



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA E ANALÍTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOAN PETRUS OLIVEIRA LIMA

ARCABOUÇOS À BASE DE COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) INCORPORADOS DE APATITAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

FORTALEZA

2018

JOAN PETRUS OLIVEIRA LIMA

ARCABOUÇOS À BASE DE COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)
INCORPORADOS DE APATITAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

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

Orientador: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698a Lima, Joan Petrus Oliveira.
Arcabouços à base de colágeno de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) incorporados de apatitas para aplicações biomédicas / Joan Petrus Oliveira Lima. – 2018.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.
1. Hidrogéis. 2. Curcumina. 3. Biomaterial. I. Título.

CDD 540

JOAN PETRUS OLIVEIRA LIMA

ARCABOUÇOS A BASE DE COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)
INCORPORADOS DE APATITAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

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

Aprovada em 18/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Men de sá Moreira Souza Filho
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva da Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria Claudete Lima e Josenir Alcântara de Oliveira, meu padastro/pai Paulo Mosânio (*in memoriam*), meus irmãos Rodrigo e sua namorada Milena, Isa e Cassius, meu tio César, meus primos Ártemis, Walter e Anna Paula e à minha querida sobrinha Valentina.

À minha namorada Lorena Chaves pelo companheirismo, apoio, carinho e paciência.

A Dna. Hélia, Kelly, “Rei”, Meire, Daniel, Glauber e Maxwell, por gentilmente me acolherem nesta família maravilhosa!

Ao professor Dr. Pierre pela orientação, amizade, confiança e pelo suporte no meu desenvolvimento profissional.

Ao professor Dr. Men de sá pela coorientação, por todo o apoio no meu crescimento como indivíduo e profissional desde a graduação, pela confiança, pela amizade e ter “segurado as pontas” nos meus momentos pessoais mais difíceis.

Aos meus colegas do Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMat) – Eduardo, Tiago, Clinton, Elayne, Davino, Wesley, Anderson, Lillian Fachine, Samuel, Alvernes, Kamylla, Denis, Alan, Natália, Laís, Janaína, Fernando Lima, Grazielly, Gabriela Ibiapina, Fábio Cavalcante, Vanessa, João Pedro, Ticiane, Paulo – e a todo o Laboratório de Tecnologia da Biomassa, em especial: Lorena Alves, Alinne Rodrigues, Andressa, Fabrizia, “Vanessinha”, Celso, Hálisson, Lilian, Adriano (“The Boss”), Matheus Oliveira, Samara Sena, Menta, Yana Luck, Edla Freire, Lyndervan, Juliana Rabelo, Juliana Fernandes, Marques Neto, Rayanne e Dna. Francisca, por todo o imenso apoio e paciência.

Aos professores Dr. Bartolomeu Warlene, Dra. Selma Mazzetto e Dra. Cristiane Oliveira, pelas ótimas críticas construtivas na minha qualificação, que foram de enorme importância para meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores, técnicos e à equipe dos laboratórios, Prof. Dr. Sazaki, César e Isabella do LRX pelas medidas no equipamento de difração de raios- γ ; ao Prof. Dr. Diego Lomonaco e aos analistas do LPT pelo FTIR; ao Ms. Joel Pedrosa e analistas do LME pelo EDS e à Profª. Dr. Celli Rodrigues da EMBRAPA pelo MEV.

Ao prof. Sávio Macambira, pelo aprendizado, desenvolvimento acadêmico, amizade e boas conversas.

Aos meus amigos Allex Silveira, Sarah Nogueira, Ana Lima, Marcos Levi, Emanuel Ferreira, Vanessa Ferreira, Felipe Marques, Igor Barreto, Thalita Monteiro,

Marileide Souza, Weslen Souza, Joyce Pereira, Mayla, Tavares, Emanuel Rodrigues, Lucas Fernandes, Diego Anderson, Nara Nogueira, Luiz Fernando, Fernando Luiz, Alessandro Marinho, Vitor Martins, Nicholas Vieira, Michael (“Михайл”) Neradov, Hitalo, “Chicão”, Gabriel Marinho, Filipe Benevides, Mônica, Pedro Marinho, Augusto Peixoto, João Paulo Benevides, David Monteiro, Matheus Guerra, Ícaro Freires, Vitor Guimarães, Mateus Lima, Georgia Gondim, Isaac Farias, Ewerson Farias, pela amizade e pelos bons momentos e risadas que aliviaram o peso do trabalho.

A todos que, diretamente ou indiretamente, ajudaram e apoiaram!

À Universidade Federal do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação da Química e à EMBRAPA – Agroindústria Tropical, pela oportunidade e infraestrutura.

À CAPES pelo financiamento que possibilita a pesquisa em todo país.

