



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

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIONANOCOMPÓSITOS DE COLÁGENO E
WHISKERS DE CELULOSE**

Camila Silva Brey Gil

Belo Horizonte-MG

2010



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

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIONANOCOMPÓSITOS DE COLÁGENO E
WHISKERS DE CELULOSE**

Camila Silva Brey Gil

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. Dr. Ildfonso Binatti

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Santiago de Oliveira Patrício
Doutora em Química – UNIFEI

Prof. Dr. Patterson Patricio de Souza
Doutor em Química – CEFET-MG

Prof^º Dr. Ildfonso Binatti
Doutora em Química – CEFET-MG

Monografia aprovada em de de 2010

Belo Horizonte-MG

2010

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado por estar sempre presente em minha vida e por colocar em meu caminho pessoas que me ajudaram e as quais hoje eu posso agradecer.

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos, incentivos, amor e atenção dedicados a mim. À minha irmã pela proteção e carinho e a minha família por ser meu alicerce e fonte de inspiração.

Ao meu orientador, Dr. Ildefonso Binatti, por sua confiança e ensinamentos.

Ao professor Dr. Patterson Patrício pela oportunidade, incentivo, apoio e por estar sempre presente para me ouvir.

À professora Dr^a. Patrícia Santiago por toda ajuda, conhecimento transmitido e boa vontade.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCOM) e ao Dr. Rodrigo Lambert Oréfice por abrirem as portas para mim e me acolherem no desenvolvimento desse projeto.

Ao CEFET-MG e a todos os professores pelos ensinamentos e oportunidades.

À Meriane, obrigada por todas as horas gastas comigo, por estar presente em todo o trabalho e por tudo que fez por mim.

A minha família EJC e ao meu amigo Igor, fundamentais em tudo que possa me acontecer.

A todos os meus amigos do CEFET, à Cris pelos ótimos momentos e a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O colágeno é amplamente utilizado em aplicações farmacêuticas e médicas, tais como em implantes, enxertos e tecidos artificiais. O compósito de colágeno pode apresentar propriedades de grande interesse biomédico: baixa toxicidade, alta capacidade de suporte estrutural, alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada e biocompatibilidade [1-3]. Neste trabalho foram desenvolvidos bionanocompósitos de colágeno e whiskers de celulose, com composições de 0%, 0,5%, 1%, 3% e 5% de whiskers sobre a massa de colágeno (m/m). Estudou-se a interação entre a matriz de colágeno e os whiskers analisando-se espectros na região do infravermelho, estabilidade térmica das matrizes pela análise termogravimétrica e propriedades mecânicas pelo ensaio de tração. Observou-se que a adição de whiskers ao colágeno não alterou significativamente seu espectro na região do infravermelho, a análise do espectro nos permitiu confirmar a integridade das fibras de colágeno e mostrou que a estrutura do colágeno permanece íntegra. Na análise térmica, a adição de whiskers de celulose à matriz colagênica não acrescentou estabilidade térmica ao material. Pelo ensaio de tração verificou-se uma modificação nas propriedades mecânicas do colágeno, aumentando a resistência à tração nos compósitos. Neste trabalho foi possível a produção de bionanocompósitos de colágeno e whiskers de celulose, assim como a caracterização desses materiais.

Palavras-chave: Colágeno; Compósitos; Whiskers de Celulose.

ABSTRACT

Collagen is widely used in medical and pharmaceutical applications such as implants, grafts and artificial tissues. The composite of collagen may have properties of great biomedical interest: low toxicity, high capacity for structural support, high tensile, controlled biodegradability and biocompatibility. In this work were developed collagen bionanocomposites and cellulose whiskers, with compositions of 0%, 0,5%, 1%, 3% e 5% of whiskers on the mass of collagen (m/m). We studied the interaction between the collagen matrix and the whiskers analyzing spectra in the infrared region, thermal stability of the arrays by thermal gravimetric analysis and mechanical properties by tensile test. It was observed that the addition of whiskers to collagen did not change in the infrared spectrum, spectrum analysis has allowed us to confirm the integrity of collagen fibers and showed that the structure of collagen remained intact. In thermal analysis, the addition of cellulose whiskers to collagen matrix did not include thermal stability to the material. For the tensile test, there was a change in the mechanical properties of collagen, increasing the tensile strength in the composites. This work was possible bionanocompósitos production of collagen and cellulose whiskers as well the characterization of these materials.

Keywords: Collagen; composites, Cellulose whiskers

LISTA DE ABREVIATURAS

CNW's – Nanowhiskers de Celulose

Gly – Glicina

Pro – Prolina

Hyp – Hidroxiprolina

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

TPS – Termoplásticos

PS – Plastificado

Wh – Whiskers

Tg – Termogravimetria

FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier

NTC – Nanotubos de Carbono

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1: Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Seqüência primária de aminoácidos (cadeia peptídica); (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Estrutura quaternária (Microfibrilas).

Figura 2: A Hidrólise ácida ataca a região amorfa permitindo a formação de nanocristais de celulose de alta pureza.

Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão, imagem do CNW's obtido a partir do eucalipto.

Figura 4: Diagrama esquemático de um sistema de ensaio mecânico e corpos de prova de tração.

Figura 5: Corpo de prova de tração feito a partir de filmes de colágeno e Whiskers.

Figura 6: Ensaio de tração. a) alongamento do corpo de prova b) Momento de ruptura do corpo de prova.

Figura 7: Colágeno cedido pela Universidade Federal de Lavras

Figura 8: Espectros na região do Infravermelho para o colágeno e os compósitos com Whiskers.

Figura 9: Espectros na região do Infravermelho para o colágeno e os compósitos evidenciando as bandas características da deformação N-H em amidas.

Figura 10: Curvas termogravimétricas das amostras de colágenos e seus compósitos.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Composições em massa utilizadas no preparo dos filmes.

Tabela 2: Intensidade relativa das bandas nas regiões de deformação N-H

Tabela 3: Perda de massa dos materiais nos estágios 1 e 2 e porcentagem de resíduos à 600°C.

