ações antrópicas bem como os mecanismos que estes utilizam para degradar ou destruir materiais tóxicos, antes que eles causem um grande impacto ambiental. Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade de ecossistemas, sendo também responsáveis pela ciclagem dos compostos químicos da biosfera, incluindo a degradação de poluentes industriais. Vários estudos demonstram a utilização de fungos em processos de biorremediação, sendo *Aspergillus* sp. amplamente utilizado para este fim.

Considerando uma visão comprometida com as questões ambientais e cientes da necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias direcionadas com a

resolução de problemas ambientais, o presente trabalho visa propor o reaproveitamento e a biorremediação da serragem de couro ao cromo. Os objetivos específicos incluem num primeiro momento desenvolver metodologia de digestão da serragem de couro ao cromo e extração do colágeno do material digerido visando a obtenção de filmes e num segundo momento avaliar processos de biodegradação sobre a serragem de couro ao cromo digerida, bem como sobre os filmes obtidos utilizando culturas de *Aspergillus* sp.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Processamento do couro

As indústrias de processamento de couro são comumente conhecidas no Brasil como curtumes. Os curtumes utilizam a pele, um subproduto da indústria da carne, e a transformam em couro através do processo de curtimento, com geração de grande quantidade de poluentes nas diversas etapas do processo (PALANISAMY et al., 2004).

No estado do Rio Grande do Sul, segundo o Guia Brasileiro do Couro (2005), há aproximadamente 91 curtumes. São em média 34 curtumes que realizam todas as operações representando 37 % dos curtumes do Estado. Ainda existem 10 % que efetuam apenas o curtimento; em torno de 45 % desses já recebem o couro na forma de wet-blue e apenas 7,7 % não fazem as operações em meio aquoso, que são os curtumes de acabamento.

O processo de transformar a pele crua ou salgada em couro é uma tecnologia que requer diversas etapas de processamento, com adições de produtos químicos, intercaladas por lavagens e processos mecânicos, com a utilização de grande quantidade de água. Aproximadamente 35 a 40 litros de água são usados por um quilo de pele processada (RAMASANI & PRASAD, 1991).

As operações que envolvem o processamento do couro podem ser classificadas em três etapas: o pré-curtimento ou ribeira que é uma fase de preparação da pele, tornando-a “limpa” para receber o curtente; o curtimento que estabiliza permanentemente a matriz da pele e o pós-curtimento que envolve as operações finais de acabamento. (RAMASANI & PRASAD, 1991; SIMEONOVA &

DALEV, 1997; BAHILLO et al, 2004). O acabamento, por sua vez, envolve várias etapas importantes que conferem ao couro características finais de maciez, toque, elasticidade, brilho, cor e certas propriedades físico-mecânicas. As etapas são: rebaixamento, lavagem, neutralização, recurtimento, tingimento, engraxe, secagem, condicionamento, amaciamento, secagem estirada, lixamento, desempoamento e acabamento propriamente dito (HOINACKI, 1989).

1.1.1 Resíduos gerados

O processo de curtimento do couro gera uma grande preocupação ambiental, sendo alvo de controle rigoroso por parte de órgãos ambientais e pela sociedade em geral, devido a utilização de um grande volume de água e de substâncias químicas e da produção de uma grande quantidade de resíduos sólidos.

Os resíduos da industrialização do couro provêm tanto pela retirada de materiais orgânicos da matéria-prima como pela utilização de produtos químicos altamente poluentes em vários pontos do processo (CASSANO et al., 2001; PALANISAMY et al., 2004).

A FIGURA 1 apresenta as etapas do processo de curtimento do couro e identifica os principais produtos utilizados durante os processos e os resíduos resultantes em cada etapa.

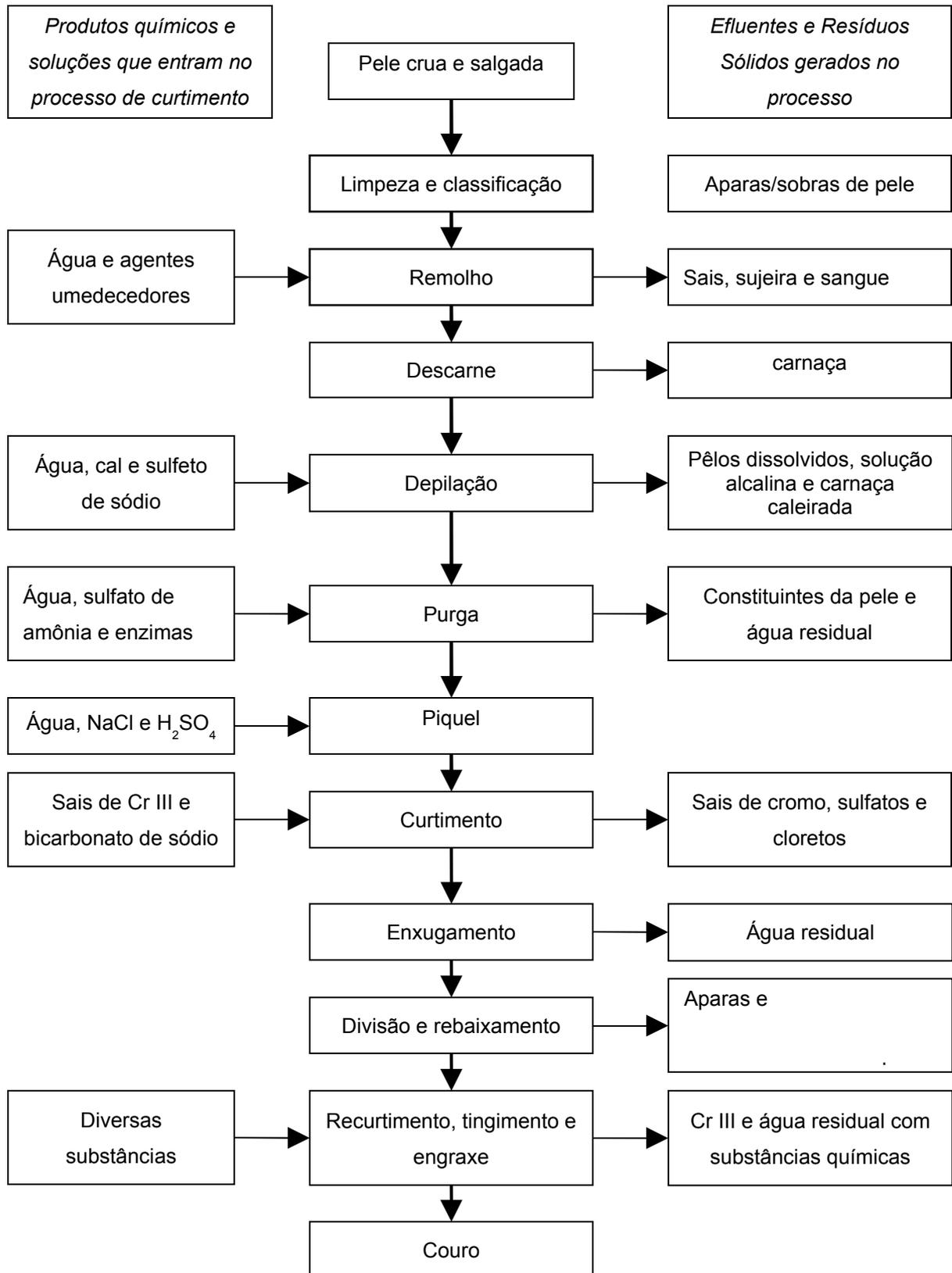


Figura 1 - Fluxograma das principais etapas de produção de couro com a indicação dos insumos químicos adicionados e dos resíduos sólidos e líquidos produzidos no processo.

Fonte: elaborado pela autora a partir de Cabeza et al, 1998.

Os resíduos podem ser sólidos ou líquidos. Os resíduos sólidos, como a serragem de rebaixadeira e o lodo, são colocados em aterros de Resíduos Perigosos. Já os resíduos líquidos, decorrentes de técnicas de processamento nas quais a pele é colocada em meio líquido aquoso com adição de produtos químicos, são devolvidos aos sistemas hídricos naturais, após tratamento.

Em muitos lugares, grandes quantidades de desperdícios de couro são dispostas em aterros sanitários (BROWN & TAYLOR & MARMER, 1996). Com o aumento das restrições ambientais e o aumento do custo dessa forma de disposição, houve o desenvolvimento de tecnologias limpas pelas indústrias do couro objetivando a minimização da geração de resíduos e a maximização do reuso (MU et al, 2003).

Uma tonelada de pele úmida gera em torno de 200 quilos de couro, juntamente com 250 quilos de resíduos sólidos curtidos e em torno de 350 quilos de resíduos de pele não curtidos. Estima-se que em torno de 100 quilos de pele sejam perdidos junto com a água residual (ALEXANDER et al, 1991).

O emprego de sais de cromo no processo de curtimento gera resíduos com a presença de compostos de cromo classificados, segundo a NBR-10004, como Resíduo de Classe I, necessitando tratamento e disposição específica em aterro de resíduos industriais perigosos (CLASS & MAIA, 1994).

No processo de curtimento de peles de animais, o cromo é largamente utilizado sob forma de sulfato básico de cromo $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5\text{SO}_4$, principalmente devido às características e propriedades físico-químicas proporcionadas aos couros como: elasticidade, flexibilidade, maciez, imputrescibilidade, resistência a altas temperaturas, entre outras (HOINACKI, 1989).

Segundo Fabiani et al., (2002) apenas 60 % dos sais de cromo usados no processo de curtimento de couro reage com a pele e em torno de 40 % do cromo é perdido nos resíduos sólidos e nas soluções aquosas do curtimento.

O cromo, quando liberado em corpos receptores, é uma grande fonte poluidora, responsável pela degradação do ambiente colocando em risco a fauna, a flora e a população que utilizam estas águas. Está presente nos resíduos de curtume, via de regra na forma trivalente (Cr III), sendo este o estado de oxidação mais estável no solo, apresentando baixa solubilidade e mobilidade com aumento de pH (MARTINES, 2005). A disposição desses resíduos diretamente no solo não é

recomendada uma vez que o cromo pode ser lixiviado ou mesmo oxidado a cromo hexavalente, cuja toxicidade é bastante elevada (BARROS & ARROYO & SOUZA-AGUIAR, 2001).

A recuperação do cromo foi estudada por Erdem (2005) que desenvolveu um método de recuperação de cromo através da oxidação de Na_2O_2 . Constatou-se ser um processo economicamente viável e uma forma importante de proteção ambiental, pois reduz o uso de Na_2SO_3 no processo de curtimento.

1.1.2 Serragem de couro ao cromo

A serragem de couro ao cromo, apresentada na FIGURA 2, é um resíduo gerado na máquina de rebaixar, operação que uniformiza a espessura do couro curtido. Por ser um resíduo volumoso em forma de farelo, impregnado de sais curtentes por vezes altamente tóxicos como no caso do cromo, merece uma atenção toda especial para que dela se obtenha o maior aproveitamento e rendimento possíveis. A serragem de couro ao cromo apresenta cerca de 40 % de umidade e em base seca o teor de cromo pode chegar a 3,0 %. Devido seu baixo peso específico, ocupa muito espaço, tornando-se problema quanto seu destino em aterros (CLASS & MAIA, 1994; ERDEM, 2005). Consiste basicamente de colágeno e complexo Cr (III), que após tratamento pode apresentar um recurso potencial para colágeno e Cromo (HEIDEMANN, 1991).



Figura 2 - Serragem de couro ao cromo.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

A serragem de couro ao cromo constitui 75 % dos resíduos sólidos que contêm o cromo no processo de curtimento. Aproximadamente 0,8 milhões de toneladas de serragem ao cromo podem ser gerados por ano em todo o mundo (ERDEM, 2005). Estima-se que para cada couro curtido ao cromo, tem-se 3 a 4 kg de serragem de rebaixadeira e aproximadamente 3,5 % do metal cromo. Esta quantidade pode variar em muito de indústria para indústria (CLASS & MAIA, 1994).

A reutilização de resíduos de couros está sendo amplamente investigada no mundo inteiro. Historicamente, a serragem de couro ao cromo foi usada como fertilizante, mas o custo de transporte e o perigo que oferecia ao ambiente fizeram com que outras formas de utilização fossem estudadas (CABEZA et al., 1998). O reaproveitamento industrial destes resíduos é importante, pois, além de minimizar o impacto ambiental, pode transformá-los em fonte de matéria-prima para novos produtos como adesivos, plásticos, cosméticos, entre outras utilizações (BERRY & CONSTANTINI & SMART, 2002).

Estudos recentes demonstram resultados satisfatórios da aplicação destes resíduos em fabricação de solas e palmilhas. Também encontram aplicação na fabricação de compensados de couro, como no caso de paredes divisórias, em decorrência da propriedade de atuar como isolante térmico e acústico (MU et al., 2003; CABEZA et al., 1998).

A possibilidade de incorporação da serragem de couro ao cromo em materiais de construção civil foi estudada por Fujikawa (2002). Segundo o autor, os tijolos de argila queimados ao forno com adição de serragem de couro, mostraram-se viáveis quanto à resistência, à compressão e à absorção de água. Também se mostrou viável a adição de serragem no concreto sem fins estruturais.

A obtenção de proteínas a partir da utilização da serragem também está sendo estudada. Em trabalho realizado por Bajza & Vrcek (2001) foram obtidos resultados satisfatórios com tratamento térmico e enzimático (protease alcalina) da serragem para recuperação de proteínas, sendo que houve recuperação de 79,4 % de proteínas da serragem considerando peso seco. Do ponto de vista ambiental os autores recomendam o tratamento enzimático, pois neste método não há desperdício de água, de substâncias químicas e de energia no processo.

1.2 Colágeno: Estrutura e formas de extração

O colágeno é um biopolímero muito abundante em animais onde constitui a principal estrutura e suporte mecânico. É facilmente disponível, não tóxico e constitui o tecido conjuntivo. É uma proteína com estrutura fibrosa, insolúvel em água, porém pode dissolver-se em soluções ácidas ou básicas concentradas. (BAILEY & PAUL, 1998; LUNGU et al., 1998; SILVA et al., 2001; DASCALU et al., 2005). Estudos indicam que a pele seca de animal possa conter de 50 a 68 % de colágeno (SIMEONOVA & DALEV, 1997; BAJZA & VRCEK, 2001)

O colágeno é utilizado em vários produtos, como cola, gelatina e adesivos. Tem ampla utilização na área farmacêutica e médica e por ser um biomaterial apresenta excelentes propriedades para próteses arteriais e peles artificiais. Na indústria de embutidos é utilizado para cobertura de lingüiça podendo ser usado como forragem e comidas para cães (BAJZA & VRCEK, 2001; BERRY & CONSTANTINI & SMART 2001; SIONKOWSKA, 2006).

