



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA FERNANDES SALES COSTA

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, TÉRMICAS E CITOTÓXICAS DE
FILMES DE COLÁGENO INCORPORADOS COM LIGNINA KRAFT
FRACIONADA

FORTALEZA

2019

JULIANA FERNANDES SALES COSTA

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, TÉRMICAS E CITOTÓXICAS DE
FILMES DE COLÁGENO INCORPORADOS COM LIGNINA KRAFT FRACIONADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Diego Lomonaco Vasconcelos de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C873a Costa, Juliana Fernandes Sales.

Avaliação da propriedades químicas, térmicas e citotóxicas de filmes de colágeno incorporados com lignina Kraft fracionada / Juliana Fernandes Sales Costa. – 2019.
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Diego Lomonaco Vasconcelos de Oliveira .

Coorientação: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho .

1. Reaproveitamento.. 2. Resíduos.. 3. Colágeno. . 4. Lignina.. 5. Filmes.. I. Título.

CDD 540

JULIANA FERNANDES SALES COSTA

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, TÉRMICAS E CITOTÓXICAS DE
FILMES DE COLÁGENO INCORPORADOS COM LIGNINA KRAFT FRACIONADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Lomonaco (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Adriano Lincoln Albuquerque Mattos
Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora de Fátima, por me iluminarem durante todos os dias desse longo caminho percorrido.

Aos meus pais, por toda a dedicação, o incentivo e o amor que me fizeram chegar até aqui. Amo vocês imensamente e essa vitória é nossa!

Ao meu irmão, Raphael, por todos os conselhos, por todo o apoio sempre dedicado e por todo amor.

A todos os meus familiares por terem sido uma base durante os momentos difíceis e por torcerem pela minha vitória.

Aos meus queridos amigos de colégio, por mesmo distantes, se fazerem tão presentes nessa etapa importante da minha vida.

Aos meus queridos amigos de UFC, pelo companheirismo desde a época da graduação.

Aos meus amigos da EMBRAPA, por toda a ajuda, força e amizade.

Ao meu orientador e ao meu co-orientador, Professor Diego e Professor Men de Sá, por toda a paciência, por toda a ajuda e ensinamentos conferidos durante todo esse período.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES - ) , ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto "Ações estruturante e inovação para o fortalecimento das cadeias produtivas da aquicultura no Brasil" (BRS-Aqua).

À Embrapa Agroindústria Tropical e à Universidade Federal do Ceará (UFC) pelas estruturas concedidas para a realização da presente pesquisa.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001).

E a todos que estiveram comigo direta ou indiretamente me auxiliando e me apoiando para que eu conseguisse chegar até aqui, o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!!!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

O colágeno é uma proteína biodegradável, com baixa antigenicidade, que compõe 30 % dos tecidos conjuntivos animais, conferindo propriedades como elasticidade e manutenção estrutural. Pode ser obtido a partir de resíduos da indústria do pescado, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável. É amplamente aplicável nos setores cosmético e farmacêutico, destacando-se na produção de filmes, onde atua como matriz polimérica. Filmes à base de colágeno, no entanto, apresentam baixa estabilidade térmica e são suscetíveis à degradação por espécies reativas de oxigênio (ROS), fato que pode ser mediado a partir da inserção de substâncias que apresentem elevada estabilidade térmica e ação antioxidante, como, por exemplo, os polifenóis. Nesse contexto, o presente trabalho apresentou como objetivo central a produção de filmes de colágeno incorporados com diferentes concentrações de lignina Kraft, um polifenol residual da indústria do papel. A lignina foi fracionada em etanol, utilizando-se a fração solúvel para a inserção nos filmes. O colágeno utilizado manteve sua estrutura tripla-hélice intacta após a extração, como mostrado pelos resultados da análise de dicroísmo circular (CD). Os filmes contendo lignina apresentaram boas propriedades térmicas (TGA) e de permeabilidade ao vapor d'água (PVA), além de terem apresentado significativa atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e anti-UV. Com relação à citotoxicidade, foi constatado que o grau de toxicidade dos filmes é dependente da concentração de lignina presente.

Palavras-chave: Reaproveitamento. Resíduos. Colágeno. Lignina. Filmes.

ABSTRACT

Collagen is a biodegradable, with low antigenicity protein that makes up 30% of animal connective tissues, conferring properties such as elasticity and structural maintenance. It can be used from fish industry waste, thus contributing to sustainable development. It is widely applicable in the cosmetic and pharmaceutical sectors, standing out in the production of films, where it acts as a polymer matrix. Collagen-based films, however, have low thermal stability and are susceptible to degradation by reactive oxygen species (ROS), a fact that can be mediated from the insertion of substances with high economic stability and antioxidant action, such as examples, polyphenolic substances. In this context, the present work aims at the production of bonding films incorporated with different concentrations of lignin Kraft, a residual polyphenol of the paper industry. The lignin was fractionated in ethanol, using the soluble fraction for insertion into the films. The collagen used kept its triple structure intact after extraction, as shown in the circular dichroism (CD) data. The films containing lignin showed good thermal properties (TGA) and water vapor permeability (PVA), besides presenting antioxidant (DPPH and ABTS) and anti-UV activity. Regarding cytotoxicity, the degree of toxicity of the films was found to be dependent on the concentration of lignin present.

Keywords: Reuse. Waste. Collagen. Lignin. Films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	15
Figura 2 – Estrutura fibrosa da proteína colagenosa.....	17
Figura 3 – Estrutura da poliprolina II (Esquerda) e da poliprolina I (Direita).....	17
Figura 4 – Principais aminoácidos que constituem o colágeno: I - Glicina, II - Prolina e III – Hidroxiprolina.....	18
Figura 5 – Estrutura do colágeno, com as regiões telopeptídicas.....	18
Figura 6 – Estrutura da lignina e os respectivos álcoois hidroxicinâmicos precursores dos monômeros: (1) Álcool <i>p</i> -cumarílico, (2) Álcool coniferílico e (3) Álcool sinapílico.....	21
Figura 7 – Reação de redução do radical DPPH a partir da lignina.....	31
Figura 8 – Reação de redução do radical ABTS a partir da lignina.....	32
Figura 9 – Colágeno liofilizado, extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.....	36
Figura 10 – FTIR do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.....	37
Figura 11 – Ligações referentes aos sinais das Amidas A e B.....	38
Figura 12 – Ligações referentes aos sinais das Amidas I, II e III.....	38
Figura 13 – TGA do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.....	39
Figura 14 – Ponto isoelétrico do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.....	41
Figura 15 – Dicroísmo circular do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.....	42
Figura 16 – Fração solúvel de lignina Kraft, obtida após o fracionamento etanólico.....	42
Figura 17 – FTIR da lignina lavada antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).....	43
Figura 18 – FTIR da região de <i>fingerprint</i> da lignina lavada antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).....	44

Figura 19 – SEC/GPC da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).....	45
Figura 20 – TGA /DTG da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).....	46
Figura 21 – HSQC 1H ^{13}C das regiões alifáticas oxigenadas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (EtOH-KL).....	48
Figura 22 – HSQC 1H ^{13}C das regiões aromáticas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (EtOH-KL).....	49
Figura 23 – Filmes de colágeno, sem lignina e incorporados com diferentes concentrações de lignina.....	50
Figura 24 – FTIR do colágeno, do glicerol, da lignina fracionada (KF) e dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)]	51
Figura 25 – FTIR, na região de <i>fingerprint</i> , do colágeno, do glicerol, da lignina fracionada (KF) e dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	52
Figura 26 – TGA/DTG dos filmes [FC- Controle; F1- 0,5% (m/m); F2- 1% (m/m); F3- 2,5% (m/m) e F4- 5% (m/m)].....	54
Figura 27 – Análise UV-Vis dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	56
Figura 28 – Estruturas de ressonância responsáveis pela estabilização da lignina.....	57
Figura 29 – Atividade antioxidante dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	58
Figura 30 – Atividade antioxidante dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	59

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Viabilidade celular (Fibroblastos) dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)]..... 62
- Gráfico 2 – Viabilidade celular (Queratinócitos) dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)]..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da análise termogravimétrica do colágeno extraído de escamas de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	40
Tabela 2 – Médias aritmética e ponderada (Mn e Mw) e polidispersividade (PDI) das cadeias poliméricas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).....	46
Tabela 3 – Resultados de T_{onset} do principal evento de degradação da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (KF).....	47
Tabela 4 – Atribuição de sinais de RMN HSQC da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (EtOH-KL) – Região Alifática Oxigenada.....	48
Tabela 5 – Atribuição de sinais de RMN HSQC da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (EtOH-KL) – Região Aromática.....	49
Tabela 6 – Resultados de análise termogravimétrica dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	53
Tabela 7 – Resultados de atividade antioxidante (ABTS), em relação à concentração de Trolox [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].....	60
Tabela 8 – Resultados de permeabilidade ao vapor d’água dos filmes [FB-Branco; F1-0,25% (m/m); F2-0,5% (m/m); F3-1% (m/m); F4-2,5% (m/m) e F5-5% (m/m)].....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivos Gerais	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Matéria-prima e reagentes	25
3.2	Métodos de obtenção dos produtos	25
3.2.1	<i>Extração de colágeno</i>	25
3.2.2	<i>Fracionamento da lignina Kraft</i>	26
3.2.3	<i>Produção de filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada</i>	27
3.3	Métodos de análise gerais	28
3.3.1	<i>Rendimento</i>	28
3.3.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	28
3.3.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	28
3.4	Métodos de análises específicos	29
3.4.1	Colágeno	29
3.4.1.1	<i>Potencial Zeta</i>	29
3.4.1.2	<i>Dicroísmo Circular</i>	29
3.4.2	Lignina fracionada e não-fracionada	30
3.4.2.1	<i>Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC)</i>	30
3.4.2.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN - HSQC)</i>	31
3.4.3	Filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada	31
3.4.3.1	<i>Análise na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	31
3.4.3.2	<i>Atividade antioxidante (DPPH)</i>	31
3.4.3.3	<i>Atividade antioxidante (ABTS)</i>	33
3.4.3.4	<i>Permeabilidade ao Vapor D'Água (PVA)</i>	34
3.4.3.5	<i>Citotoxicidade</i>	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Colágeno	37
4.1.1	<i>Rendimento</i>	37
4.1.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	37
4.1.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	40
4.1.4	<i>Potencial Zeta</i>	42
4.1.5	<i>Dicroísmo Circular</i>	42
4.2	Lignina Kraft	43

4.2.1	<i>Rendimento do fracionamento</i>	43
4.2.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	44
4.2.3	<i>Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC)</i>	46
4.2.4	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	47
4.2.5	<i>Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN – HSQC)</i>	48
4.3	Filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada	51
4.3.1	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	52
4.3.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	54
4.3.3	<i>Análise na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	56
4.3.4	<i>Atividade Antioxidante (DPPH)</i>	57
4.3.5	<i>Atividade Antioxidante (ABTS)</i>	59
4.3.6	<i>Permeabilidade ao Vapor D'Água (PVA)</i>	61
4.3.7	<i>Citotoxicidade</i>	62
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

O processo de industrialização mundial, iniciado no século XVIII com a Primeira Revolução Industrial (1760), tem sido responsável pela produção de diversos bens e serviços, que contribuem ativamente para a movimentação da economia, a geração de empregos e o desenvolvimento tecnológico. Entretanto, apesar dos benefícios citados, a atividade industrial tem apresentado desvantagens que só começaram a ser percebidas a partir do século XX, como, por exemplo, a elevada geração de resíduos contaminantes de natureza sólida, líquida e gasosa e, conseqüentemente, a atenuação dos níveis de poluição ambiental. (AHUTI, 2015; HO et al., 2012).

Na década de 90, a preocupação global com o meio ambiente, impulsionou o surgimento de uma nova vertente de pesquisa, denominada Química Verde, que visa alcançar um maior índice de desenvolvimento sustentável em processos industriais, reduzindo ao máximo os impactos causados às águas, ao ar e ao solo, os quais afetam diretamente na qualidade de vida dos organismos vivos (FOLK, 2018; ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Diante desse contexto, diversos setores industriais vêm adotando práticas relacionadas à diminuição e ao reaproveitamento dos resíduos gerados, dentre os quais se destaca o setor do pescado.

- **Indústria do pescado e o colágeno**

A indústria do pescado (peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos) tem se expandido nos últimos anos. Em 2004, a obtenção de pescado por pesca ou aquicultura atingiu a marca de 106 milhões de toneladas, enquanto, em 2016, essa quantidade subiu para 171 milhões de toneladas. Em 2016, a produção global de pescado alcançou 171 milhões de toneladas, movimentando a economia com, aproximadamente, 362 bilhões de dólares. (FAO, 2018).

Essa expansão tem ocorrido, principalmente, devido à intensa demanda alimentícia. O consumo individual de pescado atingiu a média de crescimento de 3,2% ao ano, entre o período de 1961 e 2016, superando a média de 2,8% ao ano do crescimento no consumo de carnes terrestres. (FAO, 2018). Esse aumento pode ser justificado pelos benefícios proporcionados por uma alimentação baseada em seu consumo (FISCHER; GLEI, 2015; SNEDDON, 2012; ÞORGILSSON; GUNNLAUGSDÓTTIR, 2010)

Esse ramo da indústria é alicerçado em duas atividades centrais: A pesca extrativista e

a aquicultura. A pesca extrativista tem estagnado a sua produção, desde o fim da década de 80. Enquanto isso, a aquicultura tem se destacado, alcançando, em 2016, 47% da produção global de pescado. (FAO, 2018).

A elevada ascensão da aquicultura está relacionada ao seu custo de investimento relativamente baixo e à sua produtividade elevada, além de apresentar uma tecnologia processual pouco dependente de fatores externos - Condições climática e ambiental, por exemplo - (DE SIQUEIRA, 2018).

Em contrapartida, a atividade pesqueira tem sido profundamente afetada por pelo aquecimento dos oceanos, que propiciam alterações na circulação dos oceanos e perda na concentração de oxigênio. Essas modificações consequentemente afetam as populações marinhas (SZUWALSKI, 2019).

Dentre as espécies mais cultivadas no setor aquicultor em todo o mundo, destaca-se a Tilápia do Nilo. (FAO, 2018). A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence à família dos ciclídeos (*Cichlidae*), oriunda do rio Nilo, localizado na África (POPMA; MASSER, 1999). É uma espécie de água doce e levemente salobra, de fácil prolificidade (KUBITZA, 2005). O cultivo dessa espécie na aquicultura é bastante difundido, pois se trata de uma espécie que apresenta elevada resistência às condições adversas de cultivo, como baixo teor de oxigênio dissolvido, suporta considerável salinidade da água e uma ampla faixa de temperatura de cultivo, a qual pode variar de 15 a 32°C (SEBRAE, 2015).

Atualmente, é a espécie mais cultivada no Brasil. Em 2014, foram produzidas 260 mil toneladas (KUBITZA, 2015). Em 2017, a produção da espécie representou 51,7% da produção total, com um montante de 357.639 toneladas produzidas (ALTAIR ALBUQUERQUE, 2018).

Figura 1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: RECHI, 2016.

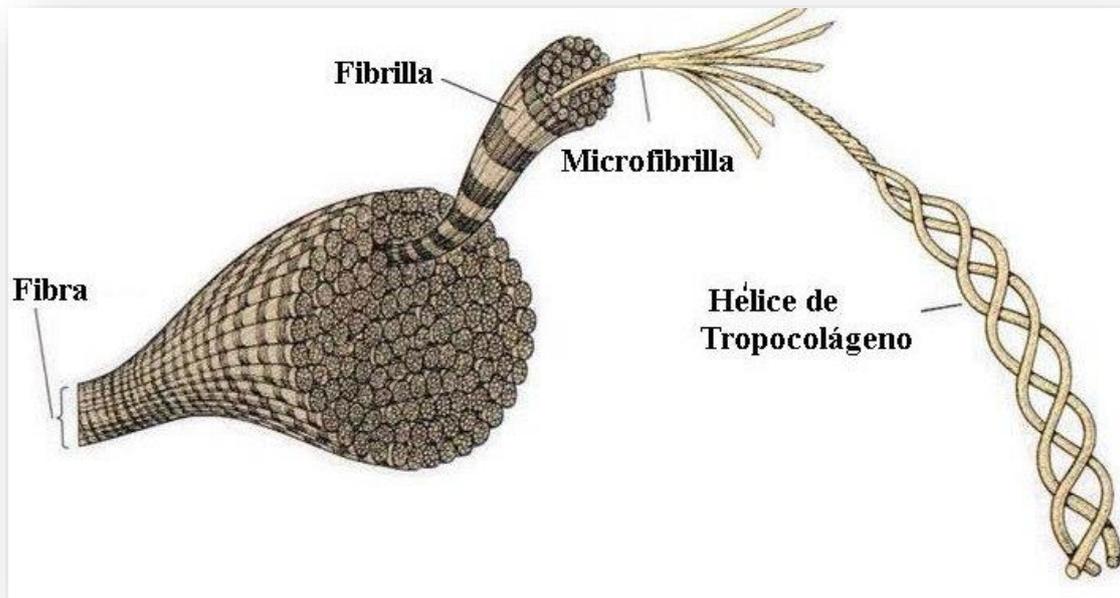
O processo de industrialização da Tilápia visa, prioritariamente, a produção de filés, que compõem apenas 30% da massa total do peixe. Os demais componentes corpóreos (escamas, pele, vísceras), que correspondem aos 70% restantes, são considerados como resíduos, podendo ser descartados no ambiente de forma incorreta. (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017). Essas partes descartadas são constituídas por uma variedade de substâncias que podem ser transformadas em produtos de significativo valor agregado, sendo o principal deles o colágeno.

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante em tecidos animais, constituindo cerca de 30% do peso proteico total. É responsável pela manutenção da integridade estrutural dos tecidos conjuntivos, conferindo resistência e elasticidade (RODRÍGUEZ; BARROSO; SÀNCHEZ, 2018). Existem, aproximadamente, 29 tipos de colágeno, os quais variam na proporção de aminoácidos que os compõem e no tipo de tecido conjuntivo onde se encontram. O mais comum é o tipo I, bastante abundante na pele, nos tendões e nos ossos. (FRATZL, 2008).

As principais fontes para a obtenção de colágeno eram as de origem bovina e suína. No entanto, com o aparecimento de diversas doenças associadas aos animais, como a encefalopatia espongiiforme bovina e a febre aftosa, juntamente com questões étnicas e religiosas que os envolvem, as fontes marinhas se tornaram fundamentais para a obtenção da proteína. (CHEN *et al.*, 2016a).

Quimicamente, o colágeno é constituído pelo enovelamento de três cadeias polipeptídicas, sendo cada uma delas composta por cerca de 1400 aminoácidos, que irão formar uma complexa estrutura tripla-hélice, responsável pela manutenção de sua atividade biológica (RODRÍGUEZ; BARROSO; SÀNCHEZ, 2018).