Tabela 4: Resultados obtidos no ensaio de tração das amostras de colágeno e compósitos com whiskers.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS.....	v
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	vi
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Objetivos	10
1.1.1 Objetivo Geral	10
1.1.2 Objetivos Específicos.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Colágeno	10
2.2 Whiskers de Celulose	12
2.3 Compósitos	14
2.4 Método de Caracterização dos Materiais	16
2.4.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho	16
2.4.2 Análise Térmica.....	17
2.4.3 Ensaio de Tração	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Preparo da solução de colágeno	19
3.2 Determinação da concentração de colágeno.....	20
3.3 Preparo dos compósitos.....	20
3.4 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho	21
3.5 Análise Térmica.....	21
3.6 Ensaio de Tração	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho	22

4.2	Análise Térmica.....	24
4.3	Ensaio de Tração.....	26
5.	CONCLUSÃO.....	27
6.	REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é amplamente utilizado na área biomédica devido às suas diversas características distintas das dos polímeros sintéticos, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade [1]. Esse material pode ser usado como tecidos artificiais, materiais para implante, revestimento de feridas e enxertos, além de aplicações na odontologia e farmacologia [2, 3]. Para atender a grande parte dessas aplicações o colágeno natural é misturado a outros materiais corroborando propriedades de interesse de e melhorando então suas características biológicas, físicas e químicas a partir da obtenção de materiais compósitos [1, 3].

Os compósitos são por definição uma agregação de dois materiais distintos para a formação de um novo material que combine as propriedades desejadas dos seus componentes [4]. Nos compósitos poliméricos, em geral, o polímero funciona como matriz, fase contínua e adiciona-se geralmente uma carga, fase dispersa. Os nanowhiskers de Celulose são obtidos a partir do processamento do biopolímero mais abundantes na natureza, a celulose e vêm sendo usado como cargas. Dentre as vantagens pode se destacar o menor custo em relação a outras cargas inorgânicas, a biodegradabilidade e a biocompatibilidade [5].

Os compósitos de colágeno, tais como os compósitos com adição de nanotubos de carbono, podem apresentar propriedades de grande interesse biomédico: baixa toxicidade, alta capacidade de suporte estrutural, alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada e biocompatibilidade [1-3].

Neste trabalho estudaremos a formação de um bionanocompósito de colágeno e Nanowhiskers de Celulose (CNW's) que atuam como um possível reforço à matriz de colágeno. Além das propriedades mecânicas, a carga foi introduzida com o intuito de aumentar a mucoadesividade do material para possíveis aplicações como veículo para liberação de drogas. Tal propriedade está ligada aos grupos sulfatos dos CNW's.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar bionanocompósitos de colágeno e whiskers de celulose.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Dispersar os whiskers de celulose na matriz de colágeno;
- 2) Verificar a influência da adição de whiskers de celulose na estrutura do colágeno analisando possíveis interações entre a matriz colagênica e o material de reforço;
- 3) Comparar a estabilidade térmica dos compósitos formados à estabilidade térmica do colágeno puro;
- 4) Avaliar a resistência mecânica das diferentes concentrações de compósitos produzidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Colágeno

O colágeno é uma proteína abundante presente em organismos animais sendo o principal elemento fibroso da pele, dentes, ossos e tendões. Compõe um terço da massa total de proteína nos seres humanos e exerce ação de suporte na estrutura geral dos tecidos, formando fibras insolúveis com alta força de sustentação. [4-6].

As fibras colágenas são alongadas e paralelas, elas são formadas a partir de moléculas de colágeno que são inicialmente sintetizadas como pró-colágenos e após a secreção para o meio extracelular elas são clivadas por enzimas conhecidas como colagenases. As moléculas formadas pela clivagem se polimerizam e formam fibrilas que se agregam para constituir as fibras colágenas. [6, 7]. De acordo com a especificidade dos tecidos e suas propriedades, as cadeias de colágeno se combinam produzindo diferentes formas de fibras para se adequar a finalidade proposta [4, 6].

O colágeno possui específicos tamanhos, estrutura e seqüência de aminoácidos[8]. São conhecidos até hoje pela literatura 28 tipos de colágeno constituídos por pelo menos 46 cadeias polipeptídicas diferentes[5]. Essas variações do colágeno são de grande importância, pois conferem diferentes características para os vários tipos de tecido do corpo. Estudos a respeito da estrutura química dos tipos de colágeno nos permitem afirmar que o colágeno compreende moléculas geneticamente distintas que possuem em comum uma configuração única de tripla hélice de três subunidades polipeptídicas (Figura 1b) [9].

O colágeno tipo 1 é o mais conhecido química e estruturalmente, sendo o tipo utilizado neste trabalho. Ele tem se destacado pela sua abundância e pela sua importância na manutenção da resistência mecânica dos ossos[5, 8]. A estrutura primária do colágeno tipo 1 é formada pelo tripleto Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hyp) (Figura 1a) que conferem ao arranjo grande resistência às forças de tensão. 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 seqüência. [4, 8, 9].

Essa unidade básica do colágeno tipo 1 é conhecida como tropocolágeno, uma tripla hélice formada por duas cadeias iguais denominadas $\alpha 1$ e uma homóloga, mas diferenciada $\alpha 2$. O tropocolágeno tem a forma de um bastão, com comprimento aproximado de 300nm e diâmetro de 1,5 nm (Figura 1c) [8, 10].