Ao projeto Embrapa-BNDES “Ações estruturantes e inovação para o fortalecimento das cadeias produtivas da Aquicultura no Brasil”, pelo apoio institucional e financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar hidrogéis a partir do colágeno de peixe com apatitas de cálcio e estrôncio para o desenvolvimento de arcabouços reticulados com curcumina. A extração do colágeno foi realizada por via química; a síntese das apatitas foi realizada por coprecipitação associada a hidrotermal, e os hidrogéis foram obtidos por um processo *in situ*. As matérias-primas e os hidrogéis foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), entumescimento, difração de Raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS). O FTIR mostrou que as apatitas são similares às biológicas pela presença de HPO_4^{2-} ; o colágeno apresentou as bandas típicas ressaltando a sua integridade estrutural; os hidrogéis tiveram alargamento das bandas causadas pelo mecanismo de reticulação. O entumescimento dos hidrogéis em meio similar ao fisiológico promoveu a liberação de curcumina. O DRX confirmou a fase hexagonal e a boa cristalinidade das apatitas e uma fase cristalina da curcumina. O MEV mostrou a formação de grãos nas apatitas, a estrutura fibrilar e a superfície lisa do colágeno, o aumento da área superficial dos hidrogéis com curcumina e cristais depositados na superfície nos que possuem apatitas. O TGA e o DSC mostraram instabilidade físico-química dos hidrogéis, supostamente por competição dos sítios de ligação de hidrogênio *intra* e *inter* cadeias colágenas com solução e curcumina. O EDS confirmou a não-estequiometria das apatitas e a pureza do colágeno. Os hidrogéis apresentam potencial como arcabouços, com o uso de um agente reticulante inovador, biocompatível e bioativo que é liberado no meio fisiológico.

Palavras-chave: Hidrogéis. Curcumina. Biomaterial.

ABSTRACT

This work aims to develop hydrogels from collagen extracted from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with synthetic calcium and strontium apatites to produce a potential scaffold cross-linked with curcumin. The extraction of collagen was performed in chemical pathway, the synthesis of apatites were by coprecipitation associated to hydrothermal and the hydrogels were obtained by a *in situ* process. The raw materials and hydrogels were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), swelling, x-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS). The FTIR showed that the apatites are close to the biological due to the presence of HPO_4^{2-} , collagen presented the typical bands and its structural integrity, the hydrogels suffered broadening caused by the crosslinking mechanism. The swelling of the hydrogels in medium similar to the physiological promoted the release of curcumin. The XRD confirmed the hexagonal phase and well-crystallinity of the apatites and a crystalline phase of curcumin. The SEM showed the formation of grains in apatites, fibrous structure and smooth surface of collagen, increase in superface area in hydrogels with curcumin and crystal deposited on the surface of those with apatite. TGA and DSC showed the physic-chemical instability of the hydrogels, supposedly due to the competition of the hydrogen bond sites *intra* and *inter* collagenous chains with the solution and curcumin. EDS confirmed the non-stoichiometry of the apatite and the purity of collagen. The hydrogels showed potential as scaffolds with a novel underexplored biocompatible and bioactive crosslinker, with its release.

Keywords: Hydrogels. Curcumin. Biomaterial.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ilustração da aplicação e aparato de Iliarov..... | 17 |
| Figura 2 – Visão geral de arcabouços ósseos | 18 |
| Figura 3 – Estrutura óssea de macro a nano..... | 19 |
| Figura 4 – Estrutura da hidroxiapatita | 19 |
| Figura 5 – Ilustração do impedimento da resorção óssea através de estrôncio..... | 20 |
| Figura 6 – Evolução dos modelos da camada não-apatítica | 22 |
| Figura 7 – Rotas teóricas da formação das apatitas <i>in vivo</i> | 23 |
| Figura 8 – Principais aminoácidos constituintes do colágeno e ligações de hidrogênio entre as cadeias..... | 25 |
| Figura 9 – Estrutura da tripla-hélice do colágeno..... | 25 |
| Figura 10 – Tipos de reticulação..... | 28 |
| Figura 11 – Estrutura química da curcumina em pH ácido-neutro e alcalino, e os compostos da degradação parcial..... | 30 |
| Figura 12 – Um dos possíveis mecanismos de ligação de hidrogênio entre a curcumina e os principais aminoácidos do colágeno..... | 31 |
| Figura 13 – Fluxograma geral do processo de extração do colágeno..... | 33 |
| Figura 14 – Fluxograma da síntese das apatitas..... | 34 |
| Figura 15 – Fluxograma dos hidrogéis..... | 36 |
| Figura 16 – Fotos dos hidrogéis..... | 37 |
| Figura 17 – FTIR das apatitas, colágