



## **Bioprodutos de Resíduos Proteicos de Pele de Bovino**

**SIMÃO ANDRÉ DE OLIVEIRA CORDOeiro**

Novembro de 2017

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
RAMO OPTIMIZAÇÃO ENERGÉTICA NA INDÚSTRIA QUÍMICA



# Bioprodutos de Resíduos Proteicos de Pele de Bovino

Simão André de Oliveira Cordoeiro

Novembro de 2017

Orientação: Doutor António Alfredo Crispim Ribeiro



## ***Agradecimentos***

---

Em primeiro lugar, tenho de agradecer ao meu orientador, Eng.<sup>o</sup> António Crispim, pelos ensinamentos e apoio prestado no decorrer do trabalho.

Em segundo, agradeço a todos os meus colegas do Centro de Investigação e Tecnologia Industrial (CIETI) que de alguma forma me ajudaram. Não posso deixar de apontar os conselhos constantes da Eng.<sup>a</sup> Vânia da Silva, à qual agradeço uma vez mais.

Não menos importante, agradeço a toda a comunidade do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), sejam colegas, amigos, professores ou funcionários, pelo contributo que deram para crescer como pessoa.

Um agradecimento muito especial à minha Mãe, Estrela Oliveira, pelo exemplo de força que me dá desde o meu nascimento. Não posso também deixar de agradecer ao meu irmão, Carlos Cordoeiro, pelo apoio.

Por fim, agradeço à minha namorada, Andreia Silva, que me acompanhou nesta longa etapa, colaborando no aperfeiçoamento do trabalho. Agradeço a paciência e o incentivo que me deste.

Muito obrigado a todos.



## Resumo

---

A indústria de curtumes é uma das mais antigas e tradicionais de Portugal, sendo contudo uma das mais poluentes. Esta indústria produz diversos resíduos sólidos, além de águas residuais, com forte impacto ambiental. A valorização dos resíduos sólidos torna-se importante pois permite reduzir o impacto ambiental e promover a sustentabilidade.

Os resíduos de couro, ricos em colagénio, representam uma alternativa promissora no que toca ao seu aproveitamento para obtenção de um produto com alto teor proteico que pode ser utilizado nas mais diversas aplicações.

O objetivo deste trabalho consistiu na valorização de um resíduo sólido da indústria de curtumes (raspas *Wet-Blue*) através da produção de bioprodutos para aplicação em couro e biofilmes para aplicação na agricultura.

O trabalho realizado dividiu-se em cinco partes: caracterização do hidrolisado proteico e das raspas *Wet-Blue*, produção e caracterização da gelatina, concentração do hidrolisado proteico, produção de bioprodutos e produção de biofilmes.

Nas diferentes caracterizações realizadas, do hidrolisado, raspas e gelatina, foram analisados vários parâmetros, nomeadamente o teor de sólidos totais, matéria mineral e orgânica e azoto *Kjeldahl*. Também foram feitas análises ao teor de crómio por espectrometria de absorção atómica com atomização por chama. De forma geral, as caracterizações efetuadas, permitiram concluir que é possível obter um produto com alto conteúdo proteico (hidrolisado proteico) que pode ser aproveitado para uma determinada aplicação. Contudo, no caso da gelatina, devido à necessidade de um dispêndio de energia elevado para a concentrar e por isso tornando o processo oneroso, optou-se por não utilizá-la.

Os bioprodutos concebidos foram produzidos de duas formas: uma, pela reticulação do hidrolisado com glutaraldeído a diferentes concentrações (2, 5 e 10% sobre a massa seca de hidrolisado) e outra, juntando licor negro ao hidrolisado em diferentes proporções (1:3, 1:1, 3:1).

Provou-se que, a partir das raspas *Wet-Blue*, é possível a produção de bioprodutos a serem aplicados no recurtume do couro. No entanto, o processo de preparação dos mesmos pode ser melhorado, nomeadamente no tempo de mistura dos reagentes. Todas as amostras, após passarem pelo processo de recurtume, foram avaliadas quanto à resistência à extensão e ao rasgo, tendo revelado, na generalidade, um incremento nas propriedades em questão. Particularizando, as

amostras recurtidas com os bioprodutos sintetizados com licor negro apresentaram melhores resultados do que os produzidos com glutaraldeído.

A preparação dos biofilmes consistiu na junção de três reagentes, hidrolisado proteico concentrado, glutaraldeído e ainda um plastificante, a glicerina. Obtida a mistura, esta foi vertida numa prensa e foi-lhe aplicada uma tensão de 100 kg. No total foram realizados três ensaios, onde as quantidades utilizadas foram equivalentes, 20 gramas de hidrolisado proteico, 25% de glutaraldeído e 25% de glicerina em relação à massa de hidrolisado. A agitação das misturas ocorreu entre 12-15 minutos. Os resultados obtidos não foram os esperados e portanto não se conseguiu demonstrar que as raspas *Wet-Blue* podem ser aproveitadas para produção de biofilmes a serem aplicados na agricultura.

Mediante os resultados obtidos, sugere-se a continuidade do trabalho, nomeadamente na área de investigação referente aos biofilmes que apresenta margem para progressão.

**Palavras-chave:** Curtume; Raspas *Wet-Blue*; Hidrolisado proteico; Bioprodutos; *Biofilmes*;

## Abstract

---

The tannery industry is one of the oldest and most traditional in Portugal, but it is one of the most polluting. This industry produces several solid wastes, in addition to waste water, with a strong environmental impact. The valorization of these wastes becomes important because it allows to reduce the environmental impact and to promote the sustainability.

Collagen rich leather waste represents a promising alternative for its use in obtaining a product with a high protein content that can be used in a wide range of applications.

The objective of this work consisted in the valorization of a solid residue of the tanning industry (*Wet-Blue* shavings) through the production of bioproducts for application in leather and biofilms for application in agriculture.

The work was divided in five parts: characterization of protein hydrolysate and *Wet-Blue* shavings, production and characterization of gelatin, protein hydrolysate concentration, bioproducts production and biofilm production.

In the various characterizations carried out, hydrolysate, shavings and gelatine, a number of parameters were analyzed, namely the total solids, moisture, mineral and organic matter and *Kjeldahl* nitrogen content. Chromium content analysis was also performed by atomic absorption spectrometry with flame atomization. In general, the characterizations allow concluding that it is possible to obtain a product with high protein content that can be used for a given application. However, in the case of gelatine, due to the need for high energy expenditure to concentrate it and therefore making the process costly, it was decided not to use it.

The bioproducts produced were produced in two ways: one by crosslinking the hydrolysate with glutaraldehyde at different concentrations (2, 5 and 10% on the dry mass of the hydrolysate) and another by adding black liquor to the hydrolysate in different proportions (1:3, 1:1, 3:1).

It has been proved that, from the *Wet-Blue* shavings, it is possible to produce bioproducts to be applied to the retanning of the leather. However, the process of preparing the same can be improved, in particular, in the time of mixing the reactants. All samples, after going through the retanning process, were evaluated for the resistance to extension and tear, showing in general terms, an increase in the properties in question. In particular, retanning samples with the black liquor synthesized bioproducts presented better results than those produced with glutaraldehyde.

The preparation of the biofilms consisted of the combination of three reactants, concentrated protein hydrolysate, glutaraldehyde and a plasticizer, glycerol. The mixture was obtained, this was poured into a press and a tension of 100 kg was applied. In total, three tests were carried out where the amounts used were equivalent, 20 grams of protein hydrolysate, 25% glutaraldehyde and 25% glycerol in relation to the hydrolysate mass. Stirring of the blends occurred between 12-15 minutes. The results obtained were not as expected and therefore it was not possible to demonstrate that the *Wet-Blue* shavings can be used to produce biofilms to be applied in agriculture.

The results obtained suggest the continuity of the work, especially in the area of research related to biofilms that presents a margin for progression.

**Keywords:** Tannery; Wet-Blue shavings; Protein hydrolysate; Bioproducts; Biofilms;

# Índice

---

1. Introdução.....	15
1.1. Indústria de Curtumes .....	15
1.1.1. Processo de Transformação das Peles em Couro .....	15
1.1.2. Portugal e o Curtume.....	17
1.1.3. Problemática Ambiental.....	18
1.2. Objetivos do Trabalho.....	20
2. Estado da Arte .....	23
2.1. Colagénio .....	23
2.2. Extração por Hidrólise .....	24
2.2.1. Hidrólise Alcalina, Ácida e Enzimática .....	25
2.3. Reticulação Química.....	28
2.4. Plastificantes .....	29
2.5. Importância dos Materiais para o Homem .....	30
2.5.1. Polímeros .....	30
2.5.2. Polímeros versus Biopolímeros .....	31
2.5.3. Preparação de Biofilmes.....	32
2.5.4. Aplicações dos Biopolímeros .....	33
3. Descrição Técnica .....	35
3.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico .....	36
3.2. Caraterização das Raspas Wet-Blue .....	38
3.3. Extração do Colagénio e Caraterização da Gelatina.....	38
3.4. Concentração do Hidrolisado Proteico em 40%.....	39
3.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro.....	39
3.6. Preparação de Biofilmes para Aplicação na Agricultura.....	41
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1. Caraterização do Hidrolisado Proteico.....	43
4.2. Caraterização das Raspas Wet-Blue .....	44
4.3. Extração do Colagénio e Caracterização da Gelatina .....	45
4.4. Concentração do Hidrolisado Proteico em 40%.....	46
4.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro.....	47
4.6. Preparação de Biofilmes.....	51
5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	55
Bibliografia.....	57
Anexos.....	61
Anexo A – Procedimentos Analíticos .....	61

A.1. Obtenção do Hidrolisado Proteico .....	61
A.2. Caraterização do Hidrolisado Proteico .....	61
A.2.1. Determinação dos sólidos totais .....	62
A.2.2. Determinação da matéria mineral e orgânica.....	63
A.2.3. Determinação do teor de azoto total .....	64
A.2.4. Determinação do teor de crómio total .....	67
A.3. Caracterização das Raspas Wet-Blue .....	68
A.3.1. Determinação do teor de humidade e de matéria mineral e orgânica .....	69
A.3.2. Determinação do teor de óxido de crómio .....	69
A.4. Extração e Caraterização da Gelatina .....	70
A.4.1. Extração da gelatina .....	70
A.4.2. Caraterização da gelatina .....	71
A.5. Concentração do Hidrolisado Proteico .....	71
A.6. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro .....	73
A.6.1. Hidrolisado Proteico e Glutaraldeído .....	73
A.6.2. Hidrolisado Proteico e Licor Negro .....	73
A.6.3. Determinação do Teor de Humidade da Pele .....	74
A.7. Síntese de Biofilmes.....	74
Anexo B – Resultados Experimentais .....	77
B.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico.....	77
B.2. Caracterização das Raspas Wet-Blue .....	80
B.3. Extração do Colagénio e Caracterização da Gelatina .....	81
B.4. Caracterização do Concentrado .....	83
B.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro .....	84
B.6. Preparação de Biofilmes .....	85
Anexo C – Exemplos de Cálculo.....	87
C.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico .....	87
C.2. Caraterização das Raspas Wet-Blue.....	90
C.3. Caracterização da Gelatina.....	91
C.4. Concentração do Hidrolisado Proteico .....	92
C.5. Teor de Humidade da Pele .....	93

## Índice de Figuras

---

Figura 1.1 - Etapas de processamento do couro. <sup>3</sup> .....	16
Figura 1.2 – Etapas e respetivas operações de processamento do couro. <sup>3</sup> .....	16
Figura 1.3 - Distribuição percentual dos resíduos sólidos. <sup>5</sup> .....	20
Figura 2.1 - Estrutura em tripla hélice do colagénio. <sup>10</sup> .....	24
Figura 2.2 - Fibrila de colagénio. <sup>adaptado de 11</sup> .....	24
Figura 2.3 - Reticulação química. <sup>20</sup> .....	28
Figura 2.4 - Reação entre o glutaraldeído e um polímero natural. <sup>21</sup> .....	29
Figura 3.1 - Etapas do processo adotado para a produção dos bioprodutos e biofilmes. .....	36
Figura 3.2 - Fulões.....	40
Figura 4.1 - Gelatina obtida por hidrólise alcalina. ....	45
Figura 4.3 - Hidrolisado com adição de 2, 5 e 10% de glutaraldeído sobre a massa seca, respetivamente.....	47
Figura 4.2 - Concentrado de hidrolisado proteico.....	47
Figura 4.4 - Hidrolisado com adição de licor negro em diferentes proporções (1:3, 1:1 e 3:1). ....	48
Figura 4.5 – Amostras de couro antes do recurtume.....	48
Figura 4.6 – Amostras de couro após o recurtume.....	48
Figura 4.7 - Biofilme antes e depois de ser prensado. ....	51
Figura 4.8 - Biofilme.....	51
Figura 4.9 - Biofilmes obtidos após um período de secagem de 12h. ....	52
Figura 4.10 - Resultado experimental relativo à prensagem do biofilme. ....	52
Figura A.1 – Digestor de Kjeldahl (Selecta, Bloc Digest 6).....	65
Figura A.2 – Destilador (Tecator, Kjeltex System 1002 Distilling Unit).....	66
Figura A.3 - Montagem experimental relativa à concentração do hidrolisado.....	72
Figura A.4 - Prensa (MEGA KMG-30A).....	75
Figura B.1 – Matrazes antes e depois da titulação.....	78
Figura B.2 - Curva de calibração.....	79
Figura B.3 – Matrazes antes e depois da titulação iodométrica.....	81



## Índice de Tabelas

---

Tabela 1.1 - Ranking das atividades/indústrias. <sup>adaptado de 6</sup> .....	19
Tabela 2.1 - Constituição da pele. <sup>3</sup> .....	23
Tabela 2.2 - Procedimentos usados na extração do colagénio a partir de subprodutos de origem animal. ....	27
Tabela 4.1 - Resultados experimentais obtidos na caracterização do hidrolisado proteico.....	43
Tabela 4.2 - Resultados experimentais respeitantes à caracterização das raspas Wet-Blue. ....	44
Tabela 4.3 - Caracterização da gelatina. ....	45
Tabela 4.4 - Avaliação subjetiva dos ensaios.....	49
Tabela 4.5 - Resultados obtidos relativos à avaliação da resistência à extensão e rasgo.....	50
Tabela B.1 - Resultados experimentais obtidos relativos ao teor de sólidos totais. ....	77
Tabela B.2 - Resultados obtidos respeitantes à matéria mineral e orgânica. ....	77
Tabela B.3 - Teor de azoto presente no hidrolisado.....	78
Tabela B.4 – Volume da solução-mãe de crómio a adicionar em função da gama de concentrações de padrões desejada. ....	78
Tabela B.5 – Registo das absorvâncias das soluções padrão e do branco.....	79
Tabela B.6 - Absorvâncias das soluções de amostra e respetiva concentração. ....	80
Tabela B.7 - Resultados experimentais obtidos relativos ao teor de humidade.....	80
Tabela B.8 - Resultados experimentais obtidos relativos à matéria mineral e orgânica. ....	80
Tabela B.9 - Teor de óxido de crómio presente nas raspas. ....	81
Tabela B.10 - Massa de gelatina obtida para cada ensaio. ....	81
Tabela B.11 - Teor de sólidos totais da amostra. ....	82
Tabela B.12 - Resultados experimentais respeitantes à matéria mineral e orgânica... ..	82
Tabela B.13 - Absorvâncias e respetivas concentrações de crómio.....	82
Tabela B.14 – Massas de concentrado obtido por cada concentração.....	83
Tabela B.15 - Resultados experimentais obtidos em relação ao teor de sólidos totais para o primeiro concentrado. ....	83
Tabela B.16 - Resultados experimentais obtidos relativamente ao teor de sólidos totais para o segundo concentrado. ....	84
Tabela B.17 - Massas de hidrolisado, licor negro e glutaraldeído utilizadas.....	84
Tabela B.18 – Teor de humidade das amostras de couro.....	84
Tabela B.19 - Resultados experimentais relativos á preparação de biofilmes.....	85



## ***Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos***

---

- $\%$  *sólidos* – Percentagem de sólidos no concentrado;
- $c_i$  – Concentração da solução-mãe de crómio (ppm);
- $c_f$  – Concentração do padrão (ppm);
- $g_N$  – Massa de azoto (g);
- Glu – Glutaraldeído;
- HP – Hidrolisado proteico;
- $m_{H_2O}$  – Massa de água a evaporar (g);
- $m_{amostra}$  – *Massa de amostra* (g);
- $m_{amostra\ carbonizada}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);
- $m_{amostra\ seca}$  – Massa da amostra seca (g);
- $m_{amostra\ seca+cadinho}$  – Massa da amostra seca mais massa de cadinho (g);
- $m_{cadinho}$  – Massa do cadinho de porcelana (g);
- $m_{concentrado}$  – Massa de concentrado (g);
- $m_{frasco}$  – Massa do frasco utilizado para armazenar a gelatina (g);
- $m_{frasco+gelatina}$  – Massa do frasco mais massa da gelatina (g);
- $m_{gelatina}$  – Massa da gelatina (g);
- $m_{gobelé}$  – Massa do gobelé (g);
- $m_{Gli}$  – Massa de glicerina (g);
- $m_{Glu}$  – Massa de glutaraldeído (g);
- $m_{HP}$  – Massa de hidrolisado proteico (g);
- $m_{LN}$  – Massa de licor negro (g);
- $m_{mat.mineral}$  – Massa de matéria mineral (g);
- $m_{mat.orgânica}$  – Massa de matéria orgânica (g);
- $m_{solução}$  – Massa de solução de amostra de hidrolisado (g);
- $MM_N$  - Massa molecular do azoto (g/mol);
- N – Normalidade do ácido clorídrico (N);
- $V_A$  – Volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL);
- $V_B$  – Volume de titulante gasto na titulação do branco (mL);
- $v_i$  – Volume de solução-mãe (mL);
- $V_i$  – Volume de amostra a diluir (mL);
- $v_f$  – Volume de balão volumétrico (mL);
- $V_f$  – Volume do balão volumétrico (mL);
- $V_{tiossulfato}$  – Volume de tiosulfato de sódio 0,1 N (mL);



# 1. Introdução

---

A presente dissertação descreve todo o trabalho elaborado que visou o estudo da síntese de bioprodutos a partir de resíduos proteicos de pele de bovino, na continuidade de outros trabalhos já realizados e no âmbito da disciplina Dissertação/Tese de mestrado em Engenharia Química – Energia e Biorrefinaria. A dissertação foi realizada no Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI), sediado no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

O objetivo deste capítulo passa pela introdução teórica acerca da indústria de curtumes e da importância da valorização dos resíduos sólidos provenientes do setor.