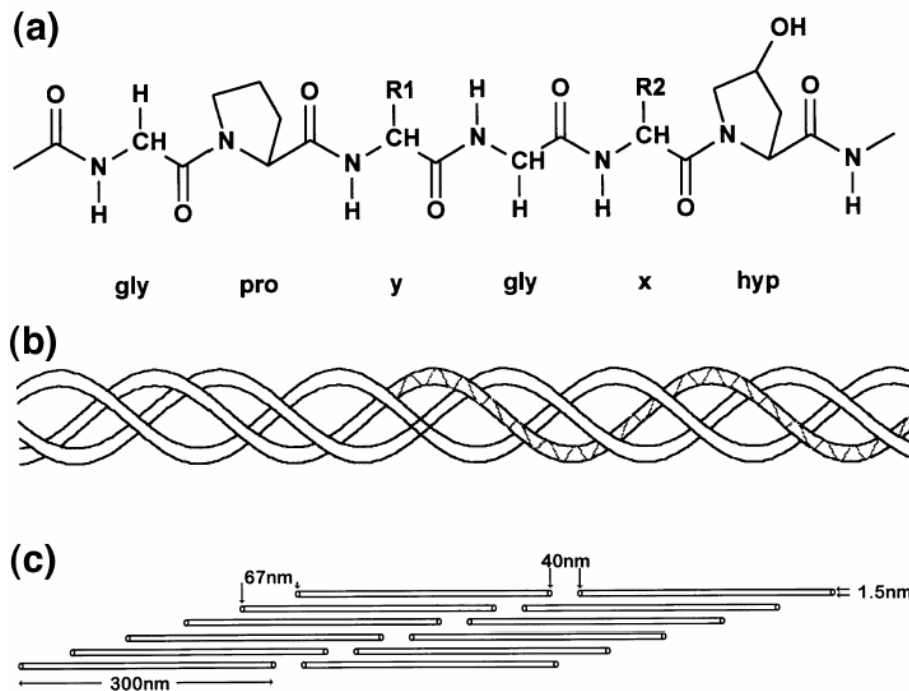


Figura 1: Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Seqüência primária de aminoácidos (cadeia peptídica); (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Estrutura quaternária (Microfibrilas) [9].

2.2 Whiskers de Celulose

O aumento do uso de biopolímeros abundantes na natureza é um dos motivos que levaram ao crescimento do número de pesquisas envolvendo a utilização de partículas nanométricas como material de reforço[11]. Além de modificarem as propriedades para o material ao qual elas serão adicionadas, essas partículas nanométricas encontram a seu favor o fator econômico, uma vez que podem ser preparadas a partir de uma grande variedade de fontes naturais[12]. Dois exemplos desses materiais de reforço são os nanotubos de carbono e os nanocompósitos de celulose, também conhecidos pela literatura como Nanowhiskers de Celulose, sendo o material de reforço utilizado nesse trabalho.

Os Whiskers de Celulose são nanopartículas cristalinas de fibras celulósicas em forma de bastão e isoladas por hidrólise ácida. Se comparados aos materiais inorgânicos os CNW's apresentam as vantagens de formarem nanocompósitos renováveis, de baixo custo, baixa densidade,

facilidade de processamento, natureza abrasiva e propriedades mecânicas altamente específicas[11, 12].

As fibras resultantes do arranjo das moléculas de celulose são compostas por microfibrilas que são constituídas de regiões cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas são altamente ordenadas, já as regiões amorfas são caracterizadas por sua desordem e por serem resultado da má formação da estrutura[13]. Os CNW's crescem em condições de hidrólise ácida controlada, que destrói regiões amorfas da fibra de celulose, permitindo a formação de cristais individuais de alta pureza (Figura 2). A fonte de celulose e as condições de hidrólise irão interferir nas dimensões dos CNW's. A sua estrutura ordenada pode conferir além de resistência outras propriedades aos materiais, tais como elétrica, óptica, magnética, ferromagnética, dielétrica e de condutividade[12, 14].

A Figura 3 mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos nanowhiskers de celulose extraídas a partir do eucalipto. A imagem é de uma suspensão diluída (0.01%) e mostra alguns nanocristais individuais juntos lateralmente agregados a cristallitos elementares. O aparecimento destes agregados é altamente esperado devido à alta área específica e fortes ligações de hidrogênio estabelecidas entre os whiskers. A partir de várias imagens da TEM, os valores médios do comprimento (L) e diâmetro (D) do nanowhiskers isolados foram determinados em 145 ± 25 nm e $6 \pm 1,5$ nm, respectivamente, dando uma razão de aspecto (L / D) de em torno de 24.

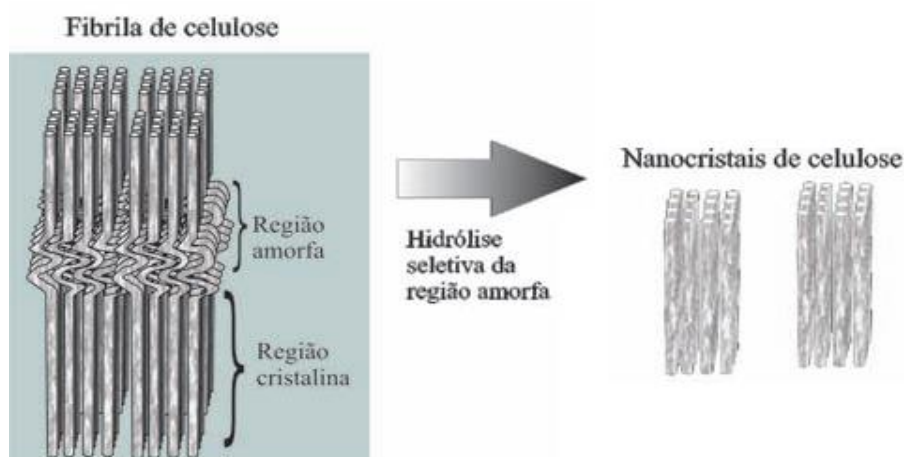


Figura 2. A Hidrólise ácida ataca a região amorfa permitindo a formação de nanocristais de celulose de alta pureza. Adaptada da ref.[15]

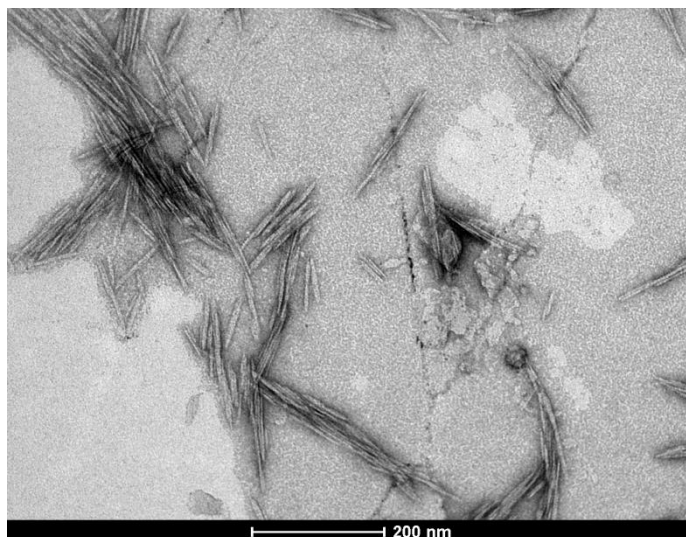


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão, imagem do CNW's obtido a partir do eucalipto.