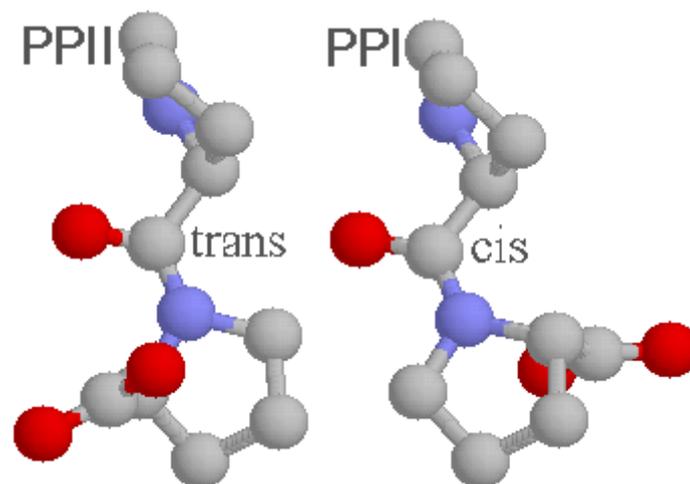
Figura 2. Estrutura fibrosa da proteína colagenosa.



Fonte: ISAZA SALDARRIAGSA; CORREA; CONGOTE, 2008.

A proteína adota uma conformação secundária rara, denominada poliprolina II, a qual é caracterizada por uma hélice rotacionada para a esquerda, diferentemente da α -hélice, que assume a forma de um prisma triangular. (ADZHUBEI; STERNBERG; MAKAROV, 2013).

Figura 3. Estrutura da poliprolina II (Esquerda) e da poliprolina I (Direita).

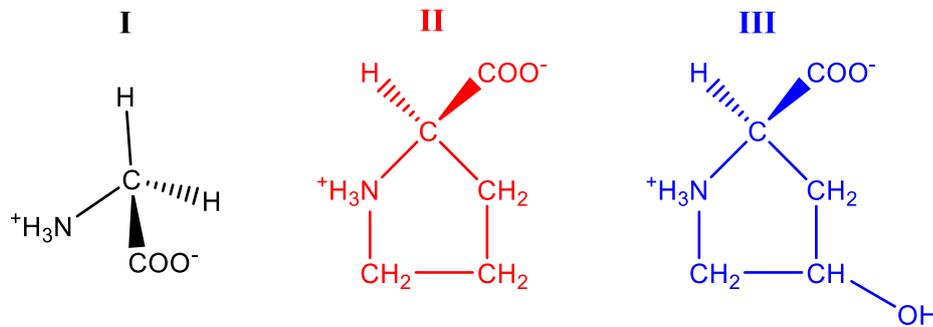


Fonte: ZOLTAN SZABO, 1997.

Essa conformação apresenta uma sequência de aminoácidos específica, com repetições tripeptídicas do tipo Gly-X-Y, onde o aminoácido glicina destaca-se como o majoritário, aparecendo sempre na terceira posição das repetições. As posições X e Y podem ser ocupadas

por quaisquer aminoácidos, sendo, em geral, ocupadas pela prolina e pela 4-hidroxiprolina (LIU *et al.*, 2015).

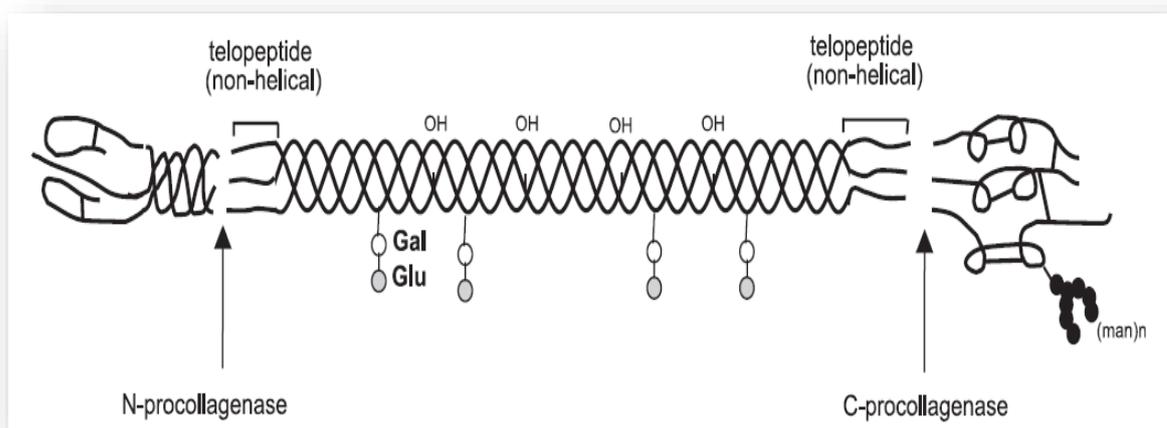
Figura 4. Principais aminoácidos que constituem o colágeno: I - Glicina, II - Prolina e III – Hidroxiprolina.



Fonte: A autora.

A manutenção da tripla-hélice é dada por interações intermoleculares (pontes de hidrogênio) entre os átomos de hidrogênio da glicina e as carbonilas (C=O) dos aminoácidos presentes na posição X de cadeias vizinhas. As pontes de hidrogênio podem ser feitas de forma direta ou intermediadas por moléculas de água (H_2O), dependendo do meio no qual a proteína se encontra (PERSIKOV *et al.*, 2000; SHOULDERS; RAINES, 2010).

Figura 5. Estrutura do colágeno, com as regiões telopeptídicas.



Fonte: GELSE; PÖSCHL; AIGNER (2003).

As extremidades dessa complexa estrutura helicoidal apresentam extensões peptídicas, que possuem ligações cruzadas aldol-histidina intensas entre os aminoácidos presentes, denominadas regiões telopeptídicas. Essas regiões são constituídas por uma faixa de 15 a 25 aminoácidos, dentre os quais se pode destacar a lisina, a alanina e a hidroxilisina (LIU *et al.*,

2015).

O colágeno, além de conferir propriedades de resistência e elasticidade às estruturas que compõe, trata-se de uma substância biodegradável, biocompatível e de baixa antigenicidade (EL-RASHIDY *et al.*, 2015). Todas essas características benéficas tornam essa proteína amplamente aplicável em diversos setores, como, por exemplo, na constituição de embalagens filmogênicas alimentícias, na composição de biomateriais para a recomposição óssea e na composição de formulações cosméticas (SIONKOWSKA *et al.*, 2017).

Por esse motivo, o valor de mercado dessa substância tem aumentado consideravelmente no decorrer dos últimos anos. Em 2016, o valor do mercado global de colágeno e de produtos baseados nessa proteína foi de 3,71 bilhões de dólares. Estima-se que, em 2025, esse valor subirá para 6,63 bilhões de dólares (GRAND REVIEW RESEARCH, 2017).

Dentre as diversas aplicações do colágeno, é possível destacar a produção de filmes. A proteína apresenta excelente capacidade de constituir a matriz de filmes, devido, principalmente, à sua característica de fornecer resistência estrutural. Esses biofilmes podem ser aplicados como biocurativos, os quais, para atuarem de forma eficaz, devem apresentar valores de permeabilidade ao vapor d'água elevados. Isso porque o processo de cicatrização é catalisado pela presença de umidade no meio. A umidade fortalece a migração e a reprodução celular. De acordo com Campos; Silva e Berger (2008):

“O curativo úmido protege as terminações nervosas, reduzindo a dor; acelera o processo cicatricial, previne a desidratação tecidual e a morte celular; promove necrólise e fibrinólise. A impossibilidade de manter estas condições também lentifica a cicatrização, causando dessecação, hipergranulação ou maceração.”

No entanto, os filmes de colágeno apresentam baixa estabilidade térmica e sofrem fácil oxidação, devido à ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (PERUMAL *et al.*, 2018; RINNERHALER *et al.*, 2015). Por esse motivo, diversos polímeros naturais e sintéticos estão sendo adicionados aos filmes de colágeno, tendo em vista a melhoria das propriedades filmogênicas. Dentre esses polímeros naturais, destacam-se espécies polifenólicas, as quais se caracterizam por apresentarem elevada estabilidade térmica, proporcionada pelas estruturas aromáticas estáveis e por apresentarem propriedades antioxidantes. (LIU *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a lignina apresenta-se como uma excelente alternativa, pois se trata de um composto polifenólico natural e de elevada abundância. (CROUVISIER-URION *et al.*,

2016). A lignina pode ser obtida em larga escala como subproduto da indústria do papel.

- **Indústria do papel e a lignina**

A indústria do papel possui uma média anual de produção de, aproximadamente, 400 milhões de toneladas. No período de 2011 a 2015, houve um aumento na produtividade, sendo alcançado um máximo em 2015, com 406 milhões de toneladas. (ANNUAIRE, 2015; FAO, 2016).

O principal processo utilizado para a obtenção de papel, em escala industrial, é o processo Kraft. Nesse processo, as lascas de madeira, após passarem por um processo mecânico de moagem, são colocadas em um digestor, juntamente com uma solução composta por sulfeto de sódio (Na_2S) e hidróxido de sódio ($NaOH$), a qual é denominada licor branco. Essa mistura permanece no digestor por cerca de 1 ou 2 horas, sob elevadas temperatura (165-175°C) e pressão. Ao final, é possível separar a polpa, contendo as fibras de celulose que irão originar o papel, do licor negro, um subproduto que é composto, majoritariamente, por lignina, além de conter água, resíduos de hemicelulose e sais inorgânicos utilizados na digestão. (RINALDI et al., 2016). Para a obtenção da lignina, o licor negro é precipitado, neutralizado com solução ácida e secado até alcançar o estado sólido (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

A partir do processo Kraft, produz-se uma média de 130 milhões de toneladas de polpa, anualmente. Estima-se que para cada tonelada de polpa produzida, são geradas cerca de dez toneladas de licor negro, como resíduo (TRAN; VAKKILAINNEN, 2015). A empresa brasileira Suzano Papel e Celulose, anualmente produz cerca de 20 mil toneladas de lignina, obtidas a partir do licor negro (CELULOSE, 2018). Dessas 20 mil toneladas, apenas 1 ou 2% são reaproveitados pela indústria para a produção de energia (CELULOSE, 2018; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

A lignina é o segundo biopolímero terrestre em abundância. Pode ser amplamente utilizada como precursora para a obtenção de uma elevada gama de compostos aromáticos de baixo peso molecular, como, por exemplo, a vanilina. Apresenta diversas características benéficas, como estabilidade térmica elevada, presença de grupo hidroxilas que podem realizar pontes de hidrogênio e atuar como ligantes em diversos materiais, fato que justifica sua crescente aplicabilidade. (CONSTANT et al., 2016; VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011).

Dentre suas características benéficas, pode-se destacar a potencial atividade antioxidante, devido aos compostos fenólicos que a compõem. A atividade antioxidante da

lignina pode ser expressa em relação ao equivalente em Trolox. O Trolox é um antioxidante solúvel em água, derivado da vitamina E. Assim como a vitamina E, é utilizado como padrão para medir a capacidade antioxidante de diversas substâncias por sua grande capacidade de extinguir radicais livres e inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) para meios biológicos (ZHONG; SHAHIDI, 2015).

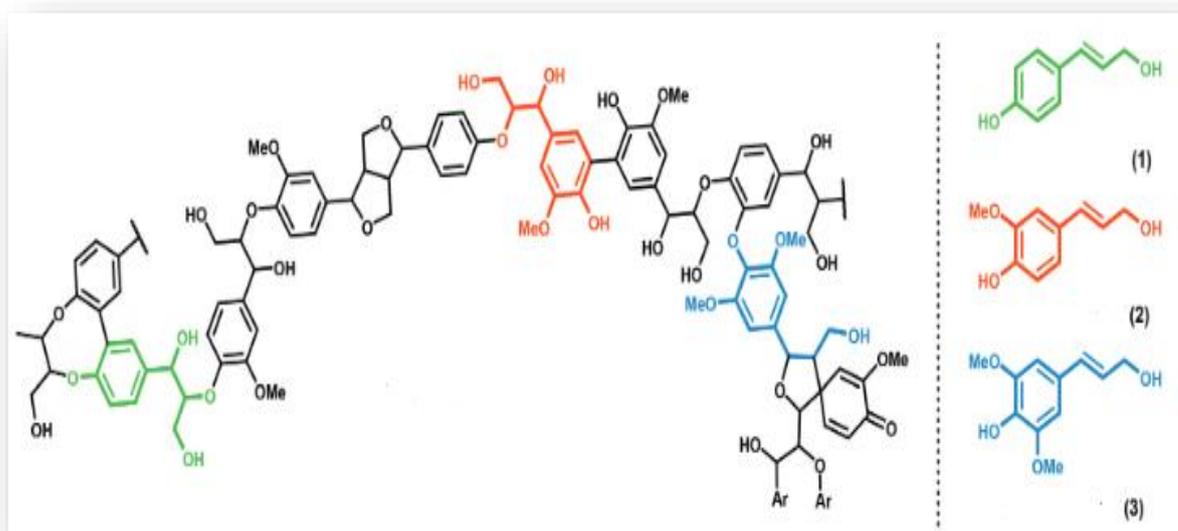
Trata-se de um biopolímero amorfo, de estrutura complexa, que compõe a parede celular das espécies vegetais, sendo responsável pela manutenção da integridade estrutural, ligando as fibras de celulose e hemicelulose. Constitui cerca de 20 a 35% da composição total da madeira, sendo essa composição variável dependendo da espécie vegetal na qual está presente. (CONSTANT *et al.*, 2016).

É composta a partir da condensação polimérica de três unidades monoméricas básicas, são elas: *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), oriundas, respectivamente, dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

As unidades monoméricas são conectadas por ligações específicas que caracterizam a sua estrutura. Essas ligações são do tipo C-O e C-C entre diferentes átomos contidos nos monômeros. As ligações mais abundantes são as do tipo β -O-4', que é uma ligação do tipo aril-éter (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010). Existe, no entanto, variados tipos de ligações como, por exemplo, as demais ligações aril-etéres (α -O-4' e 4'-O-5'), as ligações resinol (β - β '), as ligações bifenílicas (5-5') e as ligações fenilcoumaratos (β -5') (CONSTANT *et al.*, 2016).

A proporção monomérica da lignina é variável, dependendo da fonte vegetal da qual foi obtida e do processo de extração utilizado. Com relação às fontes vegetais, classifica-se, de modo geral, que nas gimnospermas (coníferas, por exemplo), há a predominância da unidade guaiacila. O eucalipto é uma espécie vegetal caracterizada como angiosperma. Enquanto isso, nas angiospermas (eucalipto, por exemplo) predomina as unidades guaiacila e siringila, sendo essa última majoritária em composição. As gramíneas, por sua vez, apresentam os três tipos de monômeros (*p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila). Essa classificação é generalizada, existindo exceções (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

Figura 6. Estrutura da lignina e os respectivos álcoois hidroxicinâmicos precursores dos monômeros: (1) Álcool *p*-cumarílico, (2) Álcool coniferílico e (3) Álcool sinapílico.



Fonte: KÄRKÄS *et al.*, 2016.

A lignina apresenta uma estrutura complexa e heterogênea, dificultando sua aplicação na produção de novos materiais. (RINALDI *et al.*, 2016). Por esse motivo, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas buscando métodos de fracionamento dessa estrutura, destacando-se o método de extração por solvente. (PASSONI *et al.*, 2016).

O fracionamento é vantajoso, pois irá separar as frações de alto e de baixo peso molecular, irá propiciar o aumento da solubilidade das frações em diversos tipos de solventes e irá propiciar o aumento da interação do polímero com outros materiais, além de facilitar o controle das propriedades químicas e estruturais de compostos formados a partir da lignina fracionada (LI; MCDONALD, 2014; PASSONI *et al.*, 2016).

Diante disso, o presente trabalho pretende avaliar as propriedades químicas, térmicas e citotóxicas de filmes de colágeno, antes e após a inserção de diferentes concentrações de lignina fracionada, utilizando glicerol como agente plastificante. O agente plastificante é responsável pela redução das interações intermoleculares que ocorrem entre as cadeias poliméricas da matriz do filme, situando-se entre as mesmas e, deste modo, aumentando o volume livre entre as cadeias. Isso provoca um aumento da flexibilidade e da mobilidade das cadeias poliméricas ao longo do polímero (VIEIRA *et al.*, 2011).

Os filmes foram caracterizados, utilizando-se técnicas como TGA, FT-IR, UV-VIS, atividade antioxidante pelos métodos dos radicais DPPH e ABTS, permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e citotoxicidade pelo método do MTT.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar as propriedades químicas, térmicas e citotóxicas de filmes de colágeno, contendo diferentes concentrações de lignina Kraft fracionada (0,5; 1,0; 2,5 e 5% m/m).

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair e caracterizar o colágeno obtido a partir de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pelo processo de extração ácida, catalisada por pepsina (*Pepsin soluble collagen* - PSC), utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), potencial zeta, análise termogravimétrica (TGA) e dicroísmo circular (CD).
- Fracionar a lignina obtida através do processo Kraft, utilizando etanol como solvente.
- Caracterizar a lignina pré e pós-fracionamento, empregando métodos de análise como espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), cromatografia por exclusão de tamanho (SEC/GPC), análise termogravimétrica (TGA) e ressonância magnética nuclear bidimensional (HSQC).
- Produzir filmes de colágeno, com diferentes concentrações de lignina – 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (m/m), adicionando glicerol como agente plastificante.
- Caracterizar os filmes produzidos através de técnicas como espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), ensaio de atividade antioxidante pelos métodos dos radicais DPPH e ABTS, análise por espectroscopia na região do UV-Visível, permeabilidade ao vapor D'água (PVA) e citotoxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima e reagentes

As escamas de Tilápia do Nilo (SISGEN A3B1887) foram obtidas da empresa de beneficiamento de pescado La Marea Pescados, localizada em Fortaleza, Ceará. A lignina foi obtida da empresa brasileira Suzano Papel e Celulose, localizada em Suzano, São Paulo. A pepsina oriunda da mucosa gástrica suína e a membrana celulósica de diálise, utilizadas na extração de colágeno foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). Os demais reagentes utilizados foram obtidos das empresas LabSynth e Dinâmica LTDA, não sendo realizadas quaisquer modificações para purificação.

3.2. Métodos de obtenção dos produtos

3.2.1. Extração de colágeno

A extração de colágeno a partir de escamas de Tilápia do Nilo foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB), localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. O método utilizado foi o de extração ácida catalisada por enzima, com adaptações (SUN *et al.*, 2017).