## 1.1. Indústria de Curtumes

Independentemente de não se poder precisar a data em que o Homem utilizou pela primeira vez as peles e o couro, a indústria de curtumes está e estará sempre ligada à história da humanidade. Basta remontar para os tempos primórdios do Homem e imaginá-lo vestido com peles que utilizava para seu agasalho.<sup>1</sup> Ao longo dos séculos esta atividade foi evoluindo, beneficiando da necessidade e espírito criativo das civilizações que reconheceram as características únicas da pele para as mais diversas aplicações. Atualmente, a indústria dos curtumes continua a ter um papel preponderante na vida da população humana, sendo utilizada em várias áreas como, por exemplo, calçado, vestuário, tapeçaria e estofos.

### 1.1.1. Processo de Transformação das Peles em Couro

Entenda-se a curtição das peles como um processo complexo que visa a transformação de um produto natural, para que este não apodreça e para lhe conferir propriedades apropriadas como resistência a agentes físicos e biológicos externos, de forma a poder ser utilizado no fabrico de produtos de uso comum.<sup>2</sup> As peles de bovino são as mais trabalhadas na indústria de curtumes como matéria-prima e o produto final do processo é comumente denominado por couro.

O processo de curtume compreende as etapas descritas na Figura 1.1<sup>3</sup> sendo que cada uma inclui diversas operações que se apresentam na Figura 1.2.



Figura 1.1 - Etapas de processamento do couro.<sup>3</sup>

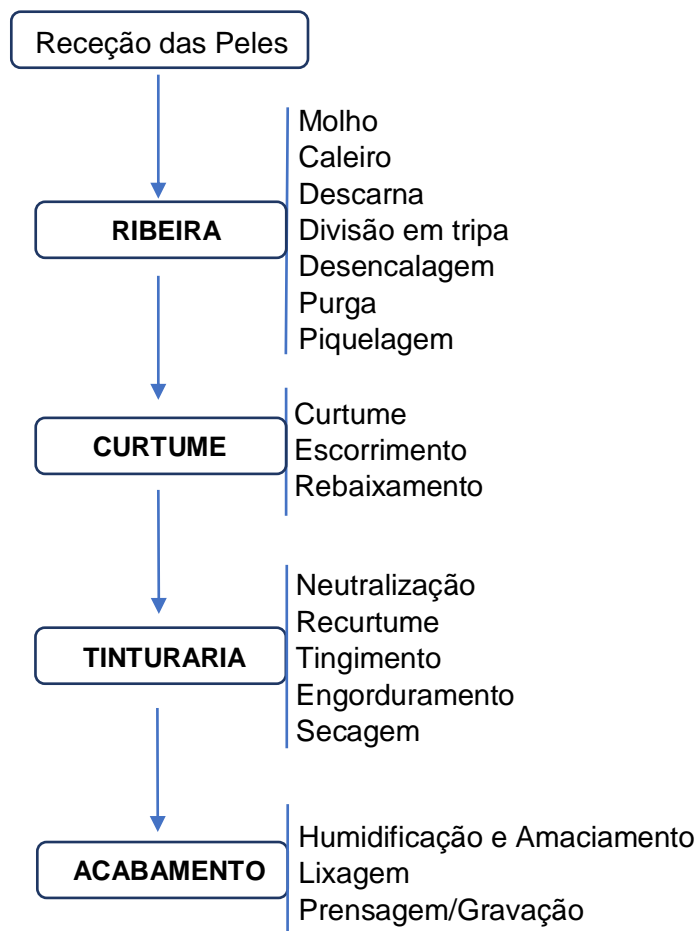


Figura 1.2 – Etapas e respetivas operações de processamento do couro.<sup>3</sup>

A Esfola e a Salga consistem nas etapas que antecedem o processamento das peles. Após o esfolamento, em que as peles são retiradas dos animais, segue-se a conservação que tem por finalidade interromper o processo de decomposição. Geralmente é utilizado o sal pois garante uma melhor qualidade de conservação. Assim, as peles são armazenadas por um tempo limitado até que seja dado o início à sua transformação numa fábrica de curtumes.

A Ribeira diz respeito à etapa em que a pele é sujeita a tratamentos físicos e químicos de forma a prepará-la para o Curtume. As operações respeitantes a esta fase garantem que sejam eliminadas sujidades, sangue, sal, pelos e ainda os tecidos adiposos e matéria subcutânea.

A seguinte fase é o Curtume que consiste no processo de conversão de peles instáveis em couro (pele curtida). Este deve apresentar um caráter imputrescível e propriedades adequadas à sua posterior utilização, nomeadamente, resistência mecânica, resistência à hidrólise e estabilidade dimensional a altas temperaturas. A obtenção destas propriedades é conseguida pelo estabelecimento de ligações transversais entre as cadeias proteicas, efetuadas através dos agentes de curtume. Os agentes de curtume podem ser minerais (sais de crómio, alumínio, zircónio e titânio) ou orgânicos (vegetal, aldeídos, sintéticos) sendo que o crómio é o mais utilizado porque permite obter um couro mais macio, flexível, com maior resistência física e maior estabilidade. Note-se que nesta fase, caso as peles tenham sido curtidas com sais de crómio, apresentam uma coloração azulada e designam-se por *Wet-Blue*.

A Tinturaria serve para conferir às peles as características pretendidas, tais como a cor, textura e brilho.

Por fim, no Acabamento, as peles são submetidas a várias operações mecânicas com o intuito de proteger a superfície do couro, melhorar a sua apresentação e corrigir eventuais defeitos ainda existentes. Neste momento, as peles estão prontas a passar por outras operações de acabamento tais como aplicações de padrões, gravados, serigrafias, entre outras.<sup>3-5</sup>

### 1.1.2. Portugal e o Curtume

Portugal, defendendo a tradição ligada à indústria de curtumes desde a época dos Descobrimentos em que influenciou o seu desenvolvimento pela introdução de novas substâncias no processo de curtume, destaca-se atualmente na transformação de peles de bovinos para a indústria do calçado.<sup>1</sup>

Da produção nacional, 85-90% destina-se ao calçado e os restantes 10-15% são aproveitados para vestuário, marroquinaria, estofos, entre outros produtos.<sup>2</sup>

A importância deste setor para a economia nacional evidencia-se pelo facto da indústria do calçado ser uma das principais exportadoras do país. Em 2016, a APICCAPS (Associação Portuguesa dos Industriais de Calçado, Componentes e Artigos de Pele e seus Sucedâneos) constatou que Portugal é um dos maiores produtores europeus de calçado em couro e, juntamente com Espanha e Itália, assegura 23% do valor das exportações mundiais.

### 1.1.3. Problemática Ambiental

Nas últimas décadas, a sociedade tem prestado maior atenção às questões de natureza ambiental. Esta atenção vem intimamente ligada ao impacto negativo das atividades humanas sobre o planeta e a sociedade que constituem uma ameaça ambiental, social e económica. Segundo a *Pure Earth* (Instituto *Blacksmith*), as principais razões subjacentes a este tema são:

- Regulação e controlo deficientes por parte das indústrias que usam substâncias perigosas e geram resíduos perigosos;
- Práticas insuficientes de controlo de resíduos e emissões perigosas, muitas vezes associadas à inexistência ou pouco desenvolvimento da tecnologia disponível na geração e tratamento de resíduos e emissões;
- A presença de indústrias perigosas próximas ou dentro de áreas densamente povoadas;
- A contribuição negativa das pequenas empresas na emissão de substâncias tóxicas cujos recursos financeiros são limitados para implementar as melhores práticas.

A mesma organização ordena as indústrias/atividades que colocam em maior risco a saúde da população humana em todo o mundo, baseando-se na emissão de poluentes tóxicos. Na Tabela 1.1<sup>adaptado de 6</sup> observa-se o *ranking* dessas indústrias/atividades.

Tabela 1.1 - *Ranking* das atividades/indústrias. adaptado de 6

Posição	Indústria/Atividade
1º	Reciclagem de baterias de chumbo ácido
2º	Fundição de chumbo
3º	Mineração
4º	Operações de curtimento
5º	Locais de despejo industrial
6º	Zonas Industriais
7º	Extração de ouro
8º	Fabricação de produtos em geral
9º	Produção de produtos químicos
10º	Produção de tinta

Como se pode observar na Tabela 1.1, as operações levadas a cabo na indústria de curtumes encontram-se no quarto lugar do *ranking*, demonstrando assim que o setor é um dos que mais contribui para o aumento e disseminação dos poluentes tóxicos. A geração de quantidades elevadas de águas residuais, resíduos curtidos e não curtidos, lamas das estações de tratamento, ruído e emissões gasosas exigem a necessidade da tomada de ações de controlo, tratamento e valorização para não agravar os problemas ambientais atuais.

O presente trabalho terá maior enfoque nos resíduos sólidos, nomeadamente os curtidos a crómio, uma vez que é a partir destes que se obterá as matérias-primas necessárias para processar os bioprodutos.

Os resíduos sólidos existem na sua maioria, não devido a uma eventual ineficiência processual aquando da curtição das peles, mas sim à necessidade incontornável de remover constituintes da pele de forma a obter o produto final com a qualidade desejável. Provenientes das fases do processo posteriores ao curtume, os resíduos sólidos curtidos a crómio, sendo constituídos fundamentalmente por água e proteínas, contêm crómio trivalente e assumem um carácter do tipo não-biodegradável sendo portanto, mais prejudiciais para o meio ambiente.<sup>4 e 5</sup> Na Figura 1.3<sup>5</sup> é possível constatar que a par dos resíduos sólidos provenientes da descarna, as raspas *Wet-Blue* (raspas azuis) são as que mais contribuem para o total de resíduos sólidos no setor, em Portugal.

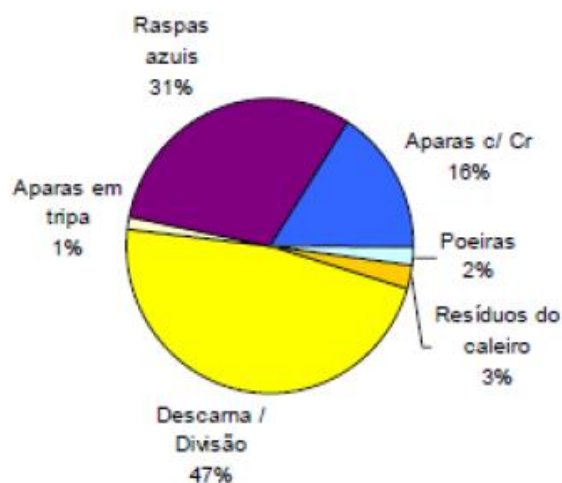


Figura 1.3 - Distribuição percentual dos resíduos sólidos.<sup>5</sup>

Atualmente, a maioria destes resíduos é depositado em aterro controlado. Em Portugal, o seu destino tem sido o Aterro de Resíduos Industriais da AUSTRAL.<sup>5</sup> O problema desta aparente solução é o espaço ocupado pela grande quantidade de resíduos acumulados, mas também pela poluição e contaminação gerada por estes. Esta contaminação deve-se ao facto de, por exemplo, as chuvas ácidas libertarem compostos cromados que se infiltram em lençóis de água, ocorrendo posteriormente a oxidação que transforma o crómio III ( $\text{Cr}^{3+}$ ) em crómio VI ( $\text{Cr}^{6+}$ ) sendo o último cancerígeno e altamente tóxico.

Posto isto, torna-se importante efetuar uma seleção criteriosa dos resíduos e investir em tecnologias que os possam valorizar, recuperando assim produtos que outrora não seriam aproveitáveis a nível industrial a fim de minimizar os impactos ambientais e promover a sustentabilidade.

## 1.2. Objetivos do Trabalho

O objetivo do trabalho consiste no desenvolvimento de bioprodutos a partir de resíduos proteicos provenientes da indústria de curtumes, procurando-se assim a valorização dos resíduos de forma a contrariar a problemática ambiental associada a este setor.

Os bioprodutos serão sintetizados a partir de duas matérias-primas, um hidrolisado proteico e uma gelatina. Relativamente à sua obtenção, no caso da gelatina, esta será obtida através da sujeição de raspas *Wet-Blue* a um processo de hidrólise alcalina. Quanto ao hidrolisado proteico, este foi fornecido pelo Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI).

Numa etapa seguinte, procurar-se-á obter bioprodutos para aplicação em couro e biofilmes para aplicação na agricultura, a partir do hidrolisado e da gelatina.



## 2. Estado da Arte

---

Nas últimas décadas, tem-se verificado um crescente interesse na valorização dos subprodutos industriais. Não fugindo à regra, o setor do curtume tem investido na pesquisa de novas soluções tecnológicas para os resíduos de couro ou na otimização das já existentes. Técnicas como pirólise e gaseificação têm sido levadas a cabo para a produção e recuperação de energia e inclusive estudos sobre as raspas como adsorventes têm sido realizados.<sup>7-9</sup> Contudo, na presente dissertação é relevante conhecer mais aprofundadamente as características da pele de bovino da qual se irá recuperar o produto orgânico a ser valorizado bem como a solução tecnológica utilizada – hidrólise.

### 2.1. Colagénio

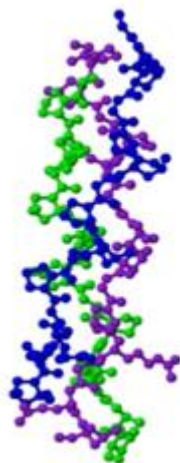
Antes de mais é importante evidenciar que a pele é constituída por diversas substâncias como se pode observar na Tabela 2.1<sup>3</sup>.

**Tabela 2.1** - Constituição da pele.<sup>3</sup>

Substância	% (massa)
Água	64
Proteínas	33
Gorduras	2
Substâncias Minerais	0,5
Outras substâncias	0,5

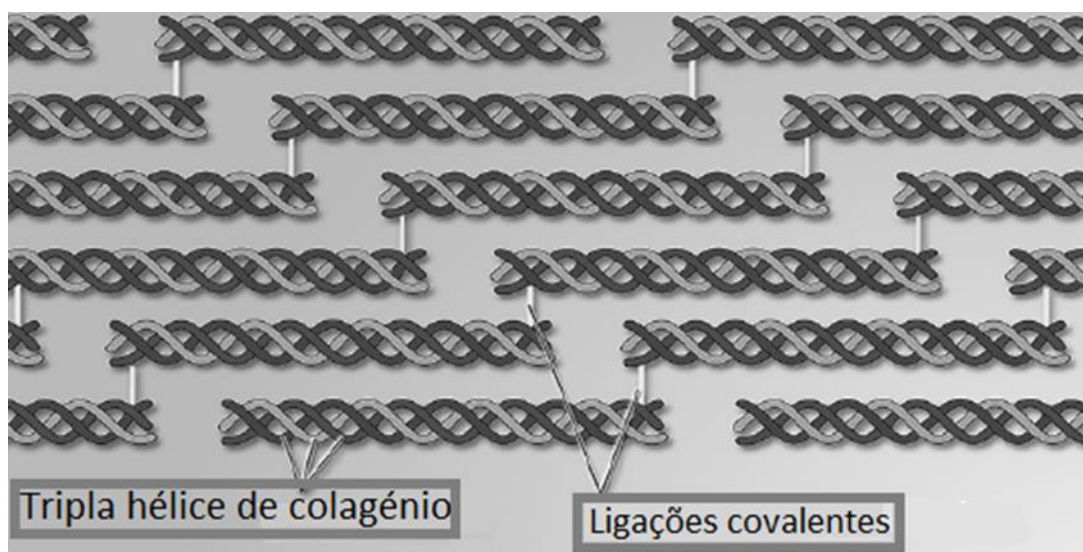
Como se pode notar, a pele contém 33% de proteínas sendo que a mais abundante nos vertebrados é o colagénio. Esta proteína pertence à família de proteínas fibrosas e é o principal componente dos tecidos conjuntivos como a pele, ossos, tendões, cartilagens e vasos sanguíneos.

Estruturalmente, o colagénio baseia-se em três cadeias peptídicas, cada uma enrolada numa hélice com 1,5 *nm* de diâmetro e 300 *nm* de comprimento. Organizadas, formam uma tripla hélice como se pode observar na Figura 2.1<sup>10</sup>. As cadeias peptídicas contêm aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, sendo que a sequência mais comum de aminoácidos é Glicina-X-Y em que X é prolina e Y, hidroxiprolina.<sup>11-13</sup>



**Figura 2.1** - Estrutura em tripla hélice do colagénio.<sup>10</sup>

Note-se que a estrutura em tripla hélice é mantida por pontes de hidrogénio. Através de ligações covalentes, estas hélices unem-se constituindo a unidade básica de fibrila de colagénio (Figura 2.2<sup>adaptado de 11</sup>). Cada uma destas fibrilas é ligada a outras, o que fortalece a estrutura das moléculas individuais. Isto justifica a natureza forte e rígida dos ossos, tendões e peles.<sup>11 e 12</sup>



**Figura 2.2** - Fibrila de colagénio.<sup>adaptado de 11</sup>

## 2.2. Extração por Hidrólise

As rasas *Wet-Blue* possuem uma estrutura altamente organizada sob a forma de fibras que se mantêm intimamente unidas. Uma solução tecnológica para a destruição destes resíduos é a hidrólise. Nesta reação, verifica-se a quebra da ligação crómio-

colagénio que é estabelecida durante a fase de curtume, através do ataque alcalino ou ácido, a quente, das raspas de couro, na presença ou não de enzimas.<sup>14</sup>

O colagénio aquecido em água, sofre uma hidratação progressiva dos grupos aminoácidos das cadeias peptídicas, as quais se rompem devido à insuficiência das forças que as mantêm coesas e transformam-se numa massa desorganizada de cadeias peptídicas altamente hidratadas – a gelatina. Em função do tipo de hidrólise e caso esta ocorra a temperaturas mais elevadas ou durante mais tempo, as cadeias peptídicas quebram, decompondo-se nos seus aminoácidos. Daqui resulta o hidrolisado proteico. Assim, o grau de conversão do colagénio em gelatina ou hidrolisado depende da severidade das condições processuais da extração como o tempo de extração e a temperatura.