Os principais aminoácidos que o constituem são: glicina, prolina, hidroxiprolina e alanina. Absorve e retém grandes quantidades de água, devido à presença de certos grupos polares reativos na molécula, os quais possibilitam a interação com

moléculas de água (HOINACKI, 1989; REST & GARRONE, 1991; BAILEY & PAUL, 1998). O intumescimento resulta desta associação de moléculas de água, com grupos reativos da molécula do colágeno. Durante o curtimento os grupos reativos reagem com os curtentes, perdendo a capacidade de reter água (HOINACKI, 1989).

Pesquisas feitas recentemente apontam a separação da proteína do couro curtido ao cromo como uma das melhores formas de minimizar a carga poluidora gerada pelas indústrias de curtumes (ERDEM, 2005; CABEZA et al, 1998; FRANCK et al, 2002).

É possível isolar proteínas (gelatina e colágeno) da serragem de couro ao cromo, utilizando proteases alcalinas sob moderadas condições. Este método possibilita a redução de resíduos com cromo, que geralmente são depositados em aterros, bem como possibilita a reutilização do Cromo no processo de curtimento do couro (CABEZA et al, 1998).

A tecnologia descrita por SIMEONOVA & DALEV (1997) apresenta vantagens ambientais e econômicas. Envolve lavagens para remoção de sais inorgânicos, separação de gordura e extração de colágeno em solução de água quente, com extração adicional de proteínas dos resíduos insolúveis após hidrólise com proteinases alcalinas.

No trabalho apresentado por BAJZA & VRCEK (2001) foi realizado um estudo comparativo entre tratamento térmico e enzimático com proteases alcalinas, utilizando resíduos de couro com o objetivo de recuperar proteínas solúveis para possível uso comercial. Foram obtidos melhores resultados com o tratamento enzimático por ser um procedimento simples, com baixo gasto de energia, sem odores prejudiciais e sem resíduos químicos perigosos na água residual.

1.3 Utilização do colágeno em blendas

As blendas poliméricas constituem-se na mistura física de pelo menos dois polímeros ou copolímeros sem que haja qualquer reação química entre eles (ORÉFICE & VASCONCELOS & MORAES, 2004).

Os produtos produzidos com os polímeros sintéticos convencionais são considerados inertes ao ataque imediato de microrganismos. Essa propriedade faz

com que esses materiais apresentem um tempo longo de vida útil e, conseqüentemente, provocam sérios problemas ambientais visto que, após o seu descarte, demoram muitos anos para se decomporem totalmente (HUANG & SHETTY & WANG, 1990; CHIPELLINI & SOLARO, 1998).

A resistência à degradação proporcionou o aumento do uso de materiais poliméricos, causando impacto ambiental negativo devido à disposição de resíduo pós-consumo. O impacto pode ser minimizado com o desenvolvimento de novos materiais poliméricos e introdução de polímeros naturais (ALEXY et al., 2003).

As blendas com polímeros sintéticos e naturais estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de materiais poliméricos bioartificiais e apresentam boas propriedades mecânicas (CASCONI et al., 1997). Representam nova classe de materiais com melhores propriedades mecânicas e biocompatibilidade que os componentes isolados (SIONKOWSKA, 2003).

O interesse nesta área deve-se às crescentes aplicações práticas destes novos materiais e os principais estudos são voltados para a melhoria de suas propriedades físicas, físico-químicas e de processamento destes materiais, comparadas às propriedades dos polímeros puros (UTRACKI, 1990).

Nos últimos anos houve um grande desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis, principalmente devido à preocupação com a proteção ambiental. Inúmeros estudos investigaram as propriedades filmogênicas das proteínas vegetais dentre as quais se destacam o amido, as proteínas de soja, ervilha, e das proteínas de origem animal como as do ovo, do leite e de proteínas miofibrilares de peixes (QUINTERO & SOBRAL, 2000; YOSHIDA & ANTUNES, 2004; SOUZA et al., 2004).

Filmes constituídos unicamente com proteínas ou polissacarídeos são frágeis, principalmente a uma baixa umidade relativa, necessitando o uso de plastificantes, geralmente polióis, que reduzem as interações intermoleculares entre as cadeias adjacentes do biopolímero. O uso de plastificante resulta no aumento de mobilidade dessas cadeias e, conseqüentemente em materiais flexíveis para aumentar a mobilidade e a flexibilidade. O glicerol é amplamente usado como plastificante (GONTARD, N & GUILBERT & CUQ, 1993; CUQ et al., 1997; COUPLAND et al., 2000; YOSHIDA & ANTUNES, 2004).

Os filmes produzidos a partir de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo com diferentes concentrações de glicerol foram avaliados. A força necessária à ruptura dos biofilmes variou de 2,94 N no filme com 70 % de glicerol para 6,67 N no filme

com 30 % de glicerol. Inversamente, a deformação na ruptura apresentou valor de 2,71 % no biofilme com 30 % de glicerol e 7,50 % no biofilme com 70 % de glicerol, o que indica a forte influência do plastificante sobre as propriedades mecânicas desses materiais (QUINTERO & SOBRAL, 2000).

A proteína que recentemente está sendo largamente usada em blendas é o colágeno. Alexy et al., (2003) realizaram estudos para avaliar a interação entre o colágeno e o Polivinil álcool (PVA) em blendas. Foram estudadas as propriedades mecânicas, a solubilidade em água e a propensão à biodegradabilidade. Os filmes de PVA com adição de 15 % de colágeno hidrolisado apresentaram resistência à tração de 24,1 MPa e deformação na ruptura de 460 %, enquanto que com adição de 20 % de colágeno a resistência à tração é 22,4 MPa e deformação na ruptura é 523 %. Amostras de filmes com adição de 25 % de colágeno hidrolisado obtiveram valores de resistência à tração de 16,1 MPa e deformação na ruptura de 567 %. Os resultados obtidos comprovam que a resistência à tração e a deformação na ruptura diminuem com o acréscimo de colágeno hidrolisado. A incorporação de 20 % de colágeno em blendas com PVA aumenta a solubilidade de água no filme, melhorando a biodegradabilidade do mesmo. No processo de biodegradação anaeróbica foi observado que a adição de colágeno nas blendas com PVA demonstra efeito positivo.

O colágeno tem uma vasta aplicação na área farmacêutica. Na área médica é utilizado na forma de filmes de inúmeras aplicações. É utilizado em um adesivo (gaze) constituindo a parte interna do mesmo na forma de um polímero entrecruzado usado para promover a cicatrização de feridas, acelerando o crescimento celular. Este adesivo na parte externa é constituído por um polímero multicamadas que promove o controle de umidade e serve de barreira contra infecções bacterianas (US PATENTS, 4841962).

Filmes de colágeno com uma ou mais camadas foram propostos como reservatório (invólucro) de medicamentos para auxiliar na cicatrização de feridas cirúrgicas. Para melhorar a flexibilidade do filme pode ser usado polietilenoglicol ou glicerol, preferencialmente este último. Os filmes são secos à temperatura ambiente entre 15° a 35° C por 10 dias sobre placas de Teflon. Para apressar o tempo de secagem podem ser usados álcoois, preferencialmente etanol, numa quantia de até 50 % do peso da solução (US PATENTS, 54182222).

Na área de alimentos, o colágeno também tem grande aplicação, principalmente sob forma de filmes para coberturas de produtos embutidos de origem animal. Um filme de colágeno misturado com 17 % de glicerol, 2 % de sorbitol e 12 % de água necessita de adição de um produto oleoso (óleos ou gorduras) para melhorar sua extensibilidade. Os elementos aditivos oleosos eliminam ou diminuem a rigidez estrutural típico de filmes de colágeno, proporcionando-lhes extensibilidade que evite a ruptura no manuseio (US PATENTS, 5885634).

Ao estudar a compatibilidade de colágeno em blendas com Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) foram avaliadas as propriedades mecânicas das blendas formuladas. Foi constatado um decréscimo da resistência à tração e da deformação na ruptura na medida em que aumentava o percentual de adição de colágeno hidrolisado nas blendas. A resistência à tração em blendas com 30 % de colágeno hidrolisado ficou próximo a 7,5 MPa e a deformação na ruptura com valor em torno de 75 % (DASCALU et al., 2005).

O estudo realizado com blendas de colágeno e quitosana em diferentes proporções avaliou o comportamento mecânico do colágeno na blenda. Foi constatado que na região elástica o colágeno deforma mais que a quitosana e na região plástica o colágeno é capaz de suportar maiores tensões. Este comportamento também é obtido nas blendas de colágeno com quitosana em diferentes proporções. Assim, blendas com maior quantidade de colágeno devem suportar maiores tensões antes da ruptura, enquanto que as blendas com mais quitosana devem deformar mais. O módulo de elasticidade do colágeno foi de 39 MPa e apresentou aumento gradativo em blendas com colágeno- quitosana nas proporções 3:1,1:1,1;3 com os valores de 41 MPa 44 MPa e 46 MPa respectivamente. A absorção de água das blendas e das membranas de colágeno também foi avaliada e os resultados apontam que após 20 horas a quantidade de água absorvida pelo filme com colágeno foi de 78 % (TONHI & PLEPIS, 2002).

A avaliação realizada no colágeno obtido da pele de bovinos para ser utilizado na área médica inclui as propriedades mecânicas de membranas de colágeno. Foi constatado que a resistência à tração foi de 58 ± 5 N/mm² e o alongamento na ruptura foi de $7 \pm 0,5$ % (ZHANG & LI & SHI, 2005).

A interação de colágeno com Polivinilpirrolidona (PVP) em blendas foi estudada por Sionkowska, (2003). Os resultados deste estudo mostraram que colágeno e PVP

são miscíveis e há possibilidade de produção de novos materiais com forte ligação entre os componentes sintéticos e biológicos da blenda.

Estudos de Hoffmann et al, (2003) relatam a biodegradabilidade de blendas álcool polivinílico (PVAL) com proteína hidrolisada, no caso colágeno. Constatou-se uma melhora na capacidade de degradação do PVA com adição de glicerol e colágeno.

1.4 Biodegradação

A biodegradação ou biotransformação é um processo de modificação química causada por atividade biológica, sob certas condições de calor, umidade, luz, nutrientes minerais e orgânicos adequados. Pode ser um processo de conversão de um material, por microrganismos, a dióxido de carbono, água, biomassa, sob condições aeróbias ou a metano, dióxido de carbono e biomassa sob condições anaeróbias (KRUPP& JEWELL, 1992; SWIFT, 1993).

A biodegradação de polímeros é um processo, no qual, bactérias, fungos e leveduras utilizam suas enzimas que consomem substâncias destes como fonte de alimento modificando a forma original do material até seu desaparecimento. (CHANDRA & RUSTGI, 1998; ROSA & FILHO & AGNELLI, 2002). É uma característica benéfica para substâncias químicas que estão dispostas no meio ambiente.

Durante as últimas décadas, a biodegradabilidade começou a ser considerada como uma característica desejável não apenas por substâncias químicas, mas também por materiais sólidos como os polímeros. Esse desenvolvimento foi estimulado por problemas ligados com o gerenciamento do desperdício de resíduos sólidos: aumento de custos, aumento das dificuldades em localizar novos locais para aterros e questões de operação dos sistemas de queima e incineração em massa. (MEZZANOTTE et al., 2005).

Muitas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de plásticos e produtos biodegradáveis, os quais requerem para sua modificação ou formulação, o estabelecimento de critérios para avaliar a biodegradabilidade do produto obtido.

Alguns testes foram descritos na literatura para medir a biodegradabilidade de materiais poliméricos e baseiam-se em uma medida indireta da degradação destes materiais pela ação de microrganismos em presença da amostra em teste, a quantidade de gás carbônico produzido ou ainda o aumento da biomassa microbiana a partir da transformação da amostra. Qualquer uma destas medidas leva em consideração a capacidade de microrganismos decompor o material polimérico, transformando-o em gás carbônico (CO₂) através do seu metabolismo ou em biomassa pela utilização de oxigênio (ROSA & PENTEADO & CALIL, 2000).

Diversos métodos são empregados para avaliar a biodegradabilidade de materiais poliméricos, destacando-se métodos enzimáticos (TOMASI et al, 1996) microbiológicos (BENEDICT et al., 1983; CHANDRA & RUSTGI, 1998) e método direto no solo (MEGAERT et al., 1996).

Os microrganismos utilizados na biodegradação são fungos e bactérias. Os fungos possuem grande capacidade de degradar parcialmente, e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes à degradação, através da ação de enzimas específicas produzidas por estes microrganismos (FIELD et al., 1992).

Fungos e leveduras crescem facilmente, produzem elevada quantidade de biomassa e ao mesmo tempo, podem ser manipuladas geneticamente e morfológicamente. *Aspergillus* sp. compreende um gênero de fungos capazes de crescerem numa ampla variedade de substratos, o que facilita os estudos em laboratório (PALLU, 2006).

Os fungos são amplamente usados em processos de fermentação industrial, o que reforça a importância de sua utilização em processos de biossorção, contribuindo com a diminuição do resíduo biológico gerado nesses processos, a biomassa fúngica. Linhagens de *Aspergillus* sp. são usados na produção de ferricromo, ácido kojik, ácido gálico, ácido cítrico e enzimas como amilases, glucoses isomerases, pectinases, lípases e glucanases (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995).

Estudos demonstraram a eficiência de *Aspergillus* sp. em processos de biorremediação, pois apresenta capacidade de retirar metais pesados da água, podendo ser usado como biorremediador desses metais, sendo uma alternativa de descontaminação ambiental. Segundo Yakubu e Dudeney (1986), *Aspergillus niger* foi capaz de biossorver quantidades expressivas de urânio. Estudos realizados por Kapoor & Viraraghavan & Cullimore (1999) relataram a capacidade do fungo A.

nidulans na remoção de metais pesados. *A. niger* e *A. oryzae* foram usados como bioabsorventes para remoção de cádmio, chumbo, níquel e cromo de efluentes. Foi comprovado que *A. niger* em condições favoráveis de pH, temperatura, tipo e concentração de nutrientes tem maior capacidade de remoção de cromo em efluente da indústria de couro. (PRASAD & FREITAS, 2000; SEPEHR et al., 2005). As atividades enzimáticas avaliadas em *A. oryzae* foram consideradas satisfatórias em efluente com pH próximo a 5, promovendo um aumento da sua capacidade de crescimento. Assim, ao avaliar-se a taxa de remoção de cromo em efluente de curtume foi verificado que o maior valor aconteceu em pH 5, decrescendo com o aumento gradativo de pH (SEPEHR et al., 2005).

A bioabsorção de Cr (VI) em solução aquosa foi avaliada com a utilização da biomassa fúngica de *Aspergillus* sp. isolado de efluente de indústrias que utilizam o cromo em seus processos. O processo de bioabsorção dependeu do pH e da concentração inicial do metal na solução aquosa. A remoção máxima ocorreu com concentração máxima de Cr (inicial - 500mg/L) em pH 2. Foi observado um rápido decréscimo da taxa de remoção de Cr (VI) quando o pH aumentou para 3 e, continuou decrescendo lentamente com o aumento do pH (SEN & DASTIDAR, 2007).