Primeiramente, as escamas foram lavadas com água corrente e com água destilada para a retirada de resíduos sólidos presentes. Logo após, pesou-se uma amostra de 473,35 gramas, a qual foi pulverizada em moinho analítico, com o auxílio de nitrogênio líquido. As escamas foram então, colocadas em um reator juntamente com uma solução de 5 litros de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, para a solubilização das proteínas não-colagenosas, onde permaneceram sob agitação mecânica durante 24 horas, à 4°C. Decorridas 24 horas, a mistura foi retirada do reator e filtrada em bomba de vácuo, utilizando-se como filtro tecido não-tecido (TNT). Após a filtração, as escamas foram lavadas com água destilada até pH neutro (pH~7,0). Então, foram colocadas novamente no reator, com 5 litros de solução de EDTA, de concentração $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, onde permaneceram sob agitação mecânica, durante 48 horas, à 4°C. O EDTA foi utilizado como agente quelante dos minerais presentes, como, por exemplo, cálcio e magnésio que compõem a fase inorgânica das escamas (Hidroxiapatita). Após o período pré-estabelecido, a mistura foi retirada do reator, filtrada em bomba de vácuo, utilizando-se tecido não tecido (TNT) e, por fim, lavada com água destilada até a neutralização, em pH~7,0. Essas etapas iniciais caracterizam o pré-tratamento das escamas.

Ao final do pré-tratamento restaram apenas 379 gramas de escamas, os quais foram submetidos ao processo de extração. No processo de extração, as escamas foram colocadas, inicialmente, no reator com 5 litros de solução de ácido acético $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$ e pepsina 0,5% (m/m), permanecendo sob agitação mecânica, à 4°C , durante 48 horas. Decorridas 48 horas, a mistura foi retirada do reator e filtrada em bomba de vácuo, com TNT, a fim de separar os resíduos das escamas e a solução colagenosa. Os resíduos foram descartados e a solução colagenosa foi colocada para precipitar com cloreto de sódio, de concentração $2,3 \text{ mol.L}^{-1}$, durante 24 horas. Logo após, o precipitado foi separado do sobrenadante por meio da centrifugação, à 4°C , durante 30 minutos, sob rotação de 12500 rpm. A solução sobrenadante foi neutralizada e descartada, enquanto o precipitado foi redissolvido numa pequena quantidade de ácido acético, concentração $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$, e colocado em membranas de diálise. As membranas de diálise foram imersas, primeiramente, em solução de hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4), de concentração $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, durante dois dias, com o objetivo de desativar a pepsina utilizada no processo de extração. Em seguida, foi colocada em solução de ácido acético $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. E por fim, colocada em água destilada, até obter-se um pH neutro (pH~7,0). Ao atingir o pH neutro, o colágeno purificado foi retirado das membranas de diálise e colocado em formas de alumínio, para ser congelado em *ultrafreezer* e, posteriormente, liofilizado.

3.2.2. Fracionamento da lignina Kraft

O processo de fracionamento da lignina Kraft foi realizado no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (UFC), situado em Fortaleza-CE.

Inicialmente, pesou-se uma amostra de 25,561 gramas de lignina. A lignina Kraft é considerada impura, pois no processo alcalino sofrido não é possível remover completamente os complexos formados entre a lignina e a hemicelulose, os quais são denominados complexos lignina-carboidrato (Do inglês, *Lignin-Carbohydrate Complex*, LCC). Portanto, logo após a pesagem, a amostra foi lavada com água destilada, filtrada à vácuo, utilizando-se papel de filtro (poro de $8 \mu\text{m}$) e levada para secar em estufa, à 105°C , a fim de garantir a desintegração dos complexos.

Em seguida, adicionou-se 150 mL de etanol P.A. à lignina seca (Proporção1:10). A mistura permaneceu sob agitação magnética durante cerca de 50 minutos. Ao final, foi filtrada, com papel de filtro (poro de $8 \mu\text{m}$), onde foram separadas as frações solúvel e

insolúvel. A fração insolúvel foi armazenada e guardada, enquanto a fração solúvel foi rotoevaporada, à 60°C, e levada para secar em estufa, para posterior pesagem, cálculo de rendimento e utilização no processo de produção dos filmes.

O etanol foi utilizado como solvente extrator, pois é um solvente polar prótico que tende a fazer ligações de hidrogênio com porções mais polares da lignina. Essas regiões mais polares apresentam maior miscibilidade em soluções aquosas ácidas, por exemplo, fato torna o fracionamento benéfico para a aplicação em filmes de matriz colagenosa. A lignina foi caracterizada após o processo de lavagem com água destilada, sendo denominada Kraft Lavada (KL) e, após o processo de fracionamento em etanol, a qual foi denominada Kraft Fracionada (EtOH-KL).

3.2.3. Produção de filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada

Os filmes foram produzidos no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB), localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE. O método utilizado para a preparação dos filmes foi o *casting*, com adaptações (GIMÉNEZ; MONTERO, 2013).

O filme controle (sem adição de lignina) foi preparado a partir da pesagem de 1,5 gramas de colágeno extraído de escamas de Tilápia, solubilizados em 50 mL de ácido acético, concentração 0,1 mol.L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação mecânica, em béquer encamisado, à 4°C, durante 24 horas. Após esse período, adicionou-se o colágeno solubilizado em ácido em um béquer contendo 0,375 gramas de glicerol (plastificante). A mistura permaneceu sob agitação em ultraturrax, 7000 rpm, durante 10 minutos. Logo após, foi levada para desgaseificar em bomba de vácuo, para a retirada de bolhas de ar. Por fim, a solução filmogênica do filme branco foi despejada em uma placa de vidro borossilicato (30 × 30 cm), a qual estava coberta por superfície de poliéster (Mylar®) e, foi puxada com o auxílio de uma barra de alumínio de espessura 1,5 mm, onde permaneceu secando, à temperatura de, aproximadamente, 20°C, durante 48 horas.

Para a produção dos filmes contendo lignina, o procedimento realizado acima foi acrescido apenas da etapa de adição da lignina. Após uma hora de solubilização do colágeno em solução de ácido acético 0,1 mol.L⁻¹, à 4°C, sob agitação mecânica, a lignina foi pesada nas proporções de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (massa de lignina/massa de colágeno) e adicionada à solução de colágeno sob agitação. Ambos permaneceram sob agitação até completar-se as 24 horas de solubilização.

3.3. Métodos de análise gerais

3.3.1. Rendimento

O rendimento da extração ácida de colágeno via catálise enzimática foi calculado a partir da massa liofilizada da proteína, obtida após a extração.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa seca de colágeno obtido(gramas)}}{\text{Massa seca de escamas (gramas)}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

O rendimento do processo de fracionamento realizado com a lignina Kraft foi calculado a partir da massa final obtida da fração solúvel.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa seca de lignina fracionada(gramas)}}{\text{Massa seca de lignina Kraft utilizada (gramas)}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

3.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (UFC), situado em Fortaleza-CE.

Os resultados foram obtidos a partir de um espectrômetro modelo FTIR/NIR Frontier, Perkin Elmer (Beaconsfield, UK). Utilizou-se um acessório de reflexão total atenuada (ATR), com cristal de seleneto de zinco (*ZnSe*) e resolução de 4 cm^{-1} . Para o colágeno, o glicerol, a lignina fracionada e a não fracionada foram feitas quatro varreduras, na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} . Enquanto isso, para os filmes de colágeno incorporados com lignina foram feitas sessenta e quatro varreduras, na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas do colágeno, do glicerol, das ligninas (fracionada/não fracionada) e dos filmes foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE.

Foi utilizado um analisador modelo STA 6000, Perkin Elmer. O método adotado abrangeu uma faixa de temperatura de 30 a 900°C , sob taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e atmosfera de gás nitrogênio (N_2), vazão $50 \text{ mL}/\text{min}$, utilizando-se cadinhos de alumina.

Foram tomadas amostras de, aproximadamente, 10 mg em cada análise.

3.4. Métodos de análise específicos

3.4.1. Colágeno

3.4.1.1. Potencial Zeta

A análise de potencial zeta do colágeno, para a determinação do ponto isoelétrico (carga líquida = 0) da proteína, foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE.

Utilizou-se um equipamento Zeta Nano-ZS, modelo ZEN3600, da marca Malvern. A amostra de colágeno foi solubilizada em ácido acético $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$, durante 24 hrs, permanecendo sob agitação constante e apresentando concentração final de $0,05 \text{ mg/mL}$. Posteriormente, foi levada para análise, a qual foi realizada à 25°C , com auxílio de auto-titulado acoplado ao equipamento. A amostra foi titulada em uma faixa de pH 1 a 10, utilizando-se soluções de hidróxido de potássio (KOH), $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e de ácido clorídrico (HCl) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.4.1.2. Dicroísmo Circular

A estrutura secundária do colágeno foi avaliada através da análise de dicroísmo circular, no Laboratório de Biotecnologia Marinha, do Departamento de Biotecnologia de Recursos Naturais (UFC), situado em Fortaleza-CE.

Foi utilizado um espectropolarímetro, da marca Jasco J-15 (Jasco International Co., lmtda, Tokio, Japão), conectado a um *peltier* com controle de temperatura. O colágeno foi dissolvido em ácido acético $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, até obter-se uma concentração de $0,5 \text{ mg/mL}$. A amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo, de caminho óptico igual a $0,5 \text{ mm}$, e foi analisada na região do ultravioleta entre 190 e 250 nm (UV distante), com uma velocidade de 50 nm/min , em intervalos de 1 nm .

A análise de dicroísmo circular fornece informações importantes acerca da estrutura secundária das proteínas. Cada tipo de estrutura (α -Hélice, β -Pregueada, Poliprolina II) apresenta padrões de absorção da luz polarizada específicos, expressos em função do grau de elipticidade. O grau de elipticidade (θ) é igual a $32,98 \Delta A$, onde ΔA é a diferença de absorção da luz polarizada à direita e à esquerda.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a estrutura da proteína, a amostra foi aquecida em uma rampa de temperatura de 15 a 45 °C, sob uma taxa de 4°C/min, sendo realizada uma medida a cada 1°C.

A temperatura de desnaturação (T_m) foi obtida a partir do grau de foldagem (α), ou seja, de enovelamento da proteína.

$$\alpha = \frac{\theta_{T_m} - \theta_U}{\theta_F - \theta_U} \text{ (Equação 3)}$$

Onde θ_{T_m} é o grau de elipticidade na temperatura de desnaturação, θ_U é o grau de elipticidade quando a proteína está totalmente desnaturada e θ_F é o grau de elipticidade quando a proteína está totalmente enovelada, formando a tripla-hélice.

Quando $\alpha = 0,5$, a proteína foldada iniciou o seu processo de disrupção da tripla-hélice, ou seja, de desnaturação. Portanto, a partir da Equação X, pode-se encontrar o grau de elipticidade na temperatura de desnaturação. Os valores de θ_F e θ_U foram determinados a partir de uma média aritmética realizada com três pontos iniciais e finais da rampa de temperatura, respectivamente.

Realizou-se uma regressão linear no gráfico de rampa de temperatura, a partir da qual foi possível obter uma reta ($y = ax + b$), onde y foi correspondente ao grau de elipticidade em T_m e x foi correspondente a T_m , em °C.

3.4.2. Lignina fracionada (EtOH-KL) e não fracionada (KL)

3.4.2.1. Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC)

As análises de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) possibilitaram a obtenção de informações acerca do número de cadeias poliméricas (M_n), do peso molecular das cadeias (M_w) e do grau de polidispersividade do polímero (M_w/M_n). As análises de SEC para as ligninas fracionada e não fracionada foram realizadas no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (UFC), situado em Fortaleza-CE.

Foi utilizado um equipamento Shimadzu LC-20AD (Kyoto, Japão). Para o método de análise desenvolvido, utilizaram-se duas colunas analíticas em série de cromatografia de permeação em gel (Phenogel 5μ 50 Å e Phenogel 5μ 10³ Å) e um detector UV-Vis, no comprimento de onda de 280 nm. Como fase móvel, utilizou-se tetraidofurano (THF) de alto grau de pureza. Inicialmente, foram pesados 2 mg de lignina fracionada e não-fracionada e

dissolvidos em 2 mL de THF alto grau de pureza. Posteriormente, a solução foi filtrada com filtro de PTFE 0,22 μm . Por fim, 20 μL de solução filtrada foram injetados na coluna de GPC, sob uma vazão de 0,35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A curva de calibração foi feita utilizando-se padrões de poliestireno PSS ($M_w = 162$ a $1.3 \times 10^5 \text{g mol}^{-1}$).

3.4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN – HSQC)

A análise de RMN foi realizada no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), situado na Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-CE.

O espectro de RMN 2D foi obtido a partir de um espectrômetro Bruker Avance DPX 300 300 MHz, equipado com uma sonda de 5 mm One Probe, com bobinas de gradiente z. As amostras (30 mg) foram solubilizadas em 500 μL de DMSO- d_6 . O pico central do solvente foi utilizado como referência interna (DMSO $\delta\text{H} / \delta\text{C}$ 2,5 / 39,5). O experimento de coerência quântica heteronuclear única (HSQC) usou o programa de pulso "hmqcbiph" da Bruker. O processamento dos dados de HSQC foi realizado com o auxílio do software Top Spin 3.6.2.

3.4.3. Filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada

3.4.3.1. Análise na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As propriedades de absorção da radiação eletromagnética, devido à presença de grupos cromóforos, dos filmes de colágeno incorporados com lignina foram analisadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE. Utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450, com módulo para amostras sólidas. Foram realizadas três varreduras na faixa de luz ultravioleta-visível (200 - 800 nm) para cada amostra.

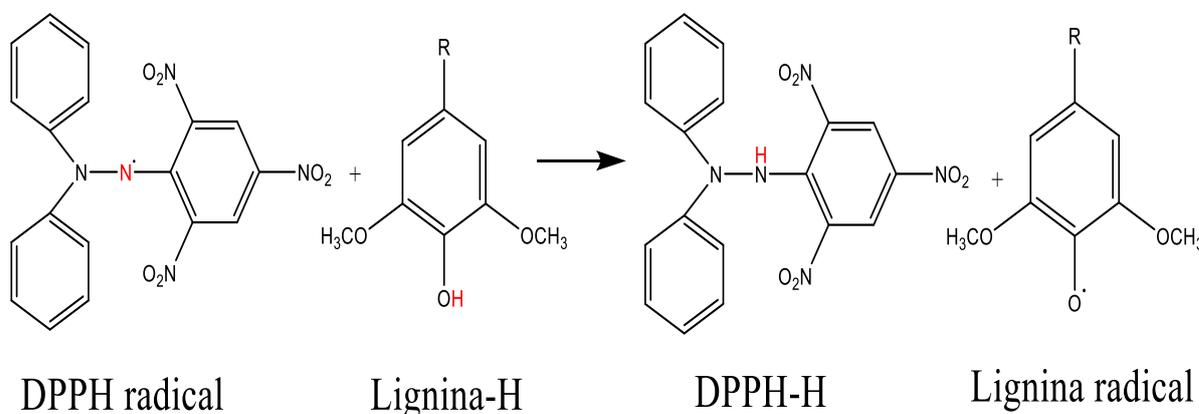
3.4.3.2. Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante a partir do método do radical DPPH (JONGJAREONRAK et al., 2008) foi realizada no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (UFC), situado em Fortaleza-CE. Foi utilizado um espectrofotômetro modelo Cary 60, marca Agilent Technologies, operando com UV Probe, versão 4.2.

Os filmes foram dissolvidos em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e permaneceram sob agitação magnética durante 30 minutos. Enquanto isso, preparou-se uma solução estoque do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), de concentração $1,00 \text{ mmol.L}^{-1}$. Essa solução de coloração violeta foi diluída até a concentração final de $0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$, sendo essa última utilizada para a análise.

Primeiramente, tomou-se uma alíquota de 2 mL da solução de DPPH e adicionou-se em uma cubeta juntamente com 1 mL de DMSO. A solução foi deixada em repouso, na ausência de luz, durante 30 minutos e, logo após, foi efetuada a leitura no comprimento de onda 517 nm (máximo de absorção do DPPH). Essa solução foi denominada branco. Em seguida, foram tomadas três alíquotas (10 μL , 100 μL e 1000 μL) de cada solução filmogênica, as quais foram adicionadas em três cubetas de quartzo distintas, juntamente com 990 μL , 900 μL e 0 μL de solução de DPPH diluída, respectivamente. O restante do volume de cada cubeta foi preenchido com DMSO. Assim como o branco, as soluções com diferentes concentrações de filmes foram deixadas em repouso, na ausência de luz, durante 30 minutos e, ao final, foram realizadas as leituras em 517 nm. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Figura 7. Reação de redução do radical DPPH a partir da lignina.



Fonte: A autora.

A partir dessa medida, foi possível identificar se houve o mecanismo de transferência eletrônica de possíveis substâncias antioxidantes presentes nos filmes para o DPPH, a fim de reduzi-lo, originando uma solução de coloração amarela.

A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde Abs branco é a absorbância média do branco e Abs amostra é a absorbância

média da amostra, ambos no comprimento de onda de 517 nm (comprimento de onda padrão).

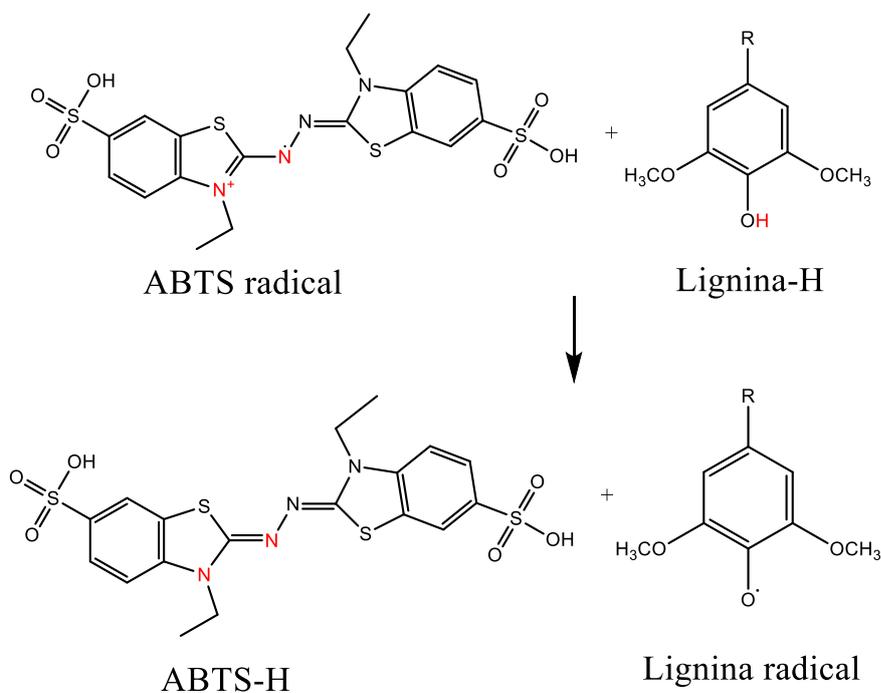
3.4.3.3. Atividade antioxidante (ABTS)

A atividade antioxidante dos filmes, utilizando o método do radical 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) (NENADIS *et al.*, 2004), foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE.

Inicialmente, o radical ABTS foi produzido a partir da reação de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 mM com 88 μ L de solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) 140 mM. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 horas. Em seguida, 1 mL dessa mistura foi diluída em álcool etílico até obter-se uma absorbância de 0,7 nm \pm 0,05 nm, no comprimento de onda de 734 nm (absorção máxima).

