

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM COLÁGENO E NANOCRISTAIS DE CELULOSE<sup>1</sup>

Sâmara Durães de Souza<sup>2</sup>  
Patricia Santiago de Oliveira Patrício<sup>3</sup>  
Luiz Carlos Alves Oliveira<sup>4</sup>  
Ana Pacheli Heitmann<sup>5</sup>

## Resumo

Os compósitos de colágeno estão associados à propriedades físicas e químicas de grande interesse para engenharia de tecidos vivos como: baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Assim, são amplamente estudados como aplicação em *scaffold* para crescimento celular. No presente trabalho, foram desenvolvidos nanobiocompósitos de colágeno com nanocristais de celulose (NCC), utilizando como plastificante o glicerol e variando a concentração de NCC. Com o objetivo de determinar a interação entre a matriz de colágeno e os nanocristais de celulose, as amostras foram submetidas à análise de caracterização: morfológica, térmica, mecânica. Foram investigadas as variações na intensidade relativa das bandas na região de 3.400 cm<sup>-1</sup> e 1.000 cm<sup>-1</sup>. Como a nanocarga é mais estável termicamente que a matriz, estudou-se a estabilidade térmica dos nanocompósitos. Paralelamente, as propriedades mecânicas foram mensuradas pelo ensaio de tração.  
**Palavras-chave:** Colágeno; Compósitos; Nanocristais de celulose; Caracterização.

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION NANOCOMPOSITE BASED AND COLLAGEN CELLULOSE NANOCRYSTALS

### Abstract

The collagen composites are associated with physical and chemical properties of great interest for the engineering of living tissues as: low toxicity, biodegradability and biocompatibility. Thus, they are widely studied for application in scaffold for cell growth. In this work, we developed collagen nanobiocomposites with nanocrystals of cellulose (NCC) using glycerol as plasticizers and varying the concentration of NCC. Aiming to determine the interaction between the collagen matrix and the cellulose nanocrystals, the samples were analysed for characterization: Morphological, thermal, mechanical. We investigated the variations in the relative intensity of the bands in the region of 3,400 cm<sup>-1</sup> and 1,000 cm<sup>-1</sup>. As the nanocharge is thermally more stable than the matrix we studied the thermal stability of the nanocomposite. In addition, the mechanical properties were measured by tensile test.

**Key words:** Collagen; Composites; Cellulose nanocrystals; Characterization.

<sup>1</sup> Contribuição técnica ao 68<sup>o</sup> Congresso Anual da ABM - Internacional, 30 de julho a 2 de agosto de 2013, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Estudante de Química tecnológica. Bolsista de Iniciação científica. Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Química. Dra. Professora. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Químico. Dr. Prof. Associado.. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Química. Belo Horizonte, MG, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

As matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos de mamíferos, são constituídas principalmente por colágeno.<sup>(1)</sup> O colágeno representa a principal proteína estrutural do corpo dos vertebrados, funcionando também como um orientador de tecidos em desenvolvimento.<sup>(2)</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 1).<sup>(3)</sup> O modo de interação do colágeno com os tecidos do corpo, está associado com algumas propriedades naturais como baixa resposta imunológica, baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e a habilidade de promover o crescimento celular.<sup>(1,4)</sup>

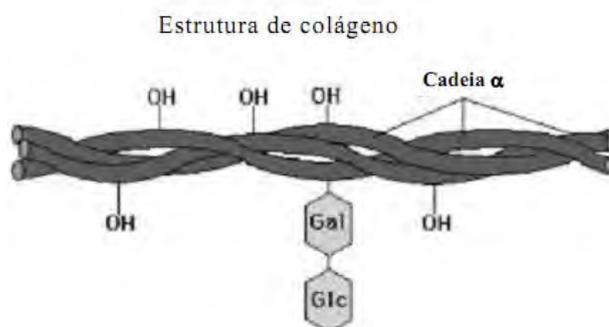


Figura 1. Estrutura das fibras de colágeno.

Plastificantes são moléculas, não voláteis e que se dispersam facilmente em um polímero. Em geral, são adicionados para melhorar a processabilidade e a flexibilidade dos produtos acabados. Algumas propriedades de interesse em um plastificante 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.<sup>(5,6)</sup> Um dos plastificantes mais estudados em combinação com os filmes de colágeno é o glicerol (Figura 2). O glicerol é um composto orgânico pertencente a 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.<sup>(7)</sup>

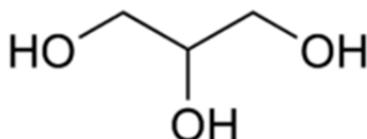


Figura 2. Representação estrutural da molécula de glicerol.