O estudo realizado por Pallu (2006) avaliou os mecanismos envolvidos nos processos de bioabsorção do metal pesado cádmio por biomassa viva e morta de *Aspergillus* sp. em ambientes líquidos. Constatou-se que a biomassa deste fungo apresentou níveis efetivos de bioabsorção de cádmio, mostrando-se promissor para uso em processos de remoção deste metal em ambientes líquidos.

A dificuldade de tratar efluentes com corantes têxteis de alta toxicidade, com tratamento convencional biológico e físico-químico devido à complexa estrutura molecular do corante, motivou a investigação de tecnologia inovadora para estes tratamentos. Os fungos foram investigados e foi constatado que *A. niger* demonstrou eficiência na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil. Os pesquisadores investigaram o papel da carboxila, dos grupos funcionais fosfato e amino e dos lipídios presentes na biomassa de *A. niger* na bioabsorção de 4 corantes Azul Básico(Basic Blue) 9, Azul ácido 29 (Acid Blue 29), Vermelho Congo(Congo Red) e Vermelho Disperso 1 (Disperse Red 1) (FU & VIRARAGHAVAN, 2002).

O tratamento de efluente têxtil diluído em bioreator com baixa fonte de nitrogênio e de carbono, mostrou-se eficiente com a utilização de *A. niger*. O fungo

absorveu o corante sem produzir quaisquer enzimas de biodegradação no processo. Foi alcançado 95-97 % de eficiência na remoção de cor em condições favoráveis como segue: temperatura entre 28 a 30 °C, pH entre 3-7 e a concentração de glicose a 0,3 %. O estudo mostrou ser de 20 horas o tempo para obtenção dos melhores resultados de remoção de cor do efluente têxtil tratado. (ASSADI & JAHANGIRIB, 2001).

Em testes de biodegradação realizados por Dullius, (2004), colônias dos fungos foram coletadas em amostras de efluente têxtil, solos de lavoura de fumo e de mata nativa, lodo de fundo de lago e chorume de lixão. Foram selecionadas colônias de fungos mais representativas, isoladas e submetidas a testes de descoloração. Das três colônias eficientes foi selecionada uma para realizar ensaios de remoção de cor em efluente têxtil. Foi constatado que o fungo *Aspergillus* apresentou alta capacidade de remoção de corantes têxteis sintéticos não sendo mais detectados após 24 horas de exposição à biomassa fúngica.

A remoção de chumbo com utilização da biomassa fúngica de *A. niger* encontrada no efluente da indústria de fermentação para produção de ácido cítrico foi investigado por Jialong et al, (2001) com a utilização de biossorção. Os resultados indicaram que a biossorção de chumbo em solução aquosa ocorreu rapidamente, atingindo o equilíbrio num período de 4 horas.

O fungo *Aspergillus* sp. também demonstrou eficiência na capacidade de remoção de compostos fenólicos encontrados no efluente gerado no processo industrial de do azeite de oliva. Estes compostos são altamente poluentes, pois inibem a atividade bacteriana. O experimento realizado por Garcia et al, (2000) com alguns gêneros de fungos, dentre os quais *Aspergillus* sp. demonstrou resultados satisfatórios quanto à remoção destes compostos fenólicos. A capacidade de *A. niger* de remoção de fenóis foi de 76 % e de difenóis foi de 82 %, enquanto que *Aspergillus terreus* removeu 64 % de fenóis totais e 76 % de difenóis.

2. METODOLOGIA

A metodologia empregada para a realização deste trabalho utilizou serragem de couro ao cromo, resíduo sólido oriundo de um curtume da região de abrangência da Universidade de Santa Cruz do Sul. O fluxograma da FIGURA 3 representa esquematicamente a metodologia utilizada para o desenvolvimento desta pesquisa.

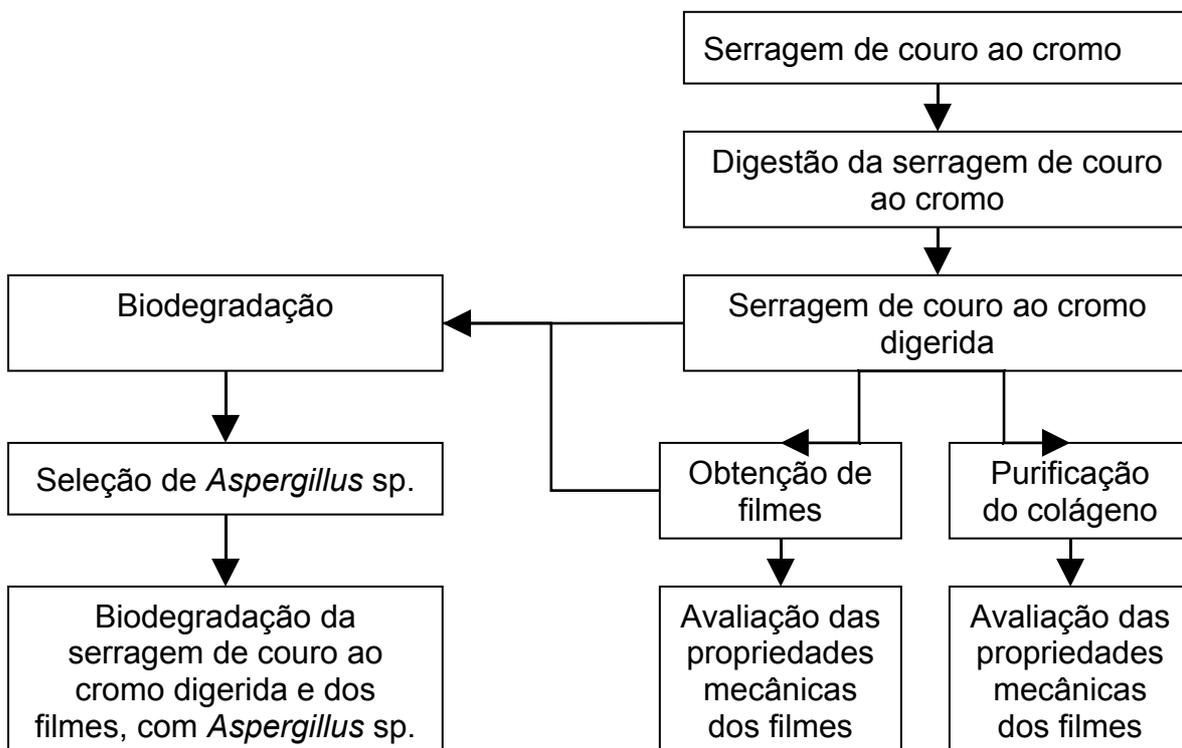


Figura 3 - Fluxograma da metodologia empregada para avaliar o reaproveitamento e a biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e de filmes de serragem de couro ao cromo digerida.

Fonte: Fluxograma elaborado pela autora, 2007.

A partir da serragem de couro ao cromo digerida foi realizada a extração do colágeno com posterior testes de purificação do mesmo. Também foram avaliadas diferentes formulações para a obtenção de filmes a partir da serragem de couro ao cromo digerida. Os ensaios de biodegradação foram realizados com utilização de amostras de fungos do gênero *Aspergillus* para avaliação da capacidade de degradar a serragem de couro ao cromo digerida e os filmes obtidos da serragem de couro ao cromo digerida.

2.1 Extração e purificação do colágeno

A serragem de couro ao cromo foi seca a temperatura ambiente por 7 dias. Após foi pesado 6 g da serragem e colocada em um béquer com 30 mL de água com 3 g de ácido oxálico. O béquer foi coberto com vidro relógio e aquecido, em banho de óleo, sob agitação até a completa digestão da serragem completa.

Alíquotas de 6 gramas de serragem de couro ao cromo foram sendo acrescentadas à solução até que não houvesse mais a digestão completa da serragem de couro ao cromo.

2.1.1 Obtenção de serragem de couro ao cromo digerida

Em um béquer de 100 mL foram colocados 20 g de serragem de couro ao cromo seca, 3 g de ácido oxálico e 30 mL de água. O frasco foi coberto com vidro relógio e aquecido em banho de óleo, com temperatura até 100 °C, durante 45 minutos, sob agitação.

Após resfriamento, o pH da solução de serragem de couro ao cromo digerida foi medido com potenciômetro e para a neutralização da solução foi utilizado hidróxido de sódio (25 %) para obtenção de uma solução com pH entre 6 -7.

2.1.2 Purificação do colágeno

A purificação do colágeno foi realizada em triplicata utilizando etanol e sulfato de amônio como agentes precipitantes.

2.1.2.1 Purificação do colágeno com etanol

A serragem de couro ao cromo digerida foi diluída em água (1:1), gotejada em solução de etanol 50 % na proporção de 1:10, sob agitação e centrifugada (3500g por 2 min). O precipitado foi dissolvido em água e novamente gotejado em solução de etanol 50 % na proporção de 1:10, sob agitação e centrifugada a 3500g por 2 min. O precipitado foi dissolvido em água e repetido o procedimento anteriormente descrito. O sobrenadante obtido em cada centrifugação foi desprezado.

Em outro ensaio para obtenção de colágeno foram seguidas as mesmas etapas anteriormente descritas, no entanto a solução de serragem de couro ao cromo digerida foi gotejada em etanol comercial numa proporção de 1:10.

2.1.2.2 Purificação do colágeno com sulfato de amônio

A solução de serragem de couro ao cromo digerida neutralizada foi gotejada em solução de sulfato de amônio 40 %, numa proporção de 1:1 (v:v), sob forte agitação. Em seguida o precipitado foi solubilizado em 30 mL de água e gotejado em solução de sulfato de amônio 40 %, numa proporção de 1:1 (v:v), sob forte agitação. O processo de solubilização em água seguido por reprecipitação em sulfato de amônio foi repetido mais uma vez. O material precipitado foi coletado, posto a secar à temperatura ambiente. A FIGURA 4 apresenta as etapas de purificação da serragem de couro ao cromo digerida realizadas com identificação das amostras obtidas durante o processo. Com as amostras de sobrenadante (A, B, C e D) e do

precipitado (E) foi realizada a determinação espectrofotométrica de proteínas e a determinação do Cromo Total por Espectrometria de absorção atômica.

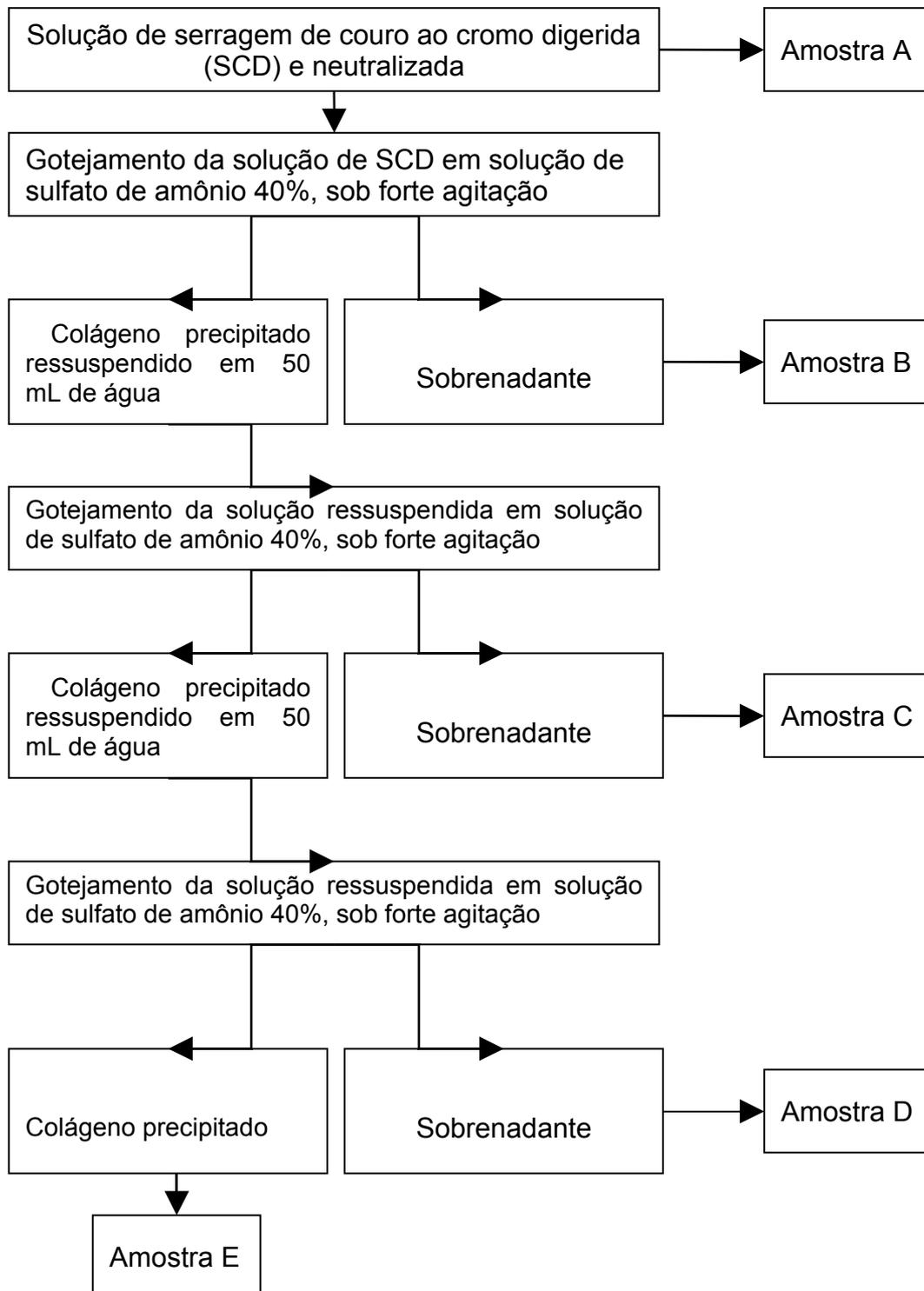


Figura 4 - Fluxograma das etapas da purificação do colágeno com sulfato de amônio 40 %.

Fonte: Fluxograma elaborado pela autora

2.1.3 Determinação de cromo total

O método utilizado na análise do cromo seguiu as normas da *American Publish Healt Association* (APHA) e foi realizada na Central Analítica na Universidade de Santa Cruz do Sul.

Inicialmente foi realizada a digestão da parte orgânica da amostra com adição de 5 mL de ácido nítrico em 250 mL da amostra e aquecido a 200° C, até concentrar a amostra à 25 mL. A leitura da concentração de cromo das amostras foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica por chama. O fator de concentrado utilizado foi 10.