Os CNW's são um assunto que vem sendo amplamente investigado, entretanto, ainda não foi encontrado para esse material alguma aplicação industrial. Por se tratar de um assunto recente, várias pesquisas estão sendo realizadas a fim de solucionar alguns fatores e aprofundar nas características do material[11].

Samir e colaboradores (2005) cita a utilização dos whiskers de celulose como modelo de material celulósico geometricamente e estruturalmente bem definido e cita importantes aplicações: A primeira utiliza cristais líquidos solidificados para aplicações ópticas em papéis de segurança. A segunda relaciona o uso dos whiskers como reforço mecânico para polieletrólitos de baixa espessura em baterias de lítio.

Este trabalho propõe a utilização dos CNW's como material de reforço para matrizes de colágeno formando um biocompósito com possível aplicação biomédica.

2.3 Compósitos

Os compósitos são sistemas constituídos de dois ou mais tipos de materiais diferentes que se combinam para formar um terceiro material de melhor desempenho. A cada dia ganham maior importância tecnológica e,

de um modo geral, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à possibilidade de se combinar as vantagens de diferentes materiais[4, 8].

Os materiais nos quais são feitos os compósitos são usualmente classificados como matriz e reforço. O material matriz proporciona estrutura ao compósito, ele preenche os espaços vazios que ficam entre os materiais reforços e os mantém em suas posições relativas. O material reforço é aquele que proporciona variação das propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo [4]. O reforço utilizado pode ser encontrado na forma de partículas, flocos, whiskers, fibras contínuas ou curtas e folhas[16].

As vantagens dos compósitos é que suas propriedades agregam as melhores qualidades dos materiais que os constituem e também propriedades intermediárias decorrentes da formação de uma região interfacial. É necessário combinar os componentes certos para que os compósitos obtidos apresentem as propriedades desejadas, entretanto, escolher a composição de um compósito para uma aplicação particular não é uma tarefa simples[17, 18]. Torna-se importante conhecer as possíveis mudanças na microestrutura da matriz com a adição do reforço para evitar efeitos secundários e melhorar a combinação de propriedades[18].

Algumas características mecânicas dos compósitos são apenas modificações do comportamento convencional dos materiais utilizados na engenharia, já outras são completamente novas. Os materiais mais comumente utilizados na engenharia apresentam caráter homogêneo e isotrópico, ou seja, são uniformes em toda sua extensão suas propriedades independem da posição e orientação do material. Em contrapartida, os compósitos são em sua maioria heterogêneos e anisotrópicos, portanto, não são uniformes e suas propriedades dependem da posição e orientação do material[16, 17].

Dentro da definição de compósitos podemos encontrar também os biocompósitos que se diferem por ser a união de um reforço a uma matriz natural biodegradável enquanto que os demais compósitos são produzidos pela união de um reforço a uma matriz não-biodegradável que tem sua biodegradabilidade aumentada em virtude da fibra natural (reforço). Neste

trabalho ocorre a formação de um biocompósito ao misturarmos as propriedades dos CNW's à matriz de colágeno. Apesar de tanto os compósitos quanto os biocompósitos serem ambientalmente corretos, os biocompósitos são totalmente biodegradáveis não fornecendo prejuízos ao meio ambiente ao final de sua vida útil [15, 19].

Atualmente vários trabalhos vêm sendo feitos com a finalidade de avaliar a utilização dos compósitos em diferentes áreas, materiais de reforços como os CNW's estão sendo estudados para um melhor aprofundamento das características finais do compósito formado. Teixeira (2007) utilizou os CNW's como reforço para Amidos Termoplásticos (TPS). Nesse trabalho a principal contribuição das nanofibras foi na redução da absorção de água pelos TPS e o efeito reforço foi limitado pela presença de açúcares decorrentes da hidrólise ácida do amido residual [20].

O trabalho proposto por Lu e colaboradores (2005) forma Biocompósitos utilizando cristais de celulose extraídos de sementes de algodão como reforço para amido plastificado (PS). Comparados aos filmes de PS puros observou-se que os biocompósitos formados sofreram um aumento no módulo de Young (módulo de elasticidade) e na resistência à tração, com a concentração do material reforço estando entre 0 e 30%. Observou-se que concentrações superiores a 30% do material reforço na matriz formam biocompósitos com maior resistência a água. Essa melhoria no desempenho do material pode ser atribuída às interações intermoleculares na forma de ligação de hidrogênio entre as fibras e entre as fibras e a matriz de PS [21].

2.4 Método de Caracterização dos Materiais

2.4.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho

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[10].

A técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é baseado na absorção da radiação infravermelha por transições vibracionais em ligações covalentes das biomoléculas presentes. As intensidades das absorções de infravermelho fornecem informações quantitativas sobre o conteúdo da amostra, a natureza das ligações moleculares e sua estrutura. Os dados de absorção coletados são expressos em um gráfico de ordenada em porcentagem de transmitância ou absorvância e abcissa em número de onda. Uma vantagem do FTIR é que seu espectro pode ser obtido em poucos segundos[10, 22].

2.4.2 Análise Térmica

A análise térmica consiste em um grupo de técnicas, através das quais uma propriedade física de um material é avaliada em função da temperatura durante uma programação de tratamento térmico [23].

As técnicas utilizadas para análise térmica podem avaliar propriedades como: massa, temperatura, entalpia e dimensão. Uma análise termogravimétrica é uma forma de análise térmica em que a massa de uma amostra em atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta[24].

2.4.3 Ensaio de Tração

O ensaio de tração permite avaliar o comportamento do material sob carga de tração estática ou lentamente aplicada. A Figura 4 se refere a um sistema de ensaio mecânico onde uma parte móvel da máquina se move alongando a amostra e aplicando sobre a mesma uma força correspondente [23]. Para realizar o ensaio de tração os filmes preparados foram cortados com um molde formando assim os corpos de prova (Figura 5).

