



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE  
MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NAS  
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
MECÂNICAS DOS NANOBIOCOMPÓSITOS DE  
COLÁGENO E NANOCRISTAIS DE CELULOSE**

**Ana Pacheli Heitmann Rodrigues**

**Belo Horizonte-MG**

**2011**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE  
MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NAS  
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
MECÂNICAS DOS NANOBIOCOMPÓSITOS DE  
COLÁGENO E NANOCRISTAIS DE CELULOSE**

**Ana Pacheli Heitmann Rodrigues**

Monografia apresentada ao Curso de  
Química Tecnológica do CEFET-MG como  
parte das exigências da disciplina Trabalho  
de Conclusão de Curso II (TCC II).

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Santiago de Oliveira Patrício

**Banca Examinadora:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Santiago de Oliveira Patrício**  
Doutora em Química – CEFET-MG

---

**Prof. Dr. Fabiano Vargas Pereira**  
Doutor em Química – UFMG

---

**Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira**  
Doutor em Química – UFMG

**Monografia aprovada em            de            de 2011**

**Belo Horizonte-MG**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar presente em todos os dias da minha vida, pois tenho certeza que Ele nunca me deixou só, durante toda essa minha jornada.

A toda a minha família e ao André pelo amor, carinho e atenção dedicados a mim. Em especial, a minha mãe e avó que sempre me deram forças e que acreditaram em mim durante toda essa minha trajetória.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Santiago pela orientação dedicada, apoio, paciência e colaboração.

Ao Prof. Dr Fabiano Vargas Pereira pela oportunidade, incentivo, confiança e ensinamentos transmitidos.

Aos pesquisadores do Laboratório 211 de Físico – Química, do Departamento de Química da UFMG, pelo carinho e amizade.

A todos os professores do Departamento de Química do CEFET MG que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação, tanto acadêmica como pessoal.

A Camila Brey Gil, pelo auxílio, companheirismo e sua boa vontade sempre disponível para me ajudar durante todo o trabalho. Agradeço por tudo que fez por mim.

A Luciana Pimenta, pelos seus conselhos, amizade, carinho e todo conhecimento sobre whiskers transmitidos a mim.

Aos meus amigos especiais Natalia Luciana e Bruno José, pela atenção, amizade, paciência e pelos divertidos momentos que passamos juntos.

A todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

O colágeno é amplamente utilizado em diversas aplicações tais como farmacêuticas, na agricultura, dentre outras. Os compósitos de colágeno podem apresentar propriedades de grande interesse biomédico como baixa toxicidade, alta capacidade de suporte estrutural, alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada e biocompatibilidade. No presente trabalho foram desenvolvidos nanobiocompósitos de colágeno e nanocristais de celulose, de duas maneiras distintas e utilizando três tipos de plastificantes diferentes. Esses compósitos foram submetidos à análise de caracterização estrutural, térmica, mecânica e morfológica, portanto estudou-se a interação entre a matriz de colágeno e os nanocristais de celulose analisando os espectros FTIR, a estabilidade térmica dos compósitos pela análise termogravimétrica, as propriedades mecânicas pelo ensaio de tração e observaram-se as estruturas morfológicas dos nanobiocompósitos, através das imagens produzidas no MEV. A análise dos resultados possibilitou verificar as interações de hidrogênio do NCC com a matriz de colágeno, sendo possível identificá-las a partir de mudanças do espectro de absorção na região do infravermelho e também verificou-se a integridade da tripla hélice da molécula de colágeno quando o mesmo é submetido a tratamento com soluções ácidas. Na análise térmica, a adição de NCC e do plastificante conferiu ao colágeno maior estabilidade térmica. No ensaio de tração verificou-se modificação nas propriedades mecânicas do colágeno em presença dos plastificantes, dos NCC's assim como dos nanobiocompósitos col/NCC/plas comparando os diferentes plastificantes e o modo de preparo dos mesmos, destacando o uso do glicerol que conferiu aumento de tensão de 275% e de deformação de 300%. As imagens obtidas por MEV, foi possível verificar as diferenças de morfologia proporcionadas pela adição de nanocargas ao colágeno a partir dos diferentes modos de processamento.

**Palavras – chaves:** Colágeno; Compósitos; Nanocristais de celulose; Plastificantes.

## **ABSTRACT**

Collagen is widely used in medical and pharmaceutical applications. The composite of collagen may have properties of great biomedical interest such as low toxicity, high capacity for structural support, high tensile strength, controlled biodegradability and biocompatibility<sup>16,20</sup>. In this work we developed collagen nanobiocomposites and cellulose nanocrystals, and in two ways using three different types of plasticizers. These composites were analyzed for characterization of thermal, mechanical and morphological therefore studied the interaction between the matrix of collagen and cellulose nanocrystals analyzing the spectra in the infrared, the thermal stability of composites by thermal analysis, mechanical properties by tension tests and observed the morphological structures of the composites, the micrographs produced by the SEM. The results enabled us to verify the interactions of cellulose nanocrystals with the collagen matrix, and can identify them from changes in the infrared spectrum. In the thermal analysis, the addition of cellulose nanocrystals and plasticizer gave the collagen thermal stability. In tensile test, there was a change in the mechanical properties of collagen, increasing the tensile strength in the composites, comparing the plasticizers and the method or preparation thereof. In SEM analyses, we observed a homogeneous distribution of plasticizers in the thermal, but it was not possible to identify cellulose nanocrystals in spite of distributed nanocargas indicative of the composites.

**Keywords:** Collagen; Composites; Cellulose nanocrystals; Plasticizers.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**NCC** – Nanocristais de celulose

**Gly** – Glicina

**Pro** – Prolina

**Hyp** – Hidroxiprolina

**TG** – Termogravimetria

**DTA** – Análise Térmica Diferencial

**DTG**- Derivada da curva TG

**FTIR** – Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**HCl** – Ácido clorídrico

**PEG** – Polietilenoglicol

**Gli** – Glicerol

**Sor** - Sorbitol

**Plas**- Plastificante

**Col** – Colágeno

**Col/NCC/plas**- Colágeno / nanocristais de celulose / plastificante

**Col/plas** – Colágeno / plastificante

**Col/(NCC/plas)** – Colágeno / (nanocristais de celulose / plastificante)

## LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

**Figura 1:** Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem do MEV se refere a fibra de eucalipto.

**Figura 2:** Ilustrações das regiões cristalinas e amorfas que compõem a estrutura das microfibrilas.

**Figura 3:** Formação de nanocristais de celulose pela hidrólise ácida das regiões amorfas das fibrilas de celulose e imagem de contraste da fase de microscopia de força atômica.

**Figura 4:** Estrutura das fibras de colágeno.

**Figura 5:** Esquema de formação da tripla-hélice da molécula de colágeno.

**Figura 6:** Estrutura química do colágeno tipo I. a) Cadeia peptídica b) Enovelamento em tripla hélice c) Microfibrilas.

**Figura 7:** Estrutura química da molécula de glicerol.

**Figura 8:** Estrutura química da molécula de sorbitol.

**Figura 9:** Estrutura química da molécula de PEG.

**Figura 10:** Diagrama esquemático do compartimento da amostra na análise de DTA.

**Figura 11:** Corpos de prova para o ensaio de tração.

**Figura 12:** Sistema de um ensaio mecânico.

**Figura 13 :** Ensaio de tração (alongamento e ruptura do filme).

**Figura 14:** Colágeno cedido pela Universidade Federal de Minas Gerais.

**Figura 15:** (a) Polpa de eucalipto (92-95% de celulose) (b) Polpa de eucalipto purificada (c) Hidrólise ácida da polpa de eucalipto.

**Figura 16 :** Nanocristais de celulose liofilizado.

**Figura 17 :** Filmes de colágeno com plastificante.

**Figura 18:** Imagens obtidas por MEV da superfície e da fratura criogênica, respectivamente do colpuro A e B e dos compósitos col/NCC/gli, C e D e col/(NCC/gli) E e F.

**Figura 19 :** Imagens obtidas por MEV da fratura criogênica, do colágeno e glicerol.

**Figura 20:** Espectros de FTIR para o filme de colágeno e de colágeno com diferentes plastificantes (Glicerol, Sorbitol e PEG 200).

**Figura 21:** Espectros de absorção na região do infravermelho dos nanobiocompósitos obtidos por diferentes métodos de processamento a) col/(NCC/plas) e b) col/NCC/plas. Cada nanobiocompósito possui um dos plastificantes gli, sorb, PEG.

**Figura 22:** Curva a) termogravimétrica TG e b) DTA para os filmes de colágeno puro e após a adição dos plastificantes, PEG, Gli e Sor.

**Figura 23:** Curva termogravimétrica dos compósitos a) e DTA b) dos nanobiocompositos col/(NCC/plast).

**Figura 24:** Curva de TG a) e DTA b) para o nanobiocompósitos Col/NCC/Plastificantes.

**Figura 25:** Curvas tensão-deformação dos filmes de colágeno puro e colágeno plastificado com diferentes aditivos.

**Figura 26:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos filmes de colágeno e plastificantes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

**Figura 27:** Curvas tensão-deformação dos compósitos de colágeno/(NCC/plastificantes).

**Figura 28:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos compósitos de colágeno/(NCC/plastificante). a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

**Figura 29:** Curvas de tração - deformação dos compósitos de colágeno/NCC/plastificantes.

**Figura 30:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos compósitos colágeno/NCC/plastificantes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

**Figura 31:** Gráfico de tensão-deformação dos nanobiocompósitos plastificados com glicerol, apenas contendo NCC do polímero puro.

**Figura 32:** Gráficos de barra que representam os aspectos do ensaio de tração dos principais filmes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1:** Composição em massa dos filmes de col/plas e col/NCC/plas.

**Tabela 2:** Principais bandas identificadas no espectro de FTIR do colágeno puro associadas às vibrações dos grupos químicos presentes na estrutura do polímero.

**Tabela 3:** Intensidade relativa das absorvâncias das bandas em  $1546\text{cm}^{-1}$  e  $1235\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1546}/A_{1235}$ ).

**Tabela 4:** Temperaturas iniciais ( $T_{\text{onset}}$ ), finais ( $T_{\text{endset}}$ ) e a velocidade máxima de degradação ( $T_{\text{vm}}$ ) das etapas de perda de massa dos nanobiocompósitos.



# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS .....	6
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 Nanocristais de celulose .....	12
1.2 Colágeno.....	16
1.3 Plastificantes .....	19
1.4 Compósitos .....	21
1.5 Métodos de Caracterização dos Materiais.....	24
1.5.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho.....	24
1.5.2 Análise Térmica.....	25
1.5.2.1 Termogravimetria - TG .....	25
1.5.2.2 Análise Térmica Diferencial - DTA .....	26
1.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
1.5.4 Ensaio de Tração .....	28
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo Geral .....	34
3.2 Objetivo Específico .....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Preparo da solução de colágeno .....	35
4.2 Determinação da concentração de colágeno.....	35
4.3 Preparo dos nanocristais de celulose.....	35
4.4 Preparo dos nanobiocompósitos .....	37

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	38
4.6 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho.....	39
4.7 Análise Térmica.....	39
4.8 Ensaio de Tração .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
5.2 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho.....	42
5.3 Análise Térmica.....	48
5.4 Ensaio de Tração .....	53
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

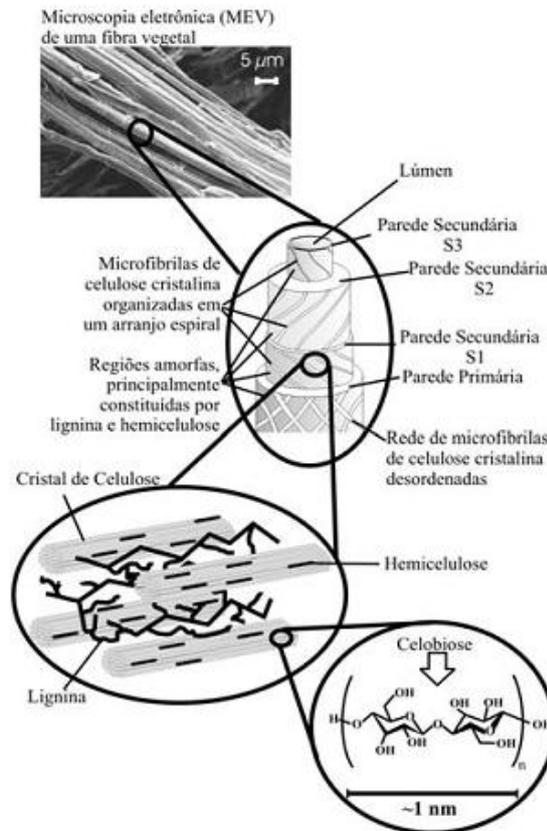
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Nanocristais de Celulose

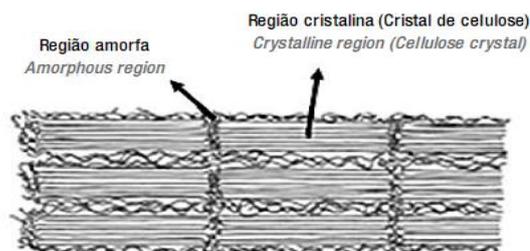
As pesquisas visando o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, de fontes renováveis são crescentes. A disponibilidade de biopolímeros, relativamente mais baratos, que se apresentam em abundância na natureza, pode ser citada como uma razão importante. Além disso, esses materiais são ditos ambientalmente corretos. Um exemplo de polímeros com essas vantagens é a celulose<sup>1</sup>.

A celulose é produzida por plantas, por árvores, por bactérias e por alguns animais (tunicados) através da polimerização de condensação da glicose, que é um produto do processo da fotossíntese dentro das plantas e árvores<sup>2</sup>. A celulose é o material orgânico mais abundante da Terra, a sua unidade repetitiva é composta por duas moléculas de glicose esterificadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, conhecida como celobiose (Figura 1) e contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular<sup>3</sup>. A partir dessas interações, sucessivas estruturas são formadas, dando origem à parede celular da fibra: micelas, agrupamento das cadeias em feixes; microfibrilas, agregados de micelas, e fibrilas, agregados de microfibrila que também podem ser denominados macrofibrilas. Portanto, as microfibrilas, que compõem as fibras, resultantes do arranjo das moléculas de celulose são constituídas de regiões cristalinas, altamente ordenadas e amorfas, desordenadas (Figura 2). As regiões cristalinas são resultados da ação combinada da biopolimerização e cristalização da celulose comandada por processos enzimáticos<sup>5,6</sup>.

A presença de celulose amorfa faz a estrutura suscetível à hidrólise ácida e, portanto é a região responsável pela extração dos nanocristais<sup>2</sup>. As fibras naturais como a celulose podem ser considerados compostos de ocorrência natural consistindo principalmente de fibrilas incorporado em matriz de lignina. As fibrilas de celulose são alinhadas ao longo do comprimento da fibra que tornam máxima a resistência a tração e flexão, além do fortalecimento da rigidez. A eficiência do reforço de fibra natural é relacionada com a natureza da celulose e sua cristalinidade<sup>7</sup>.



**Figura 1:** Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem do MEV se refere a fibra de eucalipto<sup>3</sup>.



**Figura 2:** Ilustrações das regiões cristalinas e amorfas que compõem a estrutura das microfibrilas<sup>1</sup>.

O recente interesse na utilização de partículas nanométricas rígidas como materiais de reforço em matrizes poliméricas, compósitos ou nanocompósitos, tem aumentado. Dois exemplos desses tipos de partículas são os nanotubos de carbono e os nanocristais de celulose. Os nanocristais de celulose (NCC) são também chamados de whiskers, nanofibras,

cristalitos ou cristais de celulose e são obtidos por meio da hidrólise ácida, e são assim chamados devido as suas características físicas de rigidez, de espessura e de comprimento<sup>1</sup>.