2.1.4 Determinação espectrofotométrica de proteínas

As amostras para determinação espectrofotométrica de proteínas foram obtidas do sobrenadante de cada etapa de precipitação com sulfato e amônio, em triplicata, identificadas como A, B, C e D. A determinação de proteínas também foi realizada com o material precipitado ao final das etapas, identificada como amostra E.

Para a determinação espectrofotométrica de proteínas nas amostras foram necessários os reagentes nas quantidades conforme segue: solução padrão de proteína a 5 mg/mL (5 g de albumina bovina em 1000 mL), cloreto de sódio (NaCl) 0, 15 M, reativo de biureto com sulfato de cobre (2,5 g), tartarato de sódio e potássio (10 g), hidróxido de sódio 10 g/dL (350 mL) e água destilada (1000 mL). Foram preparados cinco tubos de ensaio conforme apresentado na TABELA 1 para preparação da curva-padrão de proteínas.

Tabela 1 - Concentrações de reagentes utilizados na curva-padrão de proteínas

<i>Tubos</i>	<i>Albumina</i> (mL)	<i>Água destilada</i> (mL)	<i>Reativo de Biureto</i> (mL)
B	0	2	5
1	0,5	1,5	5
2	1	1	5
3	1,5	0,5	5
4	2	0	5

B - branco

Fonte: tabela elaborada pelo autor a partir de informações de REMIÃO & SIQUEIRA & AZEVEDO, 2003.

De cada uma das amostras A, B, C, D e E foi retirado 1 mL de solução e transferido para tubos de ensaio com 9 mL de NaCl 0,15 mol L⁻¹ e homogeneizado em agitador de tubos. Foram transferidos 2 mL de cada amostra para tubos contendo 5 mL de reativo de biureto.

Todos os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria em temperatura entre 30 e 32 ° C por 10 min e em medidos os valores de absorbância no fotômetro, em 545 nm contra o tubo B.

2.2 Obtenção de filmes com serragem de couro ao cromo digerida

2.2.1 Ensaios preliminares para obtenção de filme com serragem de couro ao cromo digerida

A solução de serragem de couro ao cromo digerida foi utilizada em testes para obtenção de filmes.

Foram preparadas formulações de filmes com duas soluções de glicerol e serragem de couro ao cromo digerida diluída em água em diferentes proporções. Na solução A, 25 mL de solução de serragem de couro ao cromo foi diluída com 75 mL de água, adicionando-se, em seguida, 4,5 g de glicerol. Na solução B, 50 mL de

solução de serragem de couro ao cromo foi diluída com 100 mL de água, adicionando-se, em seguida, 4,5 g de glicerol. As soluções A e B foram agitadas por 10 minutos para homogeneização e colocadas sobre lâminas de acetato de celulose de modo a formar filmes retangulares de aproximadamente de 14 x 20 cm cada um. Os filmes foram colocados a secar em temperatura ambiente por 24 horas.

As soluções A e B anteriormente descritas foram utilizadas para amostras de filmes com formaldeído e pó de serragem de couro ao cromo em diferentes proporções conforme apresentado na TABELA 2.

Tabela 2 – Valores das concentrações de solução de serragem de couro ao cromo digerida, pó de serragem de couro ao cromo e formaldeído

<i>Amostras</i>	<i>Solução A</i>	<i>Solução B</i>	<i>Pó de</i>	<i>Formaldeído</i>
	<i>(mL)</i>	<i>(mL)</i>	<i>serragem (g)</i>	<i>(mL)</i>
I	-	20	-	-
II	-	20	2	-
III	20	--	--	1
IV	20	-	2	-

Fonte: Tabela elaborada pela autora.

As amostras formuladas foram agitadas por 10 minutos para homogeneização, colocadas sobre lâminas de acetato de celulose, formando uma fina camada da solução, e colocadas a secar em temperatura ambiente por 24 horas.

2.2.2 Filmes com diferentes proporções de glicerol e polietilenoglicol

Amostras de filmes foram obtidas misturando-se 25 g de serragem de couro ao cromo digerida com plastificante (glicerol ou polietilenoglicol) nas quantidades de 1,5, 2,0 ou 2,5 g e 0,5 mL de formaldeído a 40 %.

As soluções foram agitadas por 10 minutos para homogeneização e a cada solução foi acrescentada água deionizada até serem obtidos 50 mL de solução. As soluções foram depositadas sobre lâminas de acetato de celulose e expostas à temperatura ambiente por 24 h para secagem.

2.2.3 Filmes com glicerol, pó de serragem e formaldeído

Amostras de filmes foram obtidas misturando-se 25 g de serragem de couro ao cromo digerida e 2,5 g de glicerol com pó de serragem nas quantidades de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 g e 0,5 mL de formaldeído a 40 %.

As soluções foram agitadas por 10 minutos para homogeneização sendo acrescentado água até o volume final de 50 mL.

2.3 Ensaaios mecânicos de tração e resistência ao impacto

Para os ensaios mecânicos de tração e resistência ao impacto foi utilizado o filme que apresentou melhor formulação para a realização do ensaio, a partir das composições descritas no item 2.2.2. Os filmes foram preparados sobre placas de Teflon, com dimensões 50 x 50 cm, sendo a espessura dos mesmos medida com um micrômetro digital em pontos diferentes do filme, considerando-se como espessura dos filmes, a média das leituras realizadas.

Os ensaios de tração foram realizados de acordo com a Norma ASTM D882-00 (2001) em uma Máquina Universal de Ensaios Marca EMIC Modelo DL10000, com célula de carga de 50 Kgf, velocidade de ensaio de 10 mm/min e distância de 125 mm entre as garras, conforme FIGURA 5.



Figura 5 - Máquina Universal de Ensaio Marca EMIC-DL10000 utilizada no ensaio de tração.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

Foram ensaiados 5 corpos de prova medindo 125 mm de comprimento e 25 mm de largura, com espessura média de 0,40 mm, conforme apresentado na FIGURA 6.



Figura 6 - Corpos de prova utilizados no ensaio de tração.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

Os parâmetros analisados foram a deformação específica na ruptura (%), o módulo de elasticidade (MPa), a força máxima (N), a tensão força máxima (MPa) e a tensão na ruptura (MPa).

O ensaio de resistência ao impacto por queda de dardo (*Dard Drop*) foi realizado seguindo procedimento descrito na norma ASTM D 1709 – 01 (2001), em equipamento apresentado na FIGURA 7.



Figura 7 – Equipamento de impacto por queda de dardo (*Dard Drop*).

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

Para o ensaio foram utilizados 9 corpos de prova medindo 190 mm x 190 mm e com espessura média de 0,46 mm (75 cm de altura do dardo).

2.4. Avaliação do teor de absorção de água do filme

Os ensaios de absorção de água dos filmes seguiram a Norma ASTM – D570, em triplicata. Para o ensaio foram utilizadas amostras do filme de melhor formulação, a partir das composições descritas no item 2.2.2 mantidas no dessecador por 48 horas. A quantidade de água absorvida pelas amostras foi determinada pela imersão em água deionizada por um determinado período de tempo

Os corpos de prova tiveram medidas suas massas e em seguida foram mergulhados em copos de béquer com 200 mL de água deionizada onde permaneceram por 24 horas. Após este tempo as amostras foram retiradas da água e tiveram novamente suas massas medidas. Também foram avaliadas massas das amostras em tempos de 10, 30 e 60 min, Através da equação,

$$A (\%) = \frac{M_u - M_s}{M_s} \times 100$$

foi determinada a quantidade de água absorvida pelas amostras onde “A” é o teor de absorção de água, “ Mu” e “Ms” são as massas das membranas úmida e seca, respectivamente.

2.5 Biodegradação

Foram realizados ensaios para avaliar processos de biodegradação sobre a serragem de couro ao cromo digerida, bem como sobre os filmes obtidos utilizando culturas de *Aspergillus* sp.

2.5.1 Biodegradação de serragem de couro ao cromo digerida, filme de serragem de couro ao cromo digerida com amostras de *Aspergillus* sp.

Foram utilizadas 28 amostras de *Aspergillus* sp. da coleção de microrganismos do laboratório de Microbiologia Industrial da Unisc mantidas previamente em ágar Sabouraud.

Os fungos utilizados na biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e do filme de serragem de couro ao cromo digerida foram: *A. terreus* 2, *A. terreus* EMMI 233-3, *A. terreus* 1, *A. terreus* 434, *A. fumigatus* 2, *A. fumigatus* 174, *A. parasiticus*, *Aspergillus* AB6 (2) I, *A. niger* 9, *Aspergillus* C1-III, *Aspergillus* A1, *A. niger* 336, *A. niger* 898, *A. niger* CMMI 111, *A. niger* 4, *Aspergillus* FSC-TE-2, *Aspergillus* 10 I-G, *Aspergillus* 2A-G, *Aspergillus* 12, *Aspergillus* 13, *Aspergillus* 14 *Aspergillus* 15, *Aspergillus* 16 *Aspergillus* 17, *Aspergillus* 18, *A. niger* AM-1, *A.s flavus* AM-1, *Aspergillus* L 15.

As amostras de *Aspergillus* sp. foram cultivadas por 7 dias a 30 °C em tubo de ensaio com 5 mL de ágar Winogradsky-sacarose com a seguinte composição (gL⁻¹): sacarose 40; fosfato monopotássico 5, sulfato de magnésio hepta-hidratado 5, cloreto de sódio 0,05, sulfato manganoso 0,05, nitrato de amônio 10, ágar bacteriológico 25, água destilada 1 L.

Amostras de esporos de *Aspergillus* sp. foram aplicadas em duplicata com *swab* sobre placas de Petri ($\Phi = 6$ cm) contendo 10 mL de ágar Winogradsky. Em uma das placas inoculadas foram aplicadas 3 alíquotas de 10 μ L de solução de serragem de couro ao cromo digerida. Sobre a outra placa foram colocadas 3 alíquotas (em forma de discos) de filme de serragem de couro ao cromo digerida de melhor formulação a partir das composições descritas no item 2.2.2. O ensaio foi realizado em duplicata, e as placas incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de 30 °C por 7 dias.

Após o período de incubação, as placas foram analisadas quanto aos padrões de crescimento fúngico e de esporulação nas placas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da serragem de couro ao cromo digerida

A metodologia utilizada para a digestão da serragem de couro ao cromo em solução de ácido oxálico 10% foi eficaz para a digestão de 20 g de serragem de couro ao cromo à temperatura de 100° C no tempo de 45 minutos. Foi obtida uma solução homogênea, pastosa, de coloração escura, conforme apresentado na FIGURA 8.



Figura 8 – Solução de serragem de couro ao cromo digerida.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

As avaliações de pH realizadas em diversas amostras comprovam que as soluções apresentam pH ácido. A TABELA 3 apresenta os valores de pH iniciais e

finais das soluções de serragem de couro ao cromo digerida avaliadas e o volume de NaOH 25 % necessário para neutralização das soluções.

Tabela 3 - Valores de pH da soluções de serragem de couro ao cromo digerida com adição de NaOH 25 % para neutralização

<i>Soluções</i>	<i>pH INICIAL</i>	<i>pH final</i>	<i>NaOH 25 % (mL)</i>
1	0,41	6,72	7,30
2	0,72	6,63	6,80
3	0,65	6,71	7,10
4	0,58	6,71	7,20
5	0,72	6,63	6,90
6	0,72	6,63	6,80

Fonte: Tabela elaborada pela autora a partir dos dados coletados.

Vários métodos para digestão de serragem de couro ao cromo são descritos na literatura, com a finalidade de recuperar o cromo contido neste resíduo. O uso de tratamento enzimático com proteases alcalinas objetivou recuperar o cromo para reutilização nos tratamentos de peles, separando a gelatina o resíduo para posterior uso. Foi utilizado hidróxido de sódio para neutralização a solução obtida (CABEZA et al.,1998). Também foram utilizados ácidos no tratamento de resíduos com cromo como o ácido clorídrico usado em uma etapa inicial de digestão de serragem de couro ao cromo e seguido por um tratamento enzimático para extração das proteínas (SIMEONOVA & DALEV, 1997).

A solubilização do colágeno é comumente realizada com adição de ácido acético 0,5 M devido a insolubilidade do colágeno em água (COOMBESA et al., 2002; HWANG et al.. 2005; SIONKOWSKA,2006).

3.2 Extração e purificação do colágeno

O método de purificação no qual foi utilizado o etanol não foi considerado satisfatório, pois o colágeno obtido no processo apresentou coloração esverdeada, indicando excessiva presença de cromo.

O colágeno obtido (FIGURA 9), no método de purificação no qual foi utilizado o sulfato de amônio 40% apresentou uma coloração cinza claro, indicando uma menor quantidade de cromo.



Figura 9 - Colágeno obtido com utilização de sulfato de amônio.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

Os resultados da análise de cromo residual encontrado no sobrenadante residual e do material precipitado (colágeno) durante o processo de purificação são apresentados na TABELA 4 (classificação das amostras conforme FIGURA 4)

Tabela 4 – Valores médios de cromo e proteínas totais obtidos nas análises de amostras do sobrenadante e precipitado no processo de purificação do colágeno

<i>Amostras</i>	<i>Concentração média do cromo total (mg L⁻¹)</i>	<i>Concentração média de proteínas (g mL⁻¹)</i>
A	16,0 ± 1,73	1,45 ± 0,02
B	7,5 ± 1,45	0,17 ± 0,03
C	1,8 ± 0,46	0,12 ± 0,03
D	0,62 ± 0,06	0,11 ± 0,03
E*	0,68 ± 0,36	0,12 ± 0,04

E* - amostra sólida ressuspensa em solução de ácido oxálico 10 %.

Fonte: tabela elaborada pela autora.

No processo de purificação do colágeno a partir da serragem de couro ao cromo observa-se que houve uma considerável diminuição do cromo nas amostras de sobrenadante (amostras B, C e D) em relação à amostra A, constituída de serragem de couro ao cromo digerida sem ter passado por nenhuma etapa do processo de purificação. A amostra E (colágeno) também apresentou níveis de cromo bastante inferior à amostra A.

Na purificação envolvendo etapas intercaladas de precipitação e solubilização do colágeno observa-se que não houve perda de colágeno, com exceção da primeira etapa de precipitação (amostra A).

Os valores obtidos neste processo de purificação não foram comparados com a literatura pois foram utilizadas escalas diferentes de determinação dos graus de pureza.

3.3 Obtenção de filmes com serragem de couro ao cromo digerida

Os filmes com serragem de couro ao cromo digerida, formaldeído e polietilenoglicol não secaram completamente à temperatura ambiente, apresentando pouca resistência ao manuseio, sem flexibilidade. Ao serem colocados em estufa à 60°C durante 24 horas, formou-se um filme quebradiço, fortemente aderido à lâmina de acetato, o que impossibilitou a realização de ensaios mecânicos.