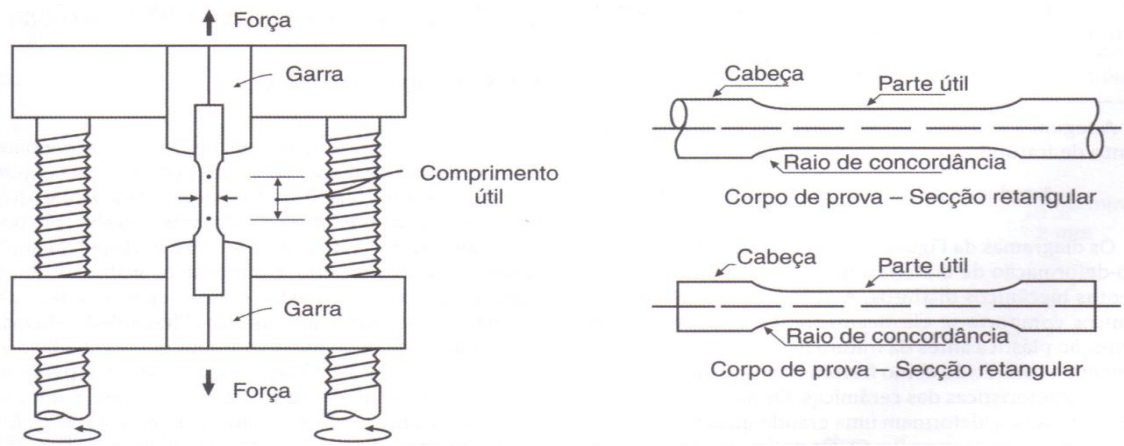


Figura 4: Diagrama esquemático de um sistema de ensaio mecânico e corpos de prova de tração [23].



Figura 5: Corpo de prova de tração feito a partir de filmes de colágeno e Whiskers.

Para o ensaio de tração são medidas as dimensões da parte útil do corpo de prova (largura, espessura e comprimento) então, cada extremidade do corpo de prova é presa em uma garra da máquina de tração. O corpo de prova é submetido a uma força sofrendo um alongamento (Figura 6a) até o momento de ruptura (Figura 6b).

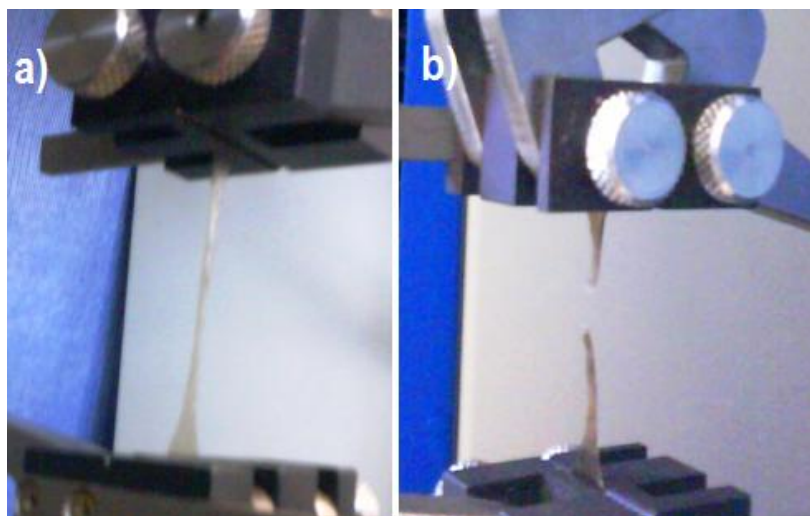


Figura 6: Ensaio de tração. a) alongamento do corpo de prova b) Momento de ruptura do corpo de prova.

O alongamento e a força aplicada são medidos através de um programa de computador conectado à máquina e obtém-se então uma curva de força em função do alongamento. Informações correspondentes à resistência, rigidez e deformabilidade do material podem ser obtidas da curva tensão-deformação[23].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O colágeno utilizado neste trabalho (Figura 7) foi cedido pela Universidade Federal de Lavras em colaboração com professor Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira. As suspensões de Whiskers (wh) foram preparadas no Laboratório de Química da Universidade Federal de Minas Gerais coordenado pelo Professor Dr. Fabiano Vargas.



Figura 7: Colágeno cedido pela Universidade Federal de Lavras

3.1 Preparo da solução de colágeno

O colágeno foi inicialmente solubilizado em uma solução de ácido acético 1% na proporção de 1g de colágeno para cada 100 mL de solução, o objetivo dessa hidrólise é a quebra parcial das ligações entre as hélices do colágeno. A mistura foi então aquecida durante duas horas sendo mantida à temperatura de 70°C e sob agitação constante. Decorrido esse tempo a mistura foi então filtrada para a remoção de possíveis impurezas provenientes do colágeno.

3.2 Determinação da concentração de colágeno

Mediu-se um volume de 5 mL da solução de colágeno e verteu-se em uma placa de petri. Colocou-se a solução para secar na estufa a 60° C por um período de 24 horas. Após a total evaporação do solvente formou-se uma camada de colágeno, pesou-se o filme de colágeno obtido em 5 mL de solução. Através dos seguintes cálculos foi possível a determinação da concentração da solução:

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

Sendo que os 5 mL se referem ao volume de solução utilizado para a formação do filme. O procedimento foi feito em triplicata.

3.3 Preparo dos compósitos

Os filmes foram preparados segundo a técnica de casting que se baseia na evaporação do solvente utilizado até a formação do filme. Foram preparados cinco filmes com composição e concentrações distintas de acordo com a Tabela1. Cada filme foi preparado utilizando como base para os cálculos uma massa total de 3g.

Tabela1. Composições em massa utilizadas no preparo dos filmes.

Filme	Composição de Whiskers	Composição de Colágeno	Composição de Glicerol
1	0%	95%	5%
2	0,5%	94,5%	5%
3	1%	94%	5%
4	3%	92%	5%
5	5%	90%	5%

Após preparar as soluções de acordo com as composições indicadas acima, estas foram vertidas em tampas de plástico e levadas à estufa para a evaporação do solvente (solução de ácido acético) a uma temperatura de aproximadamente 40°C até a formação dos filmes. As tampas foram retiradas da estufa colocadas a temperatura ambiente e os filmes foram desenformados. Após essa etapa os filmes estão prontos para as etapas de caracterização do material e ensaios de tração.