O conteúdo proteico isolado do crómio pode ser aplicado:<sup>15</sup>

- Como fertilizante orgânico à base de nitrogénio;
- Na síntese de polímeros biodegradáveis para aplicações agrícolas;
- No recurtume do couro;
- Na preparação de filmes, adesivos, cosméticos e tintas.

Sem requerer instalações nem equipamentos complexos, a hidrólise torna-se atrativa em termos económicos mas também ambientais, uma vez que não há libertação de agentes químicos perigosos sobre o meio ambiente nem sobre a saúde da população em geral.

### *2.2.1. Hidrólise Alcalina, Ácida e Enzimática*

Saliente-se que a fonte da qual se extrai o colagénio é importante porque o rendimento da extração depende de fatores como a idade, sexo e espécie do animal. Até por questões culturais e religiosas, a seleção da fonte de proteína é tida em consideração como é o caso dos judeus, islâmicos e hindus.<sup>8</sup> Atualmente, as fontes mais abundantes de colagénio são as peles de bovino e suíno, mas já existem estudos relativos à extração do colagénio de subprodutos provenientes do setor da pesca.

O colagénio pode ser obtido por hidrólise na presença, ou não, de enzimas. A nível industrial é comum recorrer-se à hidrólise com ausência de enzimas, mas os processos biológicos que as utilizam têm-se mostrado promissores, podendo reduzir o tempo de processamento e gerando menos resíduos apesar de serem mais caros.<sup>8</sup>

No que diz respeito à hidrólise alcalina, nesta ocorre a digestão dos resíduos na presença de um agente alcalino, sendo que os mais usados para o efeito são o

hidróxido de sódio (NaOH), o hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e o carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Este processo é recomendável para matérias-primas que requerem uma penetração mais agressiva na estrutura das peles, como por exemplo a pele de bovino. Deste processo resultam um hidrolisado proteico e um bolo de crómio que têm um potencial de aplicação no curtume.<sup>7 e 8</sup>

Um caminho alternativo consiste na hidrólise do colagénio com recurso a um ácido, que entrando em contacto com a pele, provoca o aumento do seu volume e a quebra das ligações não-covalentes intra e intermoleculares. Este pré-tratamento é aconselhado para matérias-primas mais frágeis como peles de peixe e suíno.<sup>8</sup>

A hidrólise enzimática, como o próprio nome indica, dá-se na presença de enzimas e é um processo viável com um rendimento de 50-60% de hidrolisado e com um baixo teor de matéria mineral e de crómio. As proteases utilizadas a uma temperatura moderada e num curto período de tempo, constituem uma solução prática na obtenção de um produto proteico que pode ser utilizado como fertilizante.<sup>7</sup>

Na Tabela 2.2 apresentam-se alguns procedimentos usados na extração de colagénio a partir de subprodutos de origem animal encontrados na bibliografia. As matérias-primas apresentadas já passaram por processos de preparação que envolvem operações como remoção de pelos, lavagem com água fria e cortes em pequenos pedaços.

**Tabela 2.2** - Procedimentos usados na extração do colagénio a partir de subprodutos de origem animal.

Matéria-prima	Pré-tratamento	Procedimento de extração
Pele de búfalo <sup>13</sup>	Mistura da pele com NaOH 0,1 N numa proporção de solução amostra/base de 1:10 (m/v) durante 6h. Regeneração da solução alcalina a cada 2h. Lavagem com água fria até se obter um pH neutro ou ligeiramente básico. Desengorduramento com álcool butílico a 10% com uma proporção sólido/solvente de 1:10 (m/v), durante 18 h e com substituição do solvente a cada 6h. Imersão das peles obtidas em $CH_3COOH$ 0,5 M com uma relação de sólido/solvente de 1:30 (m/v), durante 24h. Filtração da mistura.	Precipitação do colagénio por adição de NaCl na presença de <i>Tris</i> 0,05 M (hidroximetil) aminometano, pH 7,0. Recolha do precipitado resultante por centrifugação a 4000 rpm durante 15 <i>min</i> . Dissolução do sedimento obtido em $CH_3COOH$ 0,5 M, dialisado com $CH_3COOH$ 0,1 M e água destilada, respetivamente, e depois liofilizado.
Aparas <i>Wet-Blue</i> <sup>14</sup>	-	Tratamento com KOH, em meio aquoso, a uma temperatura de 90-95 °C, durante 4 horas. Após arrefecimento, filtração e neutralização do hidrolisado para valores de pH 6,8-7,2 recorrendo a $H_3PO_4$ .
Restos de peixe-porco ( <i>Odonus Niger</i> ) <sup>16</sup>	Tratamento com NaCl 0,8 mol/l a uma proporção de 1:6 (m/v), durante 10 min, para remover as impurezas. Lavagem com água destilada fria. Tratamento com NaOH 0,1 mol/l numa proporção de 1:10 (m/v) para remover as proteínas não colágenas. Mudança diária da solução de NaOH e finalmente lavagem com água destilada fria.	1º Método: Extração do colagénio usando $CH_3COOH$ 0,5 M, durante 3 dias; 2º Método: Extração do colagénio por adição de pepsina 0,1% (m/v) a $CH_3COOH$ 0,5 M;
Tendão de cauda de rato <sup>17</sup>	-	Extração do colagénio usando uma solução de $CH_3COOH$ 0,5 M. Separação, por peneiração, do material viscoso dos componentes insolúveis. Centrifugação da solução de colagénio seguida da adição de NaCl a 5% ao sobrenadante para precipitar o colagénio.

Em suma, a distribuição de massa molecular, estrutura, composição e propriedades funcionais do colagénio dependem das condições processuais a que as matérias-primas são sujeitas e ainda da especificidade das enzimas, quando usadas. Propriedades como a temperatura, agitação e tempo de extração representam variáveis a ter em conta no processo de extração.<sup>18 e 19</sup>

Por este motivo, é fundamental encontrar a técnica de extração ideal para cada matéria-prima de forma a obter o melhor rendimento de extração, bem como as melhores características do colagénio para uma aplicação desejada.

Após a extração da proteína, o biopolímero pode ser obtido em diversas formas, tais como esponjas, géis, fibras, filmes, entre outras. Atualmente, já existem alguns processos de síntese distintos como, por exemplo, a liofilização, extrusão e reticulação.<sup>19</sup>

No seguinte subcapítulo aborda-se a reticulação química pois foi o processo utilizado para aprimorar as propriedades termomecânicas do colagénio com vista a potencializar as suas aplicações.

### 2.3. Reticulação Química

A reticulação, também conhecida como ligação cruzada ou *crosslinking*, permite a produção de polímeros tridimensionais com alta massa molecular. Ilustrado simplificadaamente na Figura 2.3<sup>20</sup>, a reticulação química consiste num processo de ligação de cadeias poliméricas lineares por ligações covalentes.



Figura 2.3 - Reticulação química.<sup>20</sup>

Este processo é importante na medida em que o colagénio, tratando-se de um polímero natural, é bastante solúvel, pouco rígido e termicamente pouco estável, o que limita a sua gama de aplicações. Desta forma, o colagénio é melhorado no que se refere às propriedades atrás referidas bem como a taxa de degradação, permeabilidade, dureza, entre outras.<sup>21</sup>

A reticulação química passa pela reação entre um agente reticulante e a proteína. Dos inúmeros agentes reticulantes existentes como, por exemplo, o glutaraldeído, o formaldeído e o dicromato de potássio, o primeiro é o agente mais utilizado devido à sua eficiência na estabilização de biomateriais à base de colagénio.<sup>22</sup>

Existem também estudos que demonstram que os taninos (polifenóis de origem vegetal) podem ser utilizados como agentes reticulantes já que apresentam elevada afinidade com o colagénio. Este facto deve-se à estrutura flexível do colagénio ser compensada pela rigidez estrutural dos fenóis (substâncias compostas, pelo menos, por um anel aromático e um grupo hidroxila).<sup>23</sup>

A título de exemplo, na Figura 2.4<sup>21</sup> pode observar-se que a reticulação ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e o polímero natural.

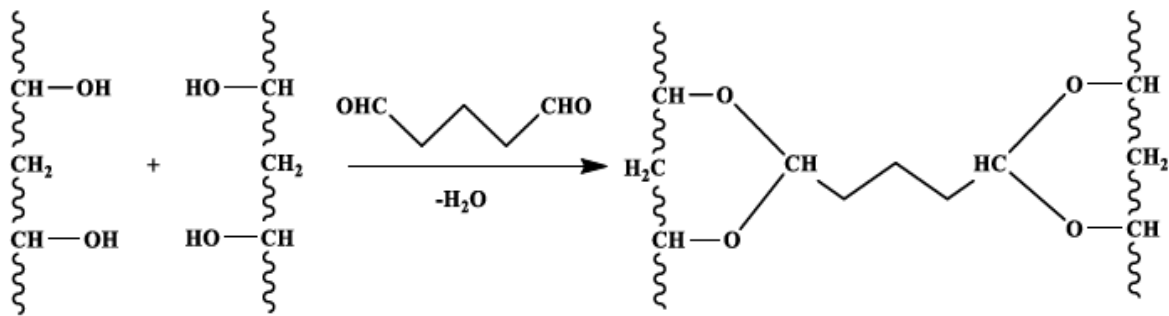


Figura 2.4 - Reação entre o glutaraldeído e um polímero natural.<sup>21</sup>

Para controlar os mecanismos de reação, têm que se ter em atenção alguns parâmetros como a temperatura, o tempo e inclusive a necessidade de adição de outras substâncias como plastificantes que melhoram as propriedades físicas dos materiais.

## 2.4. Plastificantes

Pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os plastificantes são definidos como substâncias ou materiais incorporados noutra material (usualmente um plástico ou um elastómero) para aumentar a sua flexibilidade, processabilidade ou distensibilidade.

Com o persistente crescimento da indústria de plásticos, a procura por estes aditivos químicos aumentou, existindo atualmente uma larga gama de plastificantes disponíveis com características diversas para responder a aplicações específicas.

Dado o reduzido tamanho das moléculas dos plastificantes, estes conseguem ocupar os espaços intermoleculares entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças intermoleculares dos polímeros. Conseguem ainda alterar a organização molecular tridimensional reduzindo a energia necessária para o movimento e a formação de pontes de hidrogénio entre as cadeias poliméricas. Como resultado, observa-se o aumento do volume livre e, portanto, da mobilidade molecular. Devido a esta característica, são utilizados para limitar as ligações cruzadas que se dão no mecanismo de reticulação. Os plastificantes utilizados comumente são polióis como a glicerina, mono, di e tri-etilenoglicol, sorbitol, entre muitos outros.<sup>24</sup>

## 2.5. Importância dos Materiais para o Homem

Desde o aparecimento das primeiras civilizações, o Homem tem usado objetos para melhorar a sua forma de vida. Por conseguinte, os materiais foram e sempre serão uma parte integrante da história de vida da humanidade estando esta dependente dos materiais de que se dispõe numa determinada época.

Com o intuito de tornar os materiais úteis e corresponderem ao uso dado pelo Homem para as mais diversas aplicações, tem-se observado nas últimas décadas a crescente aplicação dos conhecimentos científicos sobre os materiais. Isto, para melhorar a qualidade de vida do ser humano e, conseqüentemente, da sociedade em que está inserido. Torna-se então necessário conhecer aprofundadamente as características dos materiais para selecionar o mais adequado para uma dada aplicação, bem como o melhor método de produção.

Atualmente, os materiais existentes são categorizados em metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e eletrônicos. Todos estes materiais competem entre si na conquista dos mercados atuais e futuros, razão pela qual existem diversos fatores que podem conduzir à mudança de um determinado material, como por exemplo, preço e desenvolvimento de uma nova técnica de processamento.<sup>25</sup>

O presente trabalho trata a síntese de bioprodutos a partir de resíduos proteicos, portanto contendo polímeros naturais. Por este motivo, os polímeros serão os materiais abordados com maior incidência neste subcapítulo.

### 2.5.1. Polímeros

Etimologicamente, a palavra polímero provém do grego *polymerés*, «composto de várias partes», que designa uma espécie química cuja composição estequiométrica é um múltiplo de outra espécie química. Em termos químicos, a palavra evoluiu, significando também um composto de elevado peso molecular resultante de ligações covalentes entre várias moléculas simples – os monómeros.<sup>26</sup>

Os polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Esta distinção apareceu a partir do momento em que foi possível criar um conjunto de substâncias com características extraordinárias e únicas, os polímeros sintéticos. Estes representam as macromoléculas produzidas pelo Homem através de processos de transformação como reações químicas podendo ser classificados de acordo com a forma como foram sintetizados, por polimerização de adição ou de condensação. São exemplos de polímeros sintéticos o *nylon*, o polietileno, o polipropileno, o policloreto de vinilo, entre outros. Relativamente aos polímeros naturais, estes são obtidos a partir de

organismos vivos e estão divididos em polissacarídeos, polinucleotídeos, poliisoprenos, poliésteres e proteínas.<sup>26-28</sup>

O uso de polímeros, sejam naturais ou sintéticos, tem aumentado devido aos benefícios proporcionados pelas suas características, nomeadamente: <sup>4 e 29</sup>

- Maleabilidade, tornando-se fácil trabalhá-los de forma a cumprir requisitos técnicos específicos;
- Baixo peso permitindo um custo baixo associado ao seu transporte;
- Resistência a produtos químicos e água;
- Resistência mecânica e durabilidade;
- Baixo custo de produção.

### *2.5.2. Polímeros versus Biopolímeros*

Apesar dos polímeros sintéticos serem relativamente recentes na história do Homem, hoje em dia, são incontáveis os objetos utilizados onde estão presentes, facto que evidencia a importância destes para a indústria e economia mundial.

Contudo, existem problemas ambientais associados a este tema na medida em que a maioria dos polímeros sintéticos são processados recorrendo a derivados de petróleo e aplicados em inúmeras áreas, como por exemplo, na indústria automóvel, embalagem e construção e possuem tempos de degradação extensos, podendo demorar até 500 anos a degradarem-se.<sup>30</sup> Por estas razões, os polímeros sintéticos acarretam elevados problemas de contaminação por não serem biodegradáveis e persistirem por longos períodos de tempo como contaminantes, trazendo consequências graves para o meio ambiente como a contaminação do solo e da água. Para além disso, também geram quantidades significativas de resíduos que tomam proporções perigosas obrigando vários países a desenvolver nova legislação a ser aplicada tanto no controlo como na eliminação de materiais poliméricos após a sua utilização.

Devido a esta realidade, têm sido feitos esforços da indústria no sentido de encontrar alternativas e resolver os problemas que advêm dos polímeros sintéticos. Entre essas alternativas estão os biopolímeros que sintetizados a partir de polímeros naturais, preservam o meio ambiente e contribuem para a diminuição da dependência do petróleo que a indústria dos polímeros sintéticos apresenta.<sup>31</sup> Além disso são biodegradáveis, isto é, degradam-se naturalmente sob a ação de organismos

decompositores e na presença de fatores abióticos favoráveis tal como a temperatura, humidade e luz.

Desta forma, algumas das propriedades mais importantes da generalidade dos biomateriais podem ser sumarizadas como se segue:

- O material deve possuir um tempo de vida útil aceitável;
- Os resíduos da degradação do material não devem ser tóxicos nem poluentes;
- O material deve possuir as propriedades mecânicas apropriadas para uma determinada aplicação;
- O material deve possuir processabilidade apropriada para a aplicação pretendida.

### *2.5.3. Preparação de Biofilmes*

Os biofilmes constituem uma opção emergente e inovadora que traz associada a si o conceito de barreira que, sem dúvida, é uma propriedade altamente desejável de materiais poliméricos destinados a serem utilizados em embalagens de alimentos, sacos descartáveis e filmes utilizados na agricultura.<sup>32</sup>

Apesar do enorme potencial que visa a substituição dos plásticos convencionais pelo bioplásticos provenientes de fontes renováveis, estes biomateriais apresentam entraves ao seu uso em várias aplicações. Estes entraves devem-se geralmente à baixa impermeabilidade à água e vapores, grande sensibilidade à água e baixa resistência térmica.<sup>29</sup> Por esta razão, a indústria tem incidido no desenvolvimento e melhoria de técnicas que permitem a síntese destes materiais.

A preparação de biofilmes pode ocorrer por dois mecanismos: pela dispersão do biopolímero em placas seguido da evaporação do solvente ou por um mecanismo que se baseia nas propriedades termoplásticas dos biopolímeros.<sup>2</sup> Pormenorizando, o primeiro mecanismo consiste na dispersão do biopolímero numa superfície plana seguido da secagem à temperatura ambiente.<sup>19</sup> Já o segundo mecanismo diz respeito à utilização da prensa. O biopolímero é vertido para o suporte de uma prensa que por sua vez, poderá ou não, ser aquecida, e depois é aplicada a tensão no biopolímero de forma a compactar e uniformizar a área do mesmo.