Foram testadas várias formulações com solução de serragem de couro ao cromo digerida e formaldeído com adição de variadas concentrações de glicerol. O filme obtido a partir de 25 g de serragem de couro ao cromo digerida, formaldeído 2% e glicerol 10 % apresentado na FIGURA 10, apresentou-se manuseável, com maior resistência, facilmente removível da lâmina de acetato e com boa flexibilidade.



Figura 10 - Filme – (10 % glicerol, 2 % formaldeído).

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

A este filme foi adicionado pó de serragem de couro ao cromo, porém esta adição não possibilitou a obtenção de filmes manuseáveis com o plastificante utilizado, sendo que a solução filmogênica depositada sobre as lâminas de acetato não secou a temperatura ambiente.

3.3.1 Avaliação das propriedades mecânicas de tração e resistência ao impacto

Foram avaliadas as propriedades mecânicas de tração e de resistência ao impacto das amostras do filme. A metodologia empregada para a obtenção dos filmes mostrou-se adequada considerando o estado físico da formulação, mas causou problemas quando à espessura do filme obtido, fazendo com que não fosse alcançada a homogeneidade neste parâmetro para uma mesma amostra. A espessura média dos filmes utilizados no ensaio de tração foi de 0,40 mm.

Os resultados obtidos através do ensaio de tração são apresentados na TABELA 5.

Tabela 5 – Resultados do ensaio de tração do filme

<i>Parâmetro</i>	<i>Deformação</i>	<i>Def. Espec.</i>	<i>Módulo de Elasticidade</i>	<i>Força Máx</i>	<i>Tensão Máx</i>	<i>Tensão Ruptura</i>
<i>Unidade</i>	<i>(mm)</i>	<i>(%)</i>	<i>(MPa)</i>	<i>(N)</i>	<i>(MPa)</i>	<i>(MPa)</i>
Média	33,6±4,7	26,9±2,12	13,7±4,0	13,2±1,4	1,3±0,14	1,1±0,36

Fonte: Tabela elaborada pela autora

O valor relativamente baixo do módulo de elasticidade confirma a característica de pouca rigidez de blendas com colágeno encontradas na literatura. No estudo realizado por TONHI & PLEPIS (2002), em blendas de colágeno e quitosana, o

módulo de elasticidade da blenda aumentou com a redução do teor de colágeno puro cujo módulo de elasticidade é de 39 MPa.

Nos parâmetros de resistência à tração e de deformação específica na ruptura foram obtidos valores menores dos que os apresentados em artigos sobre blendas com colágeno. Porém nestes trabalhos a quantidade de colágeno utilizada nas blendas foi menor do que a contida na amostra, assim, a quantidade de colágeno contido na serragem de couro ao cromo utilizada na formulação do filme foi um dos fatores determinantes nas propriedades de tração. Neste contexto, ALEXY et al. (2003) encontraram que em blendas de colágeno com polivinil álcool (PVA), a adição de colágeno nos percentuais de 10, 20 e 25 % originou valores da resistência à tração de 24,1 MPa, 22,4 MPa e 16,1 MPa, e valores de deformação à ruptura de 460, 523 e 567 % respectivamente, comprovando que a adição de colágeno levou à diminuição das propriedades avaliadas devendo ser levado em consideração também a presença de PVA na composição da blenda.

O valor de deformação na ruptura de 26,9 % é mais elevado que o encontrado por SOBRAL et al., (2004) em estudo realizado com biofilmes de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo, fazendo com que se tenha obtido um filme com características menos frágeis. Naquele estudo, foi constatado que com adição de glicerol à solução filmogênica em concentrações de 30 % e 70 % ocorreu um aumento da deformação na ruptura de 2,71 % para 7,50 % (SOBRAL et al., 2004)

A resistência à tração de 13,2 N é consideravelmente maior do que o filme avaliado por SOBRAL et al. (2000), que apresentou valores da resistência à tração de 6,67 N, 4,65 N e 2,94 N com acréscimo de glicerol nas concentrações de 30, 50 e 70 %, respectivamente.

A partir da comparação dos valores encontrados por ZHAND & LI & SHI (2005) para filmes de colágeno (58 N de resistência à tração e de 7 % de deformação na ruptura), os valores aqui encontrados no filme de serragem de couro ao cromo para resistência à tração (13,2 N) e de deformação na ruptura (26,9 %) relacionam a importância da adição de glicerol no filme com o aumento da deformação na ruptura e diminuição da resistência á tração.

Na FIGURA 11 são apresentados os corpos de prova após o ensaio, onde se observou a ocorrência do rompimento praticamente retilíneo no material, não apresentando deformação plástica visível como no caso dos polímeros termoplásticos.

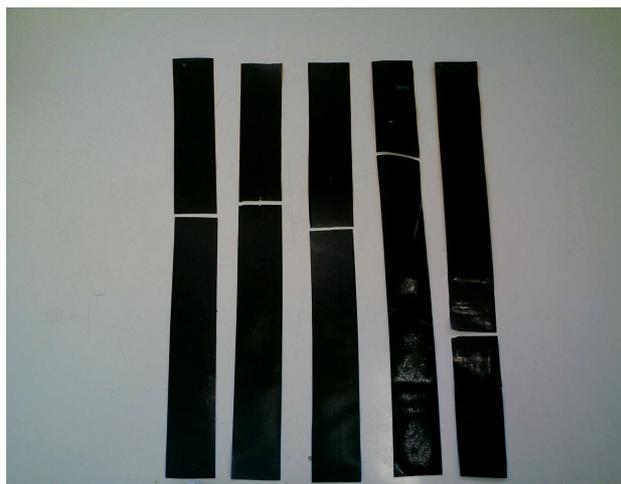


Figura 11 – Corpos de prova após o ensaio de tração, apresentando ruptura frágil.

Fonte: registro fotográfico da autora, 2007.

Deve-se considerar que os valores baixos de resistência à tração não indicam que este material não possa ser utilizado, mas que pode ser aplicado onde este tipo de propriedade não seja determinante. Ainda, pode-se prever uma diminuição do percentual de colágeno na formulação, fazendo com que a propriedade de resistência à tração aumente.

Os corpos de prova utilizados para o ensaio de resistência ao impacto apresentaram espessura muito variável, conforme já exposto. Os resultados, apresentados na TABELA 6, indicaram que a resistência dos filmes (não rompimento limite) ocorreu para o dardo de peso de 900 g não sendo testados pesos entre este valor e 1.000g. Assim, foi inferido que o filme apresentou resistência ao impacto para pesos entre 900g e 1.000g. Um fator importante que pode também ter influenciado os resultados foi a possibilidade de absorção de umidade pelo filme.

Tabela 6 – Resultado do ensaio de impacto *Dard Drop*

Corpos de Prova	Espessura média (mm)	Peso do dardo (mg)							
		1730	1670	1610	1520	1460	1100	1050	900
CP1	0,48	R	*	*	*	*	*	*	*
CP2	0,43	*	R	*	*	*	*	*	*
CP3	0,58	*	*	R	*	*	*	*	*
CP4	0,48	*	*	R	*	*	*	*	*
CP5	0,55	*	*	*	*	R	*	*	*
CP6	0,6	*	*	*	R	*	*	*	*
CP7	0,36	*	*	*	*	*	R	*	*

CP8	0,38	*	*	*	*	*	R	*	*
CP9	0,33	*	*	*	*	*	*	R	*

R: rompeu; * não rompeu

Fonte: tabela elaborada pela autora a partir de dados obtidos no ensaio de impacto realizado.

A FIGURA 12 apresenta as curvas Força X Deformação do ensaio de tração. Observa-se um comportamento inicial linear correspondente a fase elástica do escoamento seguida da fase plástica para a posterior ruptura do corpo de prova.

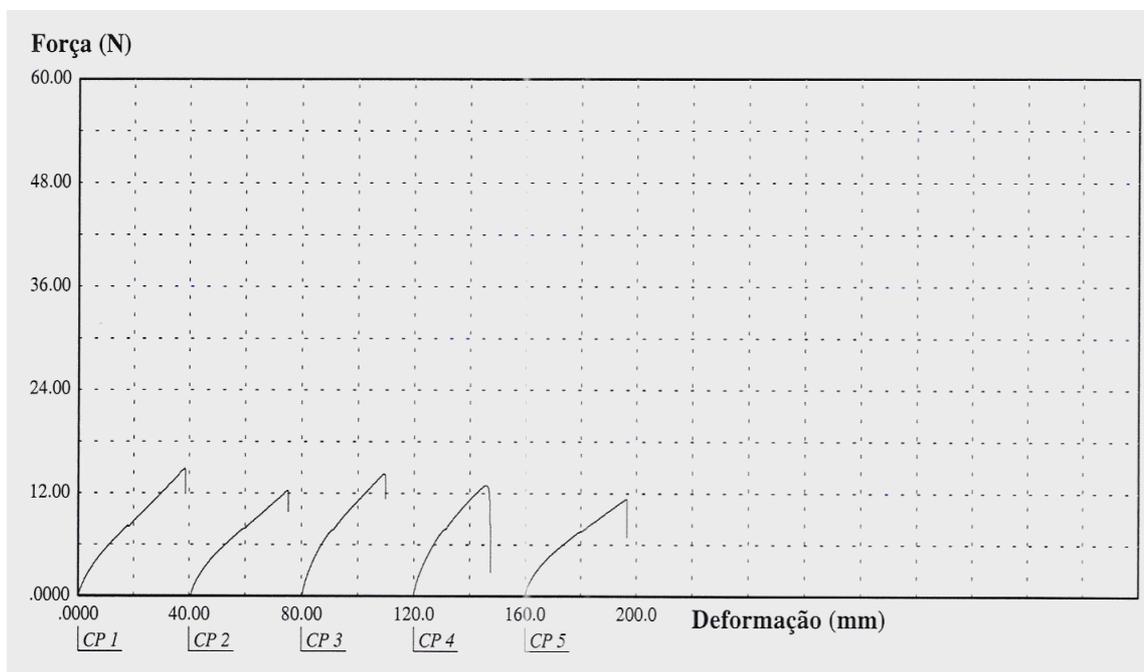


Figura 12 - Curvas de deformação do filme no ensaio de resistência à tração com célula de carga + 500KgF e velocidade de ensaio = 10 mm/min

Fonte: Relatório de ensaio – Laboratório de Materiais – UNISC

A presença do plastificante diminui as interações da proteína aumentando a mobilidade das cadeias polipeptídicas tornando os filmes menos resistentes e mais elásticos (SOBRAL et al., 2004). Entretanto a presença de cromo aumenta as interações iônicas com as cadeias de colágeno levando a um material mais resistente à tração semelhante o que ocorre no couro (HOINACKI, 1989).

A FIGURA 13 apresenta possíveis mecanismos de organização molecular dos filmes em relação à presença de formaldeído, glicerol e cromo no filme de serragem de couro ao cromo digerida.

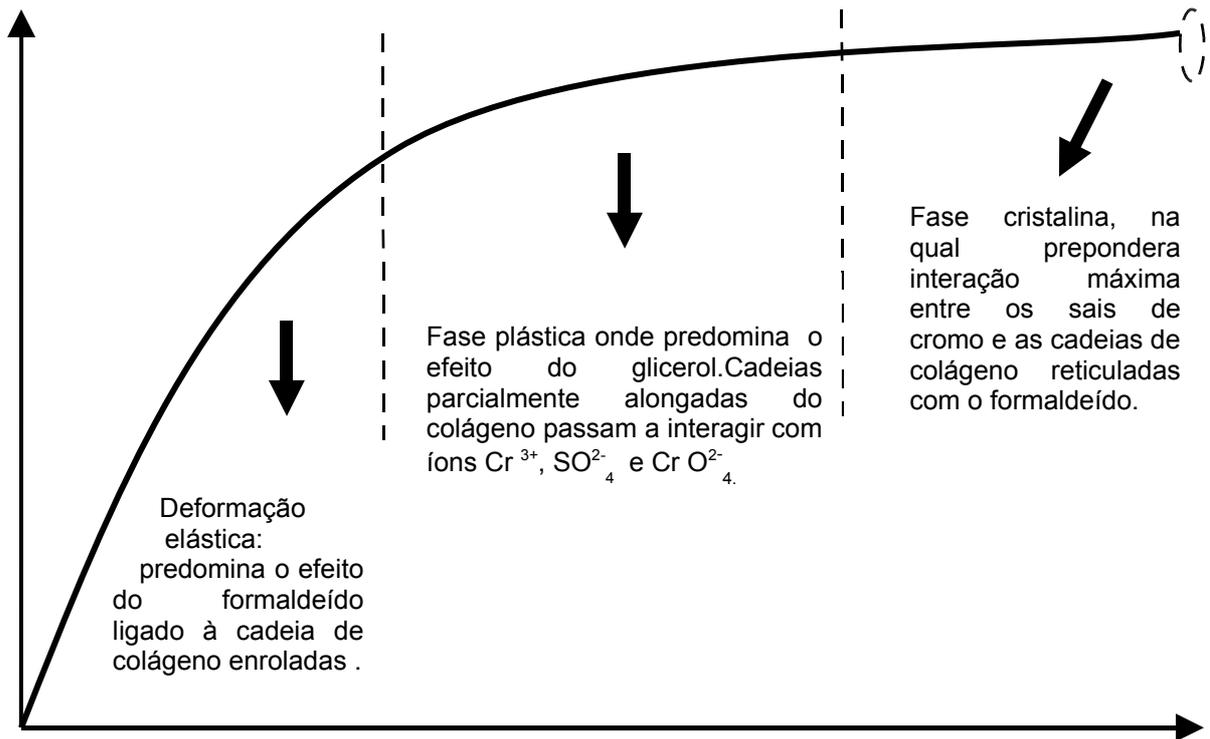


Figura 13 – Possíveis mecanismos de organização molecular dos filmes de formulados com serragem de couro ao cromo digerida com glicerol e formaldeído

Fonte: esquema elaborado pela autora, 2007.

Na composição do filme avaliado a adição de 10 % de glicerol vem de encontro ao que já está publicado, pois na área médica são usados filmes com colágeno que utilizam preferencialmente glicerol para melhorar a flexibilidade do filme usado com adesivo de feridas US PATENTS 54182222. Também na área de alimentos, são utilizados biofilmes para embutidos de carne que são constituídos de colágeno com adição de 17 % de glicerol e para diminuir a rigidez estruturas típica de filmes de colágeno são adicionados produtos oleosos à composição (US PATENTS 5885634). Entretanto o filme obtido a partir da serragem de couro contém cromo, portanto sua utilização na área médica e na área de alimentos não é viável, necessitando então do estudo de sua aplicabilidade.

3.3.2 Avaliação do filme quanto à absorção de água

No ensaio da avaliação do filme quanto à absorção de água foi constatado que o teor de absorção de água do filme em 45 % na primeira hora de imersão em água. Ao final de 24 horas o filme apresentou teor de absorção de 47 %.

Os resultados obtidos por Tonhi & Plepis (2002) apontam que filmes obtidos com colágeno apresentam um teor de absorção de em torno de 78 % após 20 horas de imersão em água..