Os filmes foram solubilizados em DMSO, durante 30 minutos. Em seguida, foram retiradas três alíquotas (10, 20 e 30 μ L) de cada solução filmogênica, às quais foram adicionados 3 mL de solução do radical ABTS previamente preparada. Após 6 minutos, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 734 nm. O álcool etílico P.A. foi utilizado para zerar o espectrofotômetro.

Figura 8. Reação de redução do radical ABTS a partir da lignina.



Fonte: A autora.

As medidas foram realizadas em triplicata e, ao final, foi determinado o potencial de inibição, de acordo com Equação 4:

$$Inibição (\%) = \frac{Abs\ branco - Abs\ amostra}{Abs\ branco} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Onde a absorbância do branco é a absorbância obtida pela apenas com a solução do radical ABTS com etanol.

Além disso, analisou-se a capacidade antioxidante dos filmes em relação ao equivalente de trolox, um antioxidante padrão. Primeiramente, preparou-se uma solução de trolox, de concentração 2 mM. Essa solução foi diluída, originando cinco soluções de diferentes concentrações (100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM). Em seguida, retiraram-se alíquotas de 30 μL de cada uma das soluções, às quais foram acrescentados 3 mL de solução do radical ABTS para a realização da leitura no comprimento de onda de 734 nm. Após a leitura, construiu-se uma curva de calibração para o trolox com uma equação da reta, onde X representava a concentração de trolox e Y à respectiva absorbância. O X foi substituído por 1000 μM , a fim de se obter um valor de absorbância para a concentração de trolox apresentada.

Por fim, as medidas de cada solução filmogênica realizadas para a determinação do potencial de inibição possibilitaram que cada filme obtivesse uma curva, com uma respectiva equação da reta. Então, o valor de absorbância referente à concentração de 1000 μM de trolox foi substituído em cada uma das equações da reta e, desse modo, determinou-se a concentração de antioxidante equivalente à 1000 μM de trolox.

3.4.3.4. Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)

A análise de PVA foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza-CE. Foi baseada no método gravimétrico ASTM E96-00 (ASTM, 2000), com modificações.

Inicialmente, foram cortadas e medidas as espessuras de cinco amostras circulares de cada filme, utilizando um bisturi e um micrômetro digital Mitutoyo, modelo Digitatic Micrometer, com resolução de 0,001 mm, respectivamente.

Em seguida, as amostras foram colocadas entre os encaixes de células de permeação de acrílico (6,7 mm de altura e 24 mm de diâmetro), com 1,5 mL de água destilada na cavidade interior das células. Então, foi realizada a selagem com graxa de silicone para

garantir que a permeação ocorresse apenas através dos filmes. As células de permeação foram acondicionadas em um dessecador vertical e mantidas sob controle de temperatura e umidade (25 ± 5 °C de temperatura e $50 \pm 5\%$ de umidade relativa). O peso das células foi verificado no intervalo mínimo de 1 hora em uma balança analítica. Foram feitas oito pesagens em um período de 24 h.

A unidade de PVA é $\frac{g.mm}{kPa.h.m^2}$ e seu valor é obtido pela Equação 4:

$$PVA = TPVA \times \frac{e}{\Delta P} \text{ (Equação 6)}$$

Onde TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água, e é a espessura do filme, e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor de água entre as faces do filme.

3.4.3.5. Citotoxicidade

A citotoxicidade dos filmes foi realizada no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), do Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFC), situado em Fortaleza-CE.

Inicialmente, foram cortados oito discos de cada filme, com diâmetro de 1 cm, os quais foram esterilizados, em capela de fluxo laminar, através da incidência de luz ultravioleta (UV), durante 40 minutos (20 minutos por face). Em seguida, as amostras foram armazenadas à 4°C.

Para a preparação dos extratos, as amostras de cada filme foram colocadas assepticamente em tubos Falcon, juntamente com 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado (10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina; no caso de células HaCat, o meio também foi suplementado com Piruvato de sódio 1 mM). Em seguida, foram incubadas à 37 ° C, durante 24 hrs, de acordo com o estabelecido pela ISO 10993-12.

Após o período de incubação, os extratos obtidos foram coletados para o ensaio. As células L929 (fibroblastos de camundongo) e as células HaCat (queratinócitos humanos) foram semeadas em meio DMEM suplementado, sob uma densidade de 5×10^3 células/poço, em uma placa de poliestireno de 96 poços. Logo após, foram incubadas à 37 ° C (5% de CO₂ e 95% de umidade), por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços e 100 µL do extrato da amostra foram adicionados a cada poço. A placa foi novamente incubada à 37 ° C, durante 24 e 48 h. Após esse período, o extrato foi removido dos poços e foram adicionados 100 µL de meio DMEM suplementado contendo 1 mg/mL do reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), então, a placa foi incubada por 4 h sob condições de cultura padrão. Em seguida, a absorbância nos poços foi medida em um

leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EUA), a 570 nm. O grupo controle foi realizado expondo as células apenas ao meio de cultura DMEM suplementado. A viabilidade das células do grupo controle foi ajustada para 100% para o cálculo dos valores médios e desvio padrão (n = 5).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Colágeno

4.1.1. Rendimento

A extração de colágeno, obtido a partir de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), apresentou rendimento igual a 3,63%. Esse resultado foi superior ao encontrado para a extração realizada a partir da espécie *Lates calcarifer*, onde o rendimento foi igual a 1,06% e, semelhante ao obtido para a extração a partir da espécie *Diodon holocanthus*, onde obteve-se um rendimento de 4%, ambas aplicando o mesmo método de extração ácida, catalisada por pepsina (CHUAYCHAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2015; HUANG et al., 2011).

Por sua vez, a proteína extraída através de escamas de Tilápia, utilizando apenas o método ácido, sem a catálise enzimática, exibiu um rendimento inferior igual a 3,2%. (CHEN et al., 2016a). Isso ocorreu, pois a pepsina, utilizada como catalisadora no processo, solubiliza as regiões terminais não-helicoidais do colágeno, as quais são denominadas regiões telopeptídicas e, desse modo, aumenta o rendimento da extração. Essas regiões são difíceis de serem dissolvidas, devido à existência de ligações covalentes intensas do tipo aldo-histidina, que são chamadas de ligações cruzadas.

Na Figura 9, encontra-se o colágeno extraído após a realização dos processos de liofilização e moagem.

Figura 9. Colágeno liofilizado, extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.

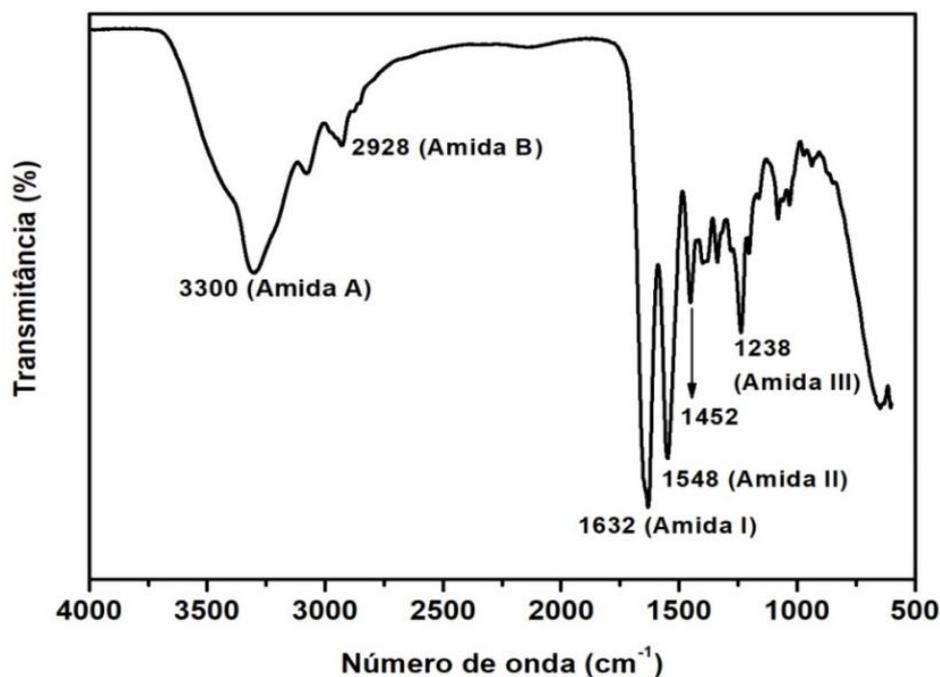


Fonte: A autora.

4.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A partir da análise de FTIR do colágeno foi possível identificar cinco bandas características da estrutura proteica, como mostrado na Figura 10, às quais correspondem as vibrações dos átomos envolvidos nas ligações peptídicas.

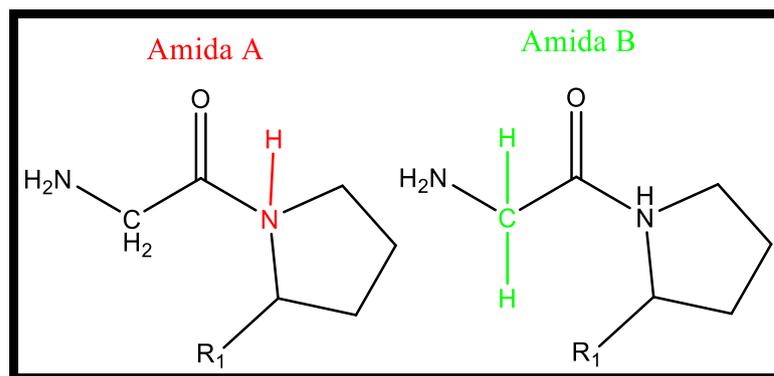
Figura 10. FTIR do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.



Fonte: A autora.

Inicialmente, foi identificada uma banda em 3300 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação N-H (Amida A) das ligações peptídicas. Em geral, esse pico é esperado numa região de maior número de onda, entre 3400 e 3440 cm^{-1} . No entanto, quando o átomo de hidrogênio está envolvido em interações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio, essa banda é encontrada em valores inferiores de número de onda, conforme o identificado. Foi observada uma banda característica de Amida B, em 2928 cm^{-1} , a qual se encontra associada aos estiramentos assimétricos de ligações C-H, de grupos metileno (CH_2). As ligações envolvidas nas vibrações referentes aos sinais de Amidas A e B encontram-se destacadas na Figura 8 abaixo.

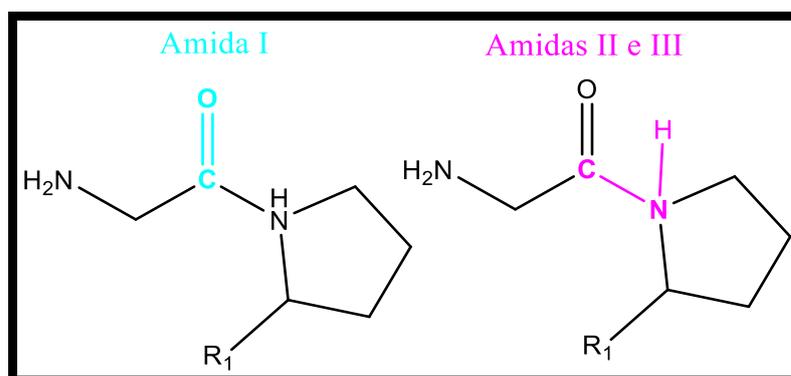
Figura 11. Ligações referentes aos sinais das Amidas A e B.



Fonte: A autora.

Constatou-se ainda uma banda em 1632 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento das ligações carbonílicas (C=O) de amida. Em geral, essa banda é esperada em valores entre 1640 e 1690 cm^{-1} , no entanto, ela foi encontrada em um número de onda menor, reafirmando a existência de ligações de hidrogênio entre as ligações N-H e C=O, as quais são fundamentais para a manutenção da estrutura secundária da proteína. Os sinais referentes às Amidas II e III (1548 e 1238 cm^{-1} , respectivamente) estão relacionados aos estiramentos das ligações C-N e aos dobramentos das ligações N-H das ligações peptídicas. As ligações envolvidas nas vibrações referentes aos sinais de Amidas I, II e III estão eminentes na Figura 12.

Figura 12. Ligações referentes aos sinais das Amidas I, II e III.



Fonte: A autora.

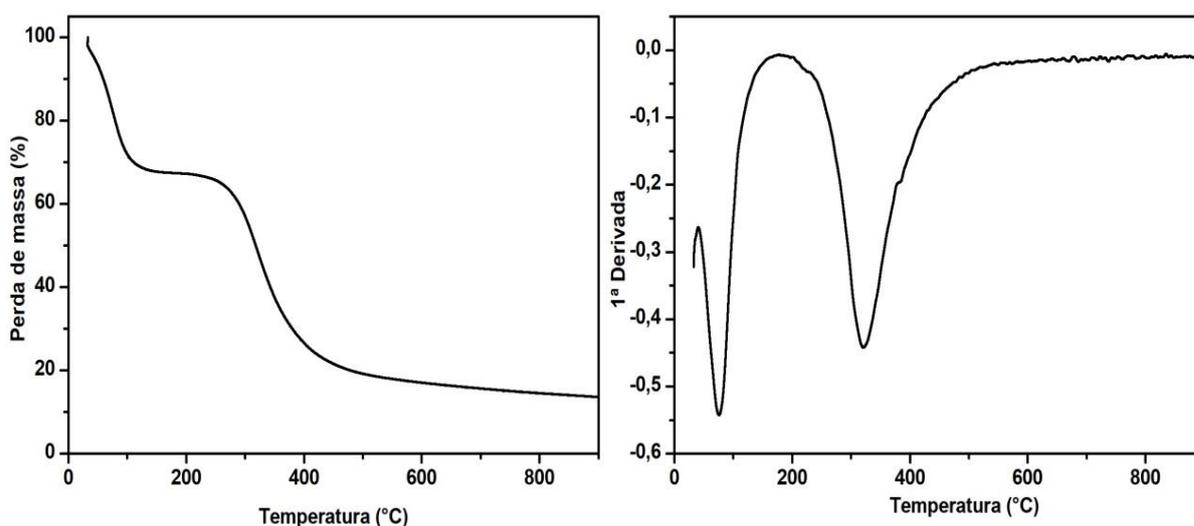
Por fim, é importante destacar a banda encontrada em 1452 cm^{-1} , a qual está relacionada ao dobramento no plano das ligações C-H dos grupos metileno, pertencentes aos anéis pirrolidínicos da prolina e da hidroxiprolina. A razão encontrada entre as absorbâncias do pico de Amida III e do pico em 1452 cm^{-1} foi de 1,12. De acordo com dados encontrados na literatura, quando essa razão é próxima de um (~ 1) indica que, após o processo de extração da proteína, houve a manutenção da estrutura tripla-hélice (CHEN *et al.*, 2016a). Essa relação

estabelece a associação entre a quantidade de ligações peptídicas (Amida III) e a quantidade de aminoácidos (prolina, hidroxiprolina e glicina) responsáveis pela sustentação da estrutura conformacional poliprolina II adotada pelo colágeno. Quando essa relação é inferior a 1,0, como ocorre para a gelatina (colágeno hidrolisado), representa que houve uma clivagem de ligações peptídicas, resultando na ruptura da tripla-hélice que é responsável pela atividade biológica da proteína.

4.1.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica do colágeno permitiu a identificação de dois eventos de degradação consideráveis, apresentados na Figura 13.

Figura 13. TGA do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.



Fonte: A autora.

O primeiro evento foi encontrado em uma faixa de temperatura inferior à 100°C, com um máximo em 76°C e apresentando uma perda de massa de 18%. Esse evento corresponde à evaporação de moléculas de água retidas na estrutura proteica. A elevada porcentagem relativa ao evento de perda de água pode ser atribuída ao fato do colágeno ter sido previamente pulverizado com nitrogênio líquido, aumentando sua umidade.

O segundo evento exibiu uma temperatura inicial de degradação em 269°C, atingindo um máximo em 321°C, e obteve uma perda de massa equivalente a 44%, como apresentado na Tabela 1. Esse evento encontra-se associado à degradação da proteína, que ocorre, principalmente, a partir da quebra das ligações peptídicas que a constituem.

Os eventos encontrados estão de acordo com os exibidos para as espécies *Arothron stellatus* e *Starry triggerfish*, as quais também apresentaram dois estágios de degradação do colágeno, sendo o primeiro encontrado na faixa de 30 a 110°C e o segundo encontrado na faixa de 300 a 400°C. (AHMAD; NIRMAL; CHUPROM, 2016; GIRIPRASATH; SINGARAVELU, 2014).

Tabela 1. Resultados da análise termogravimétrica do colágeno extraído de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

	<i>Evento 2</i> T_{onset}	<i>Evento 2</i> $T_{máxima}$	<i>Evento 2</i> PM
Colágeno	269 °C	321°C	44%

Fonte: A autora.

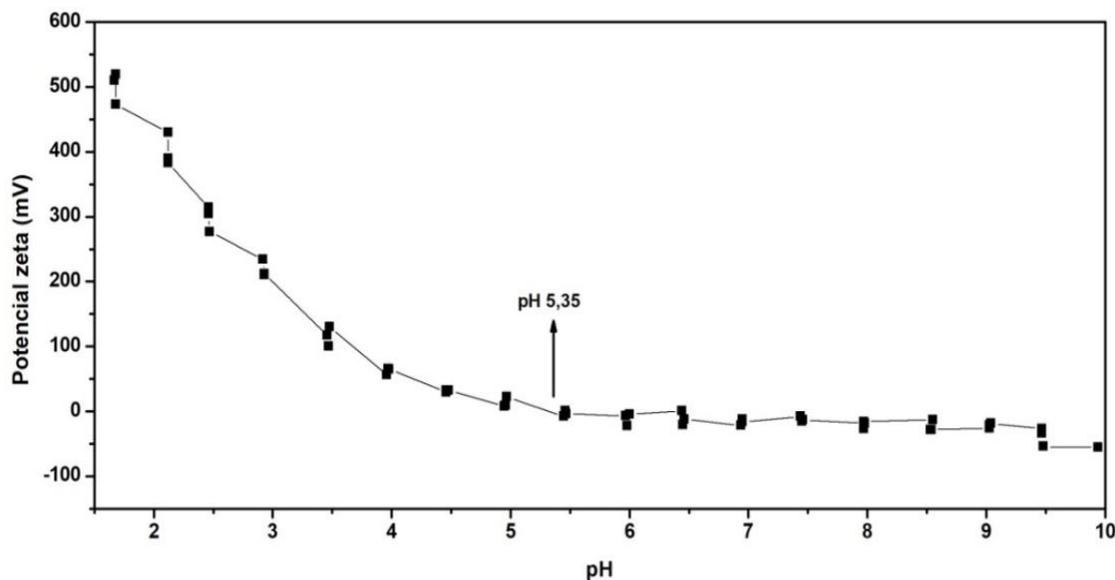
4.1.4. Potencial Zeta

A análise do potencial zeta determinou o ponto isoelétrico do colágeno obtido, ou seja, ponto onde as cargas resultantes da proteína são iguais à zero. Esse ponto foi encontrado em pH igual a 5,35, como mostrado na Figura 14. Esse valor é próximo do encontrado para o colágeno de outras espécies de peixes como, por exemplo, o colágeno extraído a partir de escamas da espécie *Lates calcarifer*, que apresentou ponto isoelétrico em pH igual a 5,76 (CHUAYCHAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2015).