#### 2.5.4. Aplicações dos Biopolímeros

Os biopolímeros encontram um vasto leque de aplicações em diversas áreas:<sup>28</sup>

- Medicina (implantes cirúrgicos, produtos de cura e cicatrização, etc.);
- Embalagens;
- Agricultura (vasos, filmes agrícolas, etc.);
- Construção civil;
- Dispositivos eletrónicos (teclados, telemóveis, telefones, etc.).

Em conclusão, o que se procura com os biopolímeros é manter a mesma utilidade dos polímeros sintéticos que dependem do petróleo, com a particularidade de minimizar os riscos ambientais.



### 3. Descrição Técnica

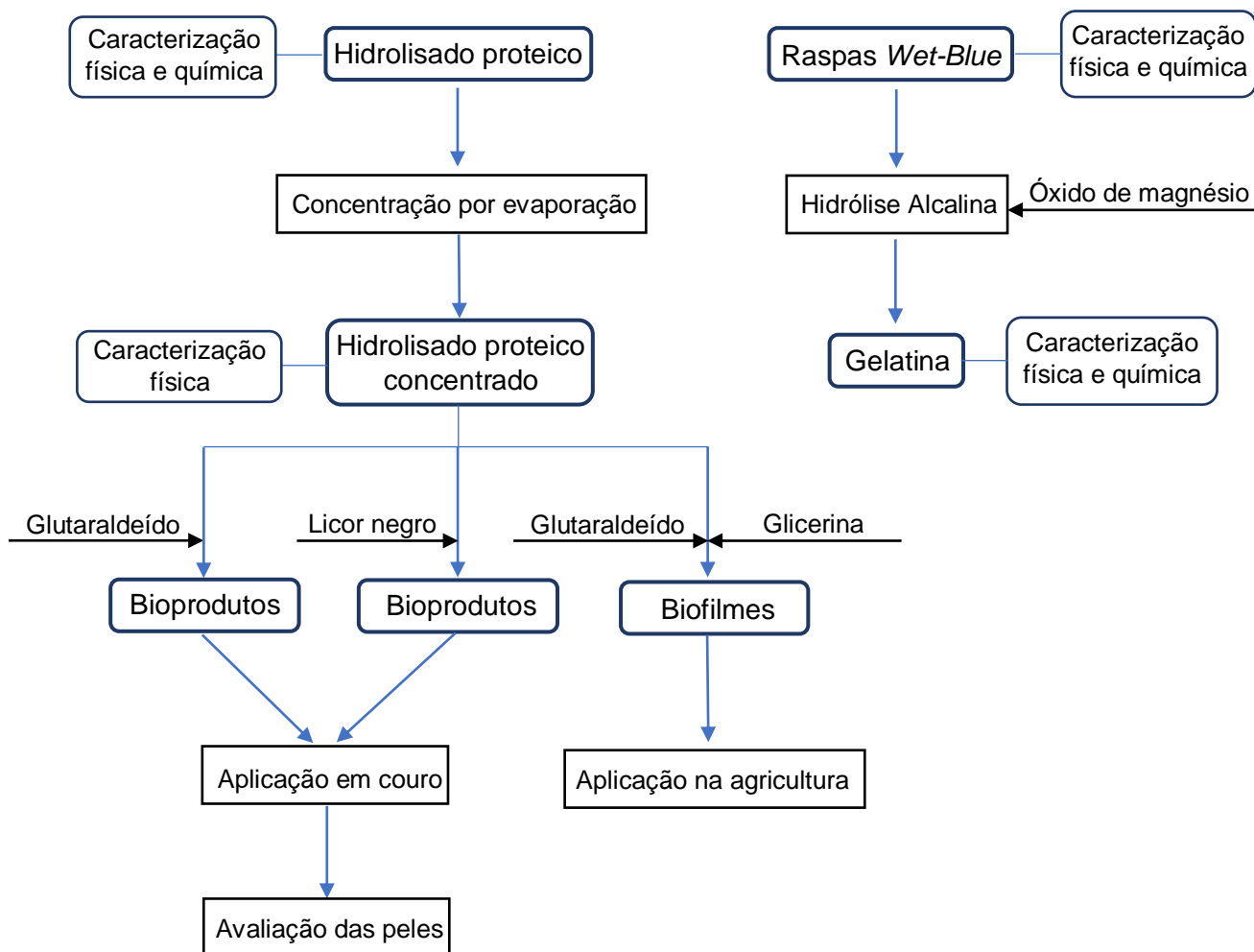
---

Neste capítulo apresenta-se a metodologia utilizada na realização deste trabalho.

As matérias-primas a utilizar para a síntese de bioprodutos são o hidrolisado proteico e a gelatina resultantes da hidrólise alcalina das raspas *Wet-Blue*. Como tal, o trabalho inicia-se com a caracterização do hidrolisado e das raspas, estando mencionados todos os parâmetros avaliados e respetivos procedimentos de análise. Posteriormente, tem-se a descrição do processo de obtenção da gelatina para a qual se determinaram parâmetros que permitiram a sua caracterização, terminando com a apresentação sumária do procedimento adotado para a concentração da solução de hidrolisado proteico.

Numa fase posterior, procedeu-se à síntese de bioprodutos para aplicação em couro, estando apresentadas todas as atuações realizadas, desde a obtenção dos bioprodutos até ao couro recurtido com os mesmos. Continuamente, as amostras de couro recurtidas foram avaliadas estando referidos todos os testes realizados. Finalmente, expõe-se a forma como foram preparados os biofilmes para aplicação na agricultura.

Na Figura 3.1 está representado o diagrama de processo respeitante à síntese de bioprodutos a partir de resíduos proteicos de pele de bovino efetuado neste trabalho experimental.



**Figura 3.1** - Etapas do processo adotado para a produção dos bioprodutos e biofilmes.

### 3.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico

Primeiramente, tenha-se em atenção que o hidrolisado proteico já existia em laboratório sendo necessário apenas caracterizá-lo. Todavia, é relevante saber qual o protocolo utilizado para a sua produção pelo que no Anexo A.1 se expõem as respetivas atuações.

Neste subcapítulo pretende-se então descrever sucintamente quais os métodos utilizados para a caracterização do hidrolisado proteico, para a qual se procura avaliarem diversos parâmetros que se apresentam de seguida. Os procedimentos adotados para cada um destes parâmetros encontram-se no Anexo A.2.

#### ✓ **Determinação dos sólidos totais**

O teor de sólidos totais foi determinado através de ciclos repetidos de secagem em estufa (*Binder*), a 105 °C, seguido de arrefecimento num exsiccador para estabilização térmica. O término da análise deu-se quando a massa da amostra se tornou constante.

#### ✓ **Determinação da matéria mineral e orgânica**

No sentido de quantificar a matéria mineral e orgânica da amostra, esta seguiu para uma mufla (*Heraeus Instruments*) onde permaneceu durante 3 horas, a uma temperatura de 550 °C. Após este período de tempo, foi colocada numa estufa e posteriormente num exsiccador para estabilizar termicamente. Finalmente, efetuou-se a sua pesagem.

#### ✓ **Determinação do teor de azoto total (*Kjeldahl*)**

O método utilizado para determinar o teor de azoto foi o método de *Kjeldahl* que se baseia na digestão da amostra por aquecimento com ácido sulfúrico concentrado num digestor (*Selecta, Bloc Digest 6*), na presença de um catalisador. Seguidamente, é adicionado um excesso de hidróxido de sódio e procede-se à destilação da mistura resultante, recolhendo-se o destilado numa solução de ácido bórico de título conhecido. Finalmente, realiza-se uma titulação com uma solução padrão de ácido clorídrico, também de título conhecido, e na presença de um indicador. O ponto final da titulação é detetado visualmente com a passagem da cor transparente/esverdeada para cor-de-rosa. Assim, foi possível determinar a quantidade de amoníaco e, conseqüentemente, a quantidade de azoto contido na amostra.

#### ✓ **Determinação do teor de crómio total**

O crómio total foi determinado recorrendo a espectrometria de absorção atómica com atomização por chama. Inicialmente, a amostra foi digerida com ácido nítrico concentrado no sentido de reduzir ou eliminar possíveis interferências químicas aquando da análise quantitativa do crómio. Seguidamente, foram preparadas as soluções padrão, lidos os respetivos valores de absorvância e construída a curva de calibração recorrendo a um espectrofotómetro de absorção no UV/Vis (*Jenway 6300*).

Posteriormente, o mesmo equipamento permitiu ler e registar as absorvâncias das soluções de amostra. Assim, foi quantificado o crómio presente na amostra.

### 3.2. Caraterização das Raspas Wet-Blue

A gelatina foi obtida a partir de raspas *Wet-Blue* provenientes da indústria de curtumes. Torna-se então importante caraterizá-las para obter informações quanto à sua composição física e química. Os parâmetros avaliados foram o teor de humidade, matéria mineral e orgânica e ainda de óxido de crómio. Os procedimentos seguidos para determinação de cada um destes parâmetros encontram-se detalhados no Anexo A.3.

#### ✓ Determinação do teor de humidade e matéria mineral e orgânica

A metodologia efetuada para avaliar os dois parâmetros em questão é idêntica à descrita no subcapítulo 3.1, relativo à determinação dos sólidos totais e da matéria mineral e orgânica do hidrolisado proteico.

#### ✓ Determinação do óxido de crómio

Para determinar o teor de óxido de crómio presente na amostra, utilizou-se o método do ácido perclórico descrito na norma *BS 1309:1974*. Este método baseia-se na oxidação das cinzas da amostra com ácido perclórico, seguida da titulação iodométrica do crómio hexavalente.

### 3.3. Extração do Colagénio e Caraterização da Gelatina

Com o intuito de extrair o colagénio e conseqüentemente obter gelatina, as raspas *Wet-Blue* foram submetidas a um processo de hidrólise alcalina com óxido de magnésio. Esta reação deu-se num banho termostático (*Selecta, Unitronic OR*) a 80 °C, com uma velocidade de agitação de 80 rpm, durante 2 horas. Decorrido o tempo de extração, o bolo de crómio foi separado da gelatina por centrifugação (*Orto, Alresa Mod. Digicen*), decantação e finalmente, filtração a vácuo. O procedimento adotado relativo à extração da gelatina encontra-se no Anexo A.4.

Relativamente à caraterização da gelatina, foram analisados os teores de sólidos totais, matéria mineral e orgânica e crómio total. A metodologia efetuada na determinação dos três parâmetros em questão é idêntica à realizada na análise dos

sólidos totais, da matéria mineral e orgânica e do crómio do hidrolisado proteico, presente no subcapítulo 3.1.

### **3.4. Concentração do Hidrolisado Proteico em 40%**

Após a caracterização do hidrolisado, verificou-se que seria necessário concentrá-lo como ponto de partida para a produção de bioprodutos e de biofilmes.

Para isso recorreu-se a um evaporador rotativo, o qual permitiu a ebulição da solução e conseqüente evaporação do solvente – água. O solvente, ao passar num condensador onde corria água fria, condensava sendo recolhido num recipiente apropriado. Este equipamento foi utilizado por permitir a ligação do condensador a um sistema de vácuo que provoca uma diminuição da pressão no sistema e conseqüente destilação do solvente a uma temperatura mais baixa do que à da pressão atmosférica, preservando a amostra de uma eventual degradação térmica. O procedimento efetuado encontra-se no Anexo A.5.

Num primeiro momento, estipulou-se concentrar 1000 gramas de hidrolisado em cerca de 40%, no entanto, com a realização da experiência, verificou-se que seria necessário repetir a concentração de forma a obter uma maior quantidade de concentrado. Assim, utilizou-se no total, 2500 gramas de hidrolisado. Dado a limitação do material de laboratório disponível, nomeadamente a não existência de balões volumétricos de 1 L, a concentração foi realizada cinco vezes em balões de 500 mL. Para tal ser possível, foi necessário efetuar cálculos prévios a fim de encontrar qual a massa de concentrado e de água a obter. Os cálculos relativos a estas massas encontram-se no anexo C.4.

Por fim, determinou-se o teor de sólidos totais do concentrado no sentido de verificar se a concentração em 40 % foi alcançada.

### **3.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro**

Os bioprodutos foram obtidos a partir de duas formas: uma, pela reticulação do hidrolisado com glutaraldeído a diferentes concentrações (2, 5 e 10% sobre a massa seca de hidrolisado) e outra, juntando licor negro ao hidrolisado em diferentes proporções (1:3, 1:1, 3:1). Os protocolos experimentais realizados encontram-se no Anexo A.6.

No sentido de determinar as quantidades dos inúmeros reagentes a utilizar no recurtume, foi necessário primeiramente caracterizar as peles quanto ao teor de humidade.

Posteriormente, recorreu-se a fulões (Figura 3.2) onde o couro sofreu um processo de recurtume que durou, aproximadamente, 6 horas. Sumariamente, o processo de recurtume compreendeu as operações de recromagem, neutralização, lavagem, recurtume e tingimento, engorduramento e fixação. No fim, foi necessário espremer, alisar, secar e amaciar a pele, tendo sido esta última operação realizada pelo Centro Tecnológico das Indústrias do Couro (CTIC).



**Figura 3.2 - Fulões.**

Como se pode observar pela Figura 3.2, existiam quatro fulões. Desta forma, foram realizados 4 ensaios que diferiram entre si relativamente aos reagentes utilizados na fase de recurtume. Num fulão, foram utilizados copolímeros sintéticos (ensaio padrão) e nos restantes foram utilizados os bioprodutos sintetizados, ou seja, num fulão foi aplicado sobre a pele, a mistura hidrolisado (HP) mais 2% de glutaraldeído (Glu), noutro foi aplicado a mistura HP mais 5% de Glu e finalmente no último fulão foi aplicado a mistura HP mais 10% de Glu. A mesma metodologia foi levada a cabo numa fase posterior em que se efetuaram mais 4 ensaios, mas desta vez para além do padrão foram aplicados no couro, as misturas de hidrolisado mais licor negro em diferentes proporções por cada fulão.

Finalmente, as peles foram sujeitas a diferentes testes onde foram avaliadas a resistência à extensão e ao rasgo. Todas estas análises foram realizadas pelo Centro Tecnológico das Indústrias do Couro (CTIC).

### **3.6. Preparação de Biofilmes para Aplicação na Agricultura**

Em termos gerais, os biofilmes foram sintetizados pela adição do hidrolisado proteico a glutaraldeído. Para garantir que o produto obtido não apresentava elevada dureza e portanto baixa maleabilidade, foi adicionado um plastificante para o amaciar. O plastificante utilizado foi a glicerina.

Numa primeira estância foi preparado um biofilme pela junção dos três reagentes que foram agitados vigorosamente promovendo a reticulação química. Como resultado a mistura ganhou consistência e nesse momento foi vertida para uma prensa onde foi aplicada uma tensão de 100 kg.

Em função dos resultados obtidos que posteriormente serão expostos, foram realizados mais dois ensaios em condições semelhantes às anteriormente explicitadas com uma diferença; obtido o biopolímero, este foi deixado a secar à temperatura ambiente cerca de 12 horas e só depois lhe foi aplicada uma tensão. No Anexo A.7 constam os passos realizados para a produção dos biofilmes.

Em qualquer ensaio efetuado, as quantidades foram equivalentes, 20 gramas de hidrolisado proteico, 25% de glutaraldeído e 25% de glicerina em relação à massa de hidrolisado. A agitação das misturas ocorreu entre 12-15 minutos.



## 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados dos ensaios experimentais realizados. Importa também referir que os resultados relativos às caracterizações representam a média dos ensaios efetuados para cada parâmetro estudado. Os resultados da caracterização do hidrolisado proteico e das raspas *Wet-Blue* encontram-se nos subcapítulos 4.1 e 4.2, respetivamente. Relativamente à extração do colagénio e caracterização da gelatina, os resultados estão descritos no subcapítulo 4.3 e no subcapítulo 4.4 estão patentes os resultados relativos à concentração do hidrolisado. No que concerne à síntese de bioprodutos, no subcapítulo 4.5 expõem-se os resultados experimentais alcançados onde se incluem os resultados da avaliação das peles. Por fim, no subcapítulo 4.6 apresentam-se os resultados referentes aos biofilmes.

### 4.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico

Dos parâmetros suscetíveis de serem analisados, foram escolhidos os teores de sólidos totais, matéria mineral e orgânica, azoto e crómio. Com isto pretende-se analisar atentamente as principais características do hidrolisado proteico cujos resultados experimentais encontram-se descritos na Tabela 4.1. Os exemplos de cálculo correspondentes podem ser consultados no Anexo C.1.

**Tabela 4.1** - Resultados experimentais obtidos na caracterização do hidrolisado proteico.

(Quadery et al., 2016)<sup>33</sup>

<b>Sólidos Totais (%)</b>	7,4	70,72
<b>Matéria Mineral (%) *</b>	29,73	2,97
<b>Matéria Orgânica (%) *</b>	70,27	97,03
<b>Azoto (%) *</b>	10,32	10,34
<b>Proteína (%) *</b>	64,49	64,63
<b>Crómio (ppm)</b>	76,56	1,47

\* Valores percentuais calculados em base seca.

Pela observação da Tabela 4.1 verifica-se que, comparativamente aos valores de referência (70,72%), o hidrolisado possui um baixo teor de sólidos (7,4%), daí ter sido necessário concentrá-lo de forma a aumentar o teor de proteína por volume de solução. Relativamente à matéria mineral, o valor obtido (29,73%) é nitidamente superior ao encontrado na literatura (2,97%) e no que diz respeito ao teor de matéria

orgânica, existe uma diferença entre o valor determinado (70,27%) e o encontrado na referência bibliográfica (97,03%).

Quanto ao teor de azoto e de proteína (10,32% e 64,49%, respetivamente), constata-se que o hidrolisado apresenta valores próximos aos reportados por Quadery *et al.* (2016) (10,34% e 64,63%, respetivamente).

Por fim, o teor de crómio (76,56 ppm) presente no hidrolisado é notoriamente superior ao encontrado na referência bibliográfica (1,47 ppm). Analisando os valores do Decreto-Lei nº 118/2006, no que diz respeito às quantidades anuais de metais pesados que podem ser introduzidos nos solos cultivados, é possível constatar-se que, para uma eventual utilização do hidrolisado para produção de um fertilizante orgânico, este não pode ser utilizado para fins agrícolas uma vez que o parâmetro em questão não cumpre o valor legislado no referido Decreto-Lei.

## 4.2. Caracterização das Raspas Wet-Blue

Na Tabela 4.2 apresentam-se os resultados experimentais obtidos para a caracterização das raspas *Wet-Blue*, podendo encontrar-se os respetivos exemplos de cálculo no Anexo C.2.

**Tabela 4.2** - Resultados experimentais respeitantes à caracterização das raspas *Wet-Blue*.

		(Pati et al., 2013) <sup>14</sup>	(Quadery et al., 2016) <sup>33</sup>
<b>Humidade (%)</b>	55,62	24,10	21,96
<b>Matéria Mineral (%) *</b>	8,80	6,86	6,63
<b>Matéria Orgânica (%) *</b>	91,20	93,14	93,37
<b>Óxido de crómio (%) *</b>	3,90	3,12	3,42

\* Valores percentuais calculados em base seca.

Sumariamente, analisando os resultados obtidos constata-se que a maioria dos parâmetros difere ligeiramente dos valores encontrados nas referências bibliográficas.

O teor de humidade (55,62%) é manifestamente superior aos valores de referência (24,10% e 21,96%). Esta diferença advém de possíveis disparidades nas condições e duração de armazenamento e nas condições climáticas. O teor de matéria mineral e orgânica (8,80 e 91,20%, respetivamente) é semelhante ao descrito por Pati *et al.* (2013) (6,86 e 93,14%, respetivamente) e por Quadery *et al.* (2016) (6,63 e 93,37%, respetivamente).

Relativamente ao teor de óxido de crómio (3,9%), este situa-se um pouco acima dos valores de referência (3,12% e 3,42%).

### 4.3. Extração do Colagénio e Caracterização da Gelatina

Relativamente à extração de colagénio, efetuaram-se inicialmente três ensaios. Em cada um, utilizaram-se aproximadamente, 10 g de raspa. Como uma certa quantidade foi utilizada para caracterizar o produto obtido, foi necessário realizar mais ensaios para garantir ter gelatina suficiente para utilizar numa fase seguinte do trabalho. Assim obteve-se no total, aproximadamente, 390 g de gelatina.

Na Tabela 4.3 estão reproduzidos os resultados adquiridos experimentalmente relativos aos parâmetros caracterizados e na Figura 4.1 pode observar-se a gelatina obtida. No Anexo C.3 estão patentes os cálculos concernentes a esta caracterização.

**Tabela 4.3** - Caracterização da gelatina.

(Cabeza, L. et al., 1998) <sup>34</sup>

<b>Sólidos Totais (%)</b>	1,20	3,54
<b>Matéria Mineral (%) *</b>	36,11	17,33
<b>Matéria Orgânica (%) *</b>	63,89	82,67
<b>Crómio (ppm)</b>	<0,50	0,30

\* Valores percentuais calculados em base seca.



**Figura 4.1** - Gelatina obtida por hidrólise alcalina.

Comparativamente à referência bibliográfica, conclui-se que de forma geral, os valores obtidos dos parâmetros analisados são ligeiramente mais baixos à exceção do teor de matéria mineral. A gelatina obtida contém um teor de sólidos de 1,20%, menor do que o valor de referência – 3,54%. Quanto ao teor de matéria mineral e orgânica, a gelatina obtida no presente trabalho apresenta maior teor de matéria mineral (36,11%) e menor teor de matéria orgânica (63,89%), relativamente ao referido por Cabeza, L et al. (1998) (17,33 e 82,67%, respetivamente). Ainda que não tendo o conhecimento

exato da concentração de crómio presente na gelatina, foi possível constatar-se que apresenta um teor de crómio inferior a 0,50 ppm, tal como o valor de referência (0,30 ppm).

Todas as diferenças observadas poderão dever-se às diferentes condições de processo de hidrólise a que a matéria-prima da gelatina foi sujeita, nomeadamente a quantidade de água e de óxido de magnésio utilizadas.

À semelhança do hidrolisado, seria necessário aumentar o teor de proteína por volume de solução. Contudo, dada a quantidade de gelatina obtida e o teor de sólidos totais, o dispêndio de energia necessário para concentrar a gelatina tornaria o processo oneroso independentemente da aplicação a que se destinasse. Por esta razão, a gelatina obtida não foi utilizada.

#### **4.4. Concentração do Hidrolisado Proteico em 40%**

Como referido anteriormente, foi necessário realizarem-se cálculos prévios de forma a saber quando se concluíam o processo de concentração. Verificou-se portanto, que por cada 500 g de hidrolisado, a massa de água a obter seria de, aproximadamente, 407,5 g (analogamente, obter-se-ia 92,5 g de concentrado no final da atividade laboratorial). Tal, não se constatou. Para qualquer uma das vezes que se realizou a concentração, nunca se obteve os valores de massa referidos anteriormente.

Em termos de massa total a concentrar, 2500 gramas, dever-se-ia ter obtido 462,5 gramas de concentrado (Figura 4.2), mas só se obteve 315,17 gramas. Este valor é possivelmente justificável devido ao facto de na maioria das vezes que se realizou a concentração, ter-se observado que a água apresentava uma coloração amarelada, indicativo da presença de hidrolisado quando o suposto era ter-se só evaporado solvente. A par disto, também se verificou a presença de um aroma característico no recipiente que continha a água. Também na remoção do concentrado, devido à sua natureza viscosa, não foi possível recolhê-lo na totalidade ficando algum impregnado no fundo e nas paredes do balão, o que seria facilmente removível caso a transferência fosse realizada mal fosse terminada a atividade laboratorial.

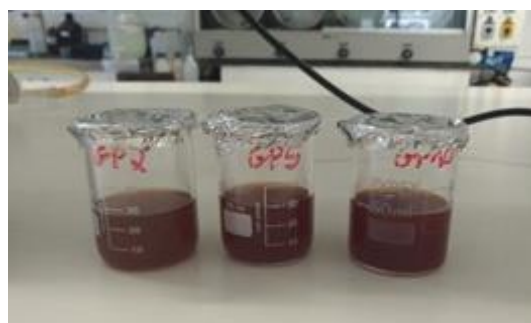


**Figura 4.2** - Concentrado de hidrolisado proteico.

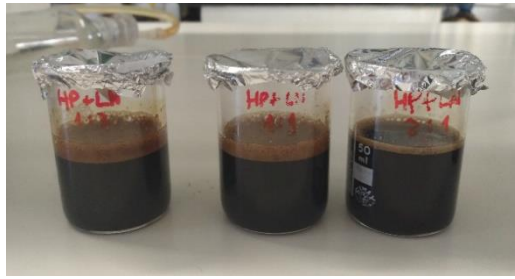
Foi ainda determinado o teor de sólidos totais para conhecer qual a concentração real obtida após a atividade laboratorial. Após a análise, constatou-se que o primeiro concentrado obtido continha 69,7 % de sólidos totais e o segundo, 64,4% de sólidos, o que indica que a concentração em 40% não foi conseguida contudo não afetou os passos seguintes do trabalho. É de salientar que para produção de bioprodutos foi acrescentada a quantidade de água necessária de forma ao hidrolisado apresentar uma concentração de 40%.

#### **4.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro**

Nas figuras que se seguem pode-se observar os bioprodutos sintetizados a partir do hidrolisado proteico concentrado: por adição de glutaraldeído (Figura 4.3) e por adição de licor negro (Figura 4.4).



**Figura 4.3** - Hidrolisado com adição de 2, 5 e 10% de glutaraldeído sobre a massa seca, respetivamente.

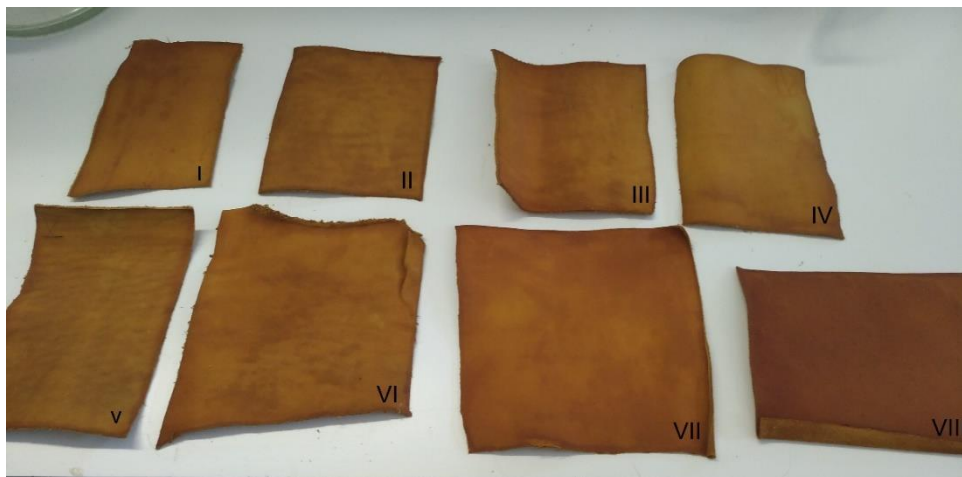


**Figura 4.4** - Hidrolisado com adição de licor negro em diferentes proporções (1:3, 1:1 e 3:1).

Independentemente do agente de reticulação utilizado, seria de esperar que os bioprodutos apresentassem alguma consistência, o que não se verificou. Possivelmente, deve-se ao pouco tempo de agitação da mistura ou da quantidade de agente reticulante utilizado. Contudo, este facto não foi impeditivo da operação de recurtume ter sido levada a cabo podendo observar-se nas Figuras 4.5 e 4.6 as amostras de couro antes e após o processo de recurtume, respetivamente.



**Figura 4.5** – Amostra de couro antes do recurtume.



**Figura 4.6** – Amostras de couro após o recurtume.

Relativamente à Figura 4.6, nas amostras I e V foram aplicados copolímeros sintéticos na etapa de recurtume (ensaios padrão), nas amostras II, III e IV, foram aplicados os bioprodutos que foram processados com 2, 5 e 10% de glutaraldeído sobre a massa seca de hidrolisado, respetivamente, e nas amostras VI, VII e VIII os bioprodutos processados com licor negro nas proporções de 1:3, 1:1 e 3:1, respetivamente.

Posto isto, pode-se analisar a Tabela 4.4 onde se expõe uma avaliação subjetiva acerca da firmeza da flor, toque da pele e intensidade da cor. Para melhor compreensão da tabela tenha-se em atenção os seguintes aspetos:

- Firmeza da flor: 1 representa uma pele bem solta de flor e 5 uma pele bem firme de flor;
- Toque da pele: 1 representa uma pele dura e 5 uma pele macia ;
- Intensidade da cor: 1 representa um cor muito ténue e 5 uma cor muito mais intensa.

**Tabela 4.4** - Avaliação subjetiva dos ensaios.

Ensaio	Firmeza	Toque	Cor
I	4	3	3
II	4	2+	3
III	4	3+	3+
IV	4	3	3-
V	4	3	3
VI	4	3	3+
VII	4	3+	3+
VIII	4	3	3+

Em função dos dados expostos na Tabela 4.4, pode-se constatar que quanto à firmeza das peles, todas as amostras ficaram firmes (4). Relativamente ao toque, de modo geral as peles ficaram mediamente macias (de 2+ a 3+). Este resultado deve-se, possivelmente, ao teor de humidade que as peles apresentavam no início do processo (20,5%) sendo que o mais aconselhado é de 50%. Por fim, em relação à avaliação da intensidade da cor e notando que foi realizada por comparação com os ensaios padrão (ensaios I e V), os ensaios VI, VII e VIII revelaram-se ligeiramente melhores do que os ensaios II, III e IV.

Posteriormente, foram realizados testes às peles recurtidas onde foram avaliadas a resistência da flor à extensão e ao rasgo. Na Tabela 4.5 podem-se observar os resultados obtidos.

**Tabela 4.5** - Resultados obtidos relativos à avaliação da resistência à extensão e rasgo.

Ensaio	Resistência da flor à extensão		Resistência ao rasgo
	Alongamento (mm)	Carga de rotura (N)	Carga de rotura (N)
I	7,7	225,3	123
II	7,6	316,3	131
III	7,8	314,5	176
IV	8,5	281,0	140
V	8,2	285,8	143
VI	8,9	405,9	150
VII	8,8	302,4	206
VIII	8,7	317,3	126

Valores mínimos das propriedades testadas; alongamento na rotura de flor – 7 mm, carga na rotura de flor – 150N e carga de rotura (rasgo) – 120 N.

Para a análise da Tabela 4.6 deve-se ter em conta que os ensaios II, III e IV serão comparados com o ensaio padrão I e os ensaios VI, VII e VIII com o ensaio padrão V.

Em relação ao ensaio padrão I, verificou-se que de, forma geral, a resistência à extensão foi superior nos ensaios II, III e IV. O mesmo se verificou nos ensaios VI, VII e VIII comparativamente ao ensaio padrão V.

Quanto à resistência ao rasgo, contactou-se que os ensaios II, III e IV (131, 176 e 140 N, respetivamente) mostraram um aumento em comparação ao ensaio padrão I (123 N). Relativamente aos ensaios comparados ao ensaio padrão V (143 N), verificou-se um aumento da resistência ao rasgo unicamente nos ensaios VI e VII (150 e 206 N, respetivamente), apresentando o ensaio VIII um valor mais baixo (126N).

Particularizando nos ensaios II, III e IV, aferiu-se que os resultados do alongamento não apresentam diferenças significativas (7,6, 7,8 e 8,5 mm, respetivamente). A carga de rotura é maior nos ensaios II e III (131 e 176 N, respetivamente) do que no ensaio IV (140 N). Observa-se ainda uma maior resistência ao rasgo no ensaio III (176 N), resultado conseguido pela aplicação do bioproducto processado com 5% de glutaraldeído sobre a massa seca de hidrolisado.

Analisando agora os ensaios VI, VII e VIII, os valores obtidos para o alongamento são bastante próximos (8,9, 8,8 e 8,7 mm, respetivamente). No que respeita à carga de rotura, destaca-se o valor do ensaio VI (405,9 N) que foi significativamente superior aos ensaios VII e VIII (302,4 e 317,3 N, respetivamente). A resistência ao rasgo foi maior no ensaio VII (206 N), quando aplicado o bioproducto processado com licor negro numa proporção de 1:1.

Os resultados da aplicação dos bioproductos permitiram verificar uma melhoria nas propriedades avaliadas sendo que as peles recurtidas com bioproductos processados

com licor negro (ensaios VI, VII e VIII) representam os melhores resultados no que diz respeito à resistência à extensão e ao rasgo.

#### 4.6. *Preparação de Biofilmes*

Como citado anteriormente, numa primeira fase foi preparado um biofilme que foi vertido numa prensa e consecutivamente foi-lhe aplicado uma tensão de 100 kg. Na Figura 4.7 pode observar-se o resultado obtido.



**Figura 4.7** - Biofilme antes e depois de ser prensado.

Pela observação da Figura 4.7, constata-se que o material “fugiu” para as bordas da prensa tendo sido destruído e por esse motivo não se obteve um filme. No sentido de o reaproveitar, foi retirada uma amostra onde foi aplicado um peso, pré-aquecido, e posteriormente deixada a secar à temperatura ambiente. Pela Figura 4.8 constata-se que a secagem e a temperatura são fatores que favorecem a formação do biofilme.



**Figura 4.8** - Biofilme.

Face a este resultado, foram produzidos mais dois biofilmes em condições experimentais idênticas às do primeiro ensaio. Contudo, quando preparada a mistura, esta foi deixada a secar à temperatura ambiente durante cerca de 12 horas. Na Figura 4.9 são observáveis os biofilmes obtidos após o período de secagem.



**Figura 4.9** - Biofilmes obtidos após um período de secagem de 12h.

De seguida, submeteu-se um dos biofilmes a uma tensão de 100 kg recorrendo à prensa pré-aquecida, cujo resultado encontra-se ilustrado na Figura 4.10.



**Figura 4.10** - Resultado experimental relativo à prensagem do biofilme.

Observando a Figura 4.10, afere-se que o resultado não foi o esperado. Isto leva a crer num conjunto de possibilidades que não permitiram a obtenção de um melhor resultado. Relativamente ao processo de produção do biofilme, a quantidade de glicerina pode ter sido excessiva e/ou a quantidade de glutaraldeído pode ter sido insuficiente para garantir o ganho da rigidez estrutural do biofilme, outra possibilidade

é o tempo de secagem não ter sido suficiente para garantir a perda de água necessária e/ou a tensão aplicada na prensa ser demasiada.

Face a estes resultados, o terceiro biofilme não teve qualquer utilidade.



## 5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

---

Após a finalização do trabalho que foi constituído por várias etapas, pode-se tirar conclusões e a partir delas refletir e, eventualmente, sugerir trabalhos futuros que lhe possam dar continuidade.

Sendo um objetivo fulcral deste trabalho a valorização das raspas *Wet-Blue* provenientes da indústria de curtumes, conclui-se que a partir destas se contraria a problemática ambiental associada ao setor, pois é possível obter um produto orgânico de alto teor proteico que pode ter várias aplicações, evitando utilizar outras soluções já ultrapassadas. Neste trabalho, conseguiu-se aproveitar o hidrolisado proteico para produção de bioprodutos que foram aplicados no recurtume de peles. O mesmo não aconteceu na preparação de biofilmes.

Relativamente à caracterização das raspas, verificou-se que estas apresentavam um alto teor de matéria orgânica (91,20%) o que indicia a presença de conteúdo proteico que pode ser extraído e aproveitado.