A absorção de água é considerado um fator importante na biodegradabilidade pois os fungos, como todos os seres vivos, necessitam da água para realizar o metabolismo.

3.4 Biodegradação

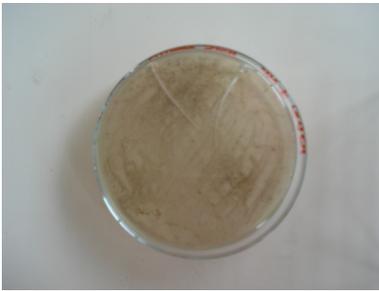
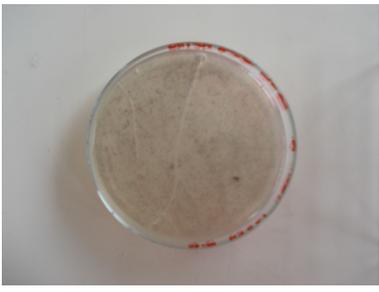
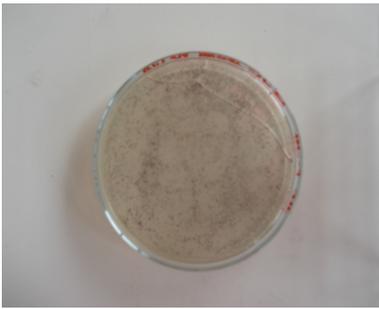
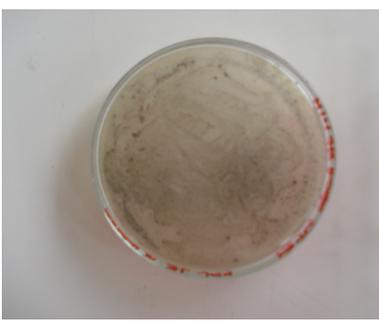
3.4.1 Biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e do filme de serragem de couro ao cromo digerida

As placas incubadas com amostras de fungos *Aspergillus* sp. após o tempo de incubação, foram avaliadas quanto aos padrões de assimilação, que incluem crescimento(C) e esporulação (E) do fungo nas placas.

Em ambiente favorável os fungos se desenvolvem e crescem em forma de hifas formando uma massa filamentosa chamada de micélio, facilmente observável nas placas. O micélio pode ser vegetativo e reprodutor. No micélio reprodutor, as hifas reprodutivas ou aéreas se projetam acima da superfície sobre a qual o fungo está crescendo sustentando os esporos reprodutivos de cores variadas (TORTORA & FUNKE & CASE, 2003).

As TABELAS 7 e 8 apresentam os padrões de assimilação de serragem de couro ao cromo digerida (SCD) e de filme de serragem de couro ao cromo digerida (FSCD), observados após o tempo de incubação de 7 dias à 30 °C.

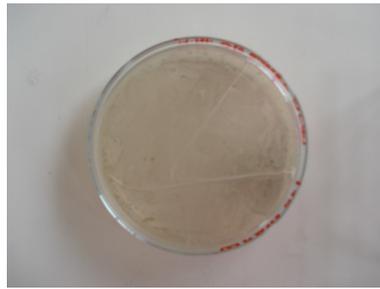
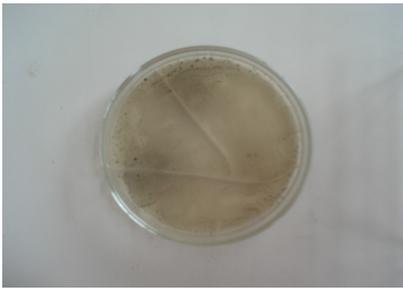
Tabela 7: Padrões de assimilação de serragem de couro ao cromo digerida (SCD)

<i>Amostra (reverso)</i>	<i>Amostra (verso)</i>	<i>SCD</i>
		<i>Aspergillus</i> 10 I – G C – completo E – completo, maior sobre o ponto de aplicação da SCD
		<i>Aspergillus</i> 2A – G C – completo E – completo
		<i>Aspergillus</i> C1-III C – completo E – completo
		<i>Aspergillus</i> FSC-TE-2 C – completo E – completo, maior em torno da amostra

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

SCD



Aspergillus L15

C – completo

E – completo e maior no contorno da amostra



Aspergillus 12

C – completo

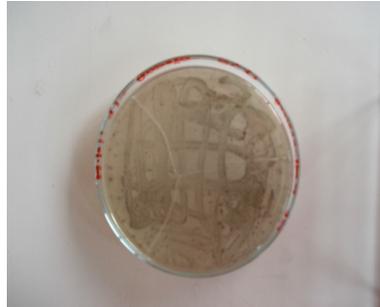
E – completo



Aspergillus 13

C – completo

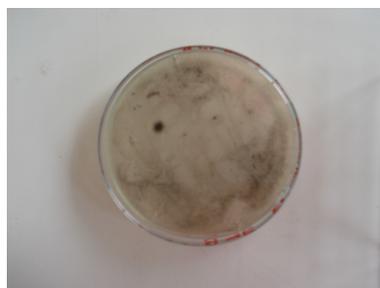
E – completo



Aspergillus 14

C – completo

E – completo, maior no contorno da amostra



Aspergillus 15

C – completo, maior sobre o contorno da amostra

E – completo, maior sobre o contorno da amostra

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

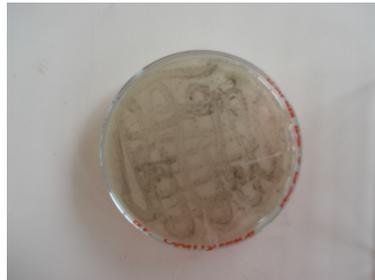
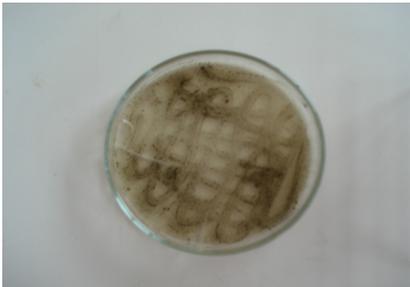
SCD



Aspergillus 17

C – completo

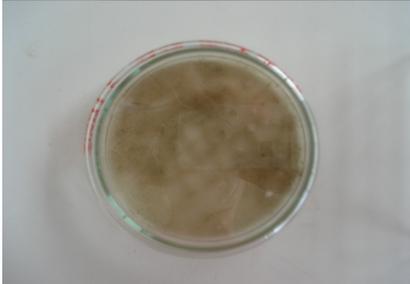
E – completo maior sobre o contorno da amostra.



Aspergillus 18

C – completo

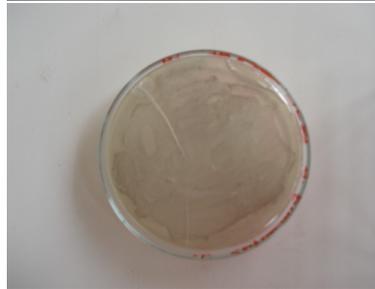
E – completo



A. flavus

C – completo

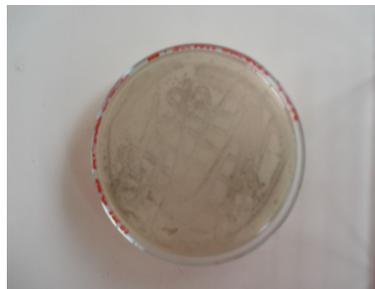
E – completo



A. fumigatus USP2

C – completo

E – completo



A. fumigatus USP174

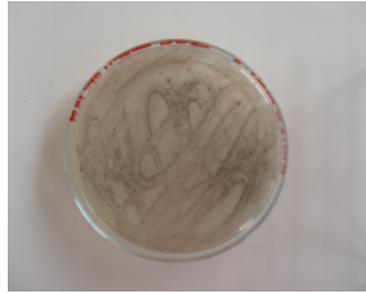
C – completo

E – completo

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

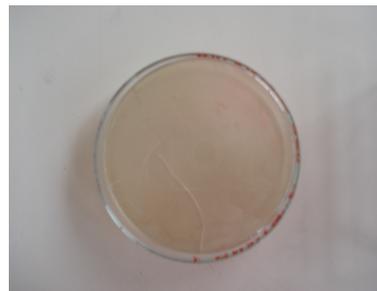
SCD



A. parasiticus

C – completo

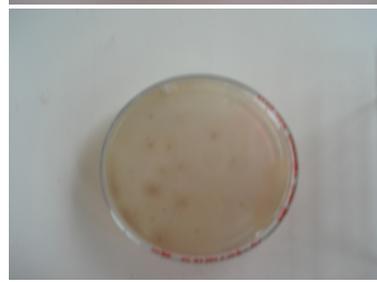
E – completo



A. terreus USP1

C – completo

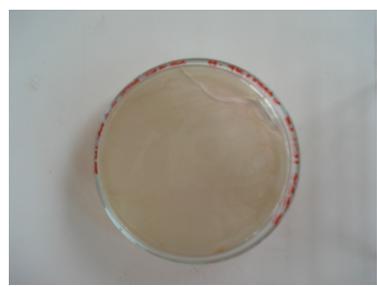
E – completo



A. terreus USP2

C – completo

E - completo



A. terreus CMMI233-3

C – completo

E - completo



A. niger AM-1

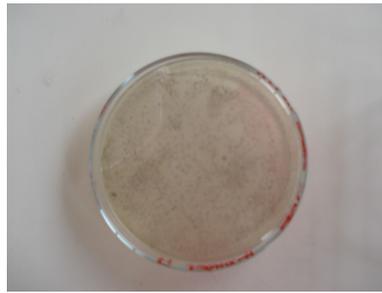
C – completo maior entre os pontos de aplicação.

E – completo, maior sobre os pontos de aplicação de SCD

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

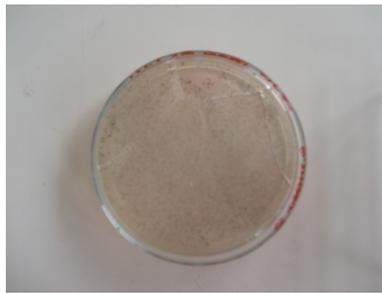
SCD



A. niger 4

C- completo

E- completo, mais intenso sobre os pontos de aplicação de SCD



A. niger USP9

C – completo

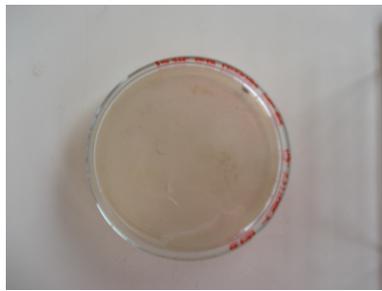
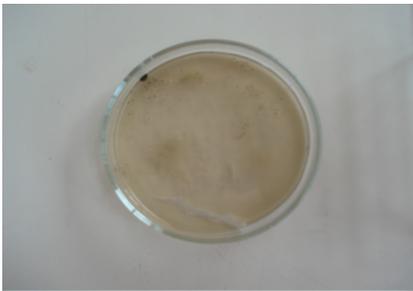
E – completo



A. niger USP336

C – completo

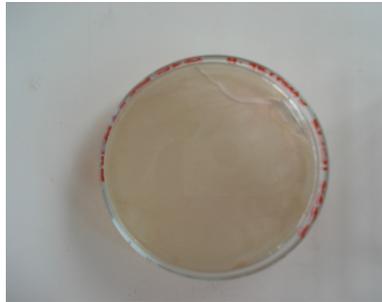
E – no contorno da amostra



A. niger USP898

C- completo

E- completo



A. niger CMMI

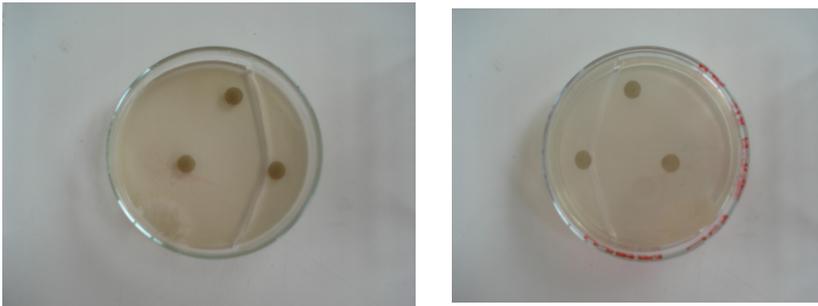
C- completo

E- completo

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

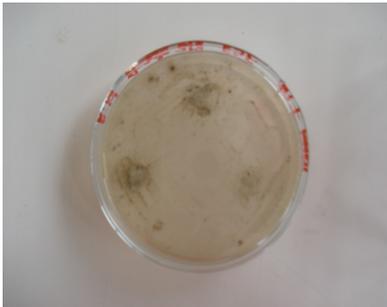
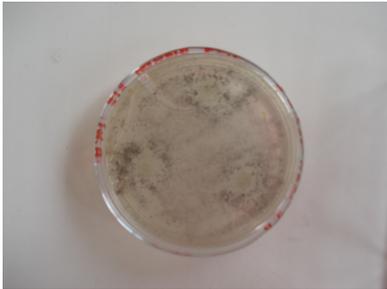
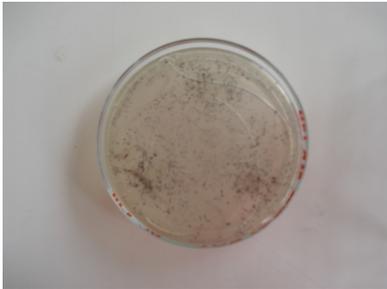
SCD



Branco
 Não foi observado
 crescimento fúngico

Fonte: tabela elaborada pela autora.

Tabela 8: Padrões de assimilação de filme de serragem de couro ao cromo digerida (FSCD).