3.4 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho

A análise de espectrometria na região do Infravermelho foi realizada no Departamento de Química do CEFET-MG. O equipamento utilizado pertence à marca Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21, equipado com Transformada de Fourier FTIR-8400S e acessório ATR.

3.5 Análise Térmica

As análises termogravimétricas (tg) dos filmes de colágeno foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais, em um equipamento Shimadzu DTG-60 nas seguintes condições: Gás de purga: ar; Vazão: 100ml/min; Taxa de aquecimento: 20°C / min; Temperatura inicial 20°C; Temperatura final:600°C.

3.6 Ensaio de Tração

Os ensaios de tração foram realizados no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, na UFMG, em uma máquina da marca EMIC DL3000, utilizando-se uma célula de carga de 200 kN.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho

A análise de espectros do colágeno e dos compósitos com Whiskers no infravermelho nos fornece informações a respeito da estrutura dos mesmos, tornando possível verificar diferenças estruturais entre as amostras. A Figura 8 mostra os espectros FTIR onde o espectro característico da estrutura do colágeno está representado pela curva 0% wh.

A integridade estrutural da molécula de colágeno é comprovada pela existência da tripla hélice, que é dada pela razão igual a 1 entre as intensidades das bandas $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ (referentes à amida terciária e à ligação C-H do anel pirrolídico, respectivamente) [11, 25]. A razão encontrada entre a intensidade dessas bandas tanto no colágeno quanto nos compósitos estão em torno de 1,07, indicando que a tripla hélice, ou seja, a estrutura do colágeno encontra-se preservada.

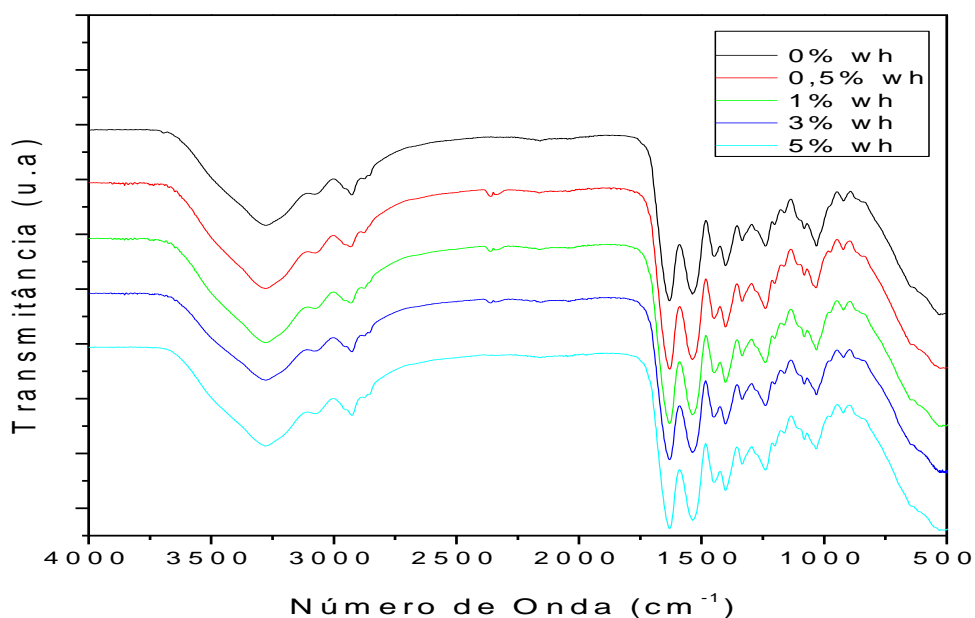


Figura 8: Espectros na região do Infravermelho para o colágeno e os compósitos com Whiskers.

Normalmente o grupo amida apresenta em espectros estiramento N-H em $\sim 3310\text{ cm}^{-1}$, estiramento C=O da amida primária em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, deformação N-H da amida secundária em $\sim 1546\text{ cm}^{-1}$ e da amida terciária em $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$.

As bandas das amidas do colágeno são sensíveis a mudanças das ligações de hidrogênio, rompimentos de ligações colágeno-colágeno e formação de ligações colágeno-whiskers. Como mostrado na figura 9 a adição de whiskers à matriz de colágeno não interfere seu espectro nas regiões de deformação N-H das amidas $\sim 1546\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$. Entretanto, ocorrem mudanças na intensidade relativa dessas bandas (Tabela 2) que estão, portanto, associadas a alterações nas interações intermoleculares do colágeno através de ligações de hidrogênio.

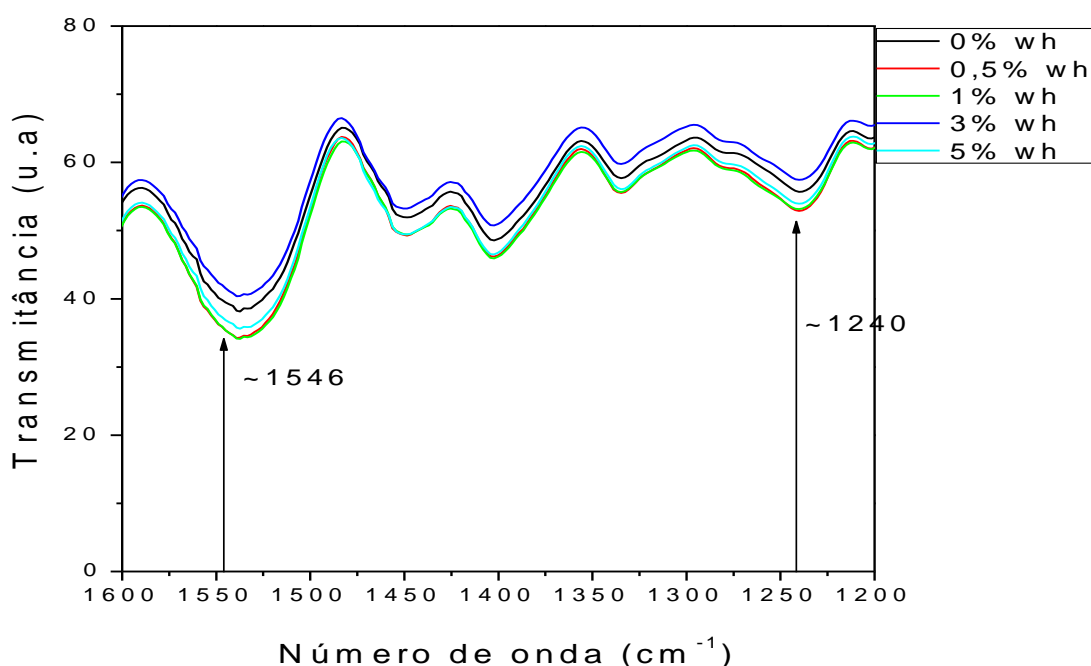


Figura 9: Espectros na região do Infravermelho para o colágeno e os compósitos evidenciando as bandas características da deformação N-H em amidas.

Tabela 2: Intensidade relativa das bandas nas regiões de deformação N-H

Amostra	Intensidade relativa
0% wh	1,62
0,5% wh	1,67
1% wh	1,69
3% wh	1,64
5% wh	1,66

A obtenção dos filmes envolvendo colágeno e CNW's foi possível devido às interações eletrostáticas existentes entre esses dois materiais. Os centros positivos estão situados nos grupos amino (-NH₃⁺) presentes na estrutura do colágeno em solução aquosa ácida enquanto que as cargas opostas situam-se nas superfícies dos nanocristais de celulose. A origem dessas cargas negativas se dá na conversão parcial dos grupos hidroxila da celulose para sulfato no momento da reação de hidrólise ácida com ácido sulfúrico para a formação dos CNW's. Essas cargas também desempenham papel fundamental se estabilizar, por repulsão, os CNW's, em solução aquosa [26].

4.2 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas do colágeno e dos compósitos (Figura 10) mostram uma perda de massa em dois estágios. O primeiro estágio compreende o intervalo de temperatura de 20°C a 200°C, nesse estágio ocorre a desnaturação do material, ou seja, a perda de água adsorvida e estrutural contida nos filmes. O segundo estágio se inicia próximo a 200°C até 450°C, sendo atribuído à degradação do material[4, 27].

A porcentagem de perda de massa durante os intervalos de temperatura pode ser verificada na Tabela 3, verifica-se que para os compósitos, exceto o composto por 5% de colágeno, que quanto maior a

adição de CNW's, maior a quantidade de água perdida. No segundo estágio verifica-se que a degradação do material diminui com o aumento da quantidade de CNW's e essa menor degradação pode ser verificada pela maior quantidade de resíduos presentes nos compósitos em relação ao colágeno puro[4, 27].

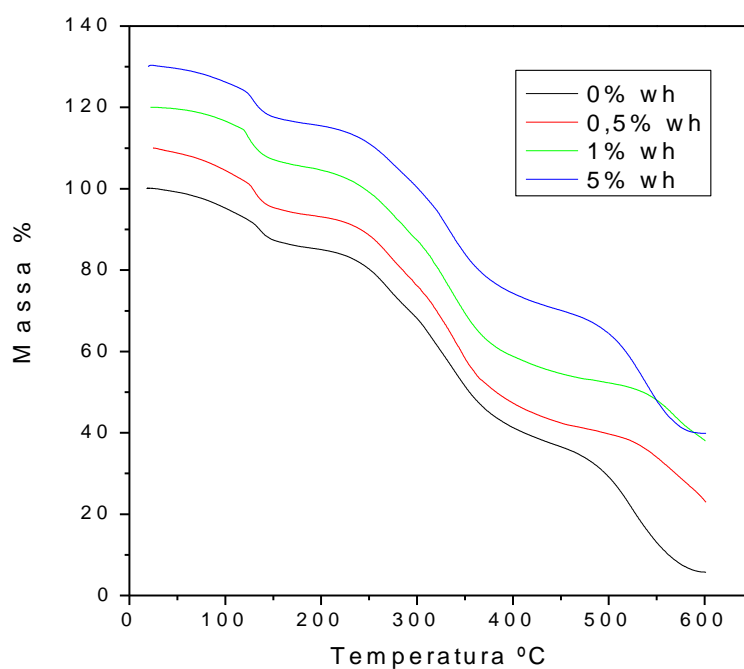


Figura 10: Curvas termogravimétricas das amostras de colágenos e seus compósitos.

Tabela 3: Perda de massa dos materiais nos estágios 1 e 2 e porcentagem de resíduos à 600°C.

Amostra	Perda de massa %		Resíduo % à 600°C
	25°C – 200°C	200°C – 450°C	
0% wh	14,97	43	5,74
0,5% wh	16,91	39	13,23
1% wh	15,45	41	18,09
5% wh	14,53	47	9,87

Em seu estudo da análise térmica de compósitos de colágeno e nanotubos de carbono (NTC), Silva 2007 verificou que a variação na temperatura de degradação dos compósitos pode estar relacionada à integridade da tripla hélice na estrutura do colágeno, ficando claro que a presença dos NTC na matriz causa maior estruturação e aumento da temperatura de degradação.

Embora a porcentagem de perda de massa tenha sido diferenciada para cada amostra observa-se que a adição de CNW's não acrescentou estabilidade térmica ao colágeno, uma vez que a temperatura de degradação do mesmo foi de 200°C para todas as amostras.

4.3 Ensaio de Tração

Os resultados obtidos para as amostras de colágeno e para os compósitos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos no ensaio de tração das amostras de colágeno e compósitos com whiskers.

Amostra	Tensão máxima (MPa)	Modulo de elasticidade (MPa)	Deformação máxima (mm)
0%	3,431	20,7	26,41
0,5%	8,167	272,5	6,418
1%	4,597	87,10	11,80
3%	3,671	102,2	17,70
5%	8,883	284,2	7,980

A análise dos valores de tensão máxima e módulo de elasticidade do colágeno puro e dos compósitos permitiram verificar que houve aumento de tais propriedades devido a adição de CNW's nos compósitos. A variação na resistência foi acompanhada pelo decréscimo no valor da deformação máxima sofrida. Uma vez que ocorre a adição de reforço aos filmes de colágeno é esperado que eles ofereçam maior resistência à deformação que o colágeno puro.