Provou-se que é possível extrair das raspas o conteúdo proteico, dependendo no entanto das condições processuais a que estas foram sujeitas, sendo demonstrado com o hidrolisado mas não com a gelatina. Neste último caso, a reduzida quantidade obtida (390 g) e o baixo teor de sólidos totais (1,20%), conduz à conclusão de que o processo de concentração seria oneroso devido ao elevado dispêndio de energia necessário. Por esta razão não se prosseguiu com a gelatina para as restantes etapas do trabalho.

Poderão ter sido vários fatores que interferiram no resultado obtido quanto à produção de gelatina: o agente hidrolisante utilizado, MgO, as condições operatórias (temperatura do banho, velocidade de agitação do banho, quantidade de reagentes e tempo de extração). Importa refletir sobre estes fatores e em futuros trabalhos proceder a estudos no sentido de rentabilizar a extração.

Proveniente da hidrólise alcalina de raspas *Wet-Blue* e portanto contendo crómio na sua constituição, foi importante determinar o teor de crómio do hidrolisado, pois sabe-se dos efeitos nefastos que o crómio pode ter quando convertido de  $\text{Cr}^{3+}$  em  $\text{Cr}^{6+}$ . O teor de crómio do hidrolisado obtido foi de 76,56 ppm, valor este que está acima do permitido pela legislação em vigor. Refletindo neste resultado poder-se-á repetir a análise efetuada e a ser confirmado, terá de se pensar em soluções tecnológicas de forma a diminuir o teor do crómio no hidrolisado. Face ao resultado, pode-se concluir que não deveria ser utilizado para fins agrícolas, como fertilizante ou na produção de biofilmes.

Foi necessário concentrar o hidrolisado utilizado como ponto de partida para a produção de bioprodutos e de biofilmes para um valor em torno dos 40%. Esta operação de concentração foi de difícil controlo não tendo contudo afetado os passos seguintes do trabalho.

Numa fase posterior, o hidrolisado proteico concentrado foi utilizado para produzir bioprodutos para aplicação no recurtume do couro.

A aplicação dos bioprodutos no processo de recurtume compreendeu a realização de oito ensaios: dois ensaios padrão (processo de recurtume tradicional) e seis ensaios de aplicação dos bioprodutos sintetizados, posteriormente comparados aos ensaios padrão. Para atestar o resultado do efeito dos bioprodutos no processo de recurtume do couro, os vários ensaios foram avaliados quanto à resistência do couro à extensão e ao rasgo. Todas as amostras revelaram melhorias nas propriedades referidas, sendo as mais significativas as amostras onde se aplicou bioprodutos sintetizados com licor negro. Provou-se que é possível, a partir de resíduos sólidos da indústria de curtumes, o reaproveitamento dos mesmos com uma mais valia na minimização dos impactes ambientais.

Na preparação de biofilmes, realizaram-se três ensaios e embora não se tenha obtido o desejado, pode-se concluir que é necessário continuar a investigar persistentemente para o avanço da técnica em causa, nomeadamente o tempo de secagem do biofilme, o agente reticulante, a quantidade de plastificante, o tempo de agitação e finalmente, a influência da temperatura e pressão no processo.

Sumarizando, e mediante os resultados obtidos, sugere-se a continuidade do trabalho, nomeadamente na área de investigação referente aos biofilmes que apresenta margem para progressão.

## Bibliografia

---

1. História da Indústria dos Curtumes, <http://www.apic.com.pt/> (consultado em 25 de Abril de 2017).
2. Neto, S. (2013), Preparação de Biofilmes a partir de Resíduos da Indústria de Curtumes, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Mestrado em Engenharia Química, Ramo Tecnologias de Proteção Ambiental, 91 pgs.
3. Crispim, A. (2017), Indústria de Curtumes, Seminário, Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Licenciatura em Engenharia Química, 66 pgs.
4. Moreira, S. (2008), Estudo da obtenção de Gelatina a partir de Raspa Wet-Blue da Indústria de Curtumes, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Mestrado em Engenharia Química, Ramo Tecnologias de Proteção Ambiental, 89 pgs.
5. Boas práticas para o Setor de Curtumes (2015), Centro Tecnológico das Indústrias do Couro, 181 pgs.
6. The World's Worst Pollution Problems: Assessing Health Risks at Hazardous Waste Sites, Pure Earth, Blacksmith Institute, 52 pgs.
7. Sundar, V., Raghavarao, J. et al. (2011), Recovery and Utilization of Chromium-Tanned Proteinous Wastes of Leather Making: A Review, *Leather Process Technology Department, Central Leather Research Institute*, 41:2048-2075
8. Schmidt, M., Dornelles, P., Jutoba, H. et al. (2015), Collagen extraction process, Department of Technology and Food Science, Federal University Of Santa Maria, Brazil, 913-922.
9. Pati, A. et al. (2014), A review on management of chrome-tanned leather shavings: a holistic paradigm to combat the environmental issues, 17 pgs.
10. Feken, K. (2015), Collagen, <http://slideplayer.com/slide/4382568/> (consultado em 26 de Junho de 2017)
11. Proteínas estruturais: colagénio, queratina e elastina (2011), Bioquímica I, Mestrado Integrado em Medicina, 12 pgs.
12. Guillén, M., Giménez, B. et al. (2011), Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, Food Hydrocolloids 25, 1813-1827.
13. Rizk, M., Mostafa, N. (2016), Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications, Chemistry Department, Faculty of Science, 1601-1609.

14. Pati, A., Rubina, C. (2013), Studies on the Generation of Biogas from Collagen Hydrolysate obtained from Chrome Shavings by Alkaline Hydrolysis: A Greener Disposal Method, *Research Journal of Recent Sciences* Vol. 2 (ISC-2012), 234-240.
15. Martinelango, P. (2002), MULTIDIMENSIONAL INSTRUMENTAL ANALYSIS OF WET-BLUE LEATHER HYDROLYSATE, Faculty of Texas Tech university, Master of Science, 76 pgs.
16. Muralidharan, N., Shakila, R., et al. (2011), Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *J Food Sci Technol*, 8 pgs.
17. Gómez, K., Prado, M. et al. (2012), Extraction And Characterization Of Collagen From Different Biological Tissues, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico, Laboratorio de Patología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, 5 pgs.
18. Matyasovsky, J., Gajtanska, M. et al. (2012), Polymer Bio-Composites Based On Collagen, *Technical University , JALCA* Vol. 107, 2012, 323-335.
19. Catalina, M. et al. (2011), Tailor-Made Biomaterials From Collagenic Wastes, Instituto de Quimica Avanzada du Cataluna (IQAC), *JALCA* Vol. 106, 2011, 153-160.
20. Pinto, A., Tabacniks, M., Implantação de Ións Em Materiais Poliméricos.
21. Mane, S. et al. (2015), Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Polymer Microbeads: A Review, *Polymer Science and Engineering Division, National Chemical Laboratory, Pune – 411008, India, CANADIAN CHEMICAL TRANSACTIONS* Vol. 3 Issue 4, 473-485.
22. L.H.H., D., Dijkstra, P. et al. (1995), Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, Department Of Chemical Technology, University of Twente, Netherlands, *Journal Of Materials in Medicine* 6 (1995) 460-472.
23. Velmurugan, P., Singam, E. et al. (2013), Investigation on Interaction of Tannic Acid with Type I Collagen and its Effect on Thermal, Enzymatic and Conformational Stability for Tissue Engineering Applications, Council of Scientific and Industrial Research - Central Leather Research Institute, Chemical Laboratory, Adyar, Chennai 600 020, India, 28 pgs.
24. Vieira, M., Silva, M. et al. (2010), Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, School of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Brazil, *European Polymer Journal* 47 (2011) 254-263.
25. Silva, P. (2016), Introdução à ciência e engenharia de materiais, *Materiais e Corrosão*, Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Licenciatura em Engenharia Química ISEP, 43 pgs.

26. Conde, L. (2011), Polímeros naturais para aplicações biomédicas. Dissertação de Mestrado em Química, Área de Especialização em Química Medicinal, Universidade do Minho, 99 pgs.
27. Silva, P. (2014), Polímeros, Materiais e Corrosão, Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Licenciatura em Engenharia Química ISEP, 143 pgs
28. Sampath, U., Ching, Y., Chuah, C. et al. (2016), Fabrication of Porous Materials from Natural/Synthetic Biopolymers and Their Composites, University of Malaya, 33 pgs.
29. LAGARON, J.M.; LOPEZ-RUBIO, A. *Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies*. Trends in Food Science & Technology, 22, 611-617, 2011.
30. Sabia que o vidro demora até 1 milhão de anos a decompor-se na natureza? <http://www.lipor.pt/pt/mitos-urbanos-da-reciclagem/sabia-que-o-vidro-demora-ate-1-milhao-de-anos-a-decompor-se-na-natureza/> (acedido em 17 de Abril de 2017).
31. Polímeros e Materiais Poliméricos, Manual do Professor
32. MARTELLI, S.M. Obtenção e Caracterização de Filmes de Queratina de Penas de Frango. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos na área de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos. Universidad Federal de Santa Catarina. Fevereiro de 2003, 98 pgs.
33. Quadery, A. Et al (2016), Extraction of polypeptide solution from Tannery solid waste (chrome shavings) and its application as Poultry feed, Leather Research Institute, Bangladesh, IOSR-JAC Volume 9. Issue Ver. III, PP 32-35.
34. Cabeza, L., Taylor, M. et al. (1998), Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium, US Department of Agriculture, Waste Management 18, 211-218



## Anexos

---

### Anexo A – Procedimentos Analíticos

Neste anexo apresentam-se os procedimentos gerais adotados para a obtenção e caracterização tanto do hidrolisado proteico como das raspas *Wet-Blue*, a extração e caracterização da gelatina, a concentração, por evaporação, do hidrolisado e ainda a síntese de bioprodutos e biofilmes.

#### A.1. Obtenção do Hidrolisado Proteico

De seguida apresenta-se o protocolo experimental relativo à extração do conteúdo proteico das raspas *Wet-Blue*.

##### Material:

- ✓ Matrizes;
- ✓ Picador 1-2-3;
- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);
- ✓ Banho termostático.

##### Reagentes/Soluções:

- ✓ Raspas *Wet-Blue*;
- ✓ NaOH;
- ✓ Água desionizada.

##### Procedimento:

1. Triturar uma determinada quantidade de raspas;
2. Pesar, para um matraz, as raspas trituradas;
3. Adicionar ao matraz, 500% de água desionizada e 8% de NaOH;
4. Colocar a mistura num banho termostático a 80 °C, durante 4 horas;
5. Separar o conteúdo proteico do bolo de crómio por centrifugação.

#### A.2. Caracterização do Hidrolisado Proteico

Com o intuito de caracterizar o hidrolisado proteico, foram analisados o teor de sólidos totais, de matéria mineral e orgânica, de azoto e ainda de crómio. Assim,

apresentam-se de seguida os procedimentos adotados, estando mencionados os materiais e reagentes utilizados.

### A.2.1. Determinação dos sólidos totais

Os sólidos representam toda a matéria que se encontra suspensa ou dissolvida num líquido. Esta análise permite avaliar a massa total dos constituintes sólidos presentes na amostra.

#### Material:

- ✓ Cadinho de porcelana;
- ✓ Balança analítica (*Kern ALJ 220-4NM*);
- ✓ Estufa a 105 °C (*Binder*);
- ✓ Exsicador.

#### Reagentes/Soluções:

- ✓ Amostra de hidrolisado proteico.

#### Procedimento:

1. Pesar um cadinho de porcelana, previamente seco em estufa a 105 °C;
2. Adicionar, rigorosamente, 10 mL de amostra para o cadinho e pesar;
3. Levar à estufa a 105 °C durante, aproximadamente, 1 hora;
4. Colocar num exsicador durante 30 minutos e efetuar a sua pesagem;
5. Repetir a secagem e pesagem até estabilização da massa da amostra.

A massa de sólidos totais por unidade de volume, em percentagem, pode ser determinada pela Equação A.1:

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra seca+cadinho}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, mL}} \times 100 \quad (\text{Equação A.1})$$

Em que:

$m_{\text{amostra seca+cadinho}}$  – Massa da amostra seca mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g).

### A.2.2. Determinação da matéria mineral e orgânica

De forma a ser possível quantificar a matéria mineral e orgânica presente na amostra, esta segue para uma mufla após terem sido analisados os sólidos totais. A massa que persiste após a ida à mufla é a matéria mineral, a que se degradou termicamente diz respeito à matéria orgânica.

#### Material:

- ✓ Cadinho de porcelana e tampa;
- ✓ Mufla a 550 °C (*Heraeus Instruments*);
- ✓ Balança analítica (*Kern ALJ 220-4NM*);
- ✓ Estufa a 105 °C (*Binder*);
- ✓ Exsicador.

#### Reagentes/Soluções:

- ✓ Amostra de hidrolisado proteico.

#### Procedimento:

1. Levar o cadinho com tampa a uma mufla a 550 °C, durante 3 horas;
2. Colocar numa estufa a 105 °C e posteriormente, num exsicador;
3. Pesar e registar a massa de cinzas.

A matéria mineral, em percentagem, pode ser determinada pela Equação A.2:

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra carbonizada}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, ml}} \times 100 \quad (\text{Equação A.2})$$

Onde:

$m_{\text{amostra carbonizada}}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g)

Para determinar o teor de matéria orgânica (Equação A.3) basta:

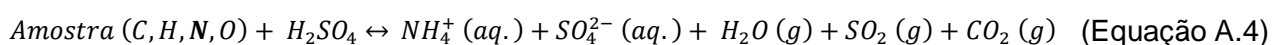
$$\begin{aligned} \text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} &= & (\text{Equação A.3}) \\ &= \text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} - \text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} \end{aligned}$$

### A.2.3. Determinação do teor de azoto total

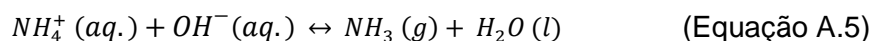
Para determinar o azoto, recorreu-se ao método de *Kjeldahl*. Este método pode ser dividido em três etapas:

1. Digestão da amostra;
2. Destilação;
3. Titulação.

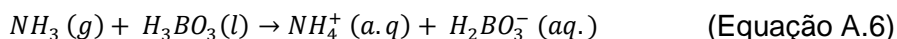
Na primeira etapa, a digestão da amostra promove a conversão do azoto orgânico em amónio. Esta digestão é efetuada a elevada temperatura, utilizando ácido sulfúrico concentrado e um catalisador (Equação A.4):



De seguida, adiciona-se um excesso de hidróxido de sódio que converte o amónio em amoníaco (Equação A.5):



A solução resultante é destilada, recolhendo-se o destilado numa solução padrão de ácido bórico (Equação A.6):



Finalmente, a terceira etapa consiste na titulação com ácido clorídrico de título conhecido e na presença de um indicador, determinando-se a quantidade de amoníaco e conseqüentemente, a quantidade de azoto contida na amostra.

#### Material:

- ✓ Tubos *Kjeldahl*;
- ✓ Digestor de *Kjeldahl* (*Selecta, Bloc Digest 6*);
- ✓ Destilador (*Tecator, Kjeltec System 1002 Distilling Unit*);
- ✓ Provetas de 15, 25 e 100 mL;
- ✓ Matrizes de 250 mL;
- ✓ Pipeta volumétrica de 5 mL;
- ✓ Micropipeta;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Esferas de vidro;
- ✓ Suporte universal;
- ✓ Bureta de 50 mL.

## Reagentes/Soluções:

- ✓ Pastilhas de catalisador;
- ✓  $H_2SO_4$  concentrado;
- ✓ Ácido bórico a 4%;
- ✓ HCl 0,084249 M;
- ✓ NaOH a 40%;
- ✓ Água desionizada;
- ✓ Indicador misto (vermelho de metilo e azul de metileno);
- ✓ Amostra de hidrolisado proteico.

## 1. Digestão

### Procedimento:

1. Pipetar 2,5 mL de amostra para um tubo de *Kjeldahl*;
2. Adicionar lentamente 12 mL de  $H_2SO_4$  concentrado;
3. Adicionar duas pastilhas de catalisador;
4. Fazer 5 réplicas e um ensaio em branco;
5. Colocar algumas esferas de vidro e homogeneizar a mistura;
6. Colocar os tubos de digestão no digestor (Figura A.1), adaptar o sistema de sucção de gases e ligar o digestor;
7. Programar o controlador do equipamento para um aumento gradual até 420 °C com patamar de uma hora a esta temperatura;
8. Desligar o digestor, deixando arrefecer os tubos. Nesta altura, os tubos apresentam um tom azul/verde ou incolor.



Figura A.1 – Digestor de *Kjeldahl* (*Selecta, Bloc Digest 6*).

## 2. Destilação

### Procedimento:

1. Posto o arrefecimento dos tubos, adicionar 75,0 mL de água desionizada;
2. Colocar 25,0 mL de ácido bórico a 4% num matraz;
3. Colocar o matraz no destilador (Figura A.2);
4. Colocar o tubo *Kjeldahl* no destilador, previamente lavado (lavagem com água durante 4 minutos) e adaptar o tubo digestor;
5. Ao tubo de digestão adicionar uma bombada de 50,0 mL de NaOH a 40%;
6. Abrir a válvula de vapor e água e destilar durante 4 minutos;



Figura A.2 – Destilador (Tecator, Kjeldtec System 1002 Distilling Unit).

## 3. Titulação

### Procedimento:

1. Colocar duas gotas de indicador misto nos matrizes;
2. Titular o  $NH_3$  recolhido no matraz com  $HCl$  0,084249 M, até mudança de cor verde/incolor para rosa;
3. Efetuar uma nova lavagem com água desionizada, seguida de uma nova destilação.