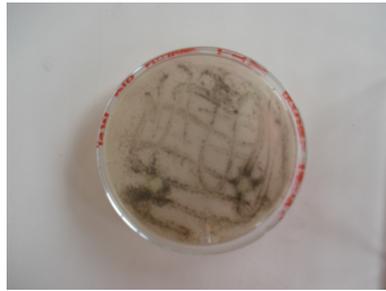
<i>Amostra (reverso)</i>	<i>Amostra (verso)</i>	<i>FSCD</i>
		<i>Aspergillus 10 I – G</i> C – completo E – completo, maior sobre os filmes
		<i>Aspergillus 2A – G</i> C – entre os discos E – entre os discos, maior em torno das amostras
		<i>Aspergillus C1-III</i> C – completo E – completo, maior em torno do filme
<i>Amostra (reverso)</i>	<i>Amostra (verso)</i>	<i>FSCD</i>



Aspergillus AB6 (2) I

C – completo, maior no contorno do filme

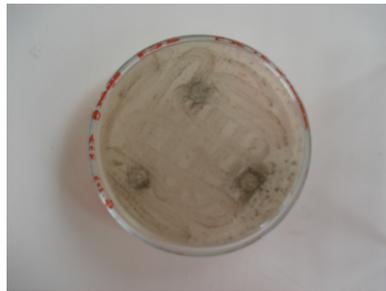
E – sobre as amostras de filme



Aspergillus A1

C – completo, maior sobre o filme

E – completo, maior sobre o filme



Aspergillus FSC-TE-2

C – completo

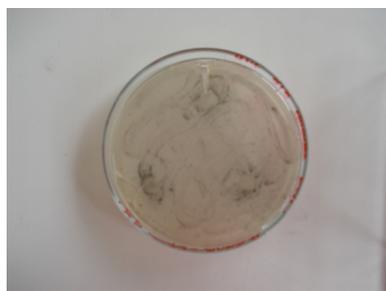
E – completo, maior no contorno do filme



Aspergillus L15

C - completo

E – completo, principalmente no contorno do filme



Aspergillus 12

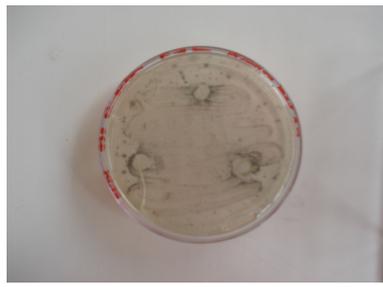
C – completo

E - completo, maior no contorno do filme

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

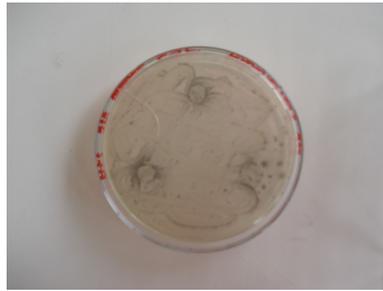
FSCD



Aspergillus 13

C – completo

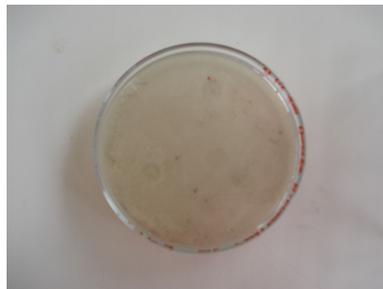
E – completo, maior no
torno do filme



Aspergillus 14

C – completo

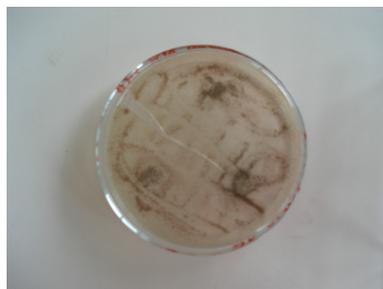
E – completo, maior em
contorno do filme



Aspergillus 15

C - completo

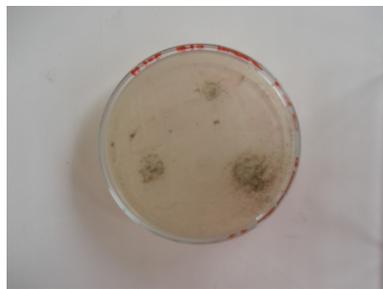
E - completo



Aspergillus 16

C - completo

E - completo, maior sobre
o contorno do filme



Aspergillus 17

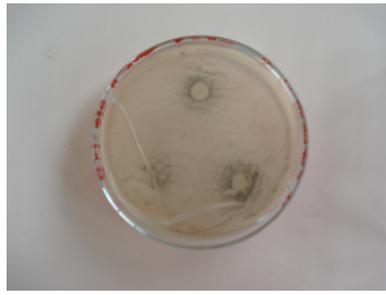
C - completo

E - completo, maior
sobre o filme

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

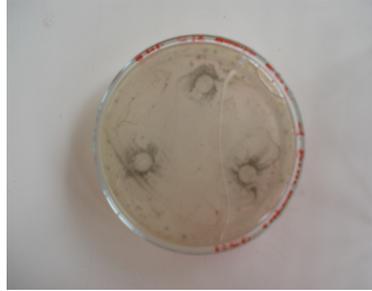
FSCD



A. fumigatus USP 2

C – completo

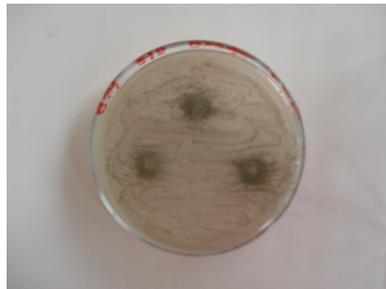
E – completo, maior em torno do filme



A. fumigatus USP174

C – completo

E – completo, maior em torno do filme



A. parasiticus

C – completo

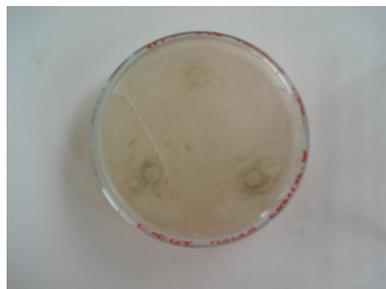
E – completo maior em torno do filme



A. terreus USP1

C – completo

E – completo, porém não observado sobre o filme



A. terreus CMMI 233-3

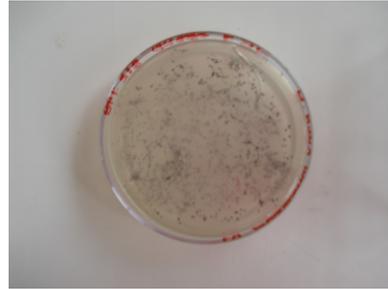
C – completo, maior em torno da amostra

E – completo, maior em torno da amostra

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

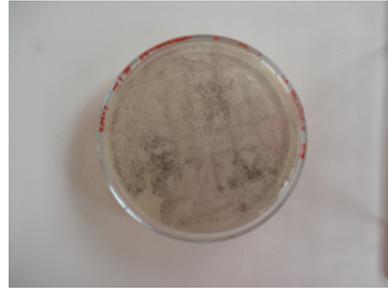
FSCD



A. niger AM-1

C – completo, maior em torno do filme

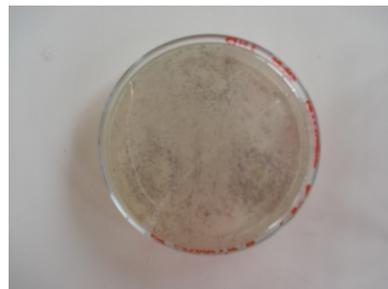
E – completo, maior em torno do filme



A. niger USP4

C – completo

E – completo, maior no contorno das amostras



A. niger USP9

C – completo

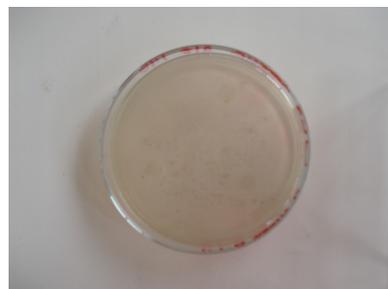
E – completo e maior no contorno da amostra



A. niger USP336

C – completo, maior sobre a amostra

E – completo, maior sobre a amostra



A. niger USP898

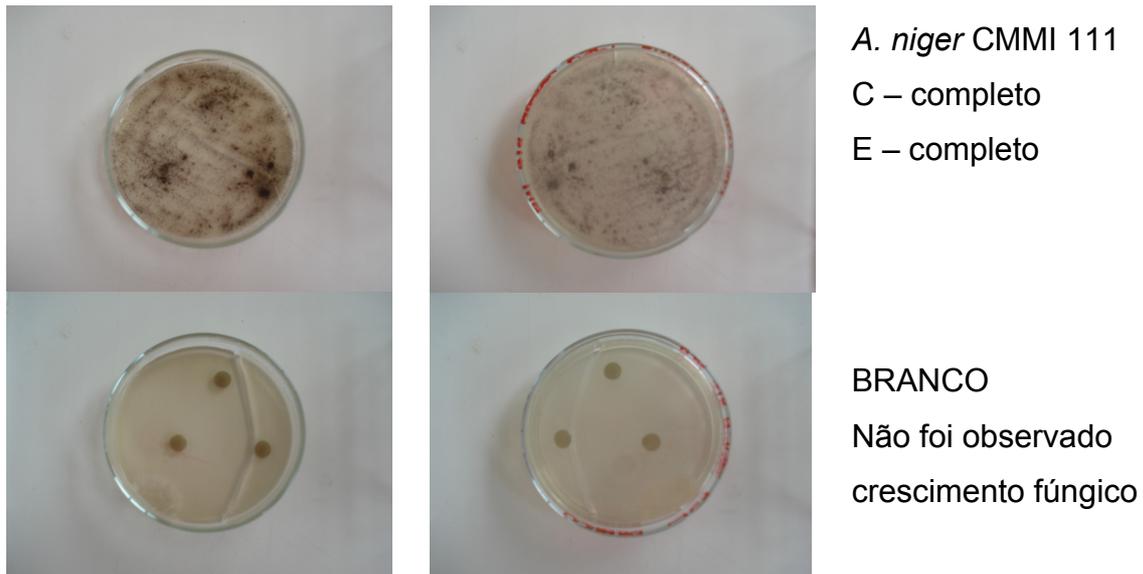
C - completo

E – completo

Amostra (reverso)

Amostra (verso)

FSCD



Fonte: tabela elaborada pela autora.

Os resultados das TABELAS 7 e 8 demonstram que após o período de incubação foram observados diferentes padrões de crescimento fúngico em todas as placas incubadas com *Aspergillus* sp.

A esporulação de *A. terreus* CMMI 233-3 ocorreu apenas em torno da amostra SCD e poucos esporos foram observados sobre amostras de FSCD. Nas placas inoculadas com *A. niger* 336 e *Aspergillus* 14 a esporulação ocorreu sobre as amostras de SCD e somente no contorno das amostras de FSCD; da mesma forma *Aspergillus* FSC TE2 apresentou esporulação completa na placa com SCD e apenas no contorno da amostra de FSC. A esporulação dos fungos ocorreu de maneira completa nas demais placas avaliadas

Os fungos utilizam uma grande variedade de substâncias obtidas do ambiente para seu crescimento, que incluem macromoléculas solúveis ou insolúveis. Polissacarídeos, proteínas, lignina, lipídios, dentre outros, precisam ser reduzidos de tamanho e atingir a solubilidade para serem absorvidos em forma de nutrientes pela membrana plasmática dos fungos. Para tanto os fungos secretam enzimas especiais para degradar estas macromoléculas. São as amilases, esterases, peroxidases, proteases, dentre outras (PUTSKE & PUTSKE, 2002; TORTORA & FUNKE & CASE, 2003). Considerando esta característica, é possível relacionar que no ensaio de biodegradação realizado, o crescimento fúngico ocorreu pela ação da enzima protease sobre o colágeno íntegro ou parcialmente hidrolisado presente na serragem de couro ao cromo digerida que, ao ser degradado foi utilizado como

nutriente pelos fungos para promover seu crescimento (SUKHISYOROVA et al., 2003). A utilização de proteases ácidas de *A. oryzae*, *A. saitoi* ou de *A. parasiticus* já foi proposto para degradação de resíduos de curtumes em meio de pH ótimo entre 3 a 6 conforme Patente US 4210721.

A capacidade de segregar proteases também está presente em *A. fumigatus*, quando cultivados na presença de colágeno sendo este a fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento, com máxima atividade proteolítica em pH 9. A enzima produzida e encontrada no sobrenadante foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e filtração por eletroforese em gel (MONOD et al., 1991).

A eficiência de *Aspergillus* sp. na degradação da serragem de couro ao cromo digerida e dos filmes de serragem de couro ao cromo digerida pode estar relacionado com os metabólitos secundários derivados do metabolismo dos açúcares como o ácido kójico e glucorônico ou de um metabólito diretamente de compostos que participam do ciclo do TCA como o ácido oxálico (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; RUIJTER, G. J. & VONVERVOORT, P. J. & VISSER, J. 1999; PUTSKE & PUTSKE, 2002)

A esporulação nas placas com filmes de serragem de couro ao cromo digerida, inoculadas por fungos *Aspergillus* sp., com exceção das amostras com *A. niger* AM 1 e *A. niger* USP898, foi mais intensa em torno dos filmes. Este fato pode ser relacionado com a presença de glicerol na formulação do filme e no metabolismo primário os fungos que apresentam como a maior parte dos lipídios produzidos, triglicerídios e seus ácidos graxos. Os lipídios podem ser usados como fonte de energia pelos fungos, sendo os triglicerídios hidrolisados por lipases, liberando glicerol e os ácidos graxos. O glicerol, após fosforilizado e oxidado, pode entrar no processo glicolítico. Pode-se então fazer a relação de que os fungos utilizaram o glicerol presente no filme como uma fonte de energia durante o seu crescimento e esporulação. (TEIXEIRA & FILHO & DURAN, 2000; PUTSKE & PUTSKE (2002); TORTORA & FUNKE & CASE, 2003).

O cromo presente na solução serragem de couro ao cromo digerida e no filme de serragem de couro ao cromo digerida não impediu o crescimento de *Aspergillus* sp. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores que comprovaram a capacidade de amostras de *Aspergillus* sp. na remoção de metais pesados tais como cádmio, chumbo, níquel e cromo de efluentes. Estudos indicam que *A. niger* em condições favoráveis de pH, temperatura, tipo e

concentração de nutrientes apresenta maior capacidade de remoção de cromo em efluente da indústria de couro. (KAPOOR & VIRARAGHAVAN & CULLIMORE 1999; PRASAD & FREITAS, 2000; SEPEHR et al., 2005).

Cabe ressaltar que a presença de formol na formulação não compromete a sua biodegradabilidade, pois em alguns resíduos de formol ligados a fontes de nitrogênio facilmente absorvíveis como uréia tem se verificado que alguns fungos geofílicos podem degradar estes resíduos liberando a fonte de nitrogênio e o formol é oxidado a ácidos orgânicos (JAHNS, T & KALTWASSER, H., 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As preocupações que visam minimizar os efeitos antrópicos sobre o ambiente são constantemente discutidas nos mais diversos setores da sociedade. As pesquisas de novas tecnologias tornam-se importantes aliados na prevenção, remediação e minimização de agressões ao ambiente. Neste contexto, os estudos sobre o reaproveitamento e a biorremediação de resíduos provenientes dos processos industriais e das atividades humanas são amplamente desenvolvidos.

O presente trabalho avaliou a possibilidade da reutilização da serragem de couro ao cromo, um resíduo de curtume. A serragem de couro ao cromo foi digerida em solução de ácido oxálico 10% num tempo de 45 min à 100°C. A purificação de colágeno realizada com o método de precipitação, utilizando sulfato de amônio 40% mostrou-se viável, entretanto o colágeno obtido ainda apresenta cromo residual em sua composição. Este problema pode ser minimizado com o aumento das etapas de precipitação-solubilização do colágeno.