Os compósitos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, uma vez que é possível combinar as propriedades individuais de cada material em um só. São materiais heterogêneos, multifásicos, compostos por uma fase contínua (matriz) e

uma descontínua (componente estrutura, reforço ou carga).<sup>(8,9)</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>(10)</sup> Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de empregar os nanocristais de celulose como cargas em matriz poliméricas, para obtenção de nanocompósitos com propriedades únicas. 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>(11)</sup> Nanocristais de celulose são extraídas de regiões amorfas da celulose que crescem sob condições controladas, 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>(1)</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>(12)</sup>

## 2 OBJETIVOS

Comparar a influência da adição de diversas proporções de nanocristais de celulose na estrutura do colágeno, e analisar as interações entre a matriz colagênica e o material de reforço. Caracterizar o material produzido, quanto as suas propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

O colágeno utilizado foi cedido pela Universidade Federal de Minas Gerais pelo professor Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira.

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

### 3.1 Preparo da Solução de Colágeno

O colágeno foi adicionado a uma solução de ácido acético 1% p/v., e aquecido durante 2 horas a uma temperatura constante de 70°C sob agitação. A mistura foi filtrada duas vezes para a remoção de impurezas.

### 3.2 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.

### 3.3 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. A composição de cada filme de colágeno está indicado na Tabela 1.

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

<i>Filme</i>	<i>Composição de NCC</i>	<i>Composição de Colágeno</i>	<i>Composição de Glicerol</i>
Puro	0%	100%	10%
0%	0%	90%	10%
1%	1%	89%	10%
3%	3%	87%	10%
5%	5%	85%	10%
7%	7%	83%	10%

Em seguida foram preparados os filmes com a inserção de nanocristais liofilizados. Adicionou-se NCC liofilizado no plastificante, deixando sob agitação por 24 horas e, em seguida, foi adicionado a solução de colágeno.

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 retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente e os filmes foram desenformados.