Os valores máximos de tensão e módulo de elasticidade, assim como os valores mínimos de deformação encontram-se nas concentrações de 0,5% e 5,0% de whiskers. A relação entre a concentração de CNW's e a variação das propriedades mecânicas não segue a regra das fases.

Silva e colaboradores (2007) testaram as propriedades mecânicas de colágeno puro e compósitos com nanotubos de carbono (NTC) com concentração de 2% e 4% (m/m). No ensaio de tração foi observado valores menores de módulo de elasticidade do colágeno do que nos compósitos. Os compósitos deste trabalho apresentaram módulo de elasticidade próximos de 101 MPa para o compósito de colágeno bovino. Os CNW's são capazes de modificar mais eficientemente as propriedades mecânicas que os NTC[4].

5. CONCLUSÃO

Este trabalho objetivou a produção e caracterização de bionanocompósitos de colágeno e whiskers de celulose. A análise dos resultados de caracterização dos compósitos obtidos permitiu se chegar às seguintes conclusões:

- 1) A análise por FTIR permitiu verificar a integridade estrutural da molécula de colágeno comprovada pela existência da tripla hélice. Foi possível também verificar através da intensidade relativa das bandas nas regiões de deformação N-H alterações nas interações intermoleculares do colágeno.
- 2) Analisando a estabilidade térmica dos compósitos foi possível concluir que a adição de whiskers de celulose à matriz colagênica não acrescentou estabilidade aos materiais formados.
- 3) Nos ensaios de tração verificou-se um aumento na resistência do material, entretanto, a relação entre a concentração de CNW's e a variação das propriedades mecânicas não segue a regra das fases.

6. REFERÊNCIAS

1. Sionkowska, A., *Modification of collagen: films by ultraviolet irradiation* Polymer Degradation and Stability, 2000. **68**(2): p. 147-151.
2. Girard, R.C.G., *Comportamento de Matrizes de Colágeno Utilizadas no Tratamento de Feridas Planas Induzidas em Pele de Rato*, in *Bioengenharia*. 2005, Universidade de São Paulo: São Carlos.
3. Di, Y. and R.J. Heath, *Collagen: stabilization and modification using a polyepoxide, triglycidyl isocyanurate* Polymer Degradation and Stability, 2009. **94**(10): p. 1684-1692.
4. Silva, E.E.d., *Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia*, in *Física*. 2007, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte.
5. Raines, M.D.S.R.T., *Collagen Structure and Stability*. The Annual Review of Biochemistry, 2009. **78**: p. 929-958.
6. Ribeiro, M.E., *Hidrolizado de colágeno: Utilização Biológica em Misturas Proteicas e seu Efeito no Tecido Cutâneo*, in *Ciência dos Alimentos*. 1994, Universidade de São Paulo: São Paulo.
7. Rodrigues, V., *Análise dos Efeitos do Colágeno Bovino e Derivados na Proliferação Celular e Biossíntese de Colágeno em Fibroblastos Humanos*, in *Biotecnologia*. 2009, Universidade de São Paulo: São Paulo.
8. Sena, L.Á.d., *Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas*, in *Engenharia Metalúrgica e de Materiais*. 2004, Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro.
9. Friess, W., *Collagen: biomaterial for drug delivery (review article)*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **45**: p. 113-136.
10. Vulcani, V.A.S., *Matrizes de Colágeno para Liberação Controlada de Progesterona*, in *Bioengenharia*. 2004, Universidade de São Paulo: São Carlos.

11. Silva, D.d.J. and M.L.O. D'Almeida, *Nanocristsais de Celulose*. O Papel, 2009. **70**(7): p. 34-52.
12. Mesquita, J.P.d., C.L. Donnici, and F.V. Pereira, *Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan*. Biomacromolecules, 2010. **11**: p. 473-480.
13. Habibi, Y., et al., *Langmuir–Blodgett films of cellulose nanocrystals: Preparation and characterization*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **316**: p. 388-397.
14. Samir, M.A.S.A., F. Alloin, and A. Dufresne, *Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 612-626.
15. Silva, R., et al., *Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos*. Química Nova, 2009. **32**(3): p. 661-667.
16. Chawla, K.K., *Composite Materials: Science and Engineering*, ed. 2. 1998.
17. Jones, R.M., *Mechanics of Composite Materials*, ed. 2. 1999.
18. Hull, D. and T.W. Clyne, *A Introduction to Composite Materials*, ed. 2. 1996, Nova York.
19. Beg, M.D.H. and K.L. Pickering, *Accelerated weathering of unbleached and bleached kraft wood fibre reinforced polypropylene composites*. Polym Degrad Stab, 2008. **93**: p. 1939–46.
20. Teixeira, E.d.M., *Utilização de Amido de Mandioca na Preparação de Novos Materiais Termoplásticos*, in *Ciência*. 2007, Universidade de São Paulo: São Carlos.
21. Lu, Y., L. Weng, and X. Cao, *Biocomposites od Plasticized Starch Reinforced with Cellulose Cristallites from Cottonseed Linter*. Macromolecular Bioscience, 2005. **5**: p. 1101-1107.
22. Belbachir, K., et al., *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**.
23. Oréfice, R.L., M.d.M. Pereira, and H.S. Mansur, *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*, ed. C. Médica. 2006, Rio de Janeiro.

24. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nielman, *Princípios de Análise Instrumental*, ed. Bookman. 2006.
25. E'Gues, M.A.M., M.d. Paula, and G. Goissis, *Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia: preparação e caracterização* Rev. odonto ciênc. , 2008. **23**(2): p. 134-140.
26. Patricio, P.S.O., et al. *Nanobiocompósitos de Filmes Automontados de Colágeno Hidrolisado com Nanowhiskers de Celulose*. in *Congresso Brasileiro de Polímeros*. 2009. Foz do Iguaçu, PR.
27. Tonhi, E. and A.M.d.G. Plepis, *Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitosana*. *Química Nova*, 2002. **25**(6): p. 943-948.