A serragem de couro ao cromo digerida foi utilizada na obtenção de um filme com a formulação de glicerol 10 % e formaldeído 2 %. No ensaio de resistência à tração foram observados valores para resistência à tração de 13,2 N e de deformação na ruptura de 26,9 %.

Os possíveis mecanismos de organização molecular dos filmes em relação à presença de formaldeído, glicerol e cromo no filme de serragem de couro ao cromo digerida foram descritos como segue. Na deformação elástica predomina o efeito do formaldeído ligado à cadeia de colágeno enroladas. Na fase plástica onde predomina o efeito do glicerol e as cadeias parcialmente alongadas do colágeno passam a interagir com íons Cr^{3+} , SO_4^{2-} e CrO_4^{2-} . Na fase cristalina prepondera a interação máxima entre os sais de cromo e as cadeias de colágeno reticuladas com o formaldeído.

O filme apresentou um teor máximo de Absorção de água de 47% em 24 horas e atingindo 45% na primeira hora do ensaio.

A biodegradação é um recurso importante na remediação de agentes poluidores e a utilização de *Aspergillus* sp. contribui nesta forma de biorremediação de poluentes.

Nos ensaios de biodegradação da serragem de couro ao cromo digerida e dos filmes formulados a partir da serragem de couro ao cromo digerida, foi observado crescimento e esporulação das amostras de fungos *Aspergillus* sp nas placas. Os resultados mostraram a eficiência do *Aspergillus* sp. na degradação da serragem de couro ao cromo digerida em presença de cromo e da mesma forma na degradação dos filmes com presença de glicerol e formaldeído na formulação

O presente trabalho vem de encontro às preocupações da Tecnologia Ambiental. Ao propor a obtenção de um novo material com a serragem de couro ao cromo digerida, possibilita-se a reutilização de um resíduo altamente tóxico proveniente de um processo industrial. Além disso, houve a preocupação em avaliar a biodegradabilidade deste novo material, que depois de esgotada a sua utilização pode ser degradado por fungos e reincorporado ao ambiente tornando-se integrante do ciclo de nutrientes.

Cabe ressaltar que as pesquisas relacionadas com o filme obtido com a serragem de couro ao cromo digerida estão apenas na fase inicial. Propõe-se futuros estudos relacionados com as concentrações dos componentes do filme, bem como a otimização do processo de elaboração do filme e indicação de possibilidades da aplicabilidade do filme elaborado como, por exemplo, na própria indústria do couro.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. T. W. et al. Environmental and safety issues – clean technology and environmental auditing. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, n. 76(1), p. 17-23, 1991.

ALEXY, P. et al. Poly(vinyl alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends: I. Experimental design optimization and biodegradation behavior. *Polymer Testing*, v. 22, p. 801-809, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18^o ed. Washington, 1992.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D 570. Standard Test Method for Water Absorption of Plastics.

_____. ASTM D1709: Standard text methods for impact resistance of plastic film by the free-falling dart method.

_____. ASTM D882-90: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting.

ASSADI, M. M.; JAHANGIRI, M. R. Textile wastewater treatment by *Aspergillus niger*. *Desalination*, v. 141, n. 1, p. 1-6, dec./2001.

BAHILLO, A. et al. Thermal valorization of footwear leather wastes in bubbling fluidized bed combustion. *Waste management*, v. 24, n. 9, p. 935-944, 2004.

BAILEY, A. J.; PAUL, R. G. Collagen – is not so simple protein. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, n. 82, p. 104, 1998.

BAJZA, Z.; VRCEK, V. Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste. *Waste Management*, v. 21, n. 1, p. 79-84, 2001.

BARROS, M. A. S. D.; ARROYO, P. A.; SOUZA-AGUIAR, E. F. et al. Problemas ambientais com soluções analíticas. Ciência e Tecnologia para el Desarrollo. 1. ed. Madrid, Espanha.

BENEDICT, C. V. et al. Fungal degradation of polycaprolactones. *Journal of Applied Polymer Science*, New York, v. 28, p. 327-334, 1983.

BERRY, F. J.; CONSTANTINI, N.; SMART, L. E. Synthesis of chromium-containing pigments from chromium recovered from leather waste. *Waste Management*, v. 22, n. 7, p. 761-772, 2002.

BROWN, E. M.; TAYLOR, M. M.; MARMER, W. N. Production and potential uses of co-products from solid tannery waste. *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, v. 91, n. 10, p. 270-276, 1996.

CABEZA, L. F. et al. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium. *Waste Management*, v. 18, n. 3, p. 211-218, 1998.

CASCONE, M. G. et al. Dehydrothermally cross-linked collagen-poly(vinyl alcohol) blends: mechanical, biological and surface properties. *J. Mater. Sci. Med.*, v. 7, n. 6, p. 297-300, 1997.

CASSANO, A. et al. Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane process. *Journal of Membrane Science*, v. 181, n. 1, p. 111-126, 2001.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Program of Polymer Science*. London, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. "Environmentally Degradable Polymers and Plastics. An Overview", in: Anais do International Workshop on Environmentally Degradable and Recyclable Polymers in Latin America, Campinas, SP, p. 15-20, nov./1998.

CLAAS, I. C.; MAIA, R. A. M. *Manual básico de resíduos industriais de curtume*. Porto Alegre: SENAI/RS, 1994. 664 p.

COOMBOSA, A.G.A. et al. Biocomposites of non-crosslinked natural and synthetic polymers. *Biomaterials* v. 23, p. 2113-2118, 2002

COUPLAND, J. N. et al. Modeling the Effect of Glycerol on the Moisture Sorption Behavior of Whey Protein Edible Films. *Journal of Food Engineering*, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2000.

CUQ, B. et al. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, v. 60, p. 1369-1374, 1997.

DASCALU, M. C. et al. On the compatibility of low density polyethylene/hydrolyzed collagen blends. II: New compatibilizers. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1391-1402, 2005.

DULLIUS, C. H. *Utilização de fungos para biodegradação de corantes têxteis sintéticos*. 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, 2004.

ERDEM, Mehmet. Chromium recovery from chrome shaving generated in tanning process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 126, n. 1-3, p. 143-146, 2005.

FABIANI, C. et al. Synthesis of chromium-containing pigments from chromium recovered from leather waste. *Waste Management*, v. 22, p. 761-772, 2002.

FIELD J. A. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 7, p. 2219-2226, 1992.

FRANK J. et al, Synthesis of chromium-containing pigments from chromium recovered from leather waste. *Waste Management* . v. 22 761-772, 2002.

FUJIKAWA, Emílio Shizuo. *Incorporação do Resíduo “Serragem de couro ao cromo” em materiais de Construção Civil*. 2002. 92 f. Dissertação (Faculdade de Engenharia Industrial) - Universidade Estadual de São Paulo, Bauru, 2002.

FU Y; VIRARAGHAVAN T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 2, p. 139-145, 2002.

GARCIA, G. et al. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, Córdoba, v. 35, p.751–758, 2000.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v. 58, p.206-211, 1993.

GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2005. Disponível em: <<http://www.guiado-calçado.com>>. Acesso em: 25 jan.2006

HEIDEMANN, E. Disposal and recycling of chrome-tanned materials. *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, v. 86, n. 9, p. 331-333, 1991.

HOFFMANN, J. et al. Assessing biodegradability of plastics based on poly(vinyl alcohol) and protein wastes. *Polymer Degradation Stability*, v. 79, p. 511-519, 2003

HOINACKI, Eugênio. *Peles e couros – Origem, Defeitos e Industrialização*. 2 ed. Porto Alegre: Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 1989. 319 p.

HUANG, J. C.; SHETTY A. S.; E WANG, M. S. Biodegradable plastics. A review, *Advances in Polymer Technology. Adv. Polym. Technol.*, v. 10(1), p. 23-30, 1990.

HWANG, J. H. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoi*). *Food Chemistry* xxx, 2005.

JAHNS, T; KALTWASSER, H. Mechanism of Microbial Degradation of Slow-Release. *Fertilizers [Journal of Polymers and the Environment](#)*, v 8, p 11-18, 2000.

JIANLONG, W. et al. Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 273–277, 2001.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. *Bioresource Technology*, Essex, v. 53, n.3, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. *Bioresource Technology*., Essex, v. 70, n. 1, p. 95-104, 1999.

KRUPP, L. R.; JEWELL, W. J. Biodegradability of modified plastics films in controlled biological environment. *Environmental Science & Technology*, Easton, v. 26, p. 193-198, 1992.

LUNGU, M. et al. Increasing biocompatibility of synthetic polymers for medical use by compounding with collagen. *Roman Biotechnol Lett*, v. 2, p. 153-161, 1998.

MARTINES, M. A. *Impacto do lodo de curtumes nos atributos biológicos e químicos do solo*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 74 p. 2005.

MEGAERT, J. et al. Microbial degradation of poly-3-hydroxybutyrate and 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, V.8, p. 3233, 1996.

MEZZANOTTE, V. et al. Influence of inocula on the results of biodegradation tests. *Polymer Degradation and Stability*, v. 87, p. 51-56, 2005.

MONOD, I.M. et al. Isolation and characterisation of extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *Society for General Microbiology*, v.35 n 1, p. 23-28, 1991

MU, C. et al. Towards zero discharge of chromium leather waste through improved alkali hydrolysis. *Waste Management*, n. 23, p. 835-843, 2003.

ORÉFICE, R. L.; VASCONCELOS, W. L.; MORAES, M. A. Estabilidade de fases em blendas de policarbonato-poliestireno avaliada por micro-FTIR, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. *Polímeros*, v. 14, n. 2, São Carlos, abr./jun.2004.

PALANISAMY, T. et al. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 181-188, apr/2004.

PALLU, Ana Paula de Souza. *Biossorção de Cádmio por linhagens de Aspergillus sp.* 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado – Escola Superior Luiz de Queiroz) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2006.

PRASAD, M.; FREITAS, H. Removal of toxic metals from the aqueous solution by the leaf stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (Holly Oak). *Environ. Pollut.*, v. 110, n. 2, p. 277-283, 2000.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M. L. Os reinos dos fungos. 1 ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. 829 p., v 2.

QUINTERO, E. S. M.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo para elaboração de biofilmes. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 35, n. 1, p. 179-189, jan./2000.

RAMASAMI, T.; PRASAD, B.G.S. Environmental aspects of leather processing. In: Proceedings of the 25th Leather Exposition. (Dasgupta, S., ed.). Indian Leather Technologist's Association, India. 1991. p. 43-71.

REMIÃO, J. O. R.; SIQUEIRA, A. J. S.; AZEVEDO, A. M. P. Bioquímica – Guia de aulas práticas. 1 ed. Porto Alegre. EDIPUCRS, 2003. 214 p.

REST, V.; GARRONE, M. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

ROSA, D. S.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da Biodegradação de Poli- β - (Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(capolactona) em solo compostado. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um pool de fungos. *Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 75-80, 2000.

RUIJTER, G.J.; VONDERVOORT, P.J.; VISSER, J. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: na oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 in the presence of manganese. *Microbiology*, Great Britain v. 145, p 2569-2576, 1999

SEN, M.; DASTIDAR, M. G. Biosorption of CR (VI) by resting cells of *Aspergillus* sp. *J. Environ. Health. Sci. Eng.*, v. 4, n. 1, p. 9-12, 2007.

SEPEHR, M. N. et al. Chromium bioremoval from tannery industries effluent by *Aspergillus oryzae*. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, v. 2, n. 4, p. 273-279, 2005.

SILVA, C. C. et al. Collagen-hydroxyapatite films: piezoelectric properties. *Materials Science & Engineering*, v. 86, p. 210-218, 2001.

SIMEONOVA, L. S.; DALEV, P. G. Utilization of a leather industry waste. *Waste management*, v. 16, n. 8, p. 765-769, 1997.

SIONKOWSKA, Alina. Interaction of collagen and poly(vinyl pyrrolidone) in blends. *Polymer Degradation and Stability*, v. 39, p. 2135-2140, 2003.

_____. Alina. The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, p. 305-312, 2006.

SOBRAL, P.J.A. et al. Propriedades de filmes comestíveis produzidos com diferentes concentrações de plastificantes e de proteínas do músculo de tilápia-donilo. *Pesq. Agropec. Bras.* v. 39, p. 255-262, 2004.

SOUZA, S. M. A. et al. Extração de proteínas miofibrilares de carne bovina para elaboração de filmes comestíveis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n. 4, p. 619-626, out./dez. 2004.

SUKHOSYRONA, E. A. et al. Characteristics of Collagenolytic Enzymes Secreted by Deuteromycete Fungi *Aspergillus flavus*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v.135, p. 447- 451, 2003

SWIFT, G. Directions for environmentally biodegradable polymer research. *Account of Chemical Research*, Washington, v. 26, p. 105-110, 1993.

TEIXEIRA, M.F.S; FILHO, J. & DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 31, p.286-290, 2000

TOMASI, G. et al. Enzymatic degradation bacterial poly-3-hydroxybutyrate by a depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Macromolecules*, Easton, v. 29, p. 507-513, 1996.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. de G. Obtenção e caracterização de Blendas colágeno-quitosana. *Quím. Nova*, v. 25, n. 6, São Paulo, nov./dez. 2002.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 827, 2003.

UNITED STATE PATENT Collagen film having improved extensibility, 23 março 1999 Disponível em <[http:// www.freepatentsonline.com/5885634/html](http://www.freepatentsonline.com/5885634/html)>. Acesso em: 20 set. 2007

UNITED STATE PATENT Collagen matrix/polymer film composite dressing. 27 junho 1989. Disponível em <[http:// www.freepatentsonline.com/4841962/html](http://www.freepatentsonline.com/4841962/html)>. Acesso em: 20 set. 2007

UNITED STATE PATENT. Method for dissolving collagen-containing skin tissues, 07 de Janeiro 1980. Disponível em <[http:// www.freepatentsonline.com/4210721/html](http://www.freepatentsonline.com/4210721/html)>. Acesso em: 20 set. 2007.

UNITED STATE PATENT. Multi-layered collagen film compositions for delivery of proteins and methods of using same, 23 maio 1995. Disponível em <[http:// www.freepatentsonline.com/54182222/html](http://www.freepatentsonline.com/54182222/html)>. Acesso em: 20 set. 2007

UTRACKI, L. A. Polymer Alloys and Blends: Thermodynamics and Rheology. *Hanser Publishers*, New York, p. 1-27, 1990

ZHANG Z, LI G. SHI B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, China, vol. 90, p.23, 2005.

YAKUBU, N. A.; DUDENEY, A. W. L. Biosorption of uranium with *Aspergillus niger*. Immobilization of ions by Biosorption. Chichester, UK: H.H. Eccles & S. Hunt. Ellis Horwood, p.183-200, 1986.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Characterization of whey protein emulsion films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 21, n. 2, p. 247-252, apr./jun. 2004

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)