ESTABILIDADE QUÍMICA E MECÂNICA DE FILMES DE AMIDO E GELATINA RECUPERADA DE RESÍDUOS DE COURO CURTIDO AO CROMO III SOB EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA

Marieli Rosseto[1], Lillian Ávila Massuda[2], Wellington Wolf Oenning[3], Aline Dettmer[4]

[1] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Santa Maria, Santa Maria, Brasil (mmarielirossetto@gmail.com)
[2 e 4] Universidade de Passo Fundo (UPF), Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), Departamento de Engenharia Química, Passo Fundo, Brasil
[3] Universidade do estado de Mato Grosso (UNEMAT), Graduação em Engenharia de Produção Agroindustrial, Barra do Bugres, Brasil

Este estudo tem como objetivo avaliar a degradação química (FTIR) e mecânica (resistência a tração e elongação) de filmes de amido de milho e gelatina extraída de resíduos de cromo curtido ao cromo III com e sem enzima transglutaminase, expostos a radiação ultravioleta. Concluiu-se que houve redução das propriedades mecânicas em todos os filmes (65 a 80%), e a enzima promoveu maior estabilidade estrutural após a exposição.

Palavras-chave: Transglutaminase; Degradação; Aplicabilidade

INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico tem impulsionado a utilização de resíduos agroindustriais para elaborar materiais úteis para a aplicação na indústria. Um exemplo disso é a utilização da gelatina extraída de resíduos de couro curtido ao cromo III (RCCC) para elaborar filmes biodegradáveis (SCOPEL et al., 2018; DANG et al., 2018). Esses filmes são vistos como uma solução atraente para substituir polímeros sintéticos que geram acúmulo de resíduos e causam impactos ambientais.

Para aperfeiçoar sua aplicação, há vários desafios que precisam ser superados, como as baixas propriedades estruturais, mecânicas e rápida degradação dos filmes quando submetidos a condições adversas, como a luz ultravioleta (UV).

Uma forma de avaliar a degradação UV é através do envelhecimento acelerado, que simula os efeitos a longo prazo que podem afetar as propriedades do material, reproduzindo em alguns dias ou semanas, danos que podem ocorrer em meses ou anos (MARCEAUX *et al*., 2018; ROSSETO et al., 2020).

A degradação ocasionada por UV promove a decomposição das moléculas em partes menores devido à ação dos fótons, alterando a forma da molécula, desnaturando as proteínas e ocasionando instabilidade física ou química, que modifica as propriedades macroscópicas do polímero, induzindo a degradação (YOUSIF; HADDAD, 2013; ANJU et al., 2020).

As principais formas de monitorar essa degradação é através de análise de resistência mecânica e características estruturais (através de FTIR) (ROY et at., 2006; TARANTILI; KIOSE, 2008; LIZÁRRAGA-LABORÍN et al., 2018; SHI et al., 2019).

Uma alternativa que permite prolongar a vida útil desses polímeros é a reticulação da gelatina promovida pela adição da enzima transglutaminase (TGase) (XIAO et al., 2021; AHAMMED et al., 2021; PENG et al., 2021). Esta atua modificando a estrutura das proteínas aumentando a integridade da estrutura do filme, ocasionando uma maior resistência a fatores externos que ocasionam a degradação, aumentando seu tempo de vida (CHENG et al., 2019; ROSSETO et al., 2020).

Com base nisso, este estudo objetivou comparar o desempenho de filmes de amido de milho e gelatina comercial (COM) e RCCC, submetidos ao envelhecimento acelerado por exposição UV, avaliando mudanças nas propriedades mecânicas e estruturais dos filmes com e sem tratamento enzimático.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados para a produção do filme foram o RCCC, fornecido por um curtume do norte do Rio Grande do Sul, Brasil, gelatina em pó comercial (Refeisucos, Brasil), enzima TGase (Ajinomoto do Brasil, Food Industry and Commerce Ltda, SP, comercializada como ACTIVA ® WM), amido de milho como aditivo (Refeisucos, Brasil), Glicerol (Dinâmica, Brasil) como plastificante.

A gelatina foi extraída do RCCC por hidrólise alcalina, seguindo o método definido por Scopel et al. (2016). Em um erlenmeyer de 250 mL, foram

colocados 12,5 g de resíduo, 0,5 g de óxido de magnésio e 62,5 mL de água destilada. A hidrólise foi realizada em incubadora de agitação orbital (Marconi, MA-420, Brasil), com agitação a 180 rpm e temperatura de 70ºC por 6 h, seguida de filtração com bomba de vácuo.

A próxima etapa consistiu na concentração da gelatina extraída através de membrana tubular de ultrafiltração de cloreto de polivinilideno (PVDF) (Koch Membrane Systems, Brasil), área superficial de 0,1 m², com peso molecular de corte de 30 - 80 kDa, pressão de 1 bar e 0,0024 fluxo de m³ / h. A membrana produziu dois fluxos, o retentado (gelatina concentrada) e o permeado (não utilizado neste estudo).

Foi realizado a determinação da proteína, pelo método sugerido por Lowry (1951), utilizando um espectrofotômetro (Tecnal UV 5100, Brasil) para medir a absorbância em 750 nm. A quantificação da proteína foi realizada por meio da equação obtida pela curva de calibração produzida com albumina de soro bovino (BSA).

A solução formadora de filme foi preparada de acordo com o descrito por Rosseto et al., (2020). Os filmes foram produzidos com a gelatina extraída do RCCC com e sem tratamento enzimático com enzima transglutaminase, e comparando seu desempenho com filmes controle, elaborados com gelatina COM nas mesmas condições.

A concentração de proteína para os filmes produzidos com a gelatina RCCC foi calculada de forma que a concentração final na solução filmogênica fosse a mesma da gelatina comercial (4% m/v).

A gelatina foi solubilizada em 100mL de água destilada, juntamente com glicerol (20% m/m gelatina a 60ºC durante 30 min em agitador magnético aquecido (Fisatom, 752A - modelo 4, Brasil). O pH foi corrigido para 7 (hidróxido de sódio 0,1 N) e a enzima TGase (0,20% m/m de gelatina) foi adicionada, misturada e a solução mantida em banho-maria termostático regulado a 37ºC por 15 min (Tecnal, TE-205 Modelo, Brasil). A quantidade de amido de milho utilizada foi de 0,5% m/v de solução filmogênica. Os filmes foram então mantidos a 85ºC por 10 min em banho-maria (Marconi, Modelo MA156, Brasil). Os filmes foram secos em estufa de convecção forçada (Ethik, modelo 420-4TDE, Brasil) a 40ºC por 15h e posteriormente mantidos por sete dias em recipiente fechado com solução saturada de brometo de sódio (NaBr), que manteve 59% de umidade relativa. dentro do contêiner.

Após este período, o material foi caracterizado quanto as propriedades mecânicas (resistência a tração e elongação) e estruturais (FTIR). Em seguida foi submetido a teste de envelhecimento acelerado por luz UV, onde as propriedades mecânicas foram monitoradas nos tempos de 0, 4, 8, 16, 32 e 64 h, e as propriedades estruturais antes e após a exposição.

A resistência à tração e o alongamento na ruptura foram determinados utilizando o texturômetro TA. XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra), operando de acordo com ASTM D882 (2002), com separação inicial de garras de 40 mm e velocidade de teste de 0,8 mm. s^{-1}. As amostras utilizadas eram de tamanho padrão, 85 x 25 mm.

Os testes de avaliação das propriedades químicas estruturais foram realizados em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Modelo Cary 630, Argilent Technologies, EUA). O equipamento foi operado em modo de reflexão total atenuada, utilizando cristal de diamante e realizando 48 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} na faixa de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1}.

A metodologia de envelhecimento por UV foi baseada em estudo de Roy et al. (2006), utilizando lâmpadas fluorescentes brancas frias e lâmpadas fluorescentes UV (marca Philips) em câmara de fotoestabilidade (Ethik Technology - modelo 424-CF, Brasil) com controle de temperatura, mantida a 30 ± 1 ° C durante todo o experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final da exposição de 64 h percebeu-se que não houve alterações no aspecto superficial dos filmes, que estavam homogêneos, com ausência de partículas insolúveis e de bolhas, além de coloração uniforme, não apresentando rupturas ou zonas quebradiças, além de possuir boa maleabilidade.

A Figura 1 mostra a propriedade de resistência a tração durante a exposição a luz UV.

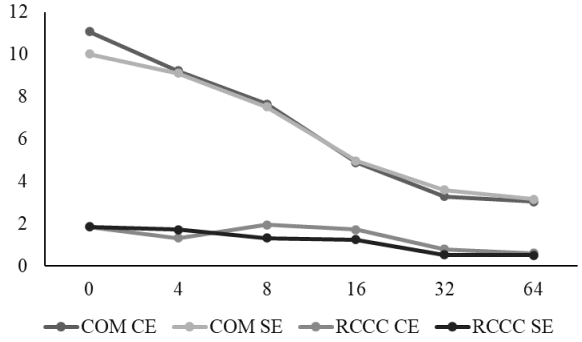


Figura 1. Resistência à tração em filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com (CE) e sem (SE) tratamento enzimático sob exposição à radiação UV durante 64 h

Avaliando o tempo 0, se percebe uma diferença na propriedade de resistência entre os filmes elaborados com gelatina RCCC e comercial (aproximadamente 80%). Esse resultado indica que os filmes RCCC apresentam menor rigidez e estabilidade quando comparados aos filmes controle (MA et al., 2018). Isso ocorre devido as cadeias menores presentes na gelatina RCCC quando comparada com a gelatina comercial, visto que passa por processo de curtimento seguido de hidrólise alcalina (SCOPEL et al., 2020). Quanto a atuação da enzima percebe-se que inicialmente promoveu diferença significativa apenas para os filmes COM (valor de $p = 5 \cdot 10^{-5}$), pois os filmes RCCC (valor de p = 0,93). Dessa forma nos filmes COM a melhoria é atribuída a estabilidade da matriz polimérica ocasionada pela reticulação induzida pela TGase (ROSSETO et al., 2020). Já nos filmes RCCC, o resultado pode ser atribuído a maior higroscopicidade do filme, ocasionada pela grande quantidade de sais presente na gelatina, que ocasiona ligações cruzadas irregulares, dificultando a ação da enzima (SCOPEL *et al*. 2018; CHENG *et al*. 2019).

Após as 64 h de exposição à luz UV, todos os filmes apresentaram perda de resistência entre 65 a 80%, e são considerados degradados, pois segundo (LIZÁRRAGA-LABORÍN et al., 2018) é possível considerar que um material é suficientemente degradado quando perde 50% da resistência à tração inicial.

Nota-se que ao final da exposição, filmes com e sem enzima não apresentam diferenças na propriedade de resistência. Indicando que a luz UV interfere na atuação da enzima ao longo da exposição, atribuída a instabilidade das moléculas de proteína, causadas pela desnaturação induzida pela luz UV (YOUSIF; HADDAD, 2013; ANJU et al., 2020).

A Figura 2 mostra a propriedade de elongação durante a exposição a luz UV.

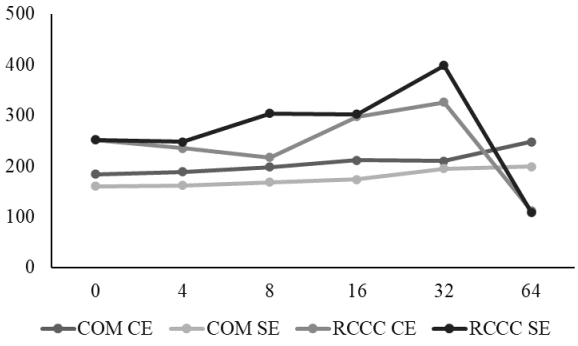


Figura 2. Elongação em filmes de amido e gelatina comercial (COM) e RCCC com (CE) e sem (SE) tratamento enzimático sob exposição à radiação UV durante 64 h

Os filmes RCCC apresentaram maiores propriedades de elongação no tempo 0. Essa diferença é atribuída a quantidade de sais presentes na gelatina RCCC e atuam como plastificantes (JIANG et al., 2016).

A elongação dos filmes RCCC teve aumento até 16 h, seguindo de queda até o tempo final, esse aumento pode ser atribuído ao aumento da cristalinidade dos filmes e a diminuição é resultado da cisão da cadeia (ROY et al., 2006).

As propriedades mecânicas abrangendo resistência à tração, alongamento na ruptura são características importantes para a compreensão da interação interna dos materiais, pois em geral, o objetivo é obter polímeros resistentes e flexíveis (JIANG et al., 2019). Esses testes revelam a capacidade de um filme manter sua integridade sob estresse durante o processamento e a aplicação (SHI et al., 2019).

Abordando os parâmetros antes e após envelhecimento, pode-se dizer que inicialmente a enzima proporcionou uma melhoria nas propriedades dos filmes, mas durante a exposição UV não se manteve. O mesmo ocorreu em estudo realizado por Rosseto et al. (2020), que estudaram filmes de amido de milho, gelatina COM e TGase, e a adição da enzima não ocasionou diferença nos filmes após as 64 horas de exposição, os autores atribuíram o resultado a redução no espaço intermolecular, ocasionado pela TGase, que apesar de um ganho de resistência inicial, não há mantém, uma vez que estas exposições promove um ambiente seco, reduzindo a atuação da enzima que apresentou maior desempenho em ambientes úmidos.

Além disso, em alguns casos a incorporação de aditivos acelera a degradação induzida por radiação dos filmes, pois a ausência de oxigênio provoca cisão da cadeia na ligação C-N, resultando na formação de radicais (carbazolil e macroalquil), que juntamente com a reticulação do filme resultam em modificações que impactam nas propriedades mecânicas (RIVATON et al., 2006; ANJU et al., 2020).

A caracterização referente a propriedades químicas foi realizada com o auxílio da análise de FTIR, que identificou as características estruturais dos filmes, principalmente, no que se refere a grupos funcionais e de ligações, avaliando se havia diferenças em nível molecular dos filmes antes e após a exposição (Figura 3).

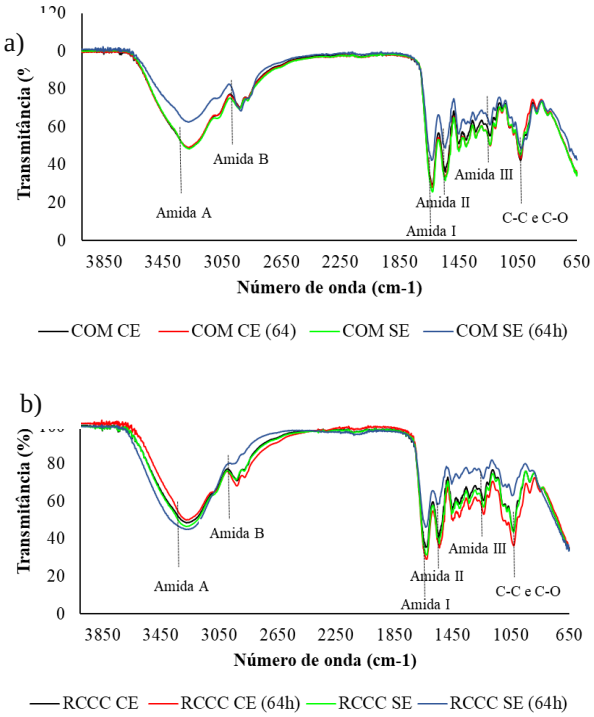


Figura 3. Determinação de propriedades estruturais através de análise de FTIR em filmes de amido e gelatina COM (a) e RCCC (b) com (CE) e sem (SE) tratamento enzimático antes e após exposição à radiação UV

Todos os filmes mostraram os principais espectros típicos de plastificantes, carboidratos (amido) e proteínas (gelatina) atribuídos à ligação peptídica da amida I e amida II (HUNTRAKUL; HARNKARNSUJARIT, 2020).

A reticulação pela TGase ocasionou maior estabilidade química nos filmes após a exposição quando comparada aos filmes sem enzima. Já os filmes COM SE apresentou menor intensidade, especialmente próximo a 3350 cm^{-1} e tanto os filmes COM SE como RCCC SE apresentaram menor intensidade entre os números de onda de 1300 a 1750 cm^{-1}. A primeira diferença é atribuída a ruptura de ligações -CN = e -CH_2, que são constituintes da cadeia da gelatina (RAHMAN et al., 2010; ROSSETO et al., 2020). Enquanto a segunda indica claramente a foto-oxidação com aumento da formação de ligações duplas conjugadas, bem como ligações C = O na estrutura do polímero (ANJU et al., 2020).

CONCLUSÃO

Através do estudo percebeu-se que houve redução das propriedades mecânicas acima de 50%, apesar dos filmes com a enzima apresentarem melhor resistência inicial, não se manteve após a exposição. No entanto, a enzima promoveu maior estabilidade estrutural do filme após a exposição, considerando que foi evidenciado mudança de intensidade nos números de ondas dos filmes SE.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - 16/2551-0000 258-4) e a Universidade de Passo Fundo (UPF).

REFERÊNCIAS

AHAMMED, S et al. Effect of transglutaminase crosslinking on solubility property and mechanical strength of gelatin-zein composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 116, p. 106649, 2021.

ANJU, S. et al. Complicity of degradable polymers in health-care applications. **Materials Today Chemistry**, v. 16, p. 100236, 2020.

ASTM. (2002). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM D882-02. *American Society for Testing and Materials*, Vol. 14, pp. 1–10.

LIZÁRRAGA-LABORÍN, L. L. et al. Accelerated weathering study of extruded polyethylene/poly (lactic acid)/chitosan films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 155, p. 43-51, 2018.

CHENG, S et al. Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. **Food chemistry**, v. 271, p. 527-535, 2019.

DANG, X; SHAN, Z; CHEN, H. Biodegradable films based on gelatin extracted from chrome leather scrap. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1023-1029, 2018.

HUNTRAKUL, K; HARNKARNSUJARIT, N. Effects of plasticizers on water sorption and aging stability of whey protein/carboxy methyl cellulose films. **Journal of Food Engineering**, v. 272, p. 109809, 2020.

JIANG, S et al. Characterization of whey protein-carboxymethylated chitosan composite films with and without transglutaminase treatment. **Carbohydrate polymers**, v. 153, p. 153-159, 2016.

JIANG, Z et al. Effect of ultrasound on the structure and functional properties of transglutaminase-crosslinked whey protein isolate exposed to prior heat treatment. **International Dairy Journal**, v. 88, p. 79-88, 2019.

LIZÁRRAGA-LABORÍN, L. L., et al. Accelerated weathering study of extruded polyethylene/poly (lactic acid) /chitosan films. **Polymer Degradation and Stability,** v. 155, p. 43-51, 2018.

LOWRY, O.H et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, Z et al. 3D porous MXene (Ti3C2)/reduced graphene oxide hybrid films for advanced lithium storage. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 4, p. 3634-3643, 2018.

MARCEAUX, S et al. Effects of accelerated ageing conditions on the mechanism of chemically-active antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 125, p. 257-265, 2018.

PENG, L et al. Preparation and characterization of gelatin films by transglutaminase cross-linking combined with ethanol precipitation or Hofmeister effect. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106421, 2021.

RAHMAN, M.F et al. A novel CdTe ink-assisted direct synthesis of CdTe thin films for the solution-processed CdTe solar cells. **Journal of Materials Science**, p. 1-16, 2020.

RIVATON, A et al. Photophysical processes and photochemical reactions involved in poly (N-vinylcarbazole) and in copolymers with carbazole units. **Polymer degradation and stability**, v. 91, n. 3, p. 565-572, 2006.

ROSSETO, M et al. Accelerated Aging of Starch-Gelatin Films with Enzymatic Treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 4, p. 1063-1075, 2021.

ROY, P. K. et al. Accelerated aging of LDPE films containing cobalt complexes as prooxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 8, p. 1791-1799, 2006.

SCOPEL, B. et al. Collagen hydrolysate extraction from chromed leather waste for polymeric film production. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 111, n. 01, p. 30-40, 2016.

SCOPEL, B.S et al. Starch-leather waste gelatin films cross-linked with glutaraldehyde. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 7, p. 1974-1984, 2020.

SCOPEL, B.S et al. Cornstarch-gelatin films: commercial gelatin versus chromed leather waste gelatin and evaluation of drying conditions. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 5, p. 1998-2006, 2018.

TARANTILI, P. A.; KIOSE, V. Effect of accelerated aging on the structure and properties of monolayer and multilayer packaging films. **Journal of applied polymer science**, v. 109, n. 1, p. 674-682, 2008.

SHI, D et al. Effect of aging treatment on the physicochemical properties of collagen films. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 436-447, 2019.

XIAO, J et al. Incorporation of gelatin improves toughness of collagen films with a homo-hierarchical structure. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128802, 2021.

YOUSIF, E; HADDAD, R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-32, 2013.