O valor do ponto isoelétrico encontrado depende da composição de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas da proteína. No caso do colágeno tipo I que foi extraído, há uma predominância de aminoácidos com cadeia lateral (-R) não carregada. Desse modo, os grupos amino ($pK_a = 2,34$) e ácido carboxílico ($pK_a = 9,60$) são os principais responsáveis pelas cargas geradas na estrutura proteica. Logo, o momento em que a carga líquida é igual a zero pode ser estimado a partir do valor médio de pK_a s desses grupos, o qual situa-se, em geral, próximo de pH igual a 5, fato que está de acordo com o encontrado.

O ponto isoelétrico da proteína fornece importantes informações acerca de sua solubilidade. Em regiões de pH abaixo do ponto isoelétrico, há uma predominância de cargas positivas, resultando em uma intensa repulsão eletrostática entre as moléculas do colágeno e, conseqüentemente, resultando no aumento de sua solubilidade.

Figura 14. Ponto isoelétrico do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.



Fonte: A autora.

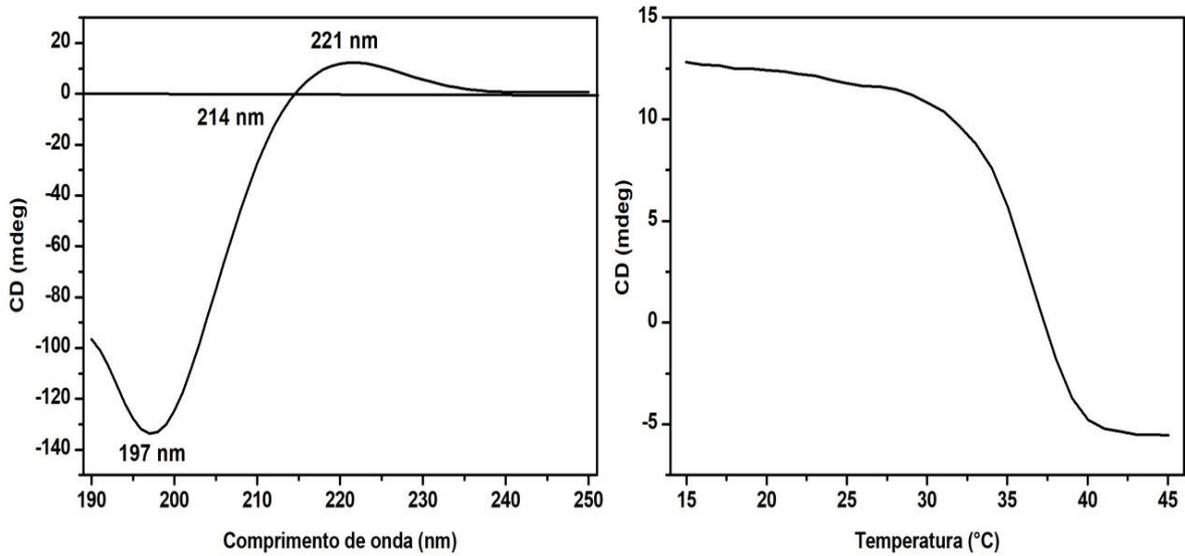
4.1.5. Dicroísmo Circular

O colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo apresentou dois picos de absorção de luz circularmente polarizada, característicos da conformação poliprolina II. O primeiro pico (absorção negativa) foi encontrado em 197 nm e o segundo (absorção positiva) em 221 nm, como mostrado na Figura 15. Os picos de absorções encontrados estão diretamente relacionados às ligações peptídicas da estrutura protéica, sendo o primeiro pico (197 nm) referente às transições $n \rightarrow \pi^*$, oriundas dos átomos com pares de elétrons não-ligantes das amidas, como oxigênio e nitrogênio, e o segundo pico (221 nm) referente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$. A partir desse resultado foi possível identificar a eficácia do processo de extração utilizado, o qual manteve a estrutura da proteína intacta.

Além disso, realizou-se uma variação de temperatura, no comprimento de 220 nm, a partir da qual foi possível identificar a queda do pico de absorção positivo que ocorreu com o aumento da temperatura. Esse fato está diretamente relacionado à desnaturação proteica, com a ruptura da tripla-hélice. Quando o grau de foldagem é igual a 0,5, ou seja, no momento em que 50% da estrutura proteica perde seu enovelamento, considera-se a temperatura de desnaturação da proteína. Na análise do colágeno extraído, essa temperatura foi encontrada em 37,1°C. O resultado foi superior ao encontrado para o colágeno extraído de pele de tilápia do Nilo e para o colágeno oriundo de escamas da carpa indiana, pertencente a espécie

Cirrhinus cirrhosus, onde as temperaturas encontradas foram, respectivamente, 34,5°C e 35°C. (PAL et al., 2016; SUN et al., 2017).

Figura 15. Dicroísmo circular do colágeno extraído a partir de escamas de Tilápia do Nilo.



Fonte: A autora.

4.2. Lignina Kraft

4.2.1. Rendimento do fracionamento

Figura 16. Fração solúvel de lignina Kraft, obtida após o fracionamento etanólico (KF ou EtOH-KL).



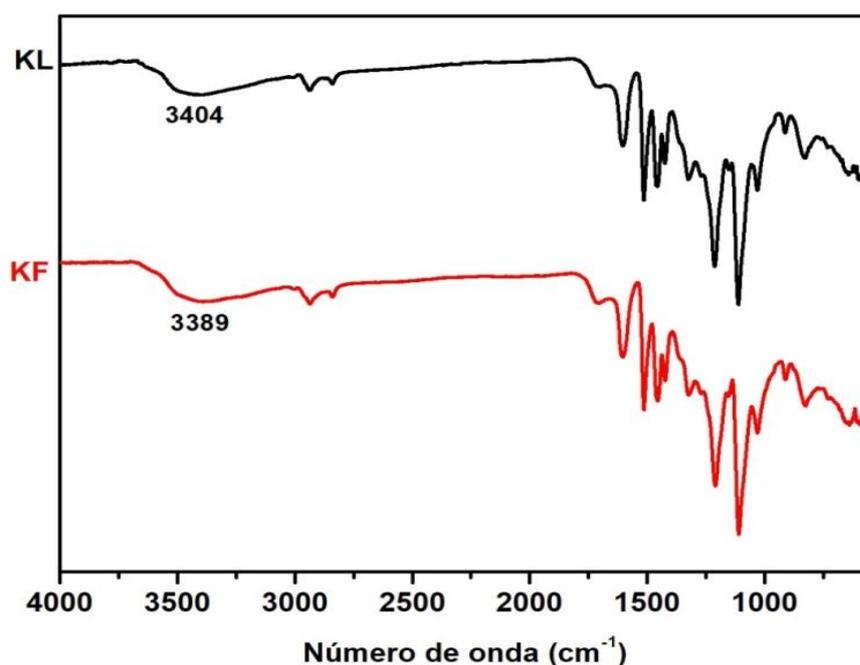
Fonte: A autora.

O fracionamento etanólico da lignina exibiu uma massa final de lignina solúvel igual a

11,859 gramas. O rendimento calculado, de acordo com a Equação 2, foi igual a 46,39 %. O resultado foi semelhante ao encontrado para a lignina Kraft, obtida a partir de uma espécie de gimnosperma, que foi fracionada com metanol e, ao final, apresentou um rendimento para a fração solúvel de, aproximadamente, 40% (PASSONI et al., 2016). A lignina solúvel em etanol encontra-se apresentada na Figura 16, após passar pelo processo de secagem.

4.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Figura 17. FTIR da lignina lavada antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).



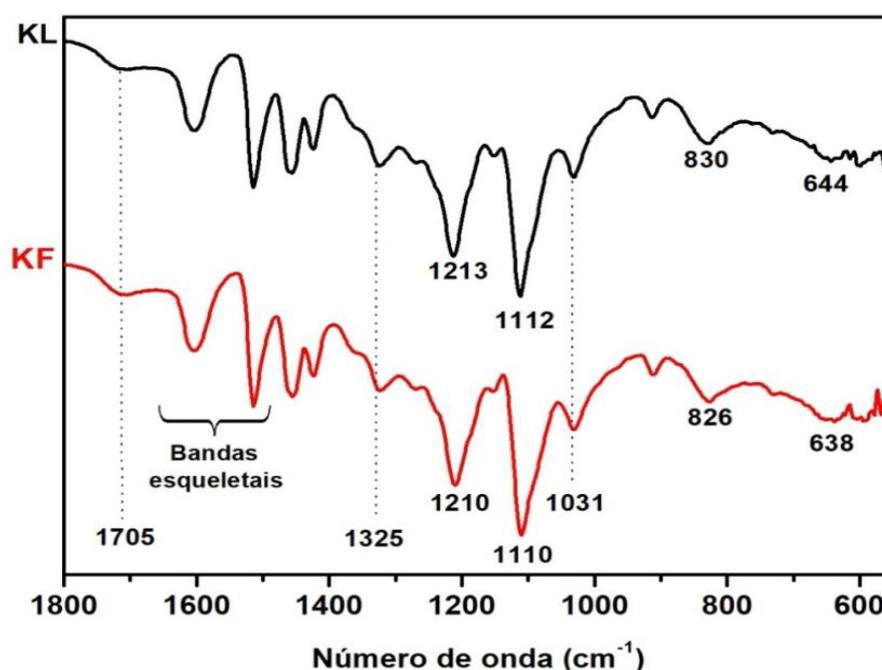
Fonte: A autora.

A análise de FTIR da lignina antes e depois do fracionamento possibilitou a identificação dos picos em 3404 e 3389 cm^{-1} para KL e para KF, respectivamente, os quais correspondem aos estiramentos das ligações O-H alifáticas e fenólicas, como mostrado na Figura 17. A diminuição do número de onda encontrado para a KF pode ser justificada pelo fato do etanol (solvente polar prótico) solubilizar fragmentos polares da lignina, os quais estão envolvidos em ligações hidrogênio. Esse fato diminui a energia das ligações O-H alifáticas e fenólicas, diminuindo, conseqüentemente, o número de onda em que são encontrados os sinais.

Em 1705 cm^{-1} , para ambas as ligninas (KL e KF), identificou-se um pico referente ao estiramento de ligações C=O de grupamentos cetonas. As bandas esqueléticas, relacionadas aos

estiramentos C=C dos anéis aromáticos constituintes das unidades monoméricas, foram encontradas em 1604 e 1515 cm^{-1} . Em 1455 cm^{-1} e 1424 cm^{-1} , foram encontrados os dobramentos no plano de ligações C-H, oriundos de grupamentos metílicos e metilênicos contidos na estrutura, associados às vibrações de ligações C-H em anéis aromáticos.

Figura 18. FTIR da região de *fingerprint* da lignina lavada antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).



Fonte: A autora.

Na região de *fingerprint* do espectro (Figura 18) foi possível identificar os sinais referentes aos monômeros constituintes da lignina. O pico em 1325 cm^{-1} , por exemplo, refere-se ao estiramento das ligações C-O de anéis siringila e guaiacila condensados. Enquanto isso, os picos em 1213 e 1210 cm^{-1} para KL e KF, respectivamente, referem-se aos estiramentos C-O de grupos guaiacila e siringila associados aos estiramentos C-C. O menor número de onda encontrado para KF reafirma a existência de ligações de hidrogênio envolvendo ligações C-O na fração etanólica solúvel, as quais ocorrem, possivelmente, devido à seletividade do solvente polar prótico por frações polares.

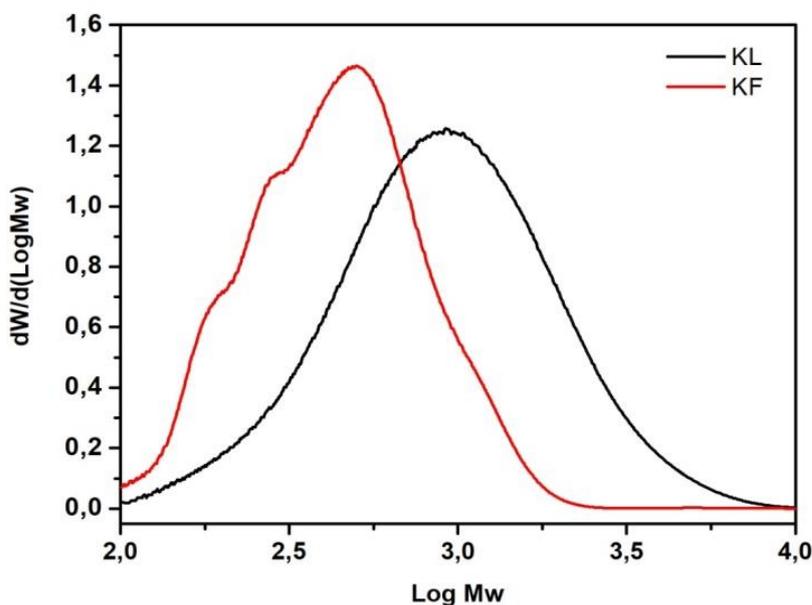
Em 1112 e 1110 cm^{-1} , foram encontrados picos referentes aos estiramentos C-O em ligações de ésteres e, em 1031 cm^{-1} , um pico referente aos dobramentos no plano de C-H de siringila e guaiacila associados aos dobramentos de ligações C-O de álcoois primários. Os picos em 830 cm^{-1} (KL) e 826 cm^{-1} (KF) estão relacionados aos dobramentos fora do plano

de ligações C-H nas unidades guaiacila. Por fim, os sinais presentes em 644 cm^{-1} (KL) e 638 cm^{-1} (KF) encontram-se relacionados aos estiramentos de ligações C-S, adquiridas após o processo Kraft.

4.2.3. Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC)

Na Figura 19, apresentada abaixo, identificou-se que a fração solúvel em etanol apresentou menores valores de Mw, ou seja, o fracionamento solubilizou fragmentos de menores massas molares. Além disso, como mostrado na Tabela 2, o valor de polidispersividade exibido para KF foi de 1,47, enquanto para KL foi de 1,66. Esse fato indica que o fracionamento proporcionou a obtenção de cadeias poliméricas de tamanhos similares, alcançando-se uma maior homogeneidade na distribuição das massas molares das frações solúveis.

Figura 19. SEC/GPC da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).



Fonte: A autora.

Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados para os fracionamentos metanólico e etanólico de ligninas Kraft, obtidas de diferentes fontes vegetais, os quais também identificaram a seleção de fragmentos de menores massas molares e com um menor grau de polidispersividade. (GOLDMANN *et al.*, 2019; PASSONI *et al.*, 2016).

Tabela 2. Médias aritmética e ponderada (Mn e Mw) e polidispersividade (PDI) das cadeias

poliméricas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).

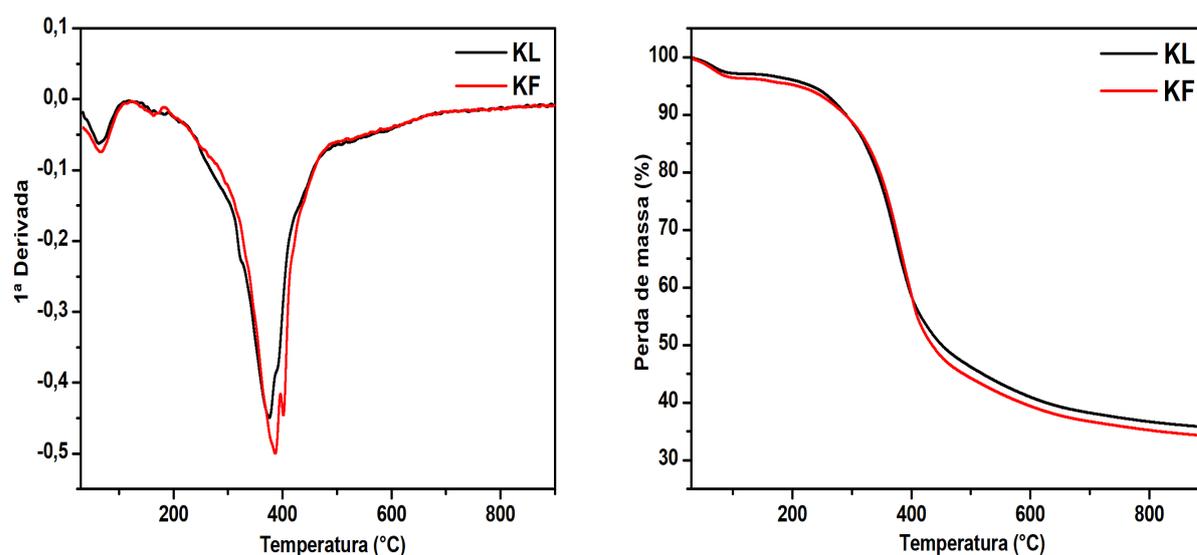
	M_n	M_w	PDI
KL	656	1093	1,66
KF	627	925	1,47

Fonte: A autora.

4.2.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A lignina fracionada e não fracionada foram analisadas por termogravimetria e os resultados foram apresentados na Figura 20. Foram exibidos dois estágios principais de degradação. O primeiro deles foi encontrado antes de 100°C, com uma perda de massa de 2 a 4%, relacionado à perda de moléculas de água por evaporação. O segundo estágio foi identificado em uma região entre 300 e 420°C, com uma perda de massa de, aproximadamente, 45%, e está relacionado à quebra das ligações características (β -O-4' e β - β , por exemplo) que conectam as estruturas monoméricas do biopolímero.

Figura 20. TGA /DTG da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (KF).



Fonte: A autora.

É importante ressaltar, que a temperatura *onset*, ou seja, a temperatura inicial de degradação no estágio segundo estágio, referente à quebra das ligações características do

polímero, foi ligeiramente inferior para a lignina que sofreu fracionamento com etanol, como mostrado na Tabela 3. Essa pequena diminuição na estabilidade térmica está diretamente associada aos dados encontrados na análise de GPC. A fração solúvel apresentou fragmentos de menores massas molares quando comparada à lignina não-fracionada. Quanto menor for o tamanho das cadeias poliméricas, menor será a quantidade de calor necessária para romper as ligações que interconectam a estrutura. Em contrapartida, estruturas grandes e condensadas necessitam de maior quantidade de calor para romper as ligações e iniciar o processo de degradação. No entanto, por tratar-se de uma pequena diminuição, pode ser considerado que o fracionamento não apresentou efeito significativo sob o comportamento térmico do polímero.

Tabela 3. Resultados de T_{onset} do principal evento de degradação da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (KF).

	<i>Evento 2</i>	<i>Evento 2</i>	<i>Evento 2</i>
	T_{onset}	$T_{máxima}$	<i>PM</i>
KL	298°C	375°C	42%
KF	296°C	380°C	43%

Fonte: A autora.

4.2.5. Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN – HSQC)

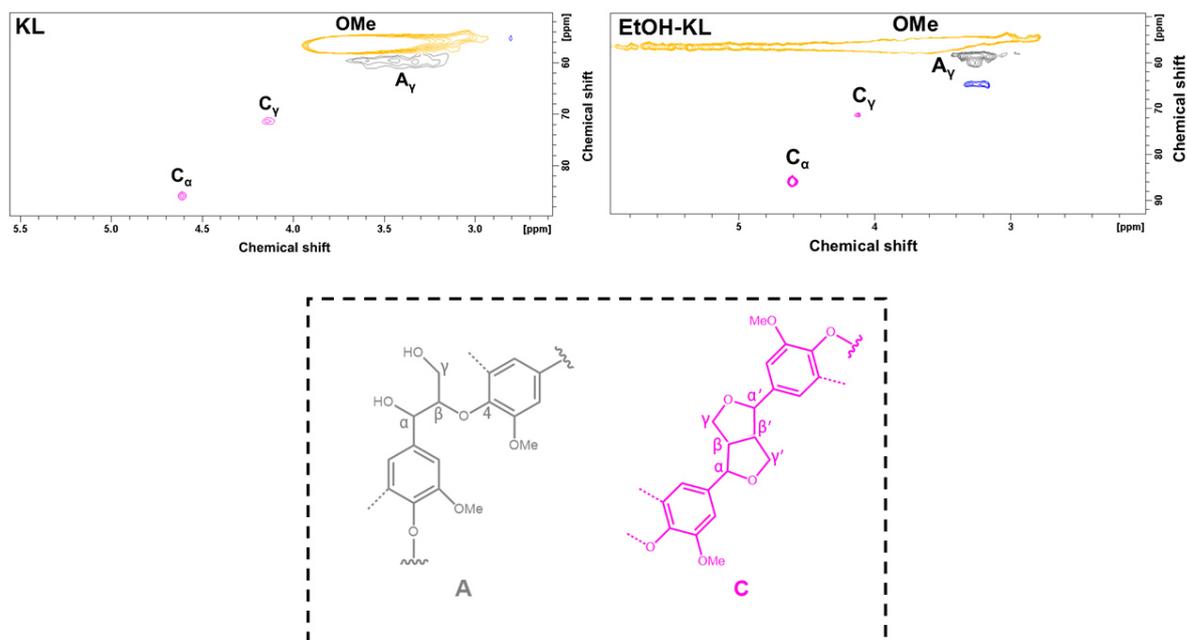
A análise estrutural da lignina por ressonância magnética nuclear bidimensional - HSQC (Do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) permitiu a identificação de duas regiões específicas: A região oxigenada alifática (δ_H 2 – 5 ppm e δ_C 50 – 90 ppm) e a região aromática (δ_H 5 – 8.5 ppm e δ_C 90 – 150 ppm).

Na região oxigenada alifática, foram identificados os sinais referentes às ligações específicas, que interligam as unidades monoméricas básicas do biopolímero, destacando-se as ligações β - β' (resinol) e as ligações β -O-4'. Além disso, identificaram-se os sinais alusivos as metoxilas ($-OCH_3$) presentes nas unidades monoméricas. Os sinais obtidos foram apresentados na Figura 18 e suas respectivas atribuições foram exibidas na Tabela 4.

Em geral, o processo Kraft ocasiona a cisão das ligações β -O-4', diminuindo a intensidade dos sinais relacionados a esse tipo de ligação. (FERNÁNDEZ-COSTAS *et al.*, 2014; HUIJGEN; GOSSELINK; BRUIJNINCX, 2016). No entanto, a partir das análises de RMN, constatou-se que, apesar de ter sido submetida ao processo Kraft, a lignina manteve

grande parte dessas ligações, as quais foram encontradas também na fração solúvel em etanol como mostrado na Figura 21. A polaridade da ligação β -O-4' justifica o seu aparecimento nas frações solúveis em etanol.

Figura 21. HSQC 1H ^{13}C das regiões alifáticas oxigenadas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (EtOH-KL).



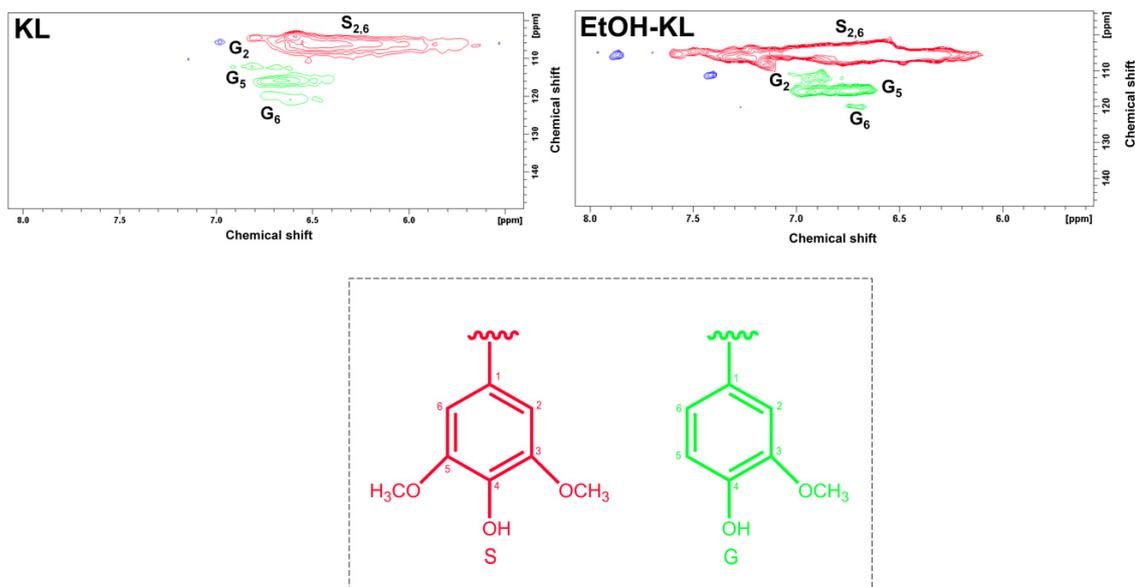
Fonte: A autora.

Tabela 4. Atribuição de sinais de RMN HSQC da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (EtOH-KL) – Região Alifática Oxigenada.

Região Alifática Oxigenada						Atribuições
Kraft	δ_H	δ_C	EtOH	δ_H	δ_C	
1	3,7	56,5	1	3,7	56,4	Metoxilas $-OCH_3$
2	3,3	59,5	2	3,3	58,5	C_Y ($\beta - O - 4'$)
3	4,1	71,0	3	4,1	71,3	C_α ($\beta - O - 4'$)
4	4,6	85,7	4	4,6	85,7	C_α ($\beta - \beta' - Resinol$)

Fonte: A autora.

Figura 22. HSQC 1H ^{13}C das regiões aromáticas da lignina antes do fracionamento (KL) e da lignina fracionada (EtOH-KL).



Fonte: A autora

Enquanto isso, a região aromática exibiu sinais atribuídos às unidades monoméricas constituintes da lignina, as quais são derivadas dos fenilpropanoides. Em ligninas advindas de espécies de angiospermas, como o eucalipto, há uma predominância de unidades siringila (S) e guaiacila (G), fato que foi confirmado a partir da análise da Figura 22. Os sinais obtidos foram atribuídos e apresentados na Tabela 5.

De modo geral, os dados de ressonância encontrados para a lignina antes e depois do fracionamento estão de acordo com o apresentado na literatura. (FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014; CHEN et al., 2016b; HUIJGEN; GOSSELINK; BRUIJNINCX, 2016).

Tabela 5. Atribuição de sinais de RMN HSQC da lignina antes do fracionamento (KL) e para a lignina fracionada (EtOH-KL) – Região Aromática.

Região Aromática						Atribuições
Kraft	δ_H	δ_C	EtOH	δ_H	δ_C	
1	6,5	103,7	1	6,6	103,9	$C_{2,6}$ – Unidades S
2	6,6	115,6	2	6,7	115,4	C_5 – Unidades G
3	6,8	111,9	3	6,8	111,2	C_2 – Unidades G
4	6,6	120,6	4	6,7	120,0	C_6 – Unidades G

Fonte: A autora.

4.3. Filmes de colágeno incorporados com lignina fracionada

Foram produzidos cinco filmes, sendo o primeiro deles constituído apenas por colágeno e glicerol (FC-Controle) e os demais adicionados com diferentes quantidades de lignina solúvel em etanol [F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].

Fisicamente, constatou-se que o filme controle apresentou determinada fragilidade, a qual foi melhorada com a inserção de lignina. Entretanto, o excesso de lignina adicionado nos filmes F3 e F4 atribuíram um aspecto quebradiço, dificultando inclusive a retirada dos mesmos da superfície do Mylar. Os filmes produzidos estão apresentados na Figura 20.

As soluções filmogênicas foram preparadas a partir da solubilização de colágeno 3% (m/v) em ácido acético 0,1 $mol.L^{-1}$. O ácido acético foi escolhido como solvente após a determinação do ponto isoelétrico do colágeno, situado em pH igual a 5,35.

Figura 23. Filmes de colágeno, sem lignina e incorporados com diferentes concentrações de lignina.



Fonte: A autora.

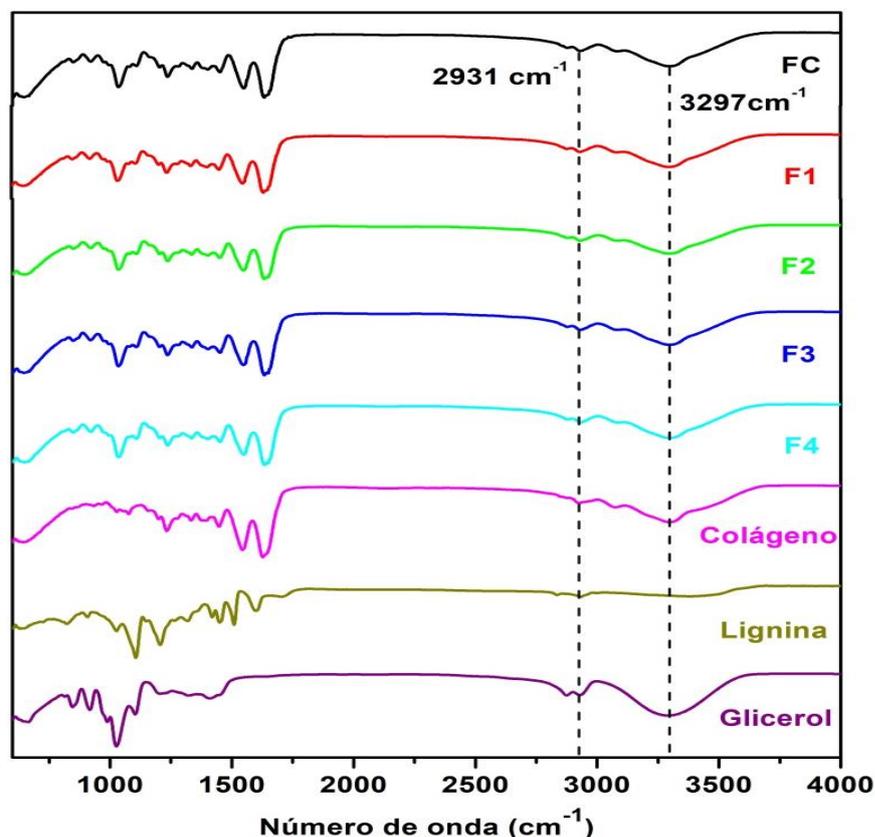
Antes do ponto isoelétrico, considera-se que há um excesso de cargas positivas na estrutura proteica, aumentando a repulsão eletrostática proteína-proteína e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade do colágeno, fato que facilita a formação de uma película filmogênica. Portanto, a solução filmogênica foi preparada em pH ácido, abaixo do P.I., para garantir a solubilidade da proteína.

4.3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os filmes foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e os principais sinais detectados foram atribuídos à matriz colagenosa e ao glicerol (agente plastificante). Os sinais alusivos a lignina não foram identificados. Esse fato está possivelmente associado às pequenas quantidades do polímero que foram adicionadas em comparação as massas de colágeno e glicerol presentes nos filmes. Além disso, pode ter ocorrido uma sobreposição de sinais para as estruturas da lignina, do colágeno e do glicerol.

Na região entre 2000 e 4000 cm^{-1} , foram encontrados dois picos significativos, como destacado na Figura 24. O primeiro pico, em 3297 cm^{-1} , é referente aos estiramentos de ligações N-H, as quais se encontram envolvidas em ligações de hidrogênio, apresentando número de onda inferior ao esperado ($3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$). Esse pico é característico de Amida A do colágeno. O pico de Amida B, encontrado em 2932 cm^{-1} , está relacionado aos estiramentos assimétricos de ligações C-H, de grupamentos metil e metileno, contidos no colágeno.

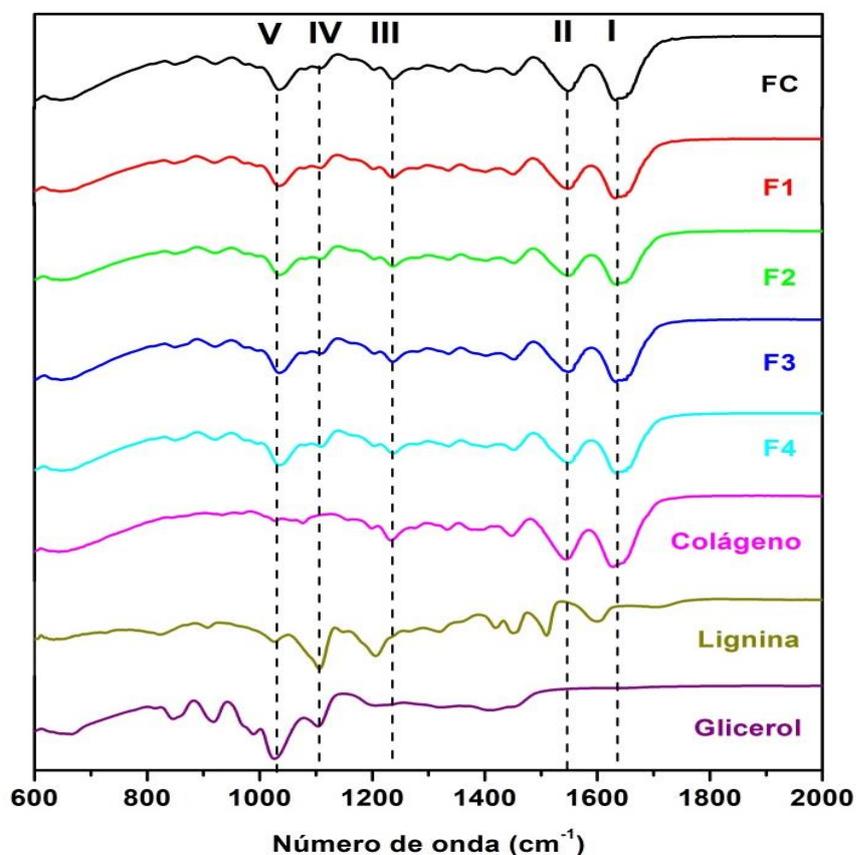
Figura 24. FTIR do colágeno, do glicerol, da lignina fracionada (KF) e dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

Na região de *fingerpint* dos filmes, foram encontrados quatro sinais significativos, os quais foram destacados na Figura 25. Os picos I, II e III encontram-se diretamente relacionados às Amidas I, II e III da estrutura colágeno. O pico de Amida I, encontrado em 1633 cm^{-1} , refere-se aos estiramentos de ligações carbonílicas (C=O), enquanto os picos de Amidas II (1549 cm^{-1}) e III (1239 cm^{-1}) referem-se aos estiramentos de ligações C-N e aos dobramentos de ligações N-H. O pico IV, por sua vez, encontrado em número de onda igual a 1035 cm^{-1} , foi associado ao estiramento de ligações C-O de álcoois primários. Como mostrado na Figura 22, esse pico acentuado nos espectros dos filmes aparece de forma sutil no espectro da lignina e não aparece no espectro do colágeno, sendo, portanto, atribuído majoritariamente ao glicerol, que foi utilizado como agente plastificante nos filmes (GUERRERO; DE LA CABA, 2010).

Figura 25. FTIR, na região de *fingerpint*, do colágeno, do glicerol, da lignina fracionada (KF) e dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

4.3.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

Na análise dos filmes por termogravimetria, cujo resultado pode ser observado na Figura 26, foi possível identificar que todos os filmes apresentaram um estágio inicial de perda de massa, com temperatura inicial de degradação (T_{onset}) abaixo de 100°C e perda de massa de, aproximadamente, 4%, referente à evaporação de moléculas de água. Além disso, identificou-se um segundo estágio de perda de massa, bastante significativo, relacionado aos eventos de degradação térmica dos componentes dos filmes.

O filme controle apresentou dois eventos de degradação térmica distintos, sendo o primeiro deles referente à degradação do glicerol (plastificante), com T_{onset} igual a 216 °C e perda de massa de 11%. De acordo com dados da literatura, a degradação do glicerol ocorre em uma faixa de temperatura, em geral, entre 100 e 300°C, estando de acordo com o encontrado. (BAXTER *et al.*, 2011; SANYANG *et al.*, 2015).

O segundo evento é referente à degradação da estrutura proteica pela quebra das ligações peptídicas, com T_{onset} igual a 297 °C e perda de massa de 16%. Na literatura, esse evento foi identificado em uma faixa média de temperatura em torno de 300°C. Para filmes de colágeno extraído da espécie *Abalistes stellaris*, a temperatura inicial de degradação da proteína foi de 331,7°C (AHMAD; NIRMAL; CHUPROM, 2016). Enquanto isso, para blendas de colágeno e fucoidan, a T_{onset} encontrada foi de 273°C (PERUMAL *et al.*, 2018).

Nos filmes com lignina fracionada, o segundo evento, localizado próximo à 300°C, encontra-se associado também à quebra ds ligações características da lignina como, por exemplo, as ligações β -O-4' e β - β (SHANKAR; REDDY; RHIM, 2015). Foi possível identificar, a partir da análise da Tabela 6, que os filmes contendo lignina apresentaram T_{onset} superiores às encontradas para o filme controle. Isso ocorreu, possivelmente, devido à inserção da lignina que, ao interagir com os demais componentes da matriz filmogênica através de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio atribuíram maior resistência térmica aos materiais. Os filmes com concentração de 0,5% e 1,0% de lignina fracionada apresentaram um aumento crescente na T_{onset} . Por outro lado, os filmes com 2,5% e 5% de lignina apresentaram uma diminuição na T_{onset} em relação aos anteriores.

Tabela 6. Resultados de análise termogravimétrica dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].