O teor de azoto pode ser determinado de acordo com a Equação A.7:

$$\text{Teor de azoto, \%} = \frac{(V_A - V_B) \times N \times MM_N}{\text{Volume de amostra, ml} \times 1000} \times 100 \quad (\text{Equação A.7})$$

Em que:

$V_A$  – Volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL);

$V_B$  – Volume de titulante gasto na titulação do branco (mL);

N – Normalidade do ácido clorídrico (N);

$MM_N$  - Massa molecular do azoto (14,007 g/mol);

Para determinar o conteúdo proteico tem-se a Equação A.8:

$$\% \text{ de proteína} = \text{Teor de azoto, \%} \times f \quad (\text{Equação A.8})$$

Onde:

f – fator de conversão de azoto para proteínas: 6,25, 5,7 ou 6,38 dependendo da amostra.

#### A.2.4. Determinação do teor de crómio total

Para a determinação do crómio total recorreu-se a espectroscopia ótica, nomeadamente, espectrometria de absorção atómica com atomização por chama. Assim sendo, a nível laboratorial, a metodologia compreendeu as seguintes etapas: digestão da amostra, preparação das soluções padrão e leitura das soluções padrão e de amostra.

Material:

- ✓ Placa de aquecimento;
- ✓ Pipeta volumétrica de 5 e 50 mL;
- ✓ Matrizes de 250 mL;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Balões volumétricos de 50 e 100 mL;
- ✓ Micropipeta;
- ✓ Espectrofotómetro de UV/Vis (*Jenway 6300*).

### Reagentes/Soluções:

- ✓  $HNO_3$  concentrado a 65%;
- ✓ Água desionizada;
- ✓ Amostra de hidrolisado proteico;
- ✓ NaOH a 40%;
- ✓ Solução-mãe de crómio 1000 ppm.

### **1. Digestão da amostra**

#### Procedimento:

1. Pipetar, rigorosamente, 50,00 mL de amostra para um matraz;
2. Adicionar 5,00 mL de  $HNO_3$  concentrado a 65%;
3. Aquecer quase até à secura de forma a digerir a amostra;
4. Colocar a mistura num balão volumétrico de 50 mL e perfazer com água desionizada.

### **2. Preparação das soluções padrão**

#### Procedimento:

1. Com o auxílio de uma micropipeta, pipetar o volume adequado de solução-mãe de crómio para balões de 100 mL de forma a obter padrões de 0,5, 1, 2, 4 e 6 ppm;
2. Perfazer com água desionizada;

### **3. Leitura das soluções padrão e das soluções de amostra**

Para ler as absorvâncias, quer das soluções padrão quer das soluções de amostra, foram seguidos os passos descritos no manual presente no laboratório de tecnologia do ISEP onde está descrito o modo operativo do respetivo equipamento.

### **A.3. Caracterização das Raspas Wet-Blue**

As raspas *Wet-Blue* foram caracterizadas quanto ao teor de humidade, de matéria mineral e orgânica e de óxido de crómio.

### A.3.1. Determinação do teor de humidade e de matéria mineral e orgânica

Para caracterizar as raspas *Wet-Blue* quanto ao teor de humidade e de matéria mineral e orgânica, procedeu-se da mesma forma que a mencionada anteriormente relativamente à caracterização do hidrolisado proteico (A.1.1 e A.1.2). A única exceção, é que trabalhando com uma amostra sólida e tal como recomendado pela norma *BS 1309:1974* para a determinação do óxido de crómio, foram utilizadas cerca de 2 g de amostra de raspa por cada réplica.

Para determinar o teor de humidade recorreu-se à Equação A.9 que é dada por:

$$\text{Teor de humidade, \% (m/m)} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação A.9})$$

Onde:

$m_{\text{amostra}}$  – Massa de amostra (g);

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa da amostra seca (g).

O teor de matéria mineral, em percentagem, é dado pela Equação A.10:

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra carbonizada}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação A.10})$$

Seja:

$m_{\text{amostra}}$  – Massa de amostra (g);

$m_{\text{amostra carbonizada}}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g).

Para determinar o teor de matéria orgânica recorreu-se à Equação A.3.

### A.3.2. Determinação do teor de óxido de crómio

O procedimento efetuado para a determinação do óxido de crómio foi o descrito na norma *BS 1309:1974*. No mesmo documento tem-se que é possível determinar o teor de óxido de crómio presente na amostra pela equação A.11:

$$\% Cr_2O_3 = \frac{V_{\text{tiosulfato}} \times 0,00253}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação A.11})$$

Onde:

$V_{\text{tiossulfato}}$  – Volume de tiosulfato adicionado (mL);

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa da amostra seca (g).

#### A.4. Extração e Caracterização da Gelatina

Seguidamente, apresenta-se o procedimento efetuado relativo à extração da gelatina e respetiva caracterização.

##### A.4.1. Extração da gelatina

###### Material:

- ✓ Picador 1-2-3;
- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);
- ✓ Espátula;
- ✓ Papel de alumínio;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Proveta de 100 mL;
- ✓ Banho termostático (*Selecta, Unitronic OR*);
- ✓ Centrífuga (*Orto, Alresa Mod. Digion*);
- ✓ Bomba de vácuo;
- ✓ Sistema de filtração;
- ✓ Filtros 55 mm (*Boeco*).

###### Reagentes/Soluções:

- ✓ Amostra de raspa *Wet-Blue*;
- ✓ MgO;
- ✓ Água desionizada.

###### Procedimento:

1. Triturar uma quantidade de raspa *Wet-Blue* até que esta apresente um aspeto moído;
2. Pesar 10 g de raspa moída;
3. Pesar 1,2 g de óxido de magnésio (equivalente a uma fração de 12% de massa da amostra de couro pesada anteriormente);

4. Misturar a amostra de raspa e o MgO com 100 mL de água;
5. Preparar o processo de digestão alcalina num matraz devidamente tapado para evitar a evaporação da mistura durante o aquecimento;
6. Colocar os matrizes no banho termostático regulado para 80 °C, durante 2 horas e com uma velocidade de agitação de 80 rpm;
7. Deixar arrefecer os matrizes à temperatura ambiente antes de proceder à separação das fases;
8. Colocar a mistura resultante numa centrífuga com uma velocidade de agitação de 3600 rpm, durante 5 minutos;
9. Decantar a gelatina para um gobelés;
10. Proceder à filtração a vácuo da gelatina;
11. Pesar a gelatina (fase orgânica) e armazená-la em frascos.

#### *A.4.2. Caracterização da gelatina*

Relativamente à caracterização da gelatina, foram analisados o teor de sólidos totais, matéria mineral e orgânica e crómio total. A metodologia e equações que permitiram quantificar os parâmetros em questão são as mesmas que as utilizadas na caracterização do hidrolisado proteico como constam nos anexos A.1.1, A.1.2 e A.1.4.

#### *A.5. Concentração do Hidrolisado Proteico*

Para concentrar a solução de hidrolisado proteico recorreu-se a um evaporador rotativo. O material, reagentes/soluções, procedimento efetuado e montagem experimental (Figura A.3) foram, respetivamente:

##### Material:

- ✓ Evaporador rotativo (*Büchi 462; Heidolph VV2000*);
- ✓ Mangueiras;
- ✓ Proveta de 500 mL;
- ✓ Balão de 1 L;
- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);

##### Reagentes/soluções:

- ✓ Hidrolisado proteico;

### Procedimento:

1. Pesar, aproximadamente, 500 g de solução de hidrolisado proteico;
2. Preparar o evaporador adaptando as mangueiras de entrada e saída de água ao condensador;
3. Colocar o balão de fundo redondo contendo a amostra acoplado ao evaporador;
4. Abrir a torneira de água e regular a temperatura do banho até 70-80 °C;
5. Interromper o processo e, rapidamente, pesar a massa de água recolhida no matraz, para depois voltar a colocá-lo no sistema e recomeçar a evaporação. Repetir este passo até obter 407,5 g de água.
6. Desligar o evaporador e deixar arrefecer todos os componentes do equipamento;
7. Proceder à desinstalação das mangueiras;
8. Finda a experiência recolher o concentrado num frasco e armazená-lo num local frio.



**Figura A.3** - Montagem experimental relativa à concentração do hidrolisado.

O procedimento efetuado bem como a equação a considerar para determinar o teor de sólidos totais do concentrado são os mesmos que os descritos no Anexo A.1.1.

## **A.6. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro**

Os bioprodutos foram produzidos de duas formas distintas cujos procedimentos se seguem nos próximos subcapítulos.

### **A.6.1. Hidrolisado Proteico e Glutaraldeído**

A primeira forma de obter os bioprodutos foi pela adição de glutaraldeído ao hidrolisado proteico a diferentes concentrações.

#### Material:

- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);
- ✓ Conta-gotas;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Vareta;

#### Reagentes/soluções:

- ✓ Hidrolisado proteico;
- ✓ Glutaraldeído a 50%;

#### Procedimento:

1. Pesar 30 g de hidrolisado proteico para um gobelé;
2. Adicionar ao hidrolisado, 2% de glutaraldeído sobre a massa seca de hidrolisado;
3. Agitar, com o auxílio de uma vareta, a mistura;
4. Repetir os passos anteriores, alterando a massa de glutaraldeído de forma a obter misturas com 5 e 10% de glutaraldeído sobre a massa seca do hidrolisado.

### **A.6.2. Hidrolisado Proteico e Licor Negro**

A segunda maneira de obter os bioprodutos foi pela adição de licor negro ao hidrolisado proteico em diferentes proporções.

#### Material:

- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);
- ✓ Conta-gotas;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Vareta.

#### Reagentes/soluções:

- ✓ Hidrolisado proteico;
- ✓ Licor Negro.

#### Procedimento:

1. Pesar 10 g de hidrolisado proteico para um gobelé;
2. Adicionar ao hidrolisado, 30 g de licor negro (razão hidrolisado/licor negro de 1:3);
3. Agitar, com o auxílio de uma vareta, a mistura;
4. Repetir os passos anteriores, para razões hidrolisado/licor negro de 1:1 e 3:1.

### A.6.3. Determinação do Teor de Humidade da Pele

O procedimento efetuado bem como a equação a considerar para determinar o teor de humidade da pele sobre a qual foram aplicados os bioprodutos são os mesmos que os descritos no subcapítulo A.2.1.

### A.7. Síntese de Biofilmes

Apresenta-se, de seguida, o procedimento efetuado na preparação de biofilmes.

#### Material:

- ✓ Balança digital (*Acculab Atilon*);
- ✓ Conta-gotas;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Varetas;
- ✓ Placa de aquecimento;
- ✓ Prensa (*MEGA KMG-30A*).

Reagentes/soluções:

- ✓ Hidrolisado proteico;
- ✓ Glutaraldeído 50%;
- ✓ Glicerina 87 %.

Procedimento:

1. Pesar 20 g de hidrolisado proteico para um gobelé;
2. Adicionar ao hidrolisado, 25% de glutaraldeído e 25% de glicerina em relação à massa de hidrolisado pesado;
3. Agitar veementemente, com o auxílio de uma vareta, a mistura de forma a promover a reticulação química e consequente aumento de consistência;
4. Levar o bioproduto a uma prensa (Figura A.4) e aplicar uma tensão de 100 kg.



**Figura A.4** - Prensa (MEGA KMG-30A).



## Anexo B – Resultados Experimentais

Nesta secção encontram-se descritos os principais resultados experimentais obtidos na caracterização do hidrolisado proteico e das raspas *Wet-Blue*, na hidrólise alcalina para obtenção da gelatina e respetiva caracterização e na concentração do hidrolisado, respetivamente. Ainda se podem encontrar também, os resultados obtidos no âmbito da síntese dos bioprodutos e biofilmes.

### B.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico

Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos na caracterização do hidrolisado proteico, cujos parâmetros e o seu respetivo procedimento foram mencionados ao longo deste documento. Na Tabela B.1 pode-se observar os resultados relativos à variação da massa mediante a secagem e pesagem efetuadas e ainda o teor de sólidos totais.

**Tabela B.1** - Resultados experimentais obtidos relativos ao teor de sólidos totais.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
36,7387	37,2102	40,8196	$m_{cadinho} (g)$
47,4380	47,9295	51,5285	
40,9957	41,7062	45,0312	
37,5680	38,0529	41,6397	$m_{amostra+cadinho} (g)$
37,4930	37,9715	41,5773	
37,4808	37,9579	41,5645	
37,4767	37,9537	41,5616	
37,4762	37,9531	41,5613	
7,4	7,4	7,4	<b>Teor de sólidos totais, % (m/v)</b>

Na Tabela B.2 estão patentes as massas obtidas após a amostra ter estado na mufla e o teor de matéria mineral e orgânica para cada ensaio.

**Tabela B.2** - Resultados obtidos respeitantes à matéria mineral e orgânica.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
36,9603	37,4325	41,0415	$m_{amostra\ carbonizada} (g)$
29,73	29,73	29,73	<b>Teor de matéria mineral, % (m/v) *</b>
70,27	70,27	70,27	<b>Teor de matéria orgânica, % (m/v) *</b>

\* Valores percentuais calculados em base seca.

Como referido no corpo do trabalho, o método de *Kjeldahl* termina com uma titulação cujo ponto final se verifica com a passagem de cor esverdeada/incolor para rosa. Na Figura B.1 observa-se a coloração das soluções contidas nos matrazes antes e após a titulação.



**Figura B.1** – Matrazes antes e depois da titulação.

Após a titulação foi quantificado o teor de azoto e de proteínas, estando os resultados descritos na Tabela B.3. Note-se que os matrazes 1 e 2 continham 5 mL de amostra, os matrazes 3, 4 e 5 continham 2,5 mL de amostra e o matraz 6 correspondia ao branco.

**Tabela B.3** - Teor de azoto presente no hidrolisado.

Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4	Matraz 5	Matraz 6	
32,5	32,6	18,2	18,6	18,7	0,2	<b>Volume de titulante adicionado (ml)</b>
10,30	10,33	11,48	11,74	11,80	-	<b>Teor de azoto, % *</b>
64,39	64,59	71,76	73,36	73,75	-	<b>Proteína, %</b>

\* Valor percentual calculado em base seca.

De forma a quantificar o crómio presente no hidrolisado proteico, foi necessário começar por preparar padrões com concentrações entre os 0,5 e 6 ppm. Na Tabela B.4 constam os volumes da solução-mãe de crómio a adicionar aos balões de 100 mL de forma a obter as concentrações desejadas.

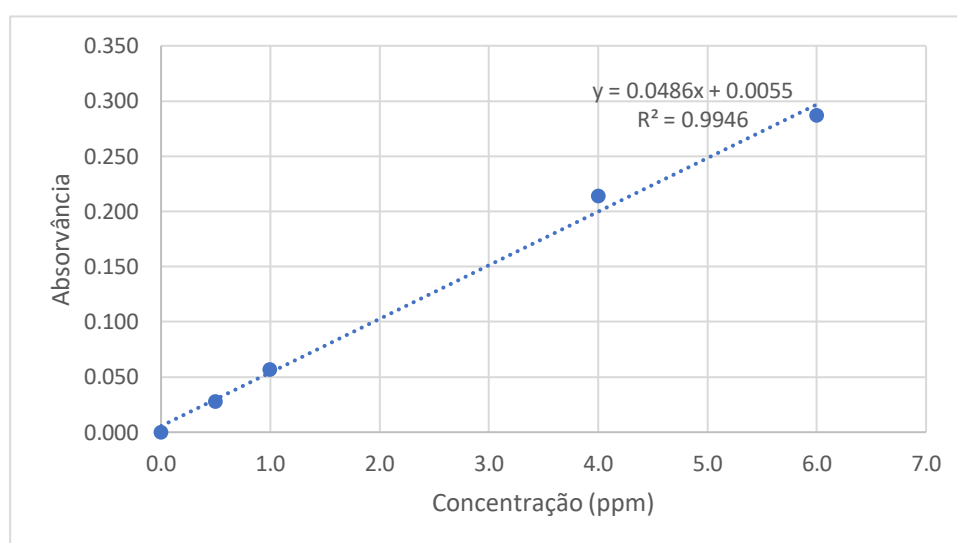
**Tabela B.4** – Volume da solução-mãe de crómio a adicionar em função da gama de concentrações de padrões desejada.

Padrão	Concentração (ppm)	Volume de solução-mãe (mL)
1	0,5	0,05
2	1	0,1
3	2	0,2
4	4	0,4
5	6	0,6

Na Tabela B.5 estão registadas as absorvâncias das soluções padrão que permitiram construir a curva de calibração que traduz a absorvância da solução em função da concentração de crómio presente em solução (Figura B.2).

**Tabela B.5** – Registo das absorvâncias das soluções padrão e do branco.

Padrão	Absorvância
Branco	0,000
1	0,028
2	0,057
3	0,137
4	0,214
5	0,287



**Figura B.2** - Curva de calibração.

No sentido de melhorar o coeficiente de correlação, o ponto relativo ao padrão 3 foi desprezado.

Após terem sido registados os valores de absorvância dos padrões, foi lido o valor de absorvância da amostra de hidrolisado para saber se seria necessário diluí-la ou não. A absorvância registada foi de 1,562. Constatou-se assim que seria necessário diluir a amostra de hidrolisado tendo-se arbitrado fatores de diluição de 5, 10, 25, 50, 100 e 200.

Assim, na Tabela B.6 estão descritos os volumes de amostra a diluir mediante os fatores de diluição (*F.D*), as leituras das absorvâncias respeitantes às soluções de amostra e as respetivas concentrações de crómio obtidas.

**Tabela B.6** - Absorvâncias das soluções de amostra e respetiva concentração.

Soluções de amostra	F.D	Volume de amostra a diluir (mL)	Absorvância	Concentração (ppm)
1	200	0,25	0,018	-
2	100	0,5	0,038	66,87
3	50	1	0,078	74,59
4	25	2	0,177	88,22
5	10	5	0,323	-
6	5	10	0,576	-

As concentrações das soluções de amostra 1, 5 e 6 não foram quantificadas visto as respetivas absorvâncias se encontrarem fora da gama dos valores previamente registados para os padrões preparados.