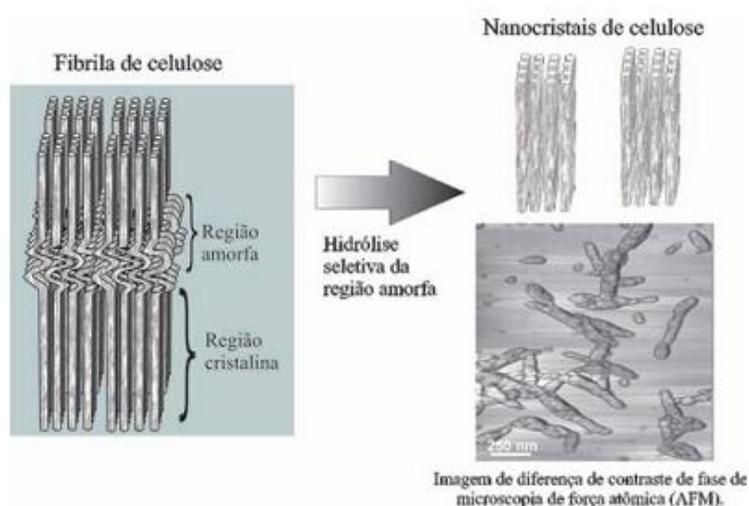
Nanocristais de celulose são obtidos a partir da hidrólise ácida controlada das fibras de celulose, destruindo as regiões amorfas em primeiro lugar deixando os segmentos cristalinos intactos, levando a formação de cristais de alta pureza. Constituem uma classe genérica de materiais que possuem resistência mecânica equivalente as forças de ligações ou átomos adjacentes. A estrutura resultante altamente ordenada produz não só elevada resistência, mas também conferem mudanças significativas nas propriedades elétricas, ópticas, magnéticas, ferromagnéticas, dielétricas, condução e até mesmo de supercondução<sup>5</sup>. Os nanocristais de celulose são materiais de reforço muito promissores para a formação de nanocompósito devido a sua alta rigidez e resistência e baixa densidade<sup>4</sup>.

Várias pesquisas demonstram a importância de se utilizar nanocristais de celulose como material de reforço. As propriedades mecânicas de biopolímeros como o amido, a fibra de seda, proteína de soja e demais matrizes orgânicas são melhoradas após a adição dos NCC<sup>11</sup>. Os nanocristais de celulose possuem inúmeras vantagens em relação a outros materiais nanoestruturados como, por exemplo, a facilidade no processo de formação, a natureza renovável, o baixo custo da matéria-prima, baixa densidade, o fato de ser biodegradável e biocompatível, as características diversificadas em função do substrato natural de origem e, ainda, as propriedades mecânicas quando comparadas com as de nanotubos de carbono e de nanofibras inorgânicas<sup>5, 8</sup>.

Como desvantagem, os principais processos de isolamento dos nanocristais são químicos, com emprego de ácidos fortes. Esses processos se apóiam no fato de que as regiões cristalinas são insolúveis em ácidos nas condições em que estes são empregados. Isso se deve à inacessibilidade que as mesmas apresentam pela elevada organização das moléculas de celulose na sua nanoestrutura. Por outro lado, a desorganização natural das

moléculas de celulose nas regiões amorfas favorece a acessibilidade dos ácidos e conseqüentemente a hidrólise das cadeias de celulose presentes nestas regiões. Assim, o isolamento dos nanocristais é facilitado pela cinética de hidrólise mais rápida apresentada pelas regiões amorfas em relação às regiões cristalinas<sup>5</sup>.

No processo de isolamento de nanocristais utilizam-se, comumente, os ácidos sulfúrico e clorídrico<sup>1</sup>. Esta hidrólise ácida é controlada e este processo destrói as regiões amorfas das fibras da celulose como mostrado na Figura 3. O processo dá origem aos segmentos cristalinos intactos e conduz à formação de cristais com alto grau de pureza. O uso de ácido sulfúrico conduz a dispersões mais estáveis devido a presença de grupos -O-SO<sub>3</sub>- e menor estabilidade térmica. Já a hidrólise com HCl confere uma menor estabilidade da suspensão e maior estabilidade térmica e mecânica. O comprimento e a dimensão lateral dos NCCs são influenciados, principalmente, pela fonte de celulose e de condições da hidrólise ácida. As propriedades mecânicas dos NCCs dependem das condições de processamento e o módulo destes materiais podem alcançar valores elevados (145 GPa para nanowhiskers do tunicado), visto que os nanowhiskers de hidrólise ácida podem ter um módulo em torno de 100 GPa<sup>9,10</sup>.



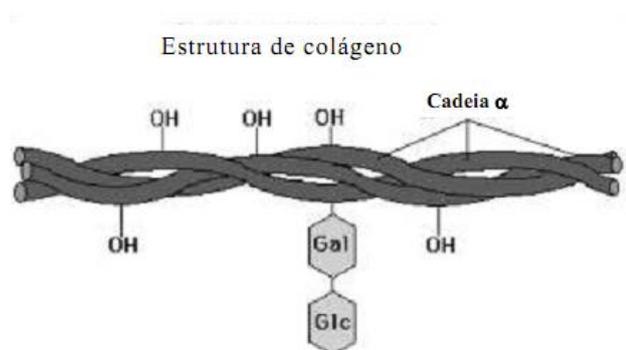
**Figura 3:** Formação de nanocristais de celulose pela hidrólise ácida das regiões amorfas das fibrilas de celulose e imagem de contraste da fase de microscopia de força atômica<sup>8</sup>.

Todas estas características importantes fazem os NCCs um atrativo à preparação de novos nanobiocompósitos biodegradáveis e geram oportunidades ao desenvolvimento de materiais para um grande número de aplicações. Entretanto, há alguns desafios científicos e tecnológicos ainda significativos para tornar os NCCs uma alternativa para preparar nanobiocompósitos novos a nível industrial. Um dos desafios principais é a compatibilização dos “nanoreforços” com o polímero para conseguir níveis aceitáveis da dispersão do enchimento dentro da matriz polimérica e aprofundar o conhecimento sobre o seu comportamento nos materiais<sup>1,8,11</sup>.

## 1.2 Colágeno

O colágeno é um dos principais componentes das matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos de mamíferos, incluindo pele, tendões, cartilagem, ossos e ligamentos<sup>12</sup>. Essa estrutura representa a principal proteína estrutural do corpo dos vertebrados, uma vez que constituem mais de 90% da proteína extracelular. Além de seu papel estrutural, o colágeno apresenta também a função de orientar tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial<sup>13</sup>.

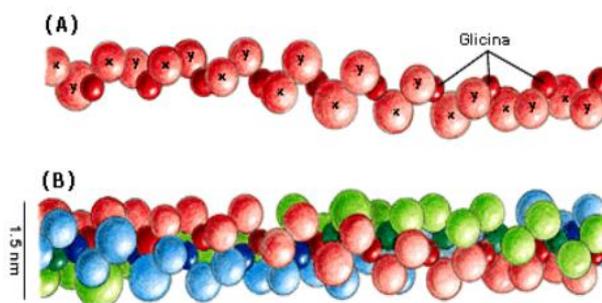
O colágeno é a proteína responsável pela formação das fibras colagênicas, que por sua vez se encontram em todas as células de origem animal e é produzido através do entrelaçamento de cadeias peptídicas de aminoácidos (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura das fibras de colágeno.

Existem pelo menos 20 tipos de cadeias que se combinam para produzir formas diferentes com propriedades mecânicas e bioquímicas diferenciadas e adequadas à especificidade dos tecidos. Na estrutura do colágeno se entrelaçam mais de 10 mil triplas ligações de polipeptídeos formando uma grande diversidade de moléculas de colágeno. Nos tecidos duros, o colágeno funciona como um suporte para a deposição mineral. Nos tecidos moles ele forma uma matriz onde se alojam várias substâncias e células. De maneira geral, o colágeno atua na manutenção da forma e na integridade dos tecidos<sup>14</sup>.

O colágeno é um filamento de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formado fundamentalmente por uma unidade chamada de tropocolágeno. Este é constituído por três cadeias polipeptídicas denominadas cadeias  $\alpha$ , que possuem forma helicoidal. Estas se enrolam umas nas outras formando a tripla hélice, através da formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam a estrutura conferindo a ela maior força e resistência (Figura 5). Cada tipo de colágeno possui sua própria sequência de aminoácidos, mas todos possuem em comum uma configuração única de tripla hélice<sup>15</sup>.

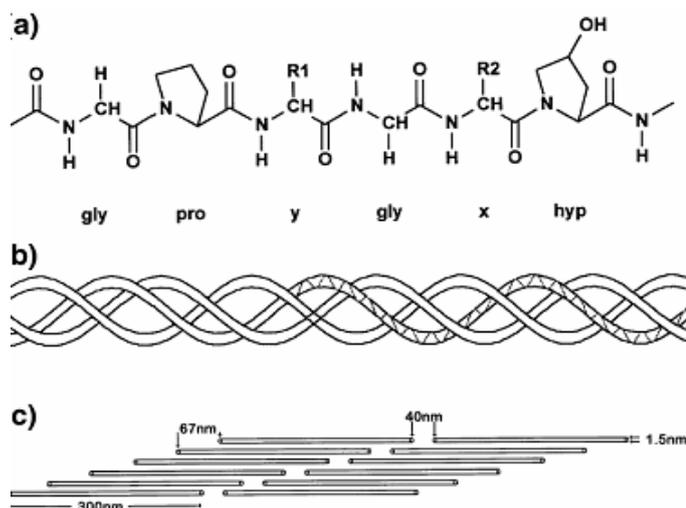


**Figura 5:** Esquema de formação da tripla-hélice da molécula de colágeno<sup>16</sup>.

O colágeno mais importante é o do tipo I que é responsável não apenas pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos em função de suas propriedades mecânicas, mas também por sua participação ativa na funcionalidade dos tecidos em função de sua interação com as células presentes na matriz extracelular. Está presente em todos os vertebrados, e incluído na lista das maiores e mais complexas macromoléculas encontradas

no reino animal<sup>17,18</sup>. No presente trabalho foi utilizado o colágeno tipo I por ser mais abundante e mais conhecido estruturalmente.

O colágeno tipo I, tem como unidade básica o tropocolágeno (Figura 6c), uma macromolécula linear, semiflexível formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeia  $\alpha$ , duas iguais ( $\alpha_1$ ) e uma diferenciada ( $\alpha_2$ ). A sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas<sup>13</sup>. Três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição de um triplete Gly-X-Y onde o X geralmente é uma Prolina (Pro) e o Y é uma Hidroxiprolina (Hip) (Figura 6a), fazem parte da estrutura colagênica. As posições X e Y, além da Prolina e Hidroxiprolina, podem ser ocupadas por outros aminoácidos naturais<sup>18</sup>. A Gly que ocupa 65% das posições na unidade de repetição possui menor grupo lateral e permite fechar as cadeias em hélice repetindo-se a cada terceira posição da sequência<sup>14,15,19</sup>.



**Figura 6:** Estrutura química do colágeno tipo I. a) Cadeia peptídica b) Enovelamento em tripla hélice c) Microfibrilas<sup>16</sup>.

O colágeno possui características distintas como biomaterial quando comparado com um polímero sintético, sendo a mais importante o modo de interação com os tecidos do corpo. Isto está associado com propriedades naturais que incluem baixa resposta imunológica, baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e a habilidade de promover o crescimento celular<sup>12, 16</sup>.

### 1.3 Plastificantes

Plastificantes são moléculas pequenas, não voláteis e que se dispersam facilmente no polímero. Em geral, são adicionados para melhorar a processabilidade e a flexibilidade dos produtos acabados. A plastificação altera a viscosidade do sistema polimérico, reduz a temperatura de transição vítrea e reduz a cristalinidade além de alterar a temperatura de fusão<sup>20</sup>. As propriedades desejadas dos plastificantes são: pureza, alta permanência ou baixa migração no material, baixa toxicidade, não alterar a cor do polímero, estabilidade térmica e a luz, não ser extraível por água, insípido e inodoro. A escolha do plastificante depende do polímero em que será utilizado<sup>20,21</sup>.

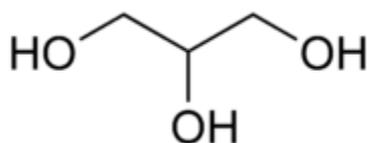
Ao se adicionar um plastificante líquido a um polímero, uma dispersão coloidal ou molecular pode ocorrer. Se existir afinidade entre ambos, ocorre à dispersão molecular, isto é o polímero incha no plastificante e, em seguida, como qualquer processo de solubilização de polímeros, forma-se uma "solução verdadeira". Por outro lado, se não existe afinidade, não ocorre o inchamento, caracterizando a incompatibilidade entre ambos e a formação de uma dispersão. A ocorrência de separação de fases é comum, seja logo após a mistura ou durante o uso de artefato, sendo que o plastificante surge na superfície da peça na forma de gotas, caracterizando esse fenômeno como exsudação. Esta separação de fases pode ser devido a incompatibilidade (mais comum) ou a mistura ineficiente que é, em geral, função da temperatura e ocorre quando quantidades excessivas de plastificantes são adicionados, normalmente acima do limite de solubilidade<sup>22</sup>.

O plastificante, quando adicionado a um polímero, as suas moléculas começam a penetrar na fase polimérica, modificando o seu arranjo conformacional. Contudo, existem basicamente duas teorias que procuram explicar o mecanismo de plastificação de polímeros: a teoria da lubricidade e a teoria do gel. A teoria da lubricidade considera a resistência à deformação como sendo um resultado da fricção molecular. O plastificante atua como um lubrificante interno, facilitando o movimento das

moléculas e tornando o processamento mais fácil. A teoria do gel propõe que os plastificantes atuam sobre as ligações dipolo-dipolo e forças de *van der Waals*, atenuando-as, e, conseqüentemente, reduzindo a rigidez do polímero. A atenuação destas interações ocorre uma vez que as moléculas de plastificante, ao se posicionarem entre as cadeias de polímero, aumentam a distância entre as mesmas. A força de atração eletrostática é inversamente proporcional à distância entre as cargas elétricas; portanto, o aumento da distância intermolecular atenua a força de atração entre as cadeias, flexibilizando o polímero. Em outras palavras, a presença das moléculas do plastificante, em meio às cadeias poliméricas, promove a "quebra" das ligações dipolo-dipolo entre as últimas, criando novos dipolos entre o polímero e o plastificante<sup>22,23</sup>.

Os plastificantes mais estudados em combinação com os filmes de colágeno são os polióis hidrofílicos como o glicerol, sorbitol e polietilenoglicol (PEG)<sup>7,22</sup>.

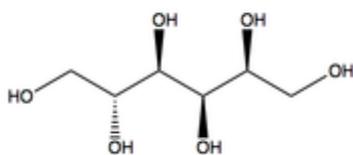
O glicerol, representado na Figura 7, é um composto orgânico pertencente à função álcool. Apresenta-se no estado líquido a temperatura ambiente, higroscópio, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Há centenas de usos para o glicerol em uma ampla variedade de produtos, como cosméticos, alimentos, fármacos, pasta de dentes, espuma de uretano e resinas sintéticas. A utilização do glicerol para a síntese de substâncias químicas de maior valor agregado é um tema de grande interesse industrial na atualidade<sup>7</sup>.



**Figura 7:** Representação esquemática da molécula de glicerol.

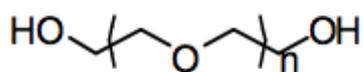
O sorbitol, cuja estrutura química é representada na Figura 8, é um líquido, viscoso, de aspecto límpido, incolor de pH neutro e livre de partículas em suspensão. Tal composto é um produto natural que pode ser encontrado em várias frutas, como a cereja, a pêra e o pêssego. A extração

do sorbitol a partir destas fontes naturais não é economicamente viável, portanto é necessário produzi-lo industrialmente mediante hidrogenação catalítica da glicose. O sorbitol pode ser utilizado em filmes poliméricos como agente plastificante. A presença de grupos hidroxilas permite que esse composto realize interações intra e intermolecular, sendo capaz de formar ligações de hidrogênio com as cadeias poliméricas. A utilização do mesmo é voltada para a indústria alimentícia e farmacêutica<sup>22</sup>.



**Figura 8:** Representação esquemática da molécula de sorbitol.

A família dos polietilenoglicóis (PEG), representado na Figura 9, são polímeros sintéticos não iônicos, mas solúveis em água. A variação no tamanho da cadeia, confere a esses compostos propriedades físico-químicas diferenciadas. Tal fato está associado a variabilidade de aplicações industriais relacionadas com esses compostos. O PEG possui importância primária na preparação de fármacos e alguns estudos estão relacionados com a liberação controlada dos mesmos<sup>23</sup>.



**Figura 9:** Representação esquemática da molécula de PEG.

## 1.4 Compósitos

Os compósitos são materiais heterogêneos, multifásicos, compostos por uma fase contínua (matriz) e uma descontínua (componente estrutural, reforço ou carga). De um modo geral, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores uma vez que é possível combinar as propriedades individuais de cada material em um só dispositivo. Além disso, é possível exercer um

controle sobre suas propriedades mecânicas e biológicas através da interação entre as suas estruturas químicas diferentes<sup>14,19,24</sup>.

A matriz corresponde ao componente presente em maior quantidade. A função da mesma é proporcionar estrutura ao compósito, preenchendo os espaços vazios que ficam entre a fase dispersa, mantendo-os em suas posições relativas. O material reforço é aquele que proporciona variação das propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo. O material obtido é um híbrido cujas propriedades não podem ser alcançadas por nenhum dos constituintes isoladamente<sup>14, 24</sup>.

Na mistura de dois componentes, de natureza química diversa, de qualquer dimensão ou forma, para que ocorra uma interação é essencial a existência de áreas de contato entre eles. Quanto maior for essa área, tanto maior será a possibilidade de ocorrer entre os dois componentes uma interação de natureza física, química ou físico-química. Se a dispersão dos constituintes for a nível molecular, poderão ocorrer interações em grau muito mais intenso do que se eles estiverem sob a condição de partículas grosseiras<sup>21</sup>.

Nos compósitos poliméricos, a matriz e o componente estrutural estão unidos por fracas interações intermoleculares. Entretanto, se a carga se dispersar em escala nanométrica e ligações químicas forem formadas entre as duas fases, então, além de uma melhora significativa das propriedades existentes, podem surgir outras, novas e inesperadas<sup>25</sup>.

A escolha da composição e estrutura de um material compósito para determinada aplicação não é uma questão simples. A introdução de um material reforço em uma matriz altera todas as propriedades individuais dos componentes. É necessário ter uma idéia das possíveis mudanças na microestrutura da matriz resultante da presença do reforço. A geração de tensões residuais de contração térmica diferencial durante a produção do compósito também pode ser significativo. Esses efeitos secundários devem ser considerados, para ter uma visão ampla da combinação de propriedades obtidas a partir de diferentes sistemas de compósitos<sup>26, 27</sup>.

Os compósitos são principalmente usados nas seguintes indústrias: mecânica de precisão (relógios, máquina de costura), automobilística (peças que se movem com alta velocidade e têm contato com metais, para evitar aglomeração de poeira resultante dos desgastes), aeronáutica, aeroespacial, ótica, médica e de material esportivo (equipamentos de pesca, peças para esqui, raquetes de tênis)<sup>21</sup>.

Dentro da definição dos compósitos podem-se encontrar também os biocompósitos que são biopolímeros ou polímeros sintéticos reforçados com fibras naturais<sup>28</sup>. As vantagens do uso de fibras naturais sobre as sintéticas tradicionais (fibras de vidro) como carga em compósitos incluem: produção a partir de fontes renováveis, baixa densidade, não são abrasivas aos equipamentos de processamento e a biodegradabilidade. O desenvolvimento de uma ligação química ou interação física, na região interfacial, promove a adesão necessária entre a fibra e a matriz, produzindo compósitos com melhores propriedades. A obtenção de uma interface distinta depende da adesão fibra/matriz, e esta adesão pode depender de vários fatores ou mecanismos tais como interdifusão, atração eletrostática, ligação química, adesão mecânica, entre outros<sup>29</sup>.

Muitos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de empregar os NCCs como cargas em matriz poliméricas, para obtenção de nanocompósitos com propriedades únicas com relação aos outros microcompósitos<sup>30</sup>. Os nanocompósitos são obtidos pela incorporação física de nanopartículas em matriz poliméricas. As propriedades destes compósitos dependem dos nanocristais, da matriz polimérica e da interação entre ambos<sup>28</sup>. A preparação de nanocompósitos poliméricos tem recebido grande atenção nos últimos anos. A busca por compósitos ecologicamente viáveis, apresentam os nanocristais de celulose como uma alternativa viável na preparação desses novos materiais. Os nanocompósitos são uma classe de compósitos na qual a carga tem uma dimensão nanométrica (1-100 nm). Como a sua dispersão se dá em nível nanométrico, pequenas quantidades de carga (<5%p/p) resultam em elevada área superficial, ou seja, os sistemas consistem inteiramente de interfaces em contrastes com os compósitos convencionais que necessitam de uma alta quantidade de

reforço (40-50% p/p), para atingir as propriedades desejadas em função dessa baixa interação. A elevada quantidade de carga atrapalha o processamento, aumenta a densidade e diminui a tenacidade do material<sup>25, 31</sup>.

No presente trabalho foi proposto a produção e a caracterização de bionanocompósitos utilizando como matriz o colágeno e como material de reforço, nanocristais de celulose.

## **1.5 Métodos de caracterização dos materiais**

### **1.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho**

O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, devido a isto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos. A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Normalmente, as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas e, em casos particulares, também na região do infravermelho longínquo<sup>32</sup>.

A maior parte das moléculas apresenta vibração ou rotação, associadas com ligações covalentes que resultam em absorção de radiação na região do infravermelho ( $4000-450\text{ cm}^{-1}$ ), devido à variação do momento dipolar da molécula<sup>13</sup>.

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula,

originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais<sup>32, 33</sup>.

## **1.5.2 Análise Térmica**

### **1.5.2.1 Termogravimetria - TG**

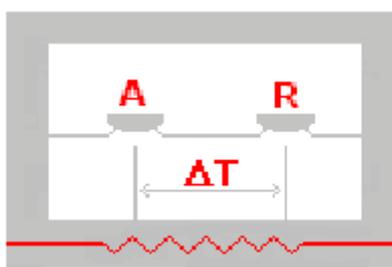
A termogravimetria é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química definida, a temperatura em que começa a se decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras<sup>33</sup>.

Os experimentos para se avaliar as variações de massa de um dado material em função da temperatura são executados mediante uma termobalança (associação forno-balança), que deve permitir o trabalho sob as mais variadas condições experimentais (diferentes atmosferas gasosas e massa de amostra, variadas razões de aquecimento e/ou condições isotérmicas em temperaturas específicas, etc. As curvas geradas fornecem informações quanto à estabilidade térmica da amostra, à composição e à estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. As variações de massa podem ser determinadas quantitativamente, enquanto outras informações obtidas a partir de uma curva TG são de natureza empírica, visto que as temperaturas dos eventos térmicos são dependentes de parâmetros relacionados às características da amostra e/ou fatores instrumentais<sup>33, 34</sup>.

### 1.5.2.2 Análise Térmica Diferencial - DTA

A análise térmica diferencial é a técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura. Para isso, a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

Esta técnica pode ser descrita tomando como base a análise de um programa de aquecimento. A Figura 10 mostra o diagrama do compartimento de DTA no qual são colocados dois cadinhos (da amostra a ser analisada (A) e do material referência (R)), e dois sensores de temperatura (um sensor em cada cadinho), em um sistema aquecido por apenas uma fonte de calor.



**Figura 10:** Diagrama esquemático do compartimento da amostra na análise de DTA.

A amostra e o material de referência são submetidos à mesma programação de aquecimento monitorada pelos sensores de temperatura, geralmente termopares. A referência pode ser alumina em pó, ou simplesmente a cápsula vazia. Ao longo do programa de aquecimento as temperaturas da amostra e da referência se mantêm iguais até que ocorra alguma alteração física ou química na amostra. Se a reação for exotérmica, a amostra irá liberar calor, ficando por um curto período de tempo, com uma temperatura maior que a referência. Do mesmo modo, se a reação for endotérmica a temperatura da amostra será temporariamente menor que a referência.

Mudanças na amostra tais como fusão, solidificação e cristalização são então registradas sob a forma de picos, sendo a variação na capacidade calorífica da amostra registrada como um deslocamento da linha base.

A curva DTA é então registrada tendo a temperatura ou o tempo na abscissa e  $\mu\text{V}$  na ordenada. A diferença de temperatura é dada em  $\mu\text{V}$  devido ao uso de termopares em sua medição.

O uso principal da DTA é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracterizá-los como endotérmico e exotérmico, reversível ou irreversível, transição de primeira ordem ou de segunda ordem, etc. Este tipo de informação, bem como sua dependência em relação a uma atmosfera específica, faz este método particularmente valioso na determinação de diagramas de fase<sup>34</sup>.

### **1.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV**

Uma das técnicas mais amplamente utilizadas no estudo morfológico de materiais poliméricos é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesta técnica um feixe de elétrons percorre a superfície da amostra, obtendo-se informações sobre a topografia presente na superfície dos materiais<sup>35</sup>. Há basicamente dois modos de formação de imagens nesta técnica: a imagem formada por elétrons retroespalhados, e a imagem obtida por elétrons secundários<sup>32, 35</sup>.

O microscópio eletrônico de varredura opera com um feixe de elétrons emitidos de um filamento e são acelerados por uma diferença de potencial, comumente na faixa de 1-30 kV. O feixe é direcionado a uma coluna óptica eletrônica, consistindo de duas ou três lentes magnéticas. As lentes produzem um feixe fino de elétrons e o dirige sobre a superfície da amostra. Dois pares de placas de deflexão colocados antes das lentes finais fazem com que o feixe de elétrons colimados rastreie toda a superfície da amostra. O MEV é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas (se possuir acessório adequado) de amostras diversas<sup>36</sup>.

A preparação das amostras para análises de MEV é relativamente simples. Para amostras poliméricas normalmente utiliza-se a técnica de fratura criogênica, que consiste em se congelar o material em nitrogênio líquido e, então, fraturá-lo. A fratura ou a superfície de interesse é recoberta com uma fina camada condutora, geralmente ouro, para atingir o deslocamento homogêneo do feixe de elétrons por toda a amostra <sup>32, 35</sup>.

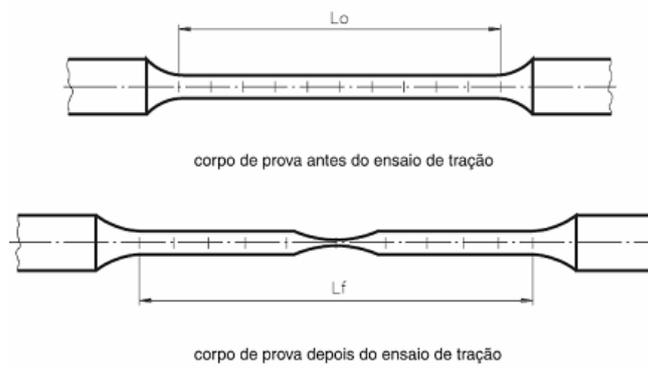
#### **1.5.4 Ensaio de Tração**

O ensaio de tração consiste em se aplicar a um corpo de prova adequadamente preparado, uma carga uniaxial provocando o alongamento da amostra na direção paralela ao eixo de aplicação da carga. O carregamento é aumentado gradativamente (carregamento estático), levando geralmente o material à fratura <sup>37, 38</sup>.

Este é sem dúvida, um dos mais simples e mais utilizados dos ensaios mecânicos e, quando realizado criteriosamente, pode fornecer informações básicas sobre as propriedades mecânicas fundamentais dos materiais empregados na engenharia. Essas informações têm muitas vezes aplicação direta no projeto e dimensionamento de componentes e produtos <sup>38</sup>.

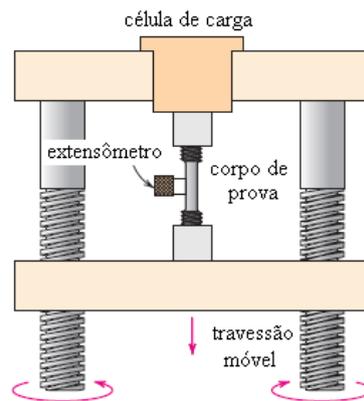
O ensaio de tração não é necessariamente capaz de fornecer informações para prever o comportamento dos materiais quando sujeitos a carregamentos em condições de serviço, no entanto, ele permite avaliar características de resistência e de ductilidade que podem ser usadas para estabelecer critérios de controle de qualidade que assegurem desempenho satisfatório em determinadas aplicações. Isso implica na necessidade de padronização dos métodos de ensaio e dos corpos de prova, com relação a tamanho, forma e técnicas para a obtenção das amostras <sup>37,39</sup>.

Para realizar o ensaio de tração os filmes preparados são cortados com um molde formando assim os corpos de prova (Figura 11).



**Figura 11:** Corpos de prova para o ensaio de tração.

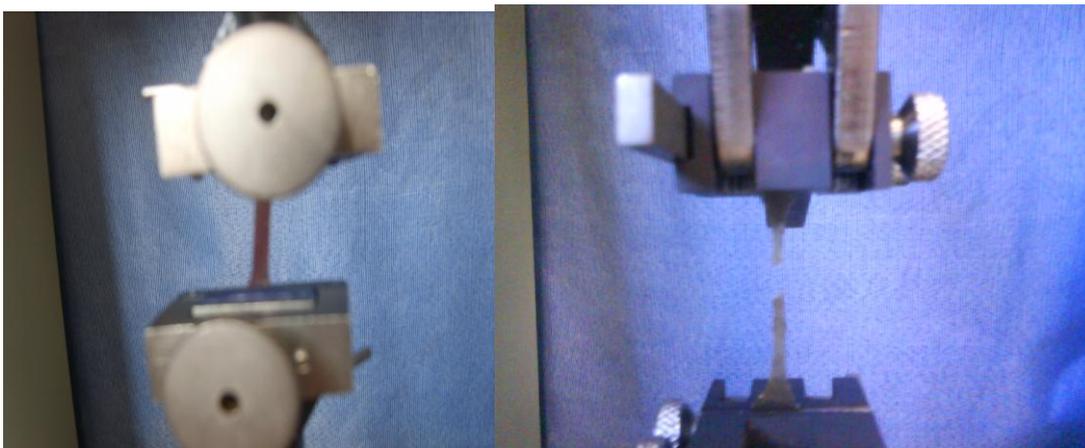
Os corpos de prova serão submetidos aos ensaios de tração. Uma parte móvel da máquina se move alongando o corpo de prova e aplicando sobre o mesmo uma força correspondente<sup>40</sup>. O sistema de ensaio mecânico está representado na Figura 12.



**Figura 12:** Sistema de um ensaio mecânico.

Cada extremidade do corpo de prova é presa em uma garra da máquina de tração. Assim, o mesmo é submetido a uma força sofrendo um

alongamento até o momento da ruptura (figura 13).



**Figura 13** : Ensaio de tração (alongamento e ruptura do filme).

O alongamento e a força aplicada são medidos utilizando um programa de computador conectado à máquina e obtêm-se então uma curva de força em função do alongamento. Informações correspondentes à resistência, rigidez e deformabilidade do material podem ser obtidas da curva de tensão – deformação<sup>40</sup>.

Entidades normativas nacionais e internacionais encarregam-se de estabelecer e atualizar normas técnicas que padronizam métodos de ensaio. Também são estabelecidas especificações exigidas para os materiais em geral e para produtos específicos<sup>37, 39</sup>.

A realização dos ensaios deve, portanto, estar subordinada à observação criteriosa da normalização vigente. A essa exigência está diretamente relacionada à confiabilidade e a comparabilidade dos resultados<sup>39</sup>.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O desenvolvimento de novos materiais tem sido baseado na mistura de dois ou mais polímeros, biopolímeros ou diferentes tipos de cargas. As misturas em diferentes proporções são promovidas na tentativa de se obter materiais com propriedades superiores as de seus precursores. Pedroso (2008) faz um estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição do acetato de polivinila (PVA), formando uma blenda. A análise de

FTIR mostrou que não houve interações entre o PVA e as moléculas de colágeno. Já as curvas de TG demonstraram que o PVA aumenta a estabilidade térmica do colágeno. As imagens obtidas por MEV revelaram que há diferença na morfologia do colágeno hidrolisado e o comercial, sendo que o primeiro apresenta uma estrutura fibrilar e desorganizada e o segundo apresenta uma estrutura mais compacta<sup>41</sup>.

Os materiais envolvendo colágeno podem apresentar propriedades de grande interesse biomédico como baixa toxicidade, alta capacidade de suporte estrutural, alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada e biocompatibilidade<sup>42,43</sup>. A possibilidade de reconstituição dos tecidos ósseos incentivou a busca por novos materiais para a formação de um composto que fosse biocompatível e biofuncional, com novas propriedades elétricas e mecânicas. Uma alternativa viável para a formação desses materiais foi proposto por Silva (2007) a partir da incorporação de nanotubos de carbono (NTC) na matriz colagênica tendo como objetivo principal a formação de estruturas que possam ser usadas em substituição a perdas de tecido, de modo a prover o crescimento do tecido natural lesado. O biocompósito sofreu alterações na resistência mecânica tornando superior a matriz de colágeno puro, o que torna viável a utilização dos mesmos para reparos de imperfeições ósseas. Os estudos de toxicidade e biocompatibilidade apresentaram resultados que qualificam os NTC e os compósitos para utilização em aplicações biológicas<sup>14</sup>.

Goissis e colaboradores (2008) citam o colágeno como bom suporte para o crescimento celular, constituindo em um agente de união biocompatível, biodegradável, osteoindutivo e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração de partículas até a incorporação pelos tecidos. Portanto eles propõem a preparação e caracterização de um material compósito de colágeno e hidroxiapatita associado ao silicato para ser utilizado como material endodôntico. O compósito desenvolvido mostrou-se promissor para aplicações em endodontia como alternativa aos materiais comerciais existentes uma vez que, os componentes do material podem influenciar positivamente na reparação tecidual da polpa dentária mantendo a normalidade fisiológica dos tecidos<sup>17</sup>.

Considerando as características de excelente biocompatibilidade, fácil manipulação e baixa toxicidade dos biocompósitos de colágeno; Dai e colaboradores (2009) desenvolveram e caracterizaram um compósito a base de colágeno e copolímero de policaprolactona que auxiliam no crescimento celular da pele humana. O material foi desenvolvido com base em um sistema de cultura que imita a estrutura anatômica da pele normal e permite a separação dos queratinócitos e fibroblastos humanos permitindo a transdução do sinal celular. Esse composto apresenta as características benéficas da possível porosidade para o crescimento celular e boa biocompatibilidade in vivo, mostrou ser um material com grande potencial para a seleção farmacêutica e aplicação clínica<sup>51</sup>.

Os materiais magnéticos atualmente têm sido estudados devido a sua versatilidade e importância em bioaplicações como agentes de contraste na ressonância magnética para detecção de tumores, na liberação controlada de drogas, separação seletiva e detecção de biomoléculas. Para essas aplicações as partículas magnéticas devem ser combinadas com materiais biológicos. Figueiro e colaboradores (2010) propõem a formação de biocompósitos com propriedades ferromagnéticas tendo como base o colágeno e granadas de ferro e ítrio. Os resultados mostram que os biocompósitos são filmes biológicos com propriedades magnéticas e podem ser empregados como material com versátil desempenho devido as suas características flexíveis e magnéticas, podendo ser empregados em dispositivos eletrônicos e para aplicações biológicas<sup>44</sup>.

Nogueira e colaboradores (2010) estudaram a viabilidade da utilização do colágeno, como adsorvente de P e K para possível utilização como fertilizante. O colágeno é um resíduo sólido, rico em nitrogênio proveniente da indústria do couro, porém a sua utilização apenas é viável após a extração de cromo. Os materiais com e sem adição de P e K foram caracterizados por análises químicas como espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raio x, microscopia eletrônica de varredura. Também foram realizados testes utilizando o material como adubo. A análise de MEV apresentou uma morfologia diferente para o colágeno com cromo e após a sua extração. A análise de difração de raio x

revelou o alto teor de Cr no colágeno residual e após o processo de extração não é possível identificar a presença do metal, sugerindo a remoção praticamente total da substância. A análise dos materiais por FTIR revelou que a extração do cromo e a incorporação de P e K não alteraram significativamente a estrutura do colágeno. Uma das principais conclusões relacionadas com o trabalho e que a aplicação do colágeno como fonte de nutrientes para plantas de arroz mostrou resultados promissores. Devido à alta capacidade de adsorção do colágeno e também da grande disponibilidade do material, o mesmo pode ser usado para adsorção de fósforo e potássio para a produção de fertilizantes naturais<sup>45</sup>.

Castiello e colaboradores (2009) utilizaram misturas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com colágeno hidrolisado derivados da indústria de curtume para avaliar a viabilidade da produção de materiais poliméricos adequados para a produção de itens termoplásticos para aplicações nos segmentos de embalagens e agrícola. As propriedades físico-químicas das misturas obtidas foram avaliadas por análises termo-mecânicas e espectroscópicas. A análise do MEV permitiu verificar a homogeneidade do material mostrando uma eficiente compatibilidade entre os dois componentes, os espectros de FTIR revelam que não houve nenhuma interação significativa entre o colágeno hidrolisado e o polietileno. A análise térmica mostrou que a fração protéica incorporada na matriz polimérica aumenta muito a resistência térmica do material. Já o ensaio mecânico revelou que o material possui alta rigidez, até mesmo em concentrações mais baixas de colágeno. Por fim, os materiais provenientes da mistura de colágeno e polietileno são viáveis e promissores, passíveis de serem processados fornecendo películas transparentes, coerentes e flexíveis que são caracterizados pela resistência térmica e mecânica satisfatória<sup>46</sup>.

No presente trabalho foi desenvolvido e caracterizado biocompósitos de colágeno e nanocristais de celulose com objetivo de estudar a influência do processamento nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos mesmos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a influência do processamento nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos nanobiocompósitos de colágeno e nanocristais de celulose.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1) Dispersar nanocristais de celulose liofilizado na matriz de colágeno;
- 2) Avaliar qual a melhor maneira de se introduzir NCC liofilizado na matriz de colágeno;
- 3) Determinar qual o melhor plastificante a ser utilizado na preparação dos compósitos;
- 4) Verificar a influência da adição de nanocristais de celulose na estrutura do colágeno analisando possíveis interações entre a matriz colagênica e o material de reforço;
- 5) Comparar a estabilidade térmica dos compósitos formados e a estabilidade térmica do colágeno puro;
- 6) Avaliar a resistência mecânica dos compósitos produzidos;
- 7) Investigar a morfologia dos compósitos desenvolvidos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

No presente trabalho o colágeno utilizado foi cedido pela Universidade Federal de Minas Gerais pelo professor Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira.



**Figura 14:** Colágeno cedido pela Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **4.1 Preparo da solução de colágeno**

O colágeno foi colocado em presença da solução de ácido acético 1 % p/v. Essa mistura foi aquecida durante 2 horas a temperatura constante de 70 °C em banho-maria. Finalmente, a mistura foi filtrada duas vezes para a remoção de impurezas provenientes do colágeno.

#### **4.2 Determinação da concentração da solução de colágeno**

Como o colágeno continha impurezas, foi necessário determinar a concentração da solução após filtração. Para isso mediram-se 5 mL da solução de colágeno preparada e verteu-se em uma placa de petri. A solução foi evaporada em uma estufa a 60 °C durante o período de 24 horas. A concentração da solução de colágeno foi determinada usando a seguinte relação matemática:

$$\text{Concentração} = \text{Massa do filme} / 5 \text{ mL}$$

O procedimento foi realizado em triplicata, para garantir a confiabilidade dos resultados.

#### **4.3 Preparo dos nanocristais de celulose**

A dispersão de nanocristais de celulose foi obtida a partir da hidrólise ácida da polpa de celulose do eucalipto, cedida pela empresa Bahia Pulp.

Para hidrólise, foi utilizada 1,0g de polpa de celulose purificada adicionada a 8 mL de ácido sulfúrico 65% (em massa) a 50°C, o processo ocorreu durante 50 minutos com temperatura controlada e agitação mecânica constante. Após a hidrólise, a solução foi diluída em torno de 5 vezes com água destilada, as suspensões foram centrifugadas 3 vezes e lavadas com água. A suspensão foi submetida à diálise durante 4 dias, até que o pH da solução permanecesse constante em torno de 6, em seguida a dispersão de NCC foi obtida por sonicação durante 2 minutos e por fim foi filtrada em papel de filtro Whatman de 25  $\mu\text{m}$ . A birrefringência verificada na solução confirma a dispersão dos NCC's.



**Figura 15:** (a) Polpa de eucalipto (92-95% de celulose) (b) Polpa de eucalipto purificada (c) Hidrólise ácida da polpa de eucalipto.

O processo de liofilização foi utilizado, pois ele permite que se desidrate a solução de nanocristais através da liofilização. Após o congelamento em nitrogênio líquido (que impede a agregação dos nanocristais) tem -se a retirada da água por sublimação, não permitindo que após congelado o sistema retorne ao estado líquido e mantendo assim as mesmas interações existentes na solução de nanocristais. Assim, o produto da liofilização constitui um sólido muito pouco denso, com grande espaçamento entre as partículas e de melhor dispersão que a solução em determinados materiais. Para a obtenção de nanocristais de celulose liofilizado, a dispersão de NCC foi distribuída em recipientes de plásticos, com no máximo 30 mL em cada pote. Esses recipientes foram devidamente fechados e previamente congelados em nitrogênio líquido. Finalmente os

recipientes com a dispersão congelada, foram levados ao liofilizador de marca TERRONE do modelo LC 3000/2 por 48 horas.



**Figura 16:** Nanocristais de celulose liofilizado.

#### 4.4 Preparo dos nanobiocompósitos

Os nanobiocompósitos col/NCC/gli foram preparados utilizando a técnica de *casting* que se baseia na evaporação do solvente até a formação do filme. Cada filme foi preparado utilizando como base para cálculos uma massa total de 5 g. Foram preparados filmes de colágeno com plastificante, colágeno com NCC e os compósitos envolvendo col/NCC/plas de dois métodos de processamento diferentes, cuja a composição está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição em massa dos filmes de col/plas, col/NCC e col/NCC/plas.

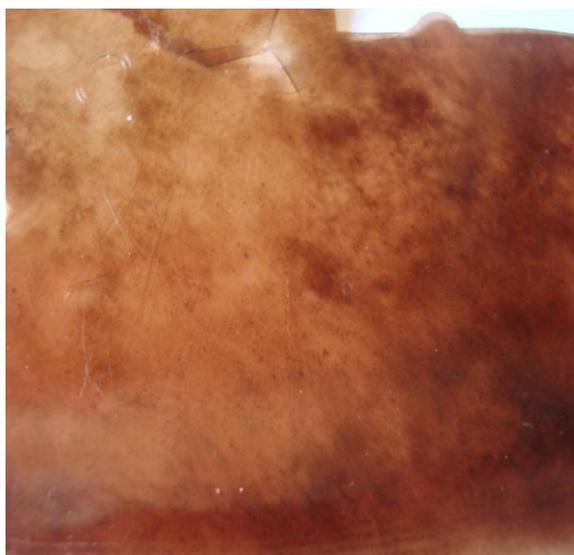
Filme	Composição de NCC	Composição de Colágeno	Composição de Glicerol	Composição de Sorbitol	Composição de PEG
1	0%	100%	0%	0%	0%
2	0%	90%	10%	0%	0%
3	0%	90%	0%	10%	0%
4	0%	90%	0%	0%	10%
5	3%	87%	10%	0%	0%

6	3%	87%	0%	10%	0%
7	3%	87%	0%	0%	10%

Em seguida, foram preparados filmes com a inserção de nanocristais liofilizados de duas maneiras distintas.

Primeiramente, adicionou o NCC liofilizado no plastificante e, em seguida, foi adicionado à solução de colágeno, deixando sob agitação por 24 horas. A segunda maneira consistiu em adicionar o NCC liofilizado diretamente na solução de colágeno com plastificante. Na Tabela 1 apenas foi representado uma das maneiras de processamento dos filmes, uma vez que a composição e a proporção dos materiais são as mesmas para os dois métodos de processamento.

O preparo de todos os filmes envolveu o mesmo procedimento, que consistiu em preparar as soluções com composição definidas, vertê-las em recipientes de plástico e levá-las a estufa mantida a temperatura de aproximadamente 40 °C, até a evaporação total do solvente e a formação dos filmes. Os recipientes foram retirados da estufa e deixados em temperatura ambiente e os filmes foram desenformados.



**Figura 17:** Filmes de colágeno com plastificante.

## **4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no CEFET MG no Departamento de Engenharia de Materiais. O equipamento utilizado é da marca Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan.

## **4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho**

A análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada no CEFET MG no Departamento de Química. O equipamento utilizado é da marca Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21, equipado com Transformada de Fourier FTIR-8400S e acessório ATR.

## **4.7 Análise Térmica**

As análises termogravimétricas (Tg) foram realizadas no Departamento de Química do CEFET MG em um equipamento Shimadzu DTG-60H nas seguintes condições: Gás de purga: ar; Vazão: 100mL/min; Taxa de aquecimento: 15°C/min; Temperatura inicial de 20°C; Temperatura final de 600°C.

## **4.8 Ensaio de Tração**

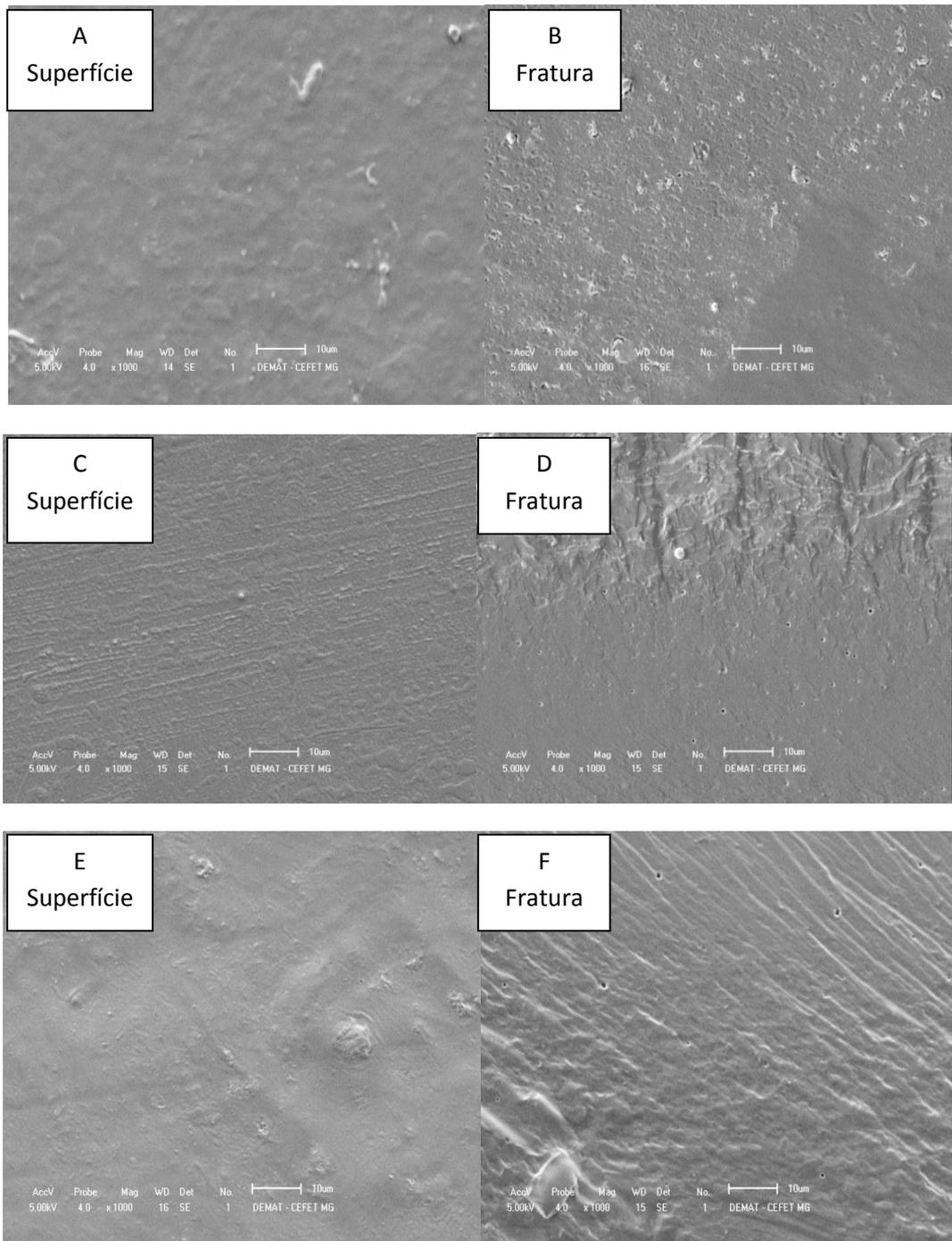
Os ensaios de tração foram realizados no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, na UFMG, em um equipamento de marca EMIC DL 3000, utilizando uma célula de carga de 4,5 Kgf.

# **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

O principal objetivo da investigação da morfologia de compósitos poliméricos é a determinação da homogeneidade de dispersão de cargas na matriz e no modo de fratura.

Na Figura 18 são mostradas as imagens obtidas por MEV, da superfície e da fratura do colágeno puro e dos nanobiocompósitos denominados col/NCC/glicerol.



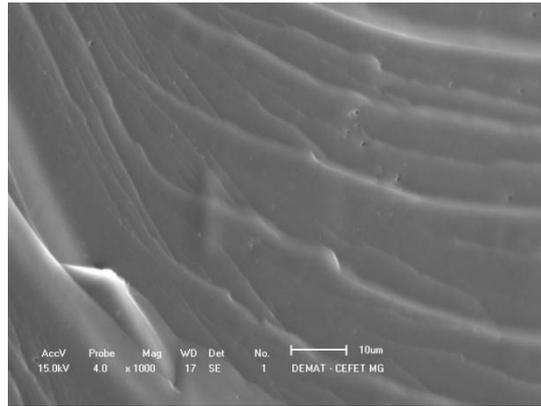
**Figura 18:** Imagens obtidas por MEV da superfície e da fratura criogênica, respectivamente do colpuro A e B e dos compósitos col/NCC/gli, C e D e col/(NCC/gli) E e F.

Pode-se observar por meio das imagens obtidas por MEV que a superfície do colágeno puro (Figura 18 A) apresenta-se muito lisa. Já as imagens de fratura revelam que a amostra possui características de materiais frágeis, apresentando pequenas trincas em toda sua extensão.

A superfície do nanobiocompósito col/NCC/gli, representada na Figura 18 C, mostra-se homogênea, porém pode ser observado algumas ranhuras na superfície da amostra. A Figura 18 D, referente à fratura da amostra, mostra a presença de duas fases distintas, uma mais lisa na qual foi verificada a existência de pequenas trincas que se assemelham as da imagem do colágeno puro e a outra mais rugosa na parte superior. Uma das possibilidades é que a concentração de NCC é diferente nas duas fases. As nanocargas podem migrar para a superfície do filme devido à diferença de tensão superficial entre os componentes do sistema. Isso explicaria as tendências de orientação observadas na superfície da amostra.

A Figura 18 E, mostra a imagem de MEV da superfície do compósito de col/(NCC/gli), como pode-se verificar as características da superfície são próximas as do colágeno puro e diferem das do nanocompósito de mesma composição. Analisando as imagens da fratura da amostra, Figura 18 F, observou-se uma única fase, e pode-se sugerir que a nanocarga encontra-se melhor dispersa na extensão filme quando comparada ao material col/NCC/gli. Em adição deve-se destacar que a dispersão prévia dos nanocristais de celulose em glicerol auxilia nessa melhor distribuição das nanocargas no material.

Com a finalidade de investigar o efeito da adição do plastificante no colágeno e se o mesmo poderia ser responsável pela separação de fase observada na Figura 18 D, a amostra col/gli foi fraturada e levada ao microscópio eletrônico de varredura.



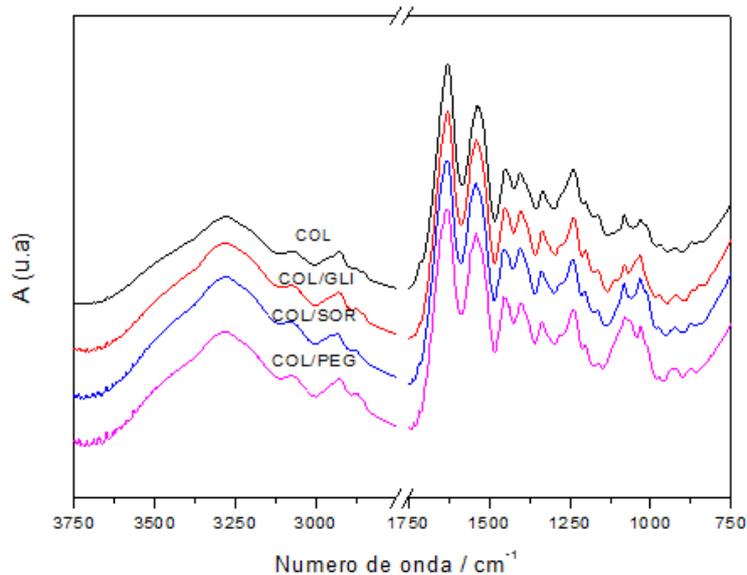
**Figura 19** : Imagens obtidas por MEV da fratura criogênica, do colágeno e glicerol.

A análise da Figura 19 permitiu verificar que o material apresenta-se homogêneo em toda sua extensão, ou seja, não apresentou separação de fases após a adição do glicerol na matriz de colágeno.

Como foi mostrado na Figura 18 D e F, o modo de processamento promove morfologias distintas nas imagens obtidas podendo-se atribuir ao mesmo as diferenças observadas nas Figuras 18 D e F.

## **5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.**

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma ferramenta importante para auxiliar na caracterização estrutural do colágeno e dos nanobiocompósitos. A Figura 20 mostra os espectros de FTIR para os filmes de colágeno puro e de colágeno com os diferentes plastificantes.



**Figura 20:** Espectros de FTIR para o filme de colágeno e de colágeno com diferentes plastificantes (Glicerol, Sorbitol e PEG 200).

A Tabela 2 correlaciona as bandas identificadas no espectro de FTIR dos filmes de colágeno puro com os respectivos grupos químicos presentes na estrutura do polímero.

**Tabela 2:** Principais bandas identificadas no espectro de FTIR do colágeno puro associadas das vibrações dos grupos químicos presentes na estrutura do polímero.

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Associações
1654	Amida I ( $\nu_{C=O}$ )
1554	Amida II ( $\delta_{N-H}$ e $\nu_{C-N}$ )
1235	Amida III ( $\nu_{C-N}$ e $\delta_{N-H}$ )
1450	Ligação do C-H do anel pirrolidínico ( $\delta_{C-H}$ dos aminoácidos)
3283	$\nu_{N-H}$

Um dos principais objetivos do estudo do espectro de FTIR do colágeno é verificar a integridade da tripla hélice da estrutura colagênica,

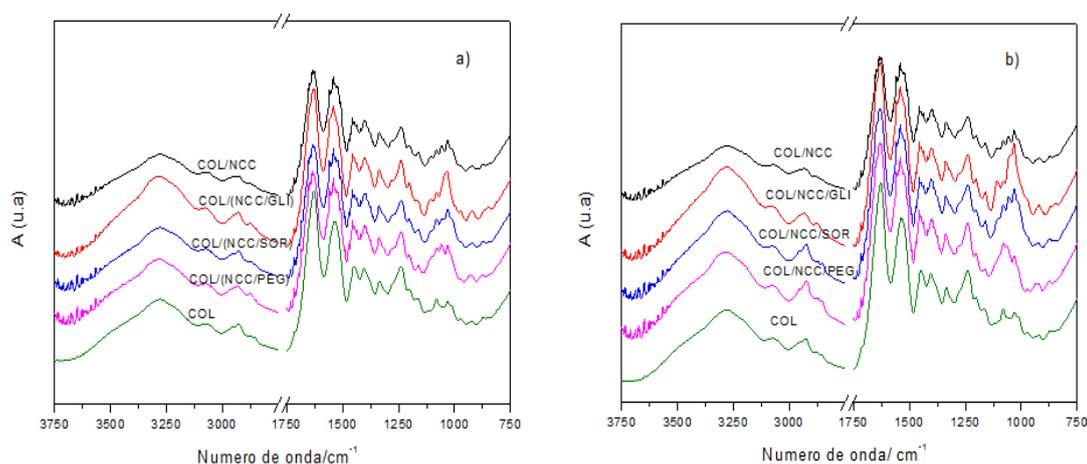
quando o mesmo é submetido a tratamentos em presença de soluções ácidas. Isso é feito através das absorbâncias observadas em  $1235\text{cm}^{-1}$  e  $1450\text{cm}^{-1}$ , associadas a vibrações de estiramento e deformação de ligações presentes no grupamento denominado amida III (conforme mostrado na Tabela 1) e ligações C-H esqueleto carbônico da glicina e prolina<sup>19</sup>. Para materiais preparados em solução ácida (pH  $\sim 3,5$ ), a integridade da estrutura secundária do colágeno pode ser verificada quando o valor da relação  $A_{1235}/A_{1450}$  for maior ou igual ao valor 0,5. Este valor específico é observado para o caso de estruturas desnaturadas. A razão encontrada entre a intensidade dessas bandas tanto no colágeno quanto nos filmes de colágeno e plastificante estão em torno de 1,0, indicando que a tripla hélice da estrutura do colágeno encontra-se preservada.

O espectro de FITR do colágeno, Figura 19, é caracterizado pela presença de bandas típicas para o grupo amida A, B, I, II e III<sup>58,59,60</sup>. A amida I possui uma banda característica em  $1654\text{cm}^{-1}$  devido à vibração de estiramento do grupo C=O. A banda associada à amida II aparece em  $1554\text{cm}^{-1}$  resultando das vibrações de deformação ligação N-H e de estiramento C-N, com contribuição de 60% e 40%, respectivamente. A banda em  $1235\text{cm}^{-1}$  possui contribuições das vibrações relativas aos mesmos grupos associadas à banda da amida II, porém envolvidos em interações, além das vibrações de deformação do grupo  $\text{CH}_2$  dos aminoácidos e é denominada amida III. A banda larga com máximo em  $3300\text{cm}^{-1}$  e ombros em números de onda menores é o resultado da contribuição das vibrações de estiramento dos grupos O-H ( $\sim 3400\text{cm}^{-1}$ ), N-H ( $\sim 3300\text{cm}^{-1}$  – amida A) e C-H ( $\sim 3080\text{cm}^{-1}$  – Amida B) presentes no colágeno.

Os plastificantes usados possuem os mesmos tipos de ligações químicas que o colágeno, com exceção das bandas de amida, e consequentemente absorbâncias que ocorrem na mesma região. A banda existente entre  $3000\text{-}3500\text{cm}^{-1}$  no espectro de FTIR de todas as misturas col/plas sofreu um discreto alargamento para número de ondas maiores devido a contribuição dos grupos O-H dos plastificantes. A região com número de onda entre  $1000$  e  $1150\text{cm}^{-1}$  apresenta um perfil de banda diferente de acordo com cada plastificante, que é proveniente do somatório

de bandas do colágeno e dos plastificantes individualmente. Essas bandas aparecem com elevada intensidade nos espectros dos plastificantes, já no do colágeno, com intensidade fraca em relação às demais, por isso, afetam o perfil de banda existente nessa região quando comparado com o colágeno puro. De uma maneira geral, os espectros mostrados na Figura 20 são semelhantes, independentes dos plastificantes utilizados na mistura. Não foi possível identificar interações específicas dos diferentes plastificantes com o colágeno. Teoricamente, para todos os plastificantes, os grupos O-H tem propensão em realizar ligações de hidrogênio com a carbonila do colágeno ou com os grupos N-H.

O espectro de FTIR dos compósitos col/NCC/plas estão mostrados na Figura 21.



**Figura 21:** Espectros de absorção na região do infravermelho dos nanobiocompósitos obtidos por diferentes métodos de processamento a) col/(NCC/plas) e b) col/NCC/plas. Cada nanobiocompósito possui um dos plastificantes gli, sorb, PEG.

Com a finalidade, de investigar criteriosamente as possibilidades de interações entre os componentes do sistema, os espectros de FTIR dos nanobiocompósitos (Figuras de 20 a) e b)) foram normalizados, segundo a banda localizado em  $1335\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $-\text{CH}_3$  do grupo amida. Essa banda foi utilizada pelo fato de estar presente apenas no colágeno, ou seja, possui uma probabilidade muito pequena de acoplamento com outras bandas dos plastificantes e dos nanocristais de celulose.

Os espectros de FTIR para os nanobiocompósitos de colágeno, plastificantes e NCC mostram a predominância das bandas do colágeno, isso é explicado pelo fato do mesmo estar presente em maior quantidade nas amostras. Os nanocristais de celulose apresentam bandas intensas na região de  $3400\text{cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , semelhante ao colágeno. Com isso, vale ressaltar que as bandas atribuídas aos nanocristais de celulose não sobrepõem aquelas associadas as amida II e III. Isso permitiu que as mesmas fossem investigadas em termos de suas intensidades relativas.

Analisando os espectros da Figura 21, pode-se perceber que a banda associada a amida III (em  $1235\text{cm}^{-1}$ ) tem sua intensidade relativa aumentada nos espectros de FTIR dos materiais obtidos envolvendo o colágeno quando comparado ao de colágeno puro. Os valores das razões de absorvâncias  $A_{1546}/A_{1235}$  foram calculados e estão mostrados na Tabela3.

**Tabela 3:** Intensidade relativa das absorvâncias das bandas em  $1546$  e  $1235\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1546}/A_{1235}$ ).

<b>Amostra</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Intensidade</b>
Col	1,50	Col/NCC	1,26
Col/ (NCC/Gli)	1,31	Col/NCC/Gli	1,38
Col/ (NCC/Sor)	1,17	Col/NCC/Sor	1,24
Col/(NCC/PEG)	1,13	Col/NCC/PEG	1,20

A razão da intensidade relativa para as bandas do colágeno puro apresentou um valor superior quando comparada as razões de todos os nanobiocompósitos. A mesma investigação foi feita para as misturas contendo plastificantes, porém a variação foi menor, indo de 1,48 para o col/PEG, 1,45 para o col/gli e 1,43 para o col/sor. Esses valores indicam um aumento no valor de intensidade da banda em  $1235\text{cm}^{-1}$ , ou seja, diferença nos tipos ou quantidade de interação envolvendo os grupos N-H do colágeno.

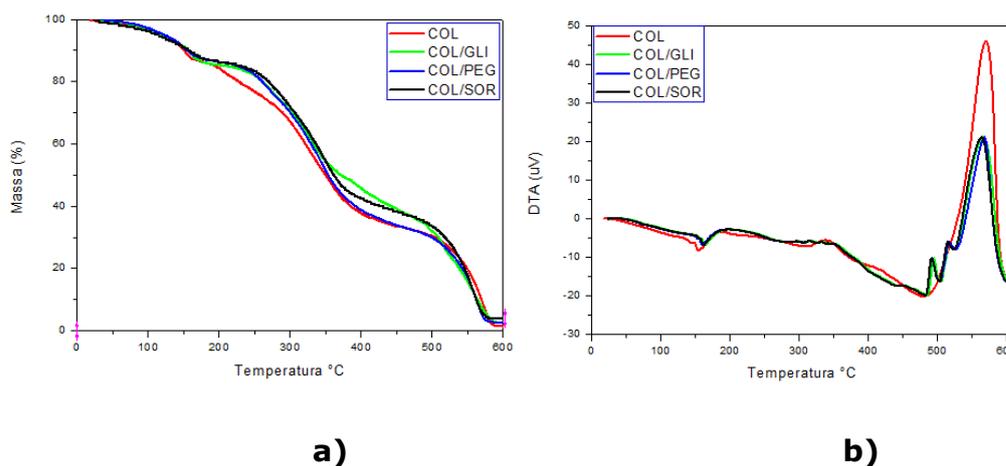
Andreuccetti e colaboradores descreveram a plastificação de gelatina tipo A com tributilcitrato, acetiltributilcitrato e outros derivados. Os autores propuseram a formação de interações de hidrogênio envolvendo o grupo amida dos aminoácidos e grupamentos dos plastificantes, através das mudanças de formato e intensidade da banda relativa às vibrações de estiramento da amida III<sup>47</sup>.

Outra observação interessante é que existe uma tendência de variação do valor da razão  $A_{1546}/A_{1235}$  com o modo de processamento. Para todos os nanobiocompósitos preparados a partir da dispersão dos nanocristais de celulose inicialmente nos plastificantes, col/(NCC/plas), esse valor é um pouco menor quando comparado aqueles preparados pelo outro método de processamento, col/NCC/plas. Com isso, pode-se propor que o grau de interação entre o polímero e os aditivos, no primeiro método de processamento provavelmente é mais intenso que no segundo caso.

As variações das intensidades relatadas anteriormente amida III possibilitam propor que os aditivos promovem o rompimento das interações entre as cadeias de colágeno o que possibilita a formação de novas interações de hidrogênio, tais como: (i) entre as cadeias de colágeno (envolvendo o átomo de hidrogênio da ligação N-H) e os grupos de O-H dos plastificantes (ii) entre as cadeias de colágeno e os grupos O-H e/ou sulfatos dos nanocristais de celulose, sendo os últimos preferenciais, uma vez que são carregados eletronegativamente.

## 5.3 Análise Térmica

A análise termogravimétrica é uma técnica de caracterização que possibilita investigar o comportamento dos materiais quando submetidos a um programa de aquecimento controlado. As curvas termogravimétricas bem como DTA para as amostras de colágeno puro e misturas col/plas são mostradas na Figura 22.



**Figura 22:** Curva a) termogravimétrica TG e b) DTA para os filmes de colágeno puro e após a adição dos plastificantes, PEG, Gli e Sor.

A análise das curvas termogravimétricas permitiu verificar que a perda de massa ocorre em três estágios diferentes. O primeiro identificado para temperaturas variando entre 120 a 180°C e está relacionada principalmente com a perda gradual de água ligada a estrutura colagênica. Já o segundo entre 240 e 390 °C pode ser atribuído a degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno, e o terceiro estágio entre 490 e 590°C, está relacionado à carbonização do material devido à presença de oxigênio do ar <sup>15</sup>.

A derivada da TG, curvas DTG, foram utilizadas para auxiliar na identificação das temperaturas iniciais ( $T_{onset}$ ), finais ( $T_{endset}$ ) e da velocidade máxima de degradação ( $T_{vm}$ ) das etapas de perda de massa dos materiais, os dados estão mostrados na Tabela 4. A  $T_{vm}$  para a primeira etapa de degradação do colágeno puro ocorreu em 148°C com perda de 14% de massa, diferindo daquelas semelhantes para as misturas col/plas. A adição

de plastificante ao colágeno promoveu um deslocamento das temperaturas da primeira etapa de perda de massa para valores maiores, variando discretamente dependendo do plastificante utilizado. No caso da adição de PEG, a  $T_{vm}$  ocorreu a 145°C, para o sorbitol em 154°C e o glicerol por volta de 155°C. Tal fato pode ser explicado pela hidrofiliçidade do PEG ser menor que a dos demais. Em relação ao colágeno puro, a  $T_{vm}$  deslocou-se para valores maiores, pois os plastificantes são capazes de reter água na estrutura do polímero através das ligações de hidrogênio formada entre os grupos OH dos mesmos (colágeno e plastificante). Os dados relatados na Tabela 4 estão em boa concordância e seguem a mesma tendência dos dados obtidos na curva de DTA.

**Tabela 4** - Temperaturas iniciais ( $T_{onset}$ ), finais ( $T_{endset}$ ) e a velocidade máxima de degradação ( $T_{vm}$ ) das etapas de perda de massa dos nanobiocompósitos.

ETAPA 1- DESIDRATAÇÃO							ETAPA 2		
Amostra	Água adsorvida			Água estruturalmente ligada			Degradação		
	$T_{onset}$	$T_{vmax}$	$T_{endset}$	$T_{onset}$	$T_{vmax}$	$T_{endset}$	$T_{onset}$	$T_{vmax}$	$T_{endset}$
Col	120	148	164	187	201	224	285	313	340
Col/Gli	135	155	168	245	265	276	313	328	348
Col/Sor	131	154	181	268	277	287	319	343	376
Col/PEG	127	145	170	251	268	281	327	344	354
Col/NCC	107	127	145	259	276	284	317	344	375
Col/NCC/Gli	128	147	170	231	253	285	325	344	376
Col/NCC/Sor	117	144	171	240	254	273	321	348	380
Col/NCC/PEG	116	144	165	240	250	265	310	344	371

Col/(NCC/Gli)	87	108	125	224	270	296	313	348	382
Col/(NCC/Sor)	118	135	162	236	270	284	308	345	380
Col/(NCC/PEG)	99	122	161	233	269	285	302	345	379

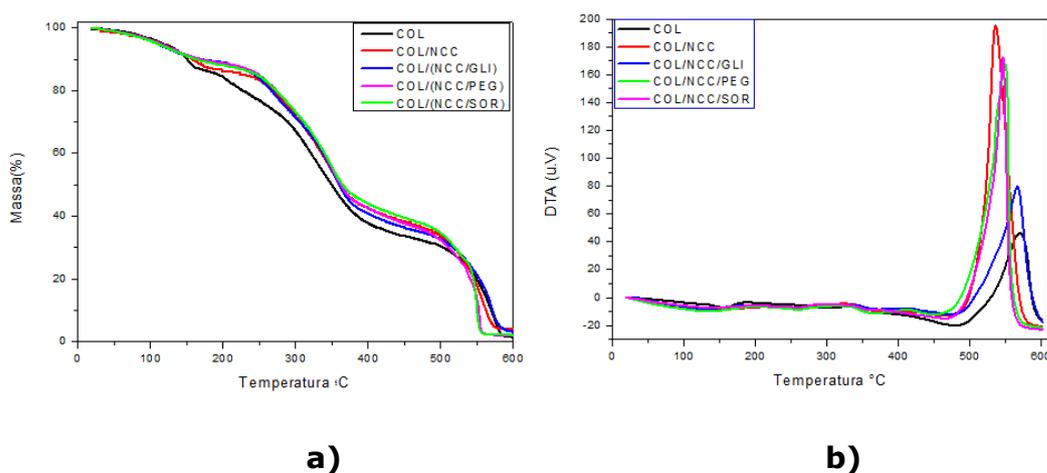
As curvas DTA para as amostras foram analisadas e o evento endotérmico, referente à perda de água foi identificado. A temperatura de desidratação para o colágeno puro foi verificada em 140°C. Já para as amostras contendo 15% em massa de plastificante tal temperatura foi deslocada conforme mostrado a seguir: para 160°C no caso da amostra contendo PEG, para 162°C para o sistema col/sor e 164°C para o col/gli. Esses resultados confirmam que a adição de plastificante confere maior resistência a desidratação do colágeno, já que esses plastificantes são hidrofílicos. As propriedades de plastificação do polímero são significativamente afetadas pela água, visto que a mesma é um plastificante natural e muito eficiente para filmes de estruturas protéicas<sup>8</sup>.

A perda da água mais fortemente ligada a estrutura do colágeno foi verificada entre 187 e 220°C para a amostra de colágeno puro. Já para os plastificantes as temperaturas de início e fim desse evento foram registradas em 245 e 287°C. O deslocamento para valores maiores foi retratado por Langmaier e colaboradores<sup>7</sup> para os sistemas envolvendo colágeno e PEG com diferentes massas molares. Os autores justificaram o deslocamento baseado na interação preferencial da água com os plastificantes frente ao polímero ou com a eliminação da mesma juntamente com os componentes de menor massa molar contidos no PEG. No caso das amostras estudadas, a água residual pode ser arrastada juntamente com os plastificantes, principalmente a glicerina e sorbitol que possuem temperatura de ebulição em torno de 290°C.

Em relação à segunda perda de massa, tanto a  $T_{onset}$  quanto a  $T_{vm}$  apresentaram um deslocamento para maiores valores no caso dos filmes de colágeno plastificado em relação ao polímero puro, conforme verificado na Figura 22 e Tabela 4. Uma proposta para explicar esse deslocamento consiste em considerar que as moléculas dos plastificantes podem realizar

interação com mais de uma cadeia do polímero ao mesmo tempo, formando uma espécie de rede, porém através de interações e não ligações químicas. O aumento da estabilidade térmica do colágeno após a adição de plastificantes já foi descrito anteriormente na literatura<sup>48</sup>.

As curvas de TG e de DTA dos compósitos col/NCC/plas com diferentes composições, variação do plastificante e modo de processamento estão representadas nas Figuras 23 e 24.

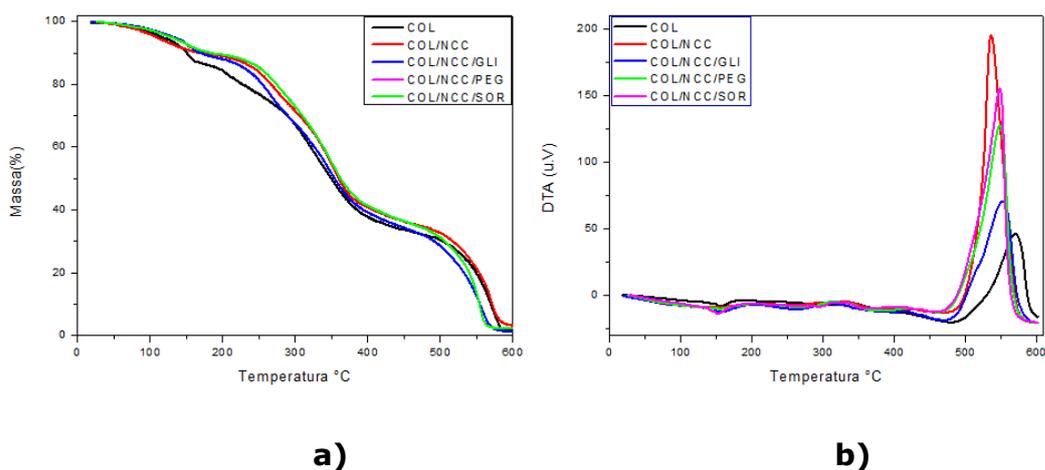


**Figura 23:** Curva termogravimétrica dos compósitos a) e DTA b) dos nanobiocompositos col/(NCC/plast).

A análise da curva TG dos nanobiocompósitos representados na Figura 23, também apresentam três estágios bem definidos em temperaturas similares aquelas identificadas a partir das curvas TG do colágeno puro e plastificado.

Comparando as amostras de colágeno puro, plastificado e após a adição dos nanocristais de celulose, com o auxílio da Tabela 4, foi possível verificar que a presença da nanocarga acelerou o processo de desidratação do material em todos os casos. De acordo com o proposto na discussão anterior, o plastificante retém água nos filmes através das interações realizadas com a mesma. Após a introdução da nanocarga novas interações ocorrem no sistema, envolvendo os grupos presentes no NCC e nos plastificantes e/ou na matriz de colágeno. As novas interações, competindo com as anteriores, são capazes de deixar a água menos adsorvida e menos fortemente ligada à estrutura dos nanobiocompósitos.

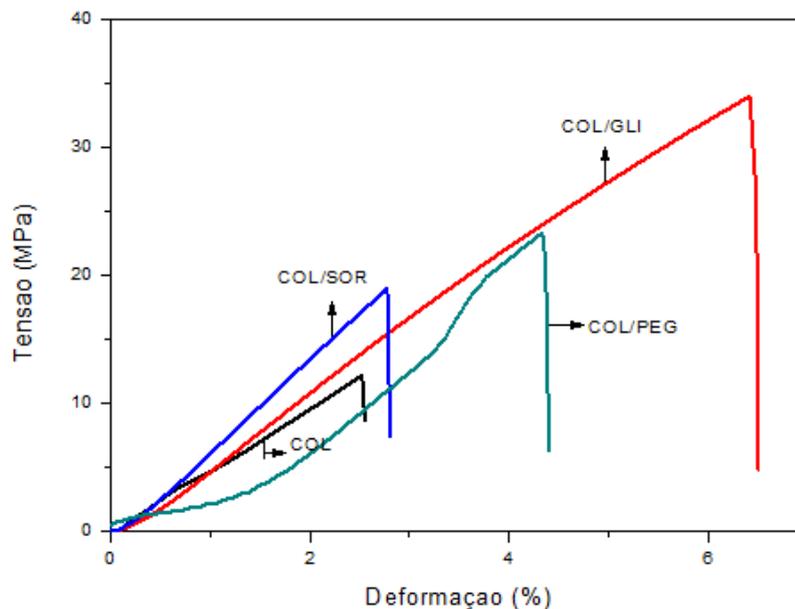
As temperaturas de velocidade máxima de degradação ( $T_{vm\acute{a}x}$ ) da matriz de colágeno são maiores após a adição dos nanocristais de celulose, para todos os sistemas, quando comparadas as de colágeno puro ou plastificado. Como a nanocarga é mais estável termicamente que a matriz, ao ser incorporada na mesma, elas funcionam como uma barreira térmica de modo a impedir a transferência de calor através da matriz polimérica. Esse tipo de efeito já foi relatado anteriormente para outros polímeros biodegradáveis<sup>49</sup>. Os efeitos tornam-se mais pronunciados para os materiais contendo glicerol e menos para aqueles contendo PEG, em comparação do nanobiocompósito com o colágeno plastificado de mesma composição. O glicerol parece interagir de maneira mais eficaz com os nanocristais de celulose, o que é comprovado pelo fato do mesmo ter suas propriedades térmicas mais significativamente afetadas pelo método de processamento dos materiais.



**Figura 24:** Curva de TG a) e DTA b) para o nanobiocompósitos Col/NCC/Plastificantes.

## 5.4 Ensaio de Tração

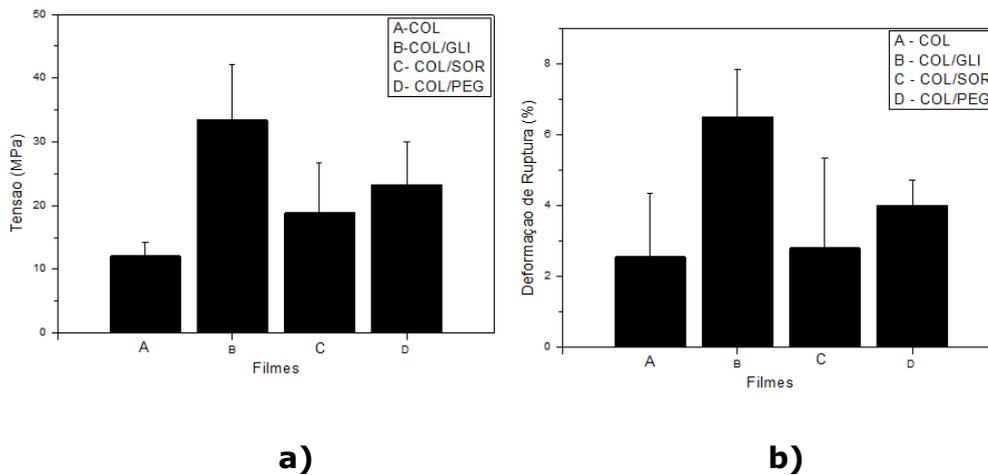
Os resultados obtidos para as amostras dos filmes de colágeno variando os tipos de plastificantes, PEG, sorbitol e glicerol adicionados nos materiais estão mostrado na Figura 25.



**Figura 25:** Curvas tensão-deformação dos filmes de colágeno puro e colágeno plastificado com diferentes aditivos.

Analisando as curvas da Figura 25, pode-se observar que o filme de colágeno puro apresenta a menor tensão e menor deformação em relação aos filmes contendo plastificante. Os resultados obtidos para a tensão e deformação na ruptura das amostras foram agrupados em gráficos de barra que estão mostrados na Figura 26. O valor da tensão de resistência do filme de colágeno puro é de 12 N enquanto os demais filmes ultrapassam o valor de 20N. Já a deformação dos filmes com plastificantes podem chegar até a 6%, quando comparado com os filmes de colágeno puro que apresentam apenas 2,5% de deformação. Isso mostra que os filmes de colágeno puro são menos resistentes e pouco flexíveis. A adição de plastificantes conferiu melhora nas propriedades mecânicas do colágeno.

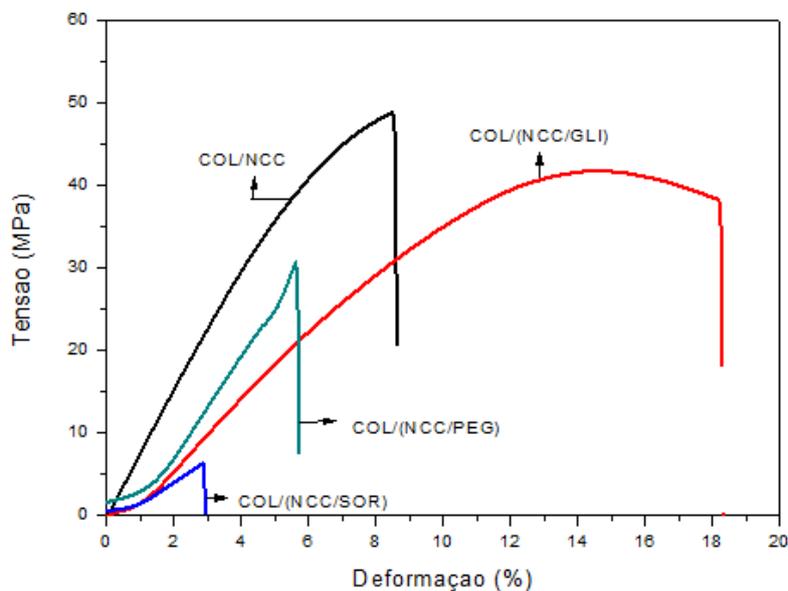
Segundo Mali e colaboradores<sup>50</sup> a presença de plastificantes altera a viscosidade do sistema polimérico uma vez que aumenta a mobilidade molecular e favorece a formação de novas interações químicas. Essas alterações são responsáveis por variações nas propriedades mecânicas e térmicas de polímeros.



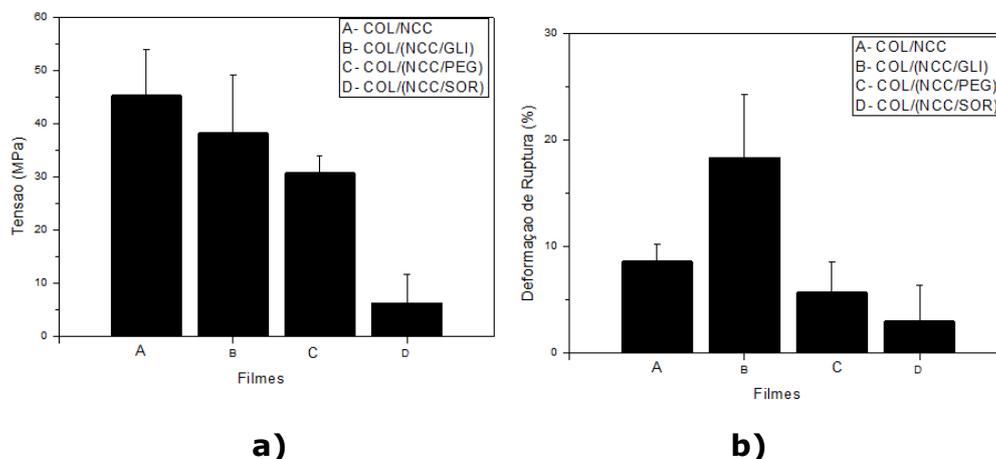
**Figura 26:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos filmes de colágeno e plastificantes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

Como materiais plastificantes utilizaram-se o glicerol, sorbitol e PEG (polietilenoglicol 200) a uma concentração de 10% m/m. Ao comparar os resultados dos ensaios de tração, Figura 26, observa-se que o material adquire maior tensão e deformação com todos os plastificantes, porém entre eles destaca-se o glicerol. O filme de col/gli apresentou aumento em torno de 275% de tensão e 300% na deformação em relação ao filme de colágeno puro. Para o sorbitol apresentou em torno de 160% de aumento na tensão e na deformação e por último o PEG 200 apresentou aproximadamente 160% de aumento na tensão e 172% de aumento na deformação. As diferenças entre os plastificantes estão relacionadas principalmente com suas massas molares. Plastificantes com menor massa molar, como o glicerol, exercem plastificação mais efetiva do que os de maior massa molar. O PEG apesar de ter maior massa molar, apresentou ser um plastificante mais eficiente do que o sorbitol. A estrutura do sorbitol apresenta muitos grupos hidroxilas próximos uns dos outros que podem interagir entre si, formando ligações de hidrogênio entre suas moléculas.

A Figura 27 mostra os resultados do ensaio de tração uniaxial para os nanobiocompósitos col/(NCC/plas). Tais compósitos foram preparados a partir dos nanocristais de celulose dispersos nos diferentes plastificantes.



**Figura 27:** Curvas tensão-deformação dos compósitos de colágeno/(NCC/plastificantes).



**Figura 28:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos compósitos de colágeno/(NCC/plastificante). a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

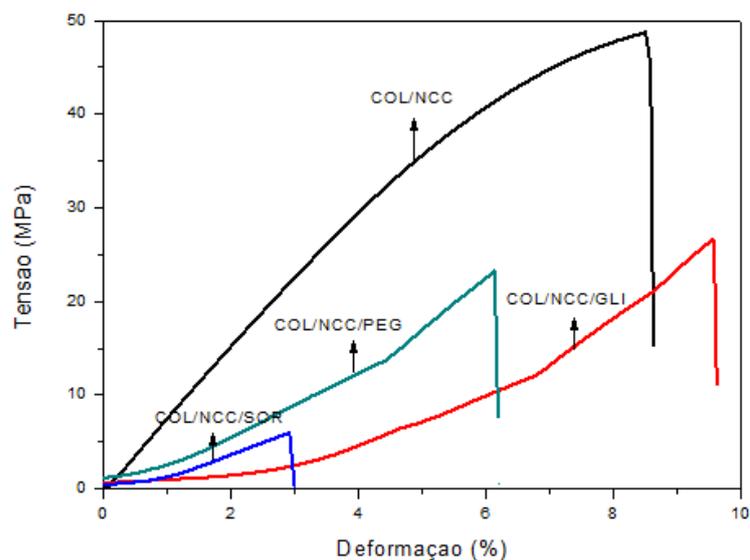
A análise das curvas de tensão em função da deformação permitiu verificar que o filme de colágeno e NCC sem o plastificante possuem maior tensão do que os demais filmes. Na Figura 28 pode-se observar que o valor da tensão é de aproximadamente 45N e a deformação é de 8%. Ao

comparar esses resultados com aqueles mostrados na Figura 25, cujo valor para a tensão do filme de colágeno puro é de 12N e a deformação é de 2%, pode-se inferir que a inserção de nanocristais de celulose no filme de colágeno aumenta a tensão e a deformação do filme tornando-o mais resistente e flexível. Os NCC's atuam principalmente como agente de reforço para o colágeno, além disso são capazes de proporcionar deformação plástica ao polímero.

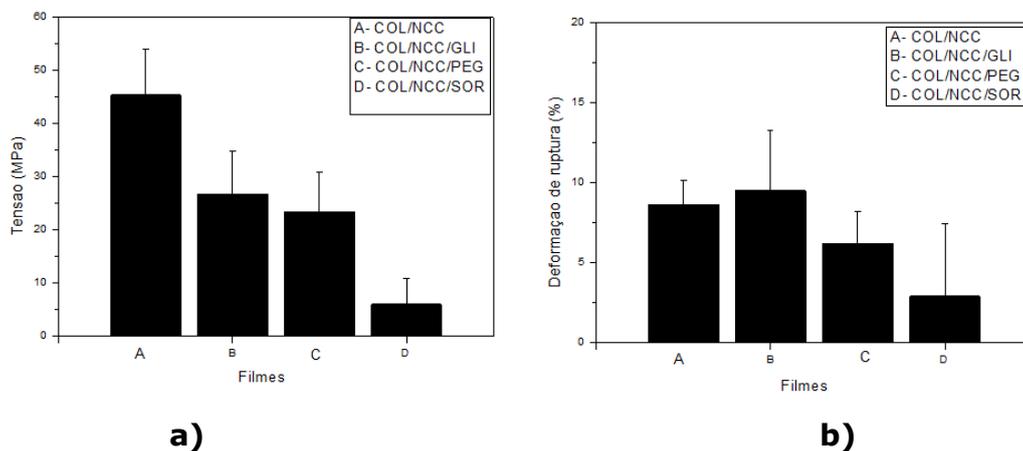
A análise da Figura 28 também permitiu verificar que a adição de plastificante nos nanobiocompósitos, de maneira geral, provocou um aumento na deformação acompanhado de uma diminuição da tensão. Dentre os plastificantes utilizados destaca-se mais uma vez o glicerol. Na Figura 28, observa-se que o gráfico de tensão-deformação para o compósito contendo glicerol, colágeno e NCC é uma curva que possui uma deformação plástica mais acentuada, isto é, o material pode se deformar plasticamente mais do que os outros filmes apresentados, até romper-se. Todos os outros compósitos apresentam características de materiais mais frágeis devido ao fato da deformação plástica ser pequena ou inexistente.

Nos compósitos contendo glicerol houve uma diminuição de 15% na tensão em comparação ao col/NCC tornando o filme menos resistente, acompanhado de um aumento na deformação de 225% conferindo propriedades de um material dúctil. Para o PEG 200 a tensão diminuiu 67% e a deformação diminuiu 34%. Esse fato ocorre porque ao preparar esses compósitos, o NCC foi adicionado primeiramente no plastificante e depois foi adicionado na solução de colágeno. O plastificante pode formar interações com os nanocristais, competindo com aquelas formadas entre esses componentes e a matriz polimérica conforme sugerido pelas análises de FTIR. Em função dessas características, os nanocristais de celulose se comportam como um agente de reforço, mas também potencializam o efeito plastificante. Já os compósitos contendo o sorbitol como plastificante, apresentaram uma diminuição de 87% na tensão e 66% na deformação de ruptura, mostrando assim que tal combinação de aditivos não é apropriada para o sistema.

Em nível de comparação, foram preparados compósitos adicionando diretamente na solução de colágeno o plastificante e os nanocristais de celulose liofilizados. Os resultados do ensaio de tração estão mostrados na Figura 30.



**Figura 29:** Curvas de tração - deformação dos compósitos de colágeno/NCC/plastificantes.

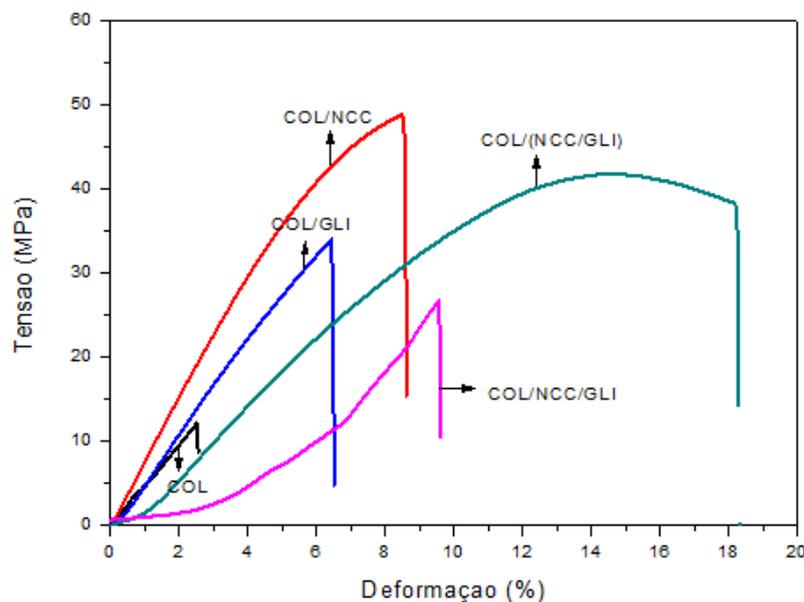


**Figura 30:** Gráficos de barra que representam os principais aspectos do ensaio de tração dos compósitos colágeno/NCC/plastificantes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

Analisando as Figuras 29 e 30, observa-se uma tendência de diminuição da tensão e um aumento na deformação para os

nanobiocompósitos col/NCC/gli em comparação com o sistema col/NCC. Analisando a Figura 30 pode-se verificar o compósito contendo col/NCC/gli apresentou uma diminuição na tensão de 58% e um aumento de 110% na deformação, no compósito com PEG houve uma diminuição de 53% na tensão e a deformação diminuiu 70% e finalmente no compósito com o sorbitol, a tensão diminuiu cerca de 86% e a deformação diminuiu 34%. Ao comparar os resultados, verifica-se que os valores de tensão dos nanobiocompósitos anteriores foram maiores e os valores de deformação (%) são muito diferentes. Isso mostra que os compósitos anteriores possuem maior resistência e os valores de deformação variam segundo o modo de processamento e o plastificante utilizado.