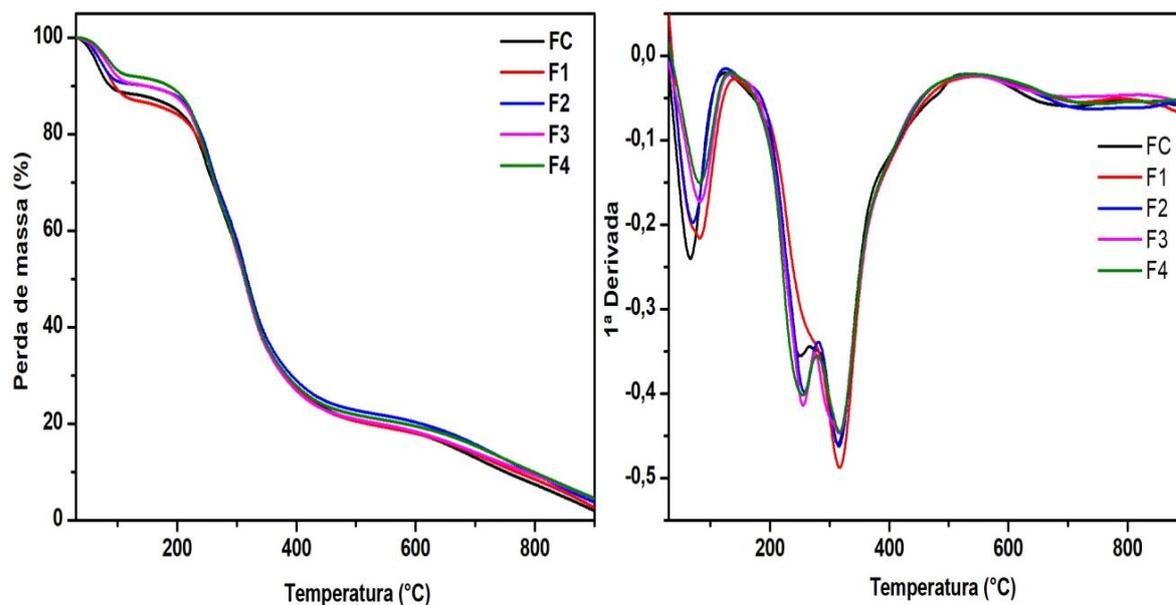
	<i>Evento 2</i>	<i>Evento 2</i>	<i>Evento 3</i>	<i>Evento 3</i>
--	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

	T_{onset}	PM	T_{onset}	PM
FC	216 °C	11%	297 °C	16%
F1	227 °C	11%	307 °C	14%
F2	229 °C	13%	309 °C	12%
F3	219 °C	15%	303 °C	11%
F4	216 °C	15%	300 °C	14%

Fonte: A autora.

Essa diminuição pode ter ocorrido, pois, a partir de determinadas concentrações de lignina, as interações lignina-lignina foram mais fortes do que as interações lignina-colágeno, propiciando um abaixamento da estabilidade térmica dos componentes do filme. Em filmes de poli-metil metacrilato (PMMA), a lignina começa a não exercer mais tanta influência sobre a estabilidade térmica, em concentrações acima de 1% (AVELINO *et al.*, 2018). Essa diminuição foi identificada em filmes de colágeno e gelatina, adicionados com elevadas quantidades de óleo de pequi (HORN *et al.*, 2018).

Figura 26. TGA/DTG dos filmes [FC- Controle; F1- 0,5% (m/m); F2- 1% (m/m); F3- 2,5% (m/m) e F4- 5% (m/m)].



Fonte: A autora.

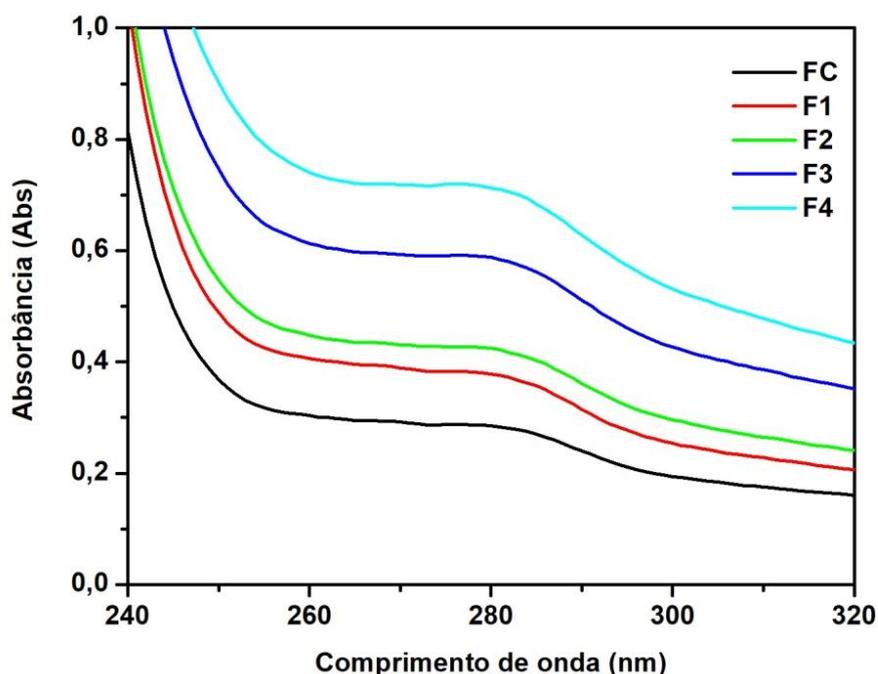
4.3.3. Análise na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O filme controle, contendo apenas colágeno e glicerol, apresentou uma pequena absorção de radiação ultravioleta, em uma faixa próxima à 280 nm, como apresentado na Figura 27. De acordo com dados da literatura, o colágeno apresenta em sua constituição pequenas quantidades de aminoácidos de cadeias laterais aromáticas, como a tirosina, a fenilalanina e o triptofano. (CHEN *et al.*, 2016a; WEI *et al.*, 2019). Essa absorção, portanto, pode ser atribuída as cadeias laterais aromáticas desses aminoácidos. A absorção em excesso da radiação ultravioleta causa a desestruturação da tripla-hélice da proteína, a partir da ruptura das ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias polipeptídicas. Esse fato torna o colágeno sensível à exposição da radiação UV.

A inserção de lignina em filmes de colágeno é de extrema importância para aumentar a resistência dos filmes frente à degradação proporcionada pela radiação UV. A lignina é constituída essencialmente por monômeros de estrutura aromática, os quais absorvem radiação ultravioleta na faixa de comprimento de onda de, aproximadamente, 260 a 400 nm, devido às transições eletrônicas entre os orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$.

Como apresentado na Figura 19, a absorbância, em 280 nm, aumenta à medida que há o aumento da concentração de lignina nos filmes. O filme com 5% de lignina, o mais concentrado, apresenta maior grau de absorção. Essa característica confere ao filme propriedades proteção contra radiação ultravioleta, a qual, quando incidida sobre diversas estruturas de relevância biológica (proteínas e lipídios, por exemplo), origina espécies radicalares reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pela degradação das estruturas.

Figura 27. Análise UV-Vis dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

4.3.4. Atividade Antioxidante (DPPH)

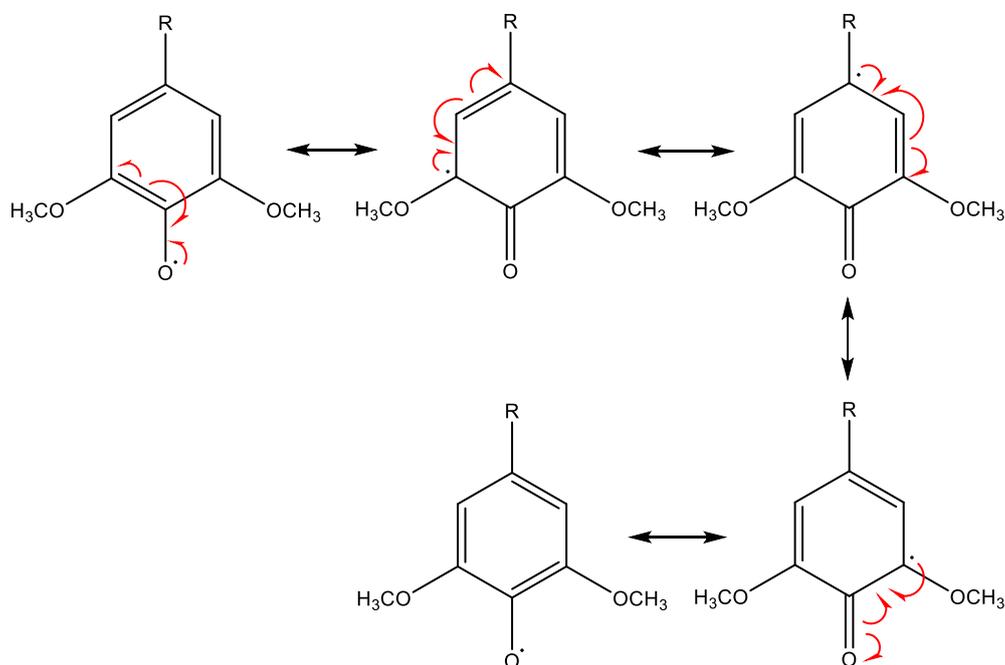
A capacidade antioxidante dos filmes foi determinada pelo método do radical DPPH, o qual se baseia no mecanismo SET (Do inglês, *Single Electron Transfer*), onde a substância antioxidante age como doadora de um átomo de hidrogênio para a redução do radical DPPH à hidrazina (Figura 28) (JONGJAREONRAK *et al.*, 2008).

O filme controle, contendo apenas colágeno e glicerol, na concentração de 0,11 mg/mL apresentou inibição abaixo de 10%. Enquanto isso, em concentrações superiores (1,11 e 11,1 mg/mL), apresentou inibição de, aproximadamente, 30% e 40%, respectivamente. Em geral, esperava-se que o colágeno não possuísse qualquer atividade antioxidante. No entanto, como citado nos resultados de absorção na região do ultravioleta, a proteína é constituída por uma pequena quantidade de aminoácidos aromáticos, dentre eles pode-se destacar a tirosina, que apresenta um grupamento fenólico em sua estrutura, ao qual pode ser atribuído a existência de atividade antioxidante no FC.

Enquanto isso, os filmes incorporados com lignina apresentaram valores de porcentagem de inibição superiores aos do filme controle, nas três concentrações determinadas, a partir da reação de redução do radical pela ação antioxidante da lignina, como mostrado na Figura 29. Esse fato pode ser explicado, devido à presença dos compostos fenólicos na estrutura da lignina, que possibilitam a estabilização do radical formado através

de ressonância, como indicado na Figura 28.

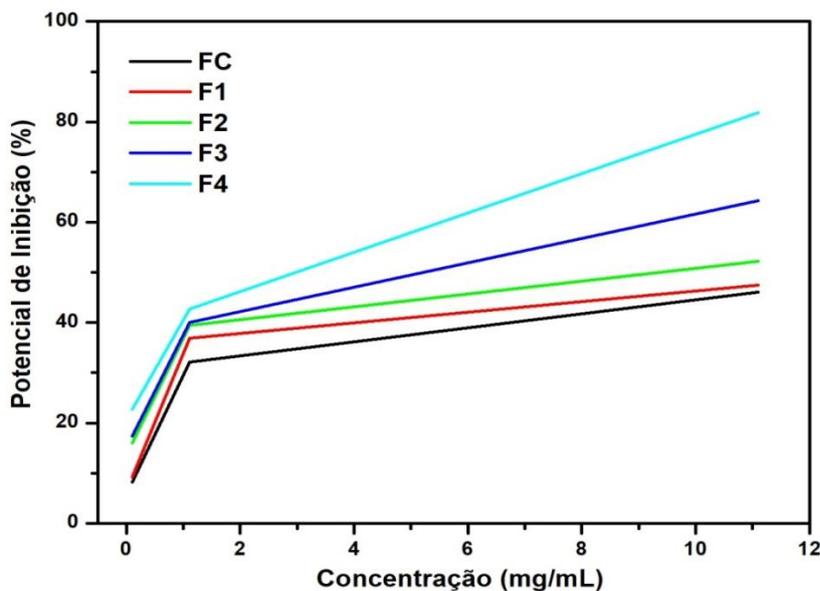
Figura 28. Estruturas de ressonância responsáveis pela estabilização da lignina.



Fonte: A autora.

É importante ressaltar que o fracionamento etanólico da lignina, como apresentado nos dados de FTIR e GPC, proporcionou a seleção de fragmentos de maior polaridade, que contém hidroxilas, e de menores massas molares e polidispersividade. Isso, possivelmente, aumentou a capacidade de ação antioxidante do polímero, pois selecionou grupos fenólicos, que contribuem para a estabilização dos radicais formados no polímero. Além disso, selecionou frações mais homogêneas e de menores pesos moleculares, que contribuem para o aumento da seletividade na ação antioxidante e para a diminuição do impedimento estérico entre a lignina e o radical DPPH, respectivamente. (UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008; ARSHANITSA *et al.*, 2013).

Figura 29. Atividade antioxidante dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

Por fim, o aumento da porcentagem de inibição ocorreu à medida que aumentou a concentração de lignina, como mostrado na Figura 29, o que é coerente, pois o aumento de concentração de lignina nos filmes aumenta, conseqüentemente, a quantidade de compostos fenólicos presentes. Esse mesmo efeito é apresentado em filmes de quitosana, incorporados com lignina. (CROUVISIER-URION *et al.*, 2016, 2017).

4.3.5. Atividade Antioxidante (ABTS)

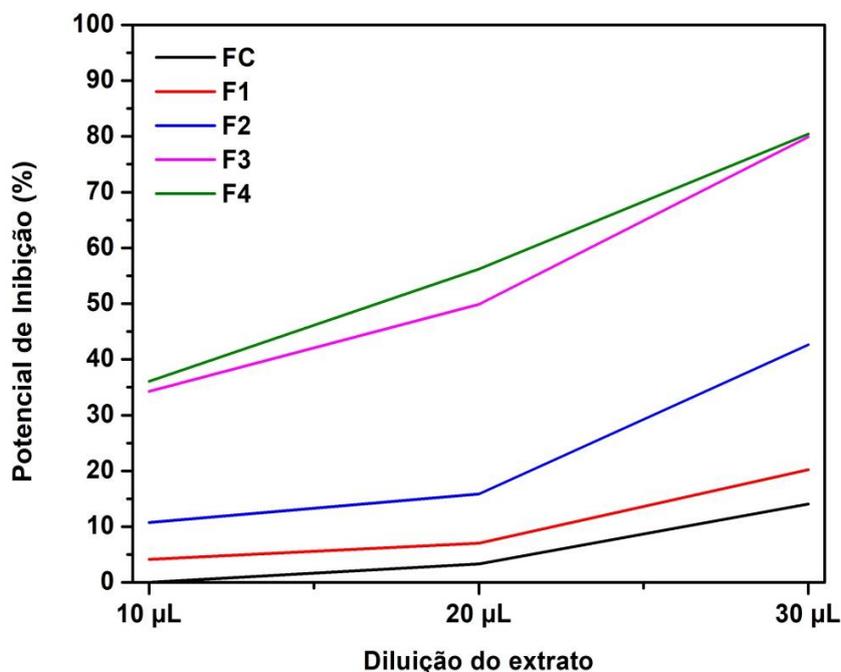
Os filmes foram submetidos à análise antioxidante pelo método do radical ABTS (NENADIS *et al.*, 2004) e os resultados obtidos em relação ao potencial de inibição foram apresentados na Figura 30. Para cada filme, foram realizadas três diluições e, em seguida, as leituras no comprimento de onda igual a 734 nm. O potencial de inibição aumentou com o aumento da concentração de lignina, confirmando os resultados obtidos na análise para o radical DPPH.

Apesar das diferenças existentes entre ambos os métodos e os tipos de radicais, os filmes apresentaram a mesma tendência de inibição ao processo oxidativo obtidas na análise para o radical DPPH. Quanto maior a concentração de lignina no filme, maior o potencial de inibição.

No entanto, essa tendência ocorreu de forma distinta para os dois métodos. O método do DPPH, por exemplo, apresentou valores superiores de inibição, quando comparado ao ABTS, para os filmes de concentração mais baixa de lignina (FC, F1 e F2). Enquanto isso, para os filmes F3 e F4, o método do radical ABTS apresentou maior potencial de inibição

quando comparado ao DPPH.

Figura 30. Atividade antioxidante dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

Essa diferença pode ser justificada a partir das interações intermoleculares. Em baixas concentrações, a lignina contida nos filmes está interagindo inteiramente com as estruturas proteicas, através, principalmente, de ligações de hidrogênio. Isso irá dificultar a aproximação da extensa molécula do radical ABTS, devido ao impedimento estérico. Logo, o processo de neutralização do radical ocorrerá de forma mais contida.

Por outro lado, em filmes com concentração elevada de lignina, haverá uma tendência de agregação das frações desse polímero, aumentando as interações lignina-lignina e diminuindo as interações lignina-colágeno. Essa agregação de frações de lignina propiciará uma maior disponibilidade de grupos fenólicos que não estão envolvidos em interações intermoleculares com as estruturas proteicas, aumentando assim a mobilidade e, consequentemente, facilitando a aproximação do radical ABTS. Além disso, o ABTS apresenta porções mais polares que o DPPH em sua estrutura, facilitando a atração das hidroxilas fenólicas.

Esse efeito está de acordo com o observado na análise termogravimétrica, onde os filmes com elevadas concentrações de lignina apresentaram um pequeno abaixamento na temperatura inicial de degradação, visto que em concentrações muito elevadas há uma forte

tendência a agregação de moléculas de lignina, causando a diminuição das interações lignina-proteína e propiciando o início da degradação em temperaturas menores.

Tabela 7. Resultados de atividade antioxidante (ABTS), em relação à concentração de Trolox [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].

	<i>Concentração (μM Trolox/g Antioxidante)</i>
FC	133.317
F1	164.068
F2	305.810
F3	660.501
F4	714.796

Fonte: A autora.

A atividade antioxidante pelo método do radical ABTS também foi obtida em relação à TEAC (Capacidade Antioxidante do composto Equivalente ao Trolox), como mostram os resultados na Tabela 7. O Trolox é um composto com significativa atividade antioxidante e, através desse método, foi possível determinar qual a concentração de trolox equivalente a 1 grama do composto antioxidante analisado. Os resultados apresentados indicaram a mesma tendência dos métodos de análise baseados no potencial de inibição, com um crescimento do potencial diretamente proporcional ao aumento da concentração de lignina.

4.3.6. Permeabilidade ao Vapor D'Água (PVA)

A análise de permeabilidade ao vapor d'água demonstrou que o aumento da concentração de lignina solúvel em etanol nos filmes resultou no aumento da permeabilidade, como mostrado na Tabela 8. Esse efeito também foi observado em filmes de matriz proteica, incorporados com diferentes polifenóis, como ácido cafeico, ácido tânico e ácido ferrúlico (NUTHONG; BENJAKUL; PRODPRAN, 2009). Contudo, em concentrações elevadas de lignina, não foi observado um acréscimo significativo na permeabilidade, fato que pode ser associado a grande quantidade de sólidos dissolvidos por unidade de área, os quais contribuem para a formação de uma espécie de barreira que impede a permeação de moléculas de água.