## B.2. Caracterização das Raspas Wet-Blue

À semelhança da caracterização do hidrolisado proteico, determinou-se o teor de humidade e de matéria mineral e orgânica das raspas *Wet-Blue*, cujos resultados experimentais encontram-se descritos na tabela B.7 e B.8, respetivamente.

**Tabela B.7** - Resultados experimentais obtidos relativos ao teor de humidade.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
41,4232	42,9001	41,5971	$m_{\text{cadinho}} (g)$
2,0318	2,0308	2,0044	$m_{\text{amostra}} (g)$
43,4550	44,9309	43,6015	$m_{\text{amostra+cadinho}} (g)$
42,3676	43,8362	42,5339	
42,3353	43,8099	42,4971	
42,3319	43,8069	42,4921	
42,3297	43,8049	42,4906	
42,3291	43,8016	42,4888	
42,3249	43,7980	42,4844	
55,6	55,8	55,7	Teor de humidade, % (m/m)

**Tabela B.8** - Resultados experimentais obtidos relativos à matéria mineral e orgânica.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
41, 5053	42,9791	41,6726	$m_{\text{amostra carbonizada}} (g)$
9,01	8,82	8,58	Teor de matéria mineral, % (m/v) *
90,99	91,18%	91,42	Teor de matéria orgânica, % (m/v) *

\* Valores percentuais calculados em base seca.

Quanto ao teor de crómio, este foi determinado pelo método perclórico que termina com uma titulação iodométrica do crómio hexavalente. Na Figura B.3 observa-se a coloração das soluções contidas nos matrizes antes e após a titulação, respetivamente.



**Figura B.3** – Matrizes antes e depois da titulação iodométrica.

Por conseguinte, os resultados experimentais relativos à determinação do teor de óxido de crómio nas raspas apresentam-se na Tabela B.9.

**Tabela B.9** - Teor de óxido de crómio presente nas raspas.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
13,5	13,8	13,9	<b>Volume de titulante adicionado (ml)</b>
3,8	3,9	4,0	<b>Teor de óxido de crómio, % (m/m) *</b>

\* Valor percentual calculado em base seca.

### **B.3. Extração do Colagénio e Caracterização da Gelatina**

Neste subcapítulo estão anexados os resultados experimentais obtidos relativamente à obtenção de uma das matérias-primas a utilizar para sintetizar o bioproduto - a gelatina - e a sua respetiva caracterização. Na Tabela B.10 estão registadas as massas de gelatina obtidas para cada ensaio e na Tabela B.11 encontram-se registadas as massas em função da secagem e pesagem efetuadas e teor de sólidos totais de cada ensaio.

**Tabela B.10** - Massa de gelatina obtida para cada ensaio.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	
85,23	90,30	84,13	84,63	89,81	91,28	$m_{\text{frasco}} (g)$
154,12	154,71	147,61	152,29	152,94	152,57	$m_{\text{frasco}+gelatina} (g)$

68,89	64,41	63,48	67,66	63,13	61,29	$m_{gelatina}(g)$
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------------------

**Tabela B.11** - Teor de sólidos totais da amostra.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
36,7373	40,8187	37,2140	$m_{cadinho}(g)$
46,6200	50,7965	47,0748	$m_{amostra+cadinho}(g)$
44,9447	49,1294	45,3645	
41,682	45,6658	42,0353	
38,9850	43,4645	39,8323	
36,8900	41,0886	37,3915	
36,8584	40,9408	37,3341	
36,8560	40,9391	37,3319	
36,8560	40,9387	37,3313	
1,2	1,2	1,2	<b>Teor de sólidos totais, % (m/v)</b>

Na Tabela B.12 e na Tabela B.13 pode ainda encontrar-se os resultados obtidos para a matéria mineral e orgânica e crómio, respetivamente.

**Tabela B.12** - Resultados experimentais respeitantes à matéria mineral e orgânica.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
36,7738	40,8531	37,2720	$m_{amostra\ carbonizada}(g)$
33,33	25	50	<b>Teor de matéria mineral, % (m/v) *</b>
66,66	75	50	<b>Teor de matéria orgânica, % (m/v) *</b>

\* Valores percentuais calculados em base seca.

**Tabela B.13** - Absorvâncias e respetivas concentrações de crómio.

Solução de amostra	Absorvância	Concentração (ppm)
1	0,010	< 0,50 ppm

Relembrando que toda a metodologia envolvida na determinação do teor de crómio no hidrolisado foi a mesma para encontrar a concentração de crómio na gelatina, pode constatar-se, pela observação da Tabela B.5 e da Tabela B.13, que o valor da absorvância da gelatina é inferior ao valor da absorvância do padrão 1, o que se traduz na impossibilidade da quantificação do teor de crómio na gelatina. Porém, permite afirmar que a mesma contém um teor de crómio inferior a 0,50 ppm.

#### B.4. Caracterização do Concentrado

A concentração do hidrolisado foi realizada cinco vezes. Em cada uma das vezes, foram concentrados 500 g de hidrolisado. Na Tabela B.14 estão apresentadas as massas de concentrado obtidas por cada concentração efetuada.

Tabela B.14 – Massas de concentrado obtido por cada concentração.

Concentração	I	II	III	IV	V	Total
$m_{hidrolisado}$	500,02	500,08	500,36	502,41	500,72	2503,59
$m_{H_2O}$	449,79	434,49	437,12	458,10	408,42	2187,92
$m_{concentrado}$	50,23	65,59	63,24	44,31	92,3	315,67

No seguimento da concentração do hidrolisado, foi determinado o teor de sólidos totais cujos resultados experimentais obtidos podem-se observar na Tabela B.15 e na Tabela B.16.

Tabela B.15 - Resultados experimentais obtidos em relação ao teor de sólidos totais para o primeiro concentrado.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
36,7382	42,8972	37,6671	$m_{cadinho} (g)$
41,8782	48,2572	42,7071	$m_{amostra+cadinho} (g)$
41,1970	47,5606	41,9846	
40,9184	47,2698	41,6817	
40,7189	47,0666	41,4842	
40,5406	46,8790	41,3121	
40,4230	46,7542	41,2000	
40,3397	46,6474	41,1500	
70,1	70,0	69,1	Teor de sólidos totais,% (m/v)

**Tabela B.16** - Resultados experimentais obtidos relativamente ao teor de sólidos totais para o segundo concentrado.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
38,5243	41,6018	44,0678	$m_{cadinho} (g)$
43,5707	46,7031	49,2635	$m_{amostra+cadinho} (g)$
42,6002	45,7545	48,2948	
42,1949	45,377	47,9039	
41,8978	45,0793	47,5965	
41,7987	44,971	47,488	
41,7604	44,8907	47,4125	
64,1	64,5	64,4	Teor de sólidos totais,% (m/v)

### B.5. Síntese de Bioprodutos para Aplicação em Couro

Na Tabela B.17 encontram-se os resultados relativos às massas de hidrolisado (HP), glutaraldeído (Glu) e licor negro (LN) utilizadas de forma a obter os bioprodutos.

**Tabela B.17** - Massas de hidrolisado, licor negro e glutaraldeído utilizadas.

HP+Glu 2	HP+Glu 5	HP+Glu 10	HP+LN 1:3	HP+LN 1:1	HP+LN 3:1	
30,99	37,13	32,90	33,68	33,46	32,55	$m_{gobelé} (g)$
30,08	30,03	30,15	10,07	20,24	30,19	$m_{HP} (g)$
0,28	0,61	1,24	-	-	-	$m_{Glu} (g)$
-	-	-	30,03	20,03	10,13	$m_{LN} (g)$

Quanto ao teor de humidade das amostras de couro a serem recurtidas, os resultados experimentais encontram-se seguidamente na Tabela B.18.

**Tabela B.18** – Teor de humidade das amostras de couro.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
40,1725	38,5210	41,5983	$m_{cadinho} (g)$
41,2658	39,5617	41,6290	$m_{amostra+cadinho} (g)$
41,0479	39,3538	42,4228	
41,0454	39,3527	42,4216	
41,0424	39,3493	42,4180	
41,0420	34,3492	42,4175	
20,5	20,4	20,5	

## B.6. Preparação de Biofilmes

Respeitante à preparação de biofilmes, na Tabela B.19 pode reparar-se nas quantidades utilizadas para o efeito em cada um dos ensaios realizados.

**Tabela B.19** - Resultados experimentais relativos á preparação de biofilmes.

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
20,08	20,02	20,32	$m_{HP}(g)$
5,06	5,08	5,19	$m_{Glu}(g)$
5,02	5,06	5,04	$m_{Gli}(g)$



## Anexo C – Exemplos de Cálculo

No sentido de proporcionar uma melhor compreensão dos resultados experimentais obtidos aquando da sua execução laboratorial, expõem-se aqui os exemplos de cálculo associados à caracterização do hidrolisado proteico, das raspas *Wet-Blue* e da gelatina, da concentração do hidrolisado proteico e da caracterização das amostras de couro a serem recurtidas. Tome-se por base o ensaio 1 para todos os exemplos de cálculo apresentados.

### C.1. Caracterização do Hidrolisado Proteico

- **Teor de sólidos totais:**

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra+cadinho}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, mL}} \times 100$$

Em que:

$m_{\text{amostra+cadinho}}$  – Massa da amostra seca mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho (g).

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{37,4762 - 36,7387}{10} \times 100 \cong 7,4 \%$$

- **Teor de matéria orgânica e mineral:**

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra carbonizada}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, mL}} \times 100$$

Onde:

$m_{\text{amostra carbonizada}}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g).

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{36,9603 - 36,7387}{10} \times 100 \cong 2,2 \%$$

$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = \text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} - \text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)}$

$$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = 7,4 - 2,2 = 5,2 \%$$

Os valores obtidos, tanto para a matéria mineral como para a matéria orgânica, significam que em 100 mL de solução de amostra, existem 0,022 e 0,052 gramas de matéria mineral e orgânica, respetivamente. No sentido de apresentar os parâmetros em função da massa seca presente no hidrolisado (7,4% de sólidos), tem-se:

$$\% \text{ de matéria mineral (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.mineral}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,022}{0,074} \times 100 \cong 29,73 \%$$

$$\% \text{ de matéria orgânica (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.orgânica}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,052}{0,074} \times 100 \cong 70,27 \%$$

- **Teor de azoto:**

$$\text{Teor de azoto, \%} = \frac{(V_A - V_B) \times N \times MM_N}{\text{Volume de amostra, mL} \times 1000} \times 100$$

Sejam:

$V_A$  – Volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL);

$V_B$  – Volume de titulante gasto na titulação do branco (mL);

N – Normalidade do ácido clorídrico (N);

$MM_N$  - Massa molecular do azoto (14,007 g/mol).

$$\text{Teor de azoto, \% (m/v)} = \frac{(32,5 - 0,2) \times 0,084249 \times 14,007}{5 \times 1000} \times 100 \cong 0,76 \%$$

Para obter o teor de azoto em função da massa seca presente no hidrolisado (7,4% de sólidos), tem-se:

$$\% \text{ de azoto (m/m)} = \frac{m_{\text{azoto}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,0076}{0,074} \times 100 \cong 10,30 \%$$

$$\% \text{ de proteína} = \text{Teor de azoto, \% (m/m)} \times f$$

Onde:

f – Fator de conversão de azoto para proteína: 6,25, 5,7 ou 6,38 dependendo da amostra.

$$\% \text{ de proteína} = 10,30 \times 6,25 \cong 64,39\%$$

Note-se que não era conhecido o fator de conversão para a amostra em questão, como tal, utilizou-se o fator geral de conversão de azoto para proteína (6,25).

- **Teor de crómio:**

Preparação das soluções padrão (padrão 1) (a partir da solução-mãe de concentração 1000 ppm):

$$c_i \times v_i = c_f \times v_f$$

A considerar:

$c_i$  – Concentração da solução-mãe de crómio (ppm);

$c_f$  – Concentração do padrão (ppm);

$v_i$  – Volume de solução-mãe (mL);

$v_f$  – Volume de balão volumétrico (mL).

$$1000 \times v_i = 0,5 \times 100$$

$$v_i = 0,05 \text{ mL}$$

Determinação do volume de amostra a diluir para ser possível quantificar o crómio:

$$\text{Fator de diluição} = \frac{V_f}{V_i}$$

Onde:

$V_i$  – Volume de amostra a diluir (mL);

$V_f$  – Volume do balão volumétrico (mL).

$$100 = \frac{50}{V_i} \leftrightarrow V_i = 0,50 \text{ mL}$$

Cálculo da concentração de crómio na amostra:

Equação da reta:  $y = 0,0486x + 0,0055 \iff$  Absorvância =  $0,0486 \cdot [\text{Cr}] + 0,0055$

$$0,038 = 0,0486 \times [\text{Cr}] + 0,0055$$

$$[\text{Cr}] \cong 0,67 \text{ ppm}$$

$$[\text{Cr}] \text{ na solução de amostra} = \text{Fator de diluição} \times [\text{Cr}]$$

$$[\text{Cr}] \text{ na solução de amostra} = 100 \times 0,67 \cong 66,87 \text{ ppm}$$

## C.2. Caracterização das Raspas Wet-Blue

- **Teor de humidade**

$$\text{Teor de humidade, \% (m/m)} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Onde:

$m_{\text{amostra}}$  – Massa de amostra (g);

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa da amostra seca (g).

$$\text{Teor de humidade, \% (m/m)} = \frac{2,0318 - 0,9017}{2,0318} \times 100 \cong 55,6 \%$$

- **Teor de matéria mineral e orgânica**

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra carbonizada}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Em que:

$m_{\text{amostra}}$  – Massa de amostra (g);

$m_{\text{amostra carbonizada}}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g).

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{41,5053 - 41,4232}{2,0318} \times 100 \cong 4,0 \%$$

$$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = \text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} - \text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)}$$

$$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = 44,4 - 4,0 = 40,4 \%$$

De forma a apresentar o teor de matéria mineral e orgânica em base seca (44,38% sólidos):

$$\% \text{ de matéria orgânica (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.orgânica}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,404}{0,444} \times 100 \cong 90,99 \%$$

$$\% \text{ de matéria orgânica (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.orgânica}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,04}{0,444} \times 100 \cong 9,01 \%$$

- **Teor de óxido de crómio**

$$\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 = \frac{V_{\text{tiosulfato}} \times 0,00253}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100$$

Sejam:

$V_{\text{tiosulfato}}$  – Volume de tiosulfato de sódio 0,1 N adicionado (mL);

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa da amostra seca (g).

$$\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 = \frac{13,5 \times 0,00253}{0,9017} \times 100 = 3,8 \%$$

### C.3. Caracterização da Gelatina

- **Teor de sólidos totais:**

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra+cadinho}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, mL}} \times 100$$

Em que:

$m_{\text{amostra+cadinho}}$  – Massa da amostra seca mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho (g).

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{36,856 - 36,7373}{10} \times 100 \cong 1,20 \%$$

- **Teor de matéria orgânica e mineral:**

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{m_{\text{amostra carbonizada}} - m_{\text{cadinho}}}{\text{Volume de amostra, mL}} \times 100$$

Onde:

$m_{\text{amostra carbonizada}}$  – Massa da amostra carbonizada mais massa do cadinho (g);

$m_{\text{cadinho}}$  – Massa do cadinho de porcelana (g).

$$\text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)} = \frac{36,7738 - 36,7373}{10} \times 100 \cong 0,40 \%$$

$$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = \text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} - \text{Teor de matéria mineral, \% (m/v)}$$

$$\text{Teor de mat. orgânica, \% (m/v)} = 1,2 - 0,4 = 0,80 \%$$

Considerando base seca (1,20% sólidos), tem-se:

$$\% \text{ de matéria orgânica (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.orgânica}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,004}{0,0120} \times 100 \cong 33,33 \%$$

$$\% \text{ de matéria orgânica (m/m)} = \frac{m_{\text{mat.orgânica}}}{m_{\text{sólidos}}} = \frac{0,08}{0,0120} \times 100 \cong 66,66 \%$$

#### C.4. Concentração do Hidrolisado Proteico

Determinação da massa de concentrado e água a obter após a concentração da solução de hidrolisado até 40%:

Balanco de massa:

$$m_{\text{solução}} \times \text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = m_{\text{concentrado}} \times \% \text{ sólidos}$$

Note-se:

$m_{solução}$  – Massa de solução de amostra de hidrolisado (g);

$m_{concentrado}$  – Massa de concentrado (g);

% *sólidos* – Teor de sólidos pretendidos, %.

$$500 \times 0.074 = m_{concentrado} \times 0.40$$

$$m_{concentrado} = 92,5 \text{ g}$$

Portanto:

$$m_{H_2O} = m_{solução} - m_{concentrado}$$

$m_{H_2O}$  – Massa de água a evaporar (g);

$$m_{H_2O} = 500 - 92,5 = 407,5 \text{ g}$$

Determinação do teor de sólidos totais:

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/m)} = \frac{m_{amostra+cadinho} - m_{cadinho}}{\text{massa de amostra, g}} \times 100$$

Em que:

$m_{amostra+cadinho}$  – Massa da amostra seca mais massa do cadinho (g);

$m_{cadinho}$  – Massa do cadinho (g).

$$\text{Teor de sólidos totais, \% (m/v)} = \frac{40,3397 - 36,7382}{5,14} \times 100 \cong 70,1 \%$$

### C.5. Teor de Humidade da Pele

$$\text{Teor de humidade, \% (m/m)} = \frac{m_{amostra} - m_{amostra\ seca}}{m_{amostra}} \times 100$$

Onde:

$m_{amostra}$  – Massa de amostra (g);

$m_{amostra\ seca}$  – Massa da amostra seca (g).

$$\text{Teor de humidade, \% (m/m)} = \frac{1,0933 - 0,8695}{1,0933} \times 100 \cong 20,5 \%$$