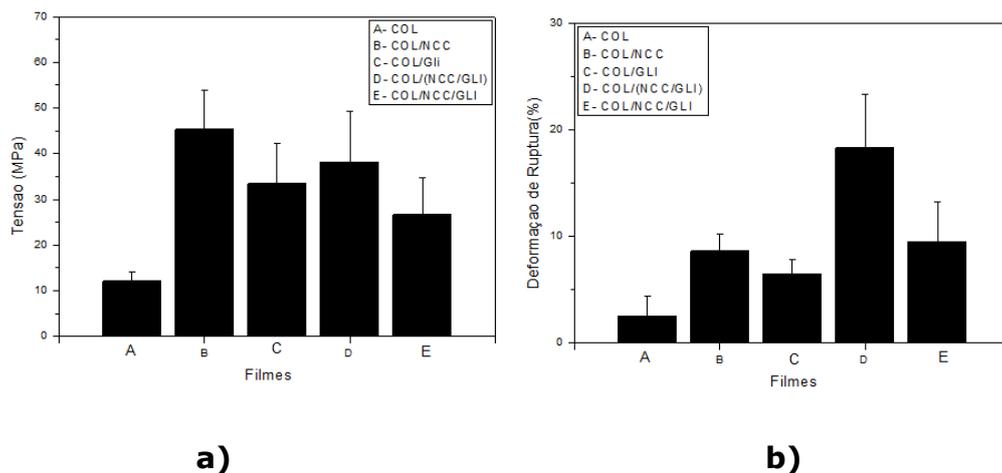
A Figura 31 agrupa as curvas dos compósitos preparados com o glicerol e NCC com diferentes formas de processamento bem como o colágeno com o plastificante ou com NCC apenas.



**Figura 31:** Gráfico de tensão-deformação dos nanobiocompósitos plastificados com glicerol, apenas contendo NCC do polímero puro.

Nas Figuras 30 e 31, se observa que o colágeno puro é o que possui menor tensão e menor deformação de ruptura. Conforme já foi discutido, ao

se adicionar o glicerol no colágeno, o plastificante proporciona aumento na tensão e na deformação de ruptura. A análise da curva do colágeno com NCC permite verificar, que os valores de tensão e de deformação aumentaram em relação à curva de colágeno puro e pode-se sugerir que a adição de plastificante neste caso torna-se desnecessária. Uma vez que ocorre a adição do material de reforço ao colágeno é esperado que o filme ofereça maior resistência à deformação que o colágeno puro.



**Figura 32:** Gráficos de barra que representam os aspectos do ensaio de tração dos principais filmes. a) Gráfico de barra da Tensão (N). b) Gráfico de barra da Deformação de Ruptura (%).

Analisando as curvas do ensaio de tração e os gráficos de barra, é possível verificar que o compósito col/(NCC/gli) possui maior tensão e maior deformação que o compósito col/NCC/gli. A tenacidade foi significativamente alterada, sendo maior para o primeiro tipo de nanobiocompósitos. Ao comparar os compósitos formados por colágeno, glicerol e NCC, observa-se que o modo de processamento dos materiais influenciou nas propriedades mecânicas dos mesmos. O perfil da curva obtido para o grupo de nanobiocompósitos col/NCC/gli provavelmente está associada à separação de fases conforme mostrado no MEV.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho objetivou o estudo da influência do processamento nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos nanobiocompósitos de colágeno e nanocristais de celulose. A análise dos resultados de caracterização estrutural, morfológica, térmica e mecânica dos compósitos obtidos permitiu se chegar às seguintes conclusões:

- 1) As imagens obtidas por MEV sugeriram a homogeneidade de dispersão do plastificante na amostra e foi possível verificar a influência do processamento com o modo de fratura das amostras.
- 2) A análise por FTIR permitiu verificar a integridade estrutural da molécula de colágeno comprovada pela existência de tripla hélice. Também foi possível verificar através da intensidade relativa e dos deslocamentos das bandas nas regiões de deformação N-H alterações nas interações intermoleculares do colágeno.
- 3) Analisando a estabilidade térmica dos compósitos foi possível concluir que a adição de nanocristais de celulose à matriz de colágeno acrescentou estabilidade aos compósitos. O NCC provavelmente se comportou como barreira para impedir a transferência de calor no sistema.
- 4) Nos ensaios de tração verificou-se que nos compósitos formados houve um aumento na resistência do material em relação ao filme de colágeno puro. Também foi possível relacionar a influência do modo de processamento do nanobiocompósito com a melhoria nas propriedades mecânicas.

O colágeno e os nanocristais de celulose são capazes de se interagir quimicamente. Tal interação permite que a carga adicionada atue como um bom agente de reforço para o colágeno. A adição de glicerol plastifica o colágeno principalmente quando o mesmo está na presença dos NCC. O modo como os aditivos são incorporados, influencia no comportamento dos mesmos como carga de reforço ou agentes de plastificação. A potencialização do efeito plastificante do

glicerol quando o NCC é previamente disperso no mesmo se dá devido ao tipo de interação preferencial formado entre esses componentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva, J. D; D'Almeida, O. L.M.; *Cellulose whiskers*. Peer-Reviewed Article. V. 70, p. 34 – 52. Julho 2009.
2. Eichhorn. S. J. *Nanowhiskers cellulose: materiais promissores para aplicações avançadas*. 2011. V. 7. p. 303-315.
3. Silva, R.; Haraguchi, K. S.; Muniz. C. E.; Rubira, F. A. *Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos*. Química Nova. v. 32 n. 3, p. 661-671, 2009.
4. Mesquita, J. P.; Donnici, C. L.; Pereira, F.V. *Biobased nanocomposites from layer-by-layer assembly of cellulose nanowhiskers with chitosan*. Biomacromolecules v. 11, p. 473–480, 2010.
5. Samir, A. S.A., Alloin F., Dufresne, A., *Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field*. Biomacromolecules. V 6. p. 612 -626, 2005.
6. Liu, Y.; He, L.; Song, H.; Gao, C. *Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth*. Journal of biomedical materials. v. 81, n.3, p. 692-704, 2006
7. John, M. J., Thomas, S., *Biofibres and biocomposites*. Carbohydrate Polymers. V.71, p. 343- 364, 2008.
8. Langmaier, F.; Mokrejs, P.; Kolomaznik, K.; Mladek, M. *Plasticizing collagen hydrolysate with glycerol and low-molecular weight poly(ethylene glycols)*. Thermochemica Acta .n . 469 , p. 52–58, 2008.
9. Li, Q.; Zhou, J.; Zhang, L. *Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers*. Journal of Polymer Science; Part B; Polymer Physics. 2009. V. 47, p 1069 – 1077.
10. Dufresne, A. *Processing of Polymer Nanocomposites Reinforced with Polysaccharide Nanocrystals*. Molecules. V.15, p. 4111 – 4128, 2010.

11. Wang, B.; Sain, M. *Dispersion of soybean stock – based nanofibers in a plastic matrix. Polymer International.* n. 56, p. 538-546, 2007.
12. Mu, C.; Liu, F.; Cheng, Q.; Li, H.; Wu, B.; Zhang, G.; Lin, W.; *Collagen cryogel cross- linked by dialdehyde starch. Macromolecular Materials and Engineering.* n 195, p. 100-107, 2010.
13. Vulcani, V. A. S., *Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona, in Bioengenharia.* 2004. Universidade de São Paulo: São Carlos.
14. Silva, E. E.; *Síntese e Aplicação de nanotubos de carbono em biotecnologia.* 2007. Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais.
15. Friess, W. *Collagen – biomaterial for drug delivery.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics . n.45, p. 113–136, 1998.
16. Horn, M. M. *Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico.* 2008. Universidade de São Paulo: São Paulo.
17. Goissis, A. P. A. *Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura: Atividade metabólica.* 2007. Universidade Federal de São Carlos: São Paulo.
18. Rodrigues, V. *Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos.* 2009. Universidade de São Paulo: São Paulo.
19. Sena, A. L. *Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita – colágeno para aplicações biomédicas.* 2004. Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro.
20. Sperling. L. H. *Introduction to physical polymers science,* ed 4. 2004.
21. Mano, E. B., *Polímeros como materiais de engenharia,* ed. 3. 2003.

22. Shimazu, A. A. ,Mali, S. , Grossmann, M. V. E. , *Plasticizing and antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol on biodegradable cassava starch films*. Ciências Agrárias. 2007. V. 28. p. 79-88.
23. Madaleno, E. , Pedrozo. T. , Rosa, D. S. , Zawadzki, S. F. , Ramos, L. P. , *Study of the use of plasticizers from renewable sources in PVC compositions*. Polímero: Ciência da Vida. 2009. V. 19. p. 263-279.
24. Tonhi, E.; Plepis, G. M. A. *Obtenção e caracterização de blendas colágeno – quitosana*. Química Nova. v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
25. Drummond, A. L., *Compósitos poliméricos obtidos a partir do óleo de bauru – Síntese e Caracterização*. 2008. Universidade Federal de Brasília : Brasília.
26. Jones, R.M., *Mechanics of Composite Materials*, ed. 2. 1999.
27. Hull, D. and T.W. Clyne, *A Introduction to Composite Materials*, ed. 2. 1996, Nova York.
28. John, M. J., Thomas, S., *Biofibres and biocomposites*. Carbohydrate Polymers. V.71, p. 343- 364, 2008.
29. Castro, D. O. *Biocompósitos a partir de biopolietileno de alta densidade reforçado por fibras de carauá*. 2010. Universidade de São Paulo: São Paulo.
30. Teixeira, E.d.M., *Utilização de Amido de Mandioca na Preparação de Novos Materiais Termoplásticos*, in *Ciência*. 2007. Universidade de São Paulo: São Carlos.
31. Patricio, P. S. O.; Ferreira, P. M. M.; Oliveira, A. C. L.; Pereira, F. V. *Nanobiocompósito de filmes automontados de colágeno hidrolisado com nanowhiskers de celulose*. Congresso Brasileiro de Polímero, 2009.
32. Silverstein, R. M. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. P.490.
33. Canevarolo, S. V. J. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2007. P.448.

34. Wendhausen, P. A. *Análises Térmicas*. Santa Catarina: UFSC, 2002.
35. Skoog, D. A. West, D. D. Holler, F. J. *Analytical Chemistry*. 6 ed. Florida: Saunders College Publishing, 1983. p. 561-585.
36. Aouada, F. A., *Síntese e caracterização óptica, morfológica e mecânica de hidrogéis de poliacrilamida com material eletro óptico confinado: polímero condutor e cristais líquidos*. 2005. Universidade Estadual de Maringá : Maringá.
37. Pacheco, A., *Propriedades mecânicas dos materiais*. 2006.
38. Mascia, N. T., *Tração, Compressão e Lei de Hooke*. 2006. Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
39. Sordi, V. L., *Ensaio de tração*. 2008.
40. Oréface, R. L., Pereira, M. D. M and H.S. Mansur, *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*, ed. C. Médica. 2006, Rio de Janeiro.
41. Pedroso. M.G. V. *Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA*. 2009. Universidade de São Paulo: São Carlos.
42. Di, Y.; Heath, R. J. *Collagen: stabilization and modification using a polyepoxide, triglycidyl isocyanurate*. *Polymer degradation and stability*. v. 94, n. 10, p. 1684-1692, 2002.
43. Sionkowska, A. *Modification of collagen: films by ultraviolet irradiation*. *Polymer degradation and stability*. v. 68, n. 2, p.147-151, 2000.
44. Figueiro. S. D., Mallman. E. J. J., Góes. J. C., Ricardo. N. M. P. S., Denardin. J. C., Sombra. A. S. B., Fachine. P. B. A. *New ferrimagnetic biocomposite film based in collagen and yttrium iron garnet*. 2010. V 4. Nº 12. p. 790-797.
45. Nogueira. F.G.E., Prado. N. T., Oliveira. L. C. A., Bastos. A. R. R., Lopes. J. H., Carvalho. J.G. *Incorporation of mineral phosphorous and potassium on leather waste (collagen): A new N-collagen PK-fertilizer with slow liberation*. *Journal of Hazardous Materials*. 2010. p. 374-380.
46. Castiello. D., Chiellini. E., Cinelli. P., D'antone. S., Puccini. M, Salvadori. M., Seggiani. M. *Polyethylene collagen hydrolyzate*

- thermoplastic blends: a new reutilization route to transform a waste of the leather industry into environmentally degradable plastics*. Journal of Applied Polymer Science. 2009. V. 114. p. 3827-3834.
47. Andreucetti. C., Carvalho. R. A., Grosso. C. R. F. *Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films*. Food Research International. 2009. p. 1113-1121.
48. Vieira. M. G. A., Silva. M. A., Santos. L. O., Beppu. M. M. *Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review*. European Polymer Journal. 2011. p. 254-263.
49. Ten. E., Turtle. J., Bahr. D., Jiang. L., Wolcott. M. *Thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhiskers composites*. Polymer. 2010. p. 2652-2660.
50. Shimazu, A. A. ,Mali, S. , Grossmann, M. V. E. , *Plasticizing and antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol on biodegradable cassava starch films*. Ciências Agrárias. 2007. V. 28. p. 79-88.
51. Dai. N. T., Yeh. K. M., Chiang. H. C., Chen. C. K. *Human single donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer*. Biochemical and biophysical research communications. 2009. p. 21-25.
52. Orts, W.J; Shey, J.; Syed, H. I.; Glenn, G. M.; Guttman, M.E.; Revol, J.F. *Application of cellulose microfibrils in Polymer nanocompósito*. Journal of Polymers and the Environment . v13. n 4 , 2005.
53. Siqueira, G.; Abdillahi, H.; Bras, J.; Dufresne, A. *High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from syngonanthus nitens (capim dourado)*. Cellulose. V. 17, p. 289-298, 2010.
54. Paula, Everton L.; Taroni, Carla B.; Abrantes, Luciana P.; Mano, Valdir; Pereira, Fabiano V.. *Preparation of a bionanocomposite based on poly(D, L – lactide) and cellulose nanowhiskers*. XII International Macromolecular Colloquium.
55. Gutterres, M. *Tendências emergentes da indústria do couro*. 2005.

56. Shoulders ,D. M.; Raines, T. R. *Collagen structure and stability*. Biochemical. n. 78, p. 928-957, 2009.
57. Tanobe, V.; Mochnaz, S.; Mazzaro, I.; Sydenstricker, D. H. T.; Amico, C. S. *Caracterização de biocompósitos poliéster/luffa cilíndrica ou sisal*. Congresso anual da ABM.
58. Belbachir, K.; Noreen, R. Gouspillou, G. Petibois, C. *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy*. Bioanalytical Chemistry. n. 395, p. 829-837, 2009.
59. Evora, C. M.; Gonzalez, L. O.; Dutra, C. L. R.; Diniz, F. M.; Wiebeck, H. Silva, A. G. L. *Comparação de técnicas FTIR de transmissão reflexão e fotoacústica na análise de poliamida -6, reciclada e irradiada*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v. 12, n. 1, p. 60-68, 2002.
60. Chinaglia, C . R. , Clever R. C., Carlos, A. *Análise de falhas em materiais através de técnicas avançadas de microscopia*. *Polímeros: Ciência da Vida*. 1997. V. 7. p. 19-23.