### 3.4 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.

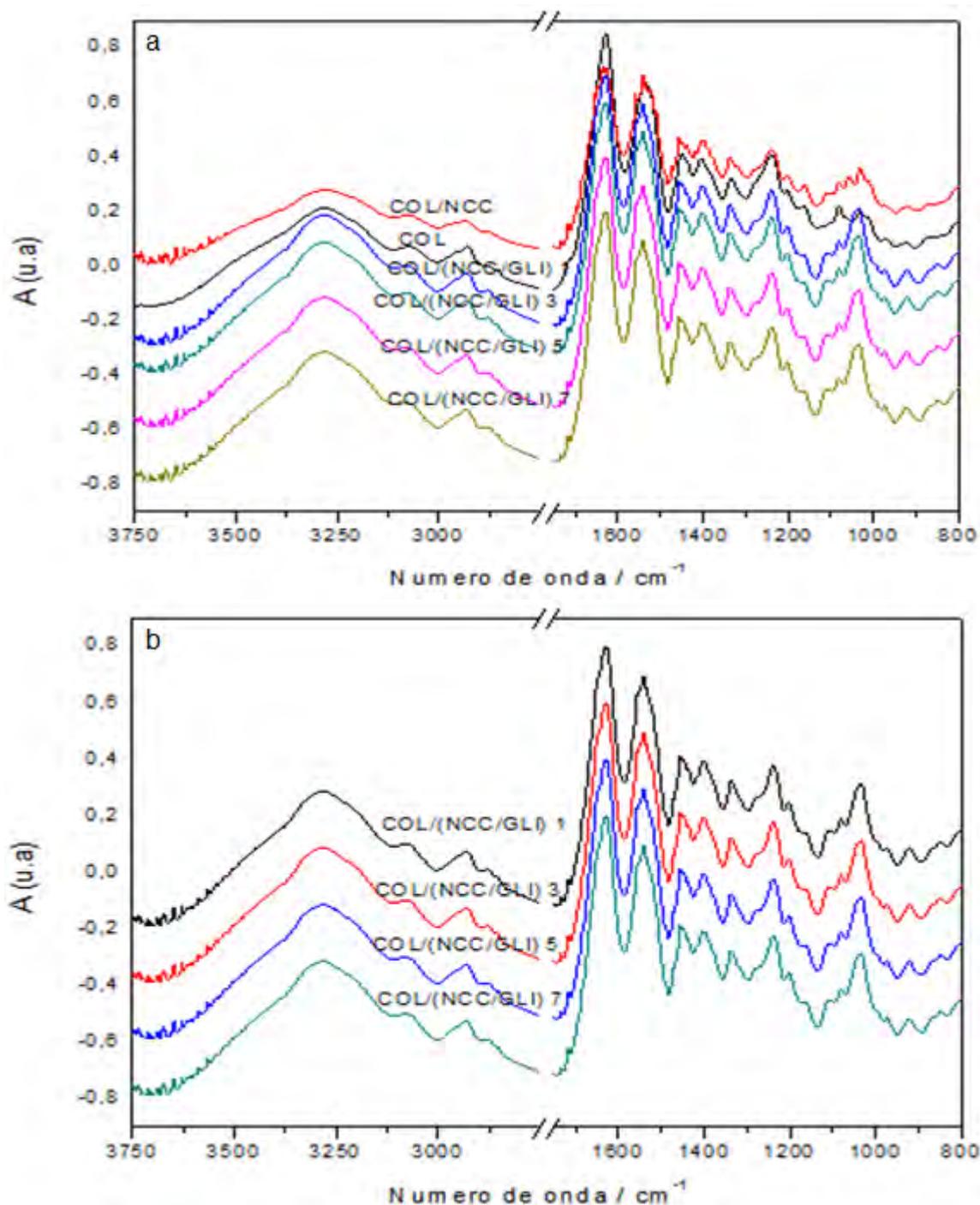
### 3.5 Análise Térmica

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.

### 3.6 Ensaio de Tração

Os ensaios de tração foram realizados no Departamento de Mecânica, no CEFET-MG, em um equipamento de marca AGX, utilizando uma célula de carga de 4,5 Kgf.

## 4 RESULTADOS



**Figura 3.** Espectros de Infravermelho (a) espectros de infravermelho incluindo o colágeno puro e colágeno com glicerol sem NCC; e (b) espectros de infravermelho dos nanocompósitos contendo as diferentes proporções de NCC

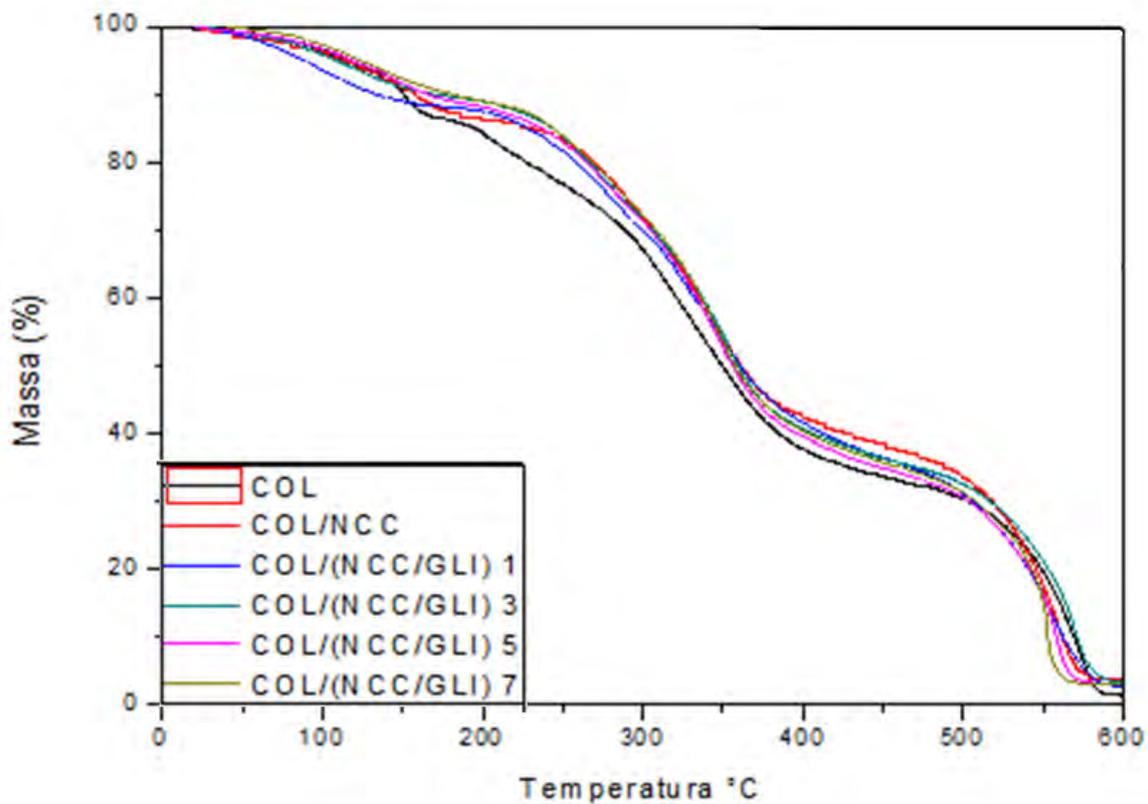


Figura 4. Curvas termogravimétricas incluindo o colágeno puro e colágeno com glicerol sem NCC.

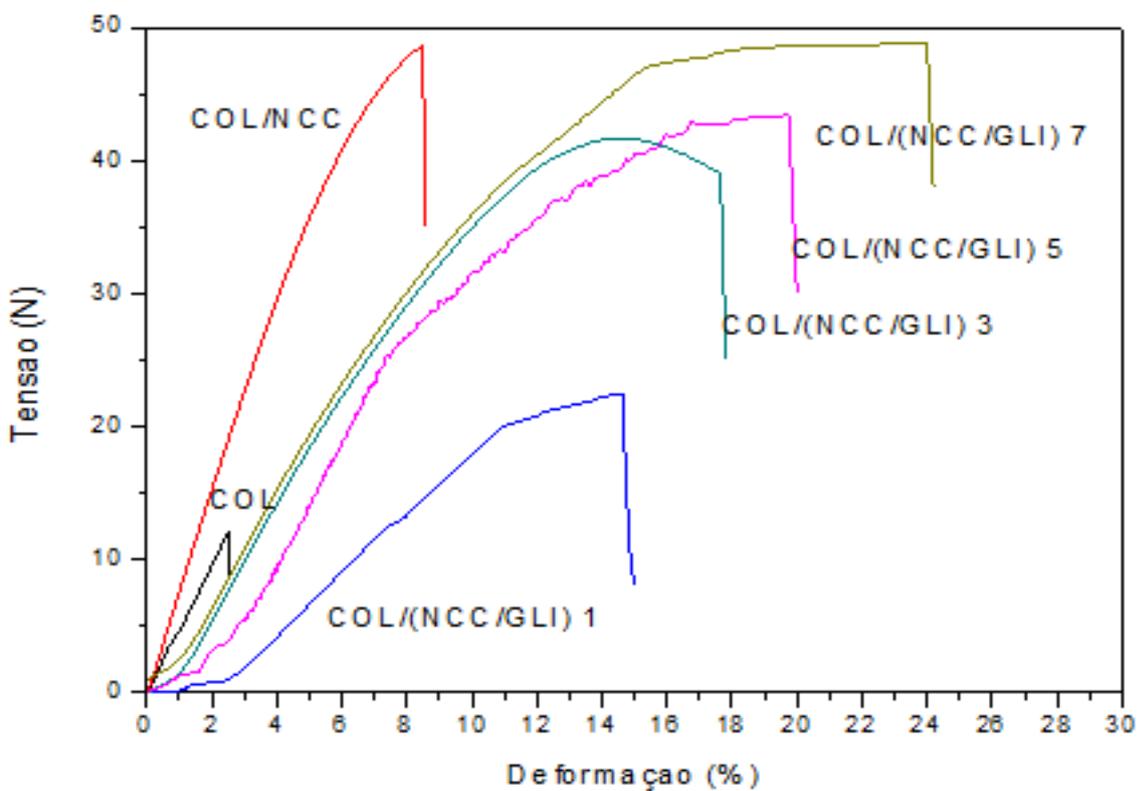


Figura 5. Curvas tensão-deformação incluindo o colágeno puro e colágeno com glicerol sem NCC

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

<i>Nº de onda (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Associações</i>
1654	Amida I ( $\nu_{C=O}$ ) $\delta\delta\delta\delta$ (9(e(estestiramento
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	$\nu_{N-H}$

## 5 DISCUSSÃO

A Figura 3 apresenta uma comparação dos espectros de FTIR, espectros de infravermelho incluindo o colágeno puro e colágeno com glicerol sem NCC (Figura 3a) e espectros de infravermelho dos nanocompósitos contendo as diferentes proporções de NCC (Figura 3b).

Com o espectro de FTIR do colágeno é possível 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 absorvâncias 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 2) e ligações C-H esqueleto carbônico da glicina e prolina.<sup>(8)</sup> Para materiais preparados em solução ácida (pH ~ 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 3, é caracterizado pela presença de bandas típicas para o grupo amida A, B, I, II e III.<sup>(13-15)</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 CH<sub>2</sub> 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 ( $\sim 3.400\text{cm}^{-1}$ ), N-H ( $\sim 3.300\text{cm}^{-1}$  – amida A) e C-H ( $\sim 3.080\text{cm}^{-1}$  – Amida B) presentes no colágeno.

A banda existente entre  $3.000\text{--}3.500\text{cm}^{-1}$  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 do plastificante. 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  $3.400\text{cm}^{-1}$  e  $1.000\text{cm}^{-1}$ , semelhante ao colágeno.

Na Figura 4, a análise da curva termogravimétrica do colágeno puro permitiu verificar que a perda de massa ocorre em três estágios diferentes. O primeiro identificado para temperaturas variando entre  $120$  a  $180^\circ\text{C}$  e está relacionada principalmente com a perda gradual de água ligada a estrutura colagênica. Já o segundo entre  $240$  e  $390^\circ\text{C}$  pode ser atribuído a degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno, e o terceiro estágio entre  $490$  e  $590^\circ\text{C}$ , está relacionado à carbonização do material devido à presença de oxigênio do ar.<sup>(16)</sup>

Comparando as amostras de colágeno puro com o plastificado após a adição dos nanocristais de celulose, foi possível verificar que a presença da nanocarga acelerou o processo de desidratação do material em todos os casos. 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>(17)</sup>

Analisando as curvas da Figura 5, observa-se que o filme de colágeno puro apresenta a menor tensão e deformação em relação aos filmes contendo plastificante. Segundo Mali e colaboradores (2007) 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.<sup>(18)</sup>

Analisando a Figura 5, 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/gli. A análise das curvas do col/NCC/gli permite verificar, que os valores de tensão e de deformação aumentaram em relação à curva de colágeno puro. 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. As curvas de tensão-deformação, também nos permite verificar que o aumento de deformação é aumenta com a adição de NCC, entretanto não é proporcional a quantidade adicionada. Assim deve-se existir um ponto de saturação da matriz em que a adição de NCC não influencia mais nas suas propriedades.

## 6 CONCLUSÕES

O colágeno e NCC são capazes de se interagir quimicamente, permitindo que a carga adicionada atue como um bom agente de reforço para o colágeno. 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 o NCC e o glicerol.

## REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 2 Vulcani, V. A. S., Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona, in *Bioengenharia*. 2004. Universidade de São Paulo: São Carlos.
- 3 Friess, W. *Collagen – biomaterial for drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* . n.45, p. 113–136, 1998.
- 4 Vulcani, V. A. S., Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona, in *Bioengenharia*. 2004. Universidade de São Paulo: São Carlos.
- 5 Mano, E. B., *Polímeros como materiais de engenharia*, ed. 3. 2003.
- 6 Sperling, L. H. *Introduction to physical polymers science*, ed 4. 2004.
- 7 Longmaier, F. , Mokrejs, P. , Kolomaznik, K. , Mladek, M. , *Plasticizing collagen hydrolisate with glycerol and low molecular weight poly(ethylene glycol)*. *Thermochimica Acta*, 2009. p. 52-58.
- 8 Tonhi, E.; Plepis, G. M. A. *Obtenção e caracterização de blendas colágeno – quitosana*. *Química Nova*. v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
- 9 Silva, E. E.; *Síntese e Aplicação de nanotubos de carbono em biotecnologia*. 2007. Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais.
- 10 Drummond, A. L., *Compósitos poliméricos obtidos a partir do óleo de bauru – Síntese e Caracterização*. 2008. Universidade Federal de Brasília : Brasília.
- 11 Silva, J. D; D’Almeida, O. L.M.; *Cellulose whiskers*. *Peer-Reviewed Article*. V. 70, p. 34 – 52. Julho 2009.
- 12 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.
- 13 Sionkowska. A., Wisnieski. M., Skopinska. J, Kennedy. C.J, Wiess.T. J. *The photochemical stability of collagen-chitosan blends*. *Journal of ptochemistry and photobiology A: chemistry*. 2004. p. 545-554.
- 14 Sionkowska. A., Wisnieski. M., Skopinska. J, Kennedy. C.J, Wiess.T. J. *Molecular interactions in collagen and chitosan blends*. *Biomaterials*. 2004. p. 795-801.
- 15 Hoque Md. S., Benjakul. S., Prodpran. T. *Effects of partial hydrolysis and plasticizers content on the properties of films from cuttlefish (Sepia*
- 16 Horn, M. M. *Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico*. 2008. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- 17 Ten. E., Turtle. J., Bahr. D., Jiang. L., Wolcott. M. *Thermal and mechanical properties of poly(3-hidroxybutyrate-co-3-hidroxyvalerate)/cellulose nanowhiskers composites*. *Polymer*. 2010. p. 2652-2660.
- 18 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.