Tabela 8. Resultados de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes [FB-Branco; F1- 0,25% (m/m); F2-0,5% (m/m); F3-1% (m/m); F4-2,5% (m/m) e F5-5% (m/m)].

	$PVA \left(\frac{g \cdot mm}{m^2 \cdot h \cdot kPa} \right)$
FC	0,22
F1	0,36
F2	0,42
F3	0,44
F4	0,45

Fonte: A autora.

Como foi mostrado nos resultados de GPC, o fracionamento da lignina com etanol permitiu a obtenção de frações mais polares e de menores pesos moleculares. Esse fato propiciou que os filmes com lignina fracionada aumentassem o grau de hidrofiliidade, permitindo a permeabilidade de moléculas de água através de interações intermoleculares. Além disso, como mencionado na análise termogravimétrica, as interações colágeno-colágeno diminuem com a adição de lignina, aumentando a mobilidade e os espaços vacantes dentro da matriz proteica, e, conseqüentemente, possibilitando a permeação da água com maior facilidade.

Essa análise é muito importante para filmes com potencial para serem aplicados como curativos, pois, em ferimentos localizados em ambientes mais secos, há um retardamento no processo de cicatrização, devido à desidratação das células responsáveis pela regeneração da pele. (XU et al., 2016). Portanto, a obtenção de um curativo que permita certo grau de permeação de moléculas de água é uma característica benéfica, pois mantém a umidade necessária na região do ferimento para a cicatrização.

4.3.7. Citotoxicidade

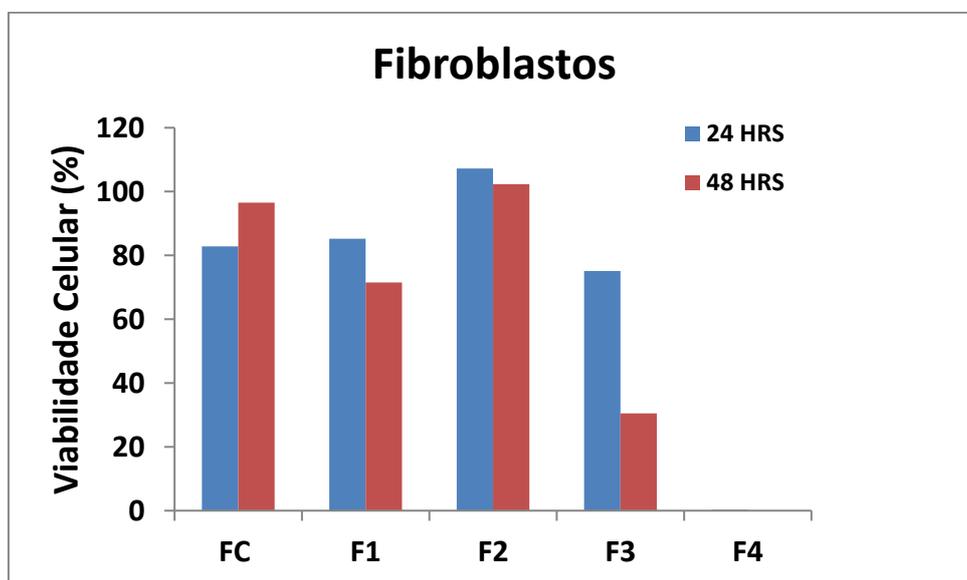
A citotoxicidade dos filmes foi realizada pelo método do MTT. Em geral, filmes de colágeno não apresentam citotoxicidade, pois a proteína possui efeitos de proliferação, diferenciação e regeneração celular. (PERUMAL et al., 2018). Esse comportamento foi confirmado a partir do resultado obtido para o FC, mostrado nos Gráficos 1 e 2, onde a

viabilidade celular foi acima de 80% nas análises utilizando fibroblastos e queratinócitos, após 24 e 48 horas.

Logo, o estudo de citotoxicidade foi feito para analisar a influência da lignina contida nos filmes sobre as células da pele. Foi identificado que o grau de toxicidade da lignina é dependente de sua concentração, fato confirmado por um estudo na literatura que analisou a citotoxicidade *in vitro* para a lignina Kraft, obtida também a partir da espécie *Eucalyptus* (GORDOBIL et al., 2019). Os filmes F3 (2,5%) e F4 (5%) apresentaram baixíssimos níveis de viabilidade celular para os fibroblastos e baixos níveis para os queratinócitos, sendo considerados, por esse motivo, inadequados para a utilização em curativos de uso tópico.

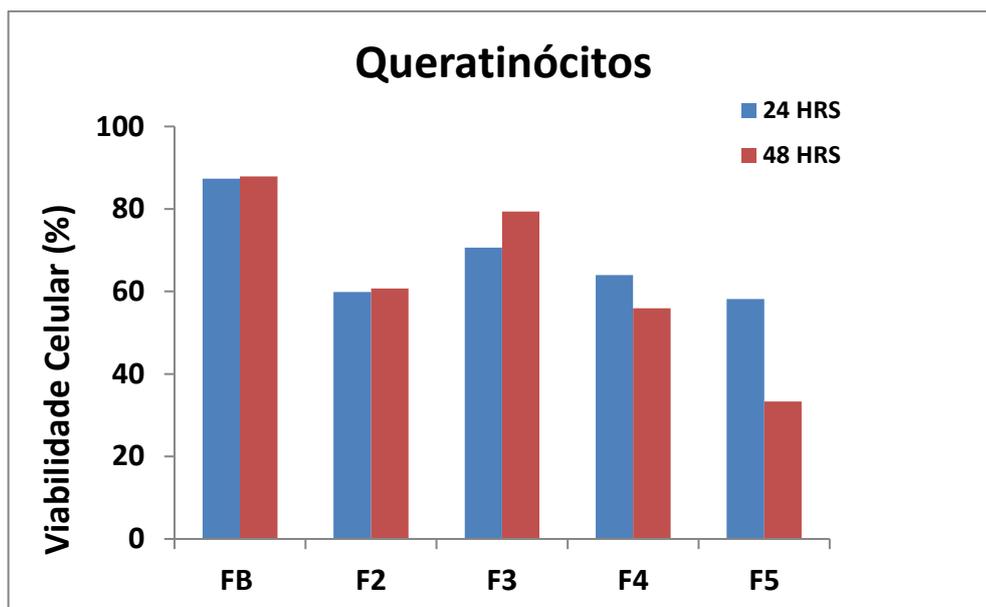
Por outro lado, o filme F2 (1%) apresentou excelente viabilidade celular para as duas linhagens de células, com destaque para os fibroblastos. Por esse motivo, era esperado que o filme F1 (0,5%), de concentração inferior ao F2, também apresentasse uma elevada viabilidade celular, fato que não ocorreu. Esse efeito pode estar relacionado a ineficácia do processo previamente realizado de esterelização com luz ultravioleta.

Gráfico 1. Viabilidade celular (Fibroblastos) dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora.

Gráfico 2. Viabilidade celular (Queratinócitos) dos filmes [FC-Controle; F1-0,5% (m/m); F2-1% (m/m); F3-2,5% (m/m) e F4-5% (m/m)].



Fonte: A autora

Comparando-se os resultados de citotoxicidade com os resultados de atividade antioxidante dos filmes é possível constatar que há uma relação diretamente proporcional entre ambos. Ou seja, quanto maior a atividade antioxidante, maior o grau de toxicidade dos filmes. Como já mencionado, o aumento da atividade antioxidante ocorre pelo aumento no número de estruturas fenólicas, responsáveis pela estabilização dos radicais livres. Portanto, é possível inferir que a concentração dos anéis aromáticos fenólicos influencia na citotoxicidade de filmes contendo lignina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho relatou a eficácia obtida no processo de extração ácida de colágeno catalisada por pepsina, a partir de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), onde se constatou a manutenção da tripla-hélice da proteína e um rendimento eficaz, de acordo com o reportado em outros trabalhos. Realizou-se também o fracionamento etanólico da lignina Kraft, onde foram obtidos fragmentos solúveis polares, de menores pesos moleculares e de elevada resistência térmica.

Os produtos obtidos possibilitaram a produção de biofilmes de colágeno, incorporados com diferentes concentrações de lignina. De forma geral, a inserção de lignina nos filmes proporcionou uma pequena melhoria em suas propriedades térmicas, com o aumento da temperatura de degradação. Além disso, os filmes apresentaram excelentes propriedades antioxidantes e de proteção contra a radiação UV, à medida que se aumentava a concentração. E, com relação à permeabilidade ao vapor d'água, o acréscimo de lignina resultou no aumento da permeabilidade. Os filmes, com baixas concentrações do polímero de origem vegetal (0,5 e 1%) apresentaram elevada viabilidade celular, indicando ausência de toxicidade.

A partir dos resultados obtidos, estudos futuros poderão ser realizados para que se possam investigar possíveis aplicações dos biofilmes produzidos, a partir das propriedades obtidas. O filme de colágeno contendo 1% de lignina, por exemplo, apresentou baixa citotoxicidade em células de pele, significativas propriedades antioxidantes e anti-UV, além de ter aumentado a permeabilidade de moléculas de água pela estrutura do filme, fato que proporciona a umidificação de ferimentos, acelerando o processo de cicatrização, podendo após mais estudos ser verificado como um possível biocurativo.

REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, A. A.; STERNBERG, M. J. E.; MAKAROV, A. A. Polyproline-II helix in proteins: Structure and function. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 12, p. 2100–2132, 2013.
- AHMAD, M.; NIRMAL, N. P.; CHUPROM, J. Molecular characteristics of collagen extracted from the starry triggerfish skin and its potential in the development of biodegradable packaging film. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33868–33879, 2016.
- AHUTI, S. Industrial Growth and Environmental Degradation. **International Education & Research Journal**, v. 1, n. 5, p. 5–7, 2015.
- ALTAIR ALBUQUERQUE. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2018. **Peixe BR - Associação Brasileira da Piscicultura**, p. 138, 2018.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ANNUAIRE, Y. **Forest Products**. 2015. [s.l.].
- ARSHANITSA, A. *et al.* Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 103, p. 78–85, 2013.
- AVELINO, F. *et al.* Poly(methyl methacrylate) films reinforced with coconut shell lignin fractions to enhance their UV-blocking, antioxidant and thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. #pagerange#, 2018.
- BAXTER, R. *et al.* Effect of glycerol on performance rice traw/starch based polymer. **Journal of Applied Sciences**, v. 11, n. 13, p. 2456–2459, 2011.
- CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A. Lignin as Renewable Raw Material. **ChemSusChem**, v. 3, p. 1227–1235, 2010.
- CAMPOS, Antonio Anselmo Granzotto; DA SILVA, João José Cândido; BERGER, Dário Elias. Protocolo de cuidados de feridas. **Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde**. Florianópolis. 70 p. il., IOESC, 2007.
- CELULOSE, S. P. E. Suzano Papel e Celulose Institutional Presentation. 2018. [s.l.: s.n.]
- CHEN, J. *et al.* Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 2016a.
- CHEN, J. *et al.* Enhancing the quality of bio-oil from catalytic pyrolysis of kraft black liquor lignin. **RSC Advances**, v. 6, n. 109, p. 107970–107976, 2016b.
- CHUAYCHAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. LWT - Food Science and Technology Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*).

LWT - Food Science and Technology, v. 63, n. 1, p. 71–76, 2015.

CONSTANT, S. *et al.* New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. **Green Chem.**, v. 18, n. 9, p. 2651–2665, 2016.

CROUVISIER-URION, K. *et al.* Biobased Composite Films from Chitosan and Lignin: Antioxidant Activity Related to Structure and Moisture. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 12, p. 6371–6381, 2016.

CROUVISIER-URION, K. *et al.* Impact of the homogenization process on the structure and antioxidant properties of chitosan-lignin composite films. **Food Chemistry**, v. 236, p. 120–126, 2017.

DE SIQUEIRA, Tagore Villarim. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. Aquaculture: the new frontier for sustainable food production. **R. BNDES**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 49, p. 119-170, Jun. 2018.

EL-RASHIDY, A. A. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticas*) fish scale collagen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 618–626, 2015.

FAO. 2015 Global Forest Products Facts and Figures. p. 1–5, 2016. [*s.l: s.n.*].

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. 2018. [*s.l: s.n.*].

FERNÁNDEZ-COSTAS, C. *et al.* Structural characterization of Kraft lignins from different spent cooking liquors by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 156–166, 2014.

FISCHER, S.; GLEI, M. Health aspects of regular consumption of fish and omega-3-fatty acids. 2015. [*s.l: s.n.*].

FRATZL, P. **Collagen: Structure and mechanics**. [*s.l: s.n.*].

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens — Structure , Function , and Biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531–1546, 2003.

GIMÉNEZ, B.; MONTERO, M. P. Food Hydrocolloids Physical and functional characterization of active fish gelatin fi lms incorporated with lignin. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 163–172, 2013.

GIRIPRASATH, R.; SINGARAVELU, S. Extraction and Characterization of Collagen from the Skin of Arothron stellatus Fish — A Novel Source of Collagen for Tissue Engineering Extraction and Characterization of Collagen from the Skin of Arothron stellatus Fish — A Novel Source of Collagen for . n. March, 2014.

GOLDMANN, W. M. *et al.* Solubility and fractionation of Indulin AT kraft lignin in ethanol-water media. **Separation and Purification Technology**, v. 209, n. March 2018, p. 826–832, 2019.

GORDOBIL, O. *et al.* In vitro cytotoxicity studies of industrial Eucalyptus kraft lignins on mouse hepatoma, melanoma and Chinese hamster ovary cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 353–361, 2019.

GRAND REVIEW RESEARCH. Collagen Market Size Worth \$6.63 Billion By 2025 | Growth Rate: 6.6%. p. 1–5, 2017. [*s.l.: s.n.*].

GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p. 261–269, 2010.

HO, Y. C. *et al.* Industrial Discharge and Their Effect to the Environment. **Industrial Waste**, n. March, p. 1–32, 2012. [*s.l.: s.n.*].

HORN, M. M. *et al.* Development and characterization of collagen / gelatin films and gels incorporated with pequi oil. v. 46627, p. 1–7, 2018. [*s.l.: s.n.*].

HUANG, Y. *et al.* Food Hydrocolloids Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1507–1513, 2011.

HUIJGEN, W. J. J.; GOSSELINK, R. J. A.; BRUIJNINCX, P. C. A. New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. v. 18, n. 9, 2016. [*s.l.: s.n.*].

ISAZA SALDARRIAGSA, J. F.; CORREA, S.; CONGOTE, J. E. Estudio de Mezclas de Colágeno/Acetato de Sodio con Polietileno de Alta Densidad (PEAD) e Hidroxiapatita (HA). **IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health**, v. 18, n. April, p. 766–769, 2008.

JONGJAREONRAK, A. *et al.* Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and a -tocopherol. v. 22, p. 449–458, 2008. [*s.l.: s.n.*].

KÄRKÄS, M. D. *et al.* Transition-metal catalyzed valorization of lignin: The key to a sustainable carbon-neutral future. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 1853–1914, 2016.

KUBITZA, F. Tilápia em água salobra e salgada - uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. **Panorama da aqüicultura**, v. 15, n. 88, p. 14–18, 2005.
KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Conquistas e Desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, 2015.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Progress in Polymer Science Chemical modification of lignins : Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014.

LI, H.; MCDONALD, A. G. Fractionation and characterization of industrial lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 67–76, 2014.

LIU, D. *et al.* Collagen and Gelatin. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 527–557, 2015.

- LIU, T. *et al.* A novel combined polyphenol-aldehyde crosslinking of collagen film—Applications in biomedical materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 889–895, 2017.
- NENADIS, N. *et al.* Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 2004.
- NUTHONG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 736–741, 2009.
- PAL, P. *et al.* Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1507–1518, 2016.
- PASSONI, V. *et al.* Fractionation of Industrial Softwood Kraft Lignin: Solvent Selection as a Tool for Tailored Material Properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 4, p. 2232–2242, 2016.
- PERSIKOV, A. V *et al.* Amino Acid Propensities for the Collagen Triple-Helix †. p. 14960–14967, 2000. [*s.l: s.n.*].
- PERUMAL, R. K. *et al.* Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1032–1040, 2018.
- POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia Life History and Biology. **SRAC Publication**, n. 283, 1999.
- RINALDI, R. *et al.* Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 29, p. 8164–8215, 2016.
- RINNERTHALER, M. *et al.* Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545–589, 2015.
- RODRÌGUEZ, M. I. A.; BARROSO, L. G. R.; SÀNCHEZ, M. L. Collagen : A review on its sources and potential cosmetic applications. n. October 2017, p. 20–26, 2018.
- SANYANG, M. L. *et al.* Effect of glycerol and sorbitol plasticizers on physical and thermal properties of sugar palm starch based films. **Recent Advances in Environment, Ecosystems and Development Effect**, n. April, p. 157–162, 2015.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico E Desenvolvimento Da Cadeia Produtiva De Tilápia. **Instituto de pesquisa Econômica Aplicada - IPEA**, p. 35, 2017.
- SEBRAE. Aquicultura no Brasil - Série Estudos Mercadológicos. 2015. [*s.l: s.n.*].

SHANKAR, S.; REDDY, J. P.; RHIM, J. Effect of lignin on water vapor barrier , mechanical , and structural properties of agar / lignin composite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 267–273, 2015.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen: Structure and Stability. p. 929–958, 2010.

SIONKOWSKA, A. *et al.* The review of versatile application of collagen. **Polymers Advanced Technologies**, v. 2016, n. April 2016, p. 4–9, 2017.

SNEDDON, A. Fish as a dietary source of healthy long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA) and vitamin D A Review of Current Literature. n. June, p. 1–16, 2012.

SUN, L. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). v. 99, p. 8–14, 2017.

SZUWALSKI, C. Impacts of historical warming on marine fisheries production. **Science**, v. 365, n. 6454, p. 979–983, 2019.

TRAN, H.; VAKKILAINEN, E. K. The Kraft chemical recovery process. **TAPPI Kraft Recovery Short Course**, n. January 2015, p. 1–8, 2015.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6683–6687, 2008.

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

VISHTAL, A.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. v. 6, n. Sjöström 1982, p. 3547–3568, 2011.

WEI, P. *et al.* Isolation and Characterization of Acid-soluble Collagen and Pepsin-soluble Collagen from the Skin of Hybrid Sturgeon. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 34, n. 4, p. 950–959, 2019.

XU, R. *et al.* Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–12, 2016.

ÞORGILSSON, B.; GUNNLAUGSDÓTTIR, H. Review of evidence for the beneficial effect of fish consumption. 2010.

ZHONG, Y.; SHAHIDI F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. **In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Antioxidants for Food Preservation**, Woodhead Publishing, 2015, Pages 287-333, ISBN 9781782420897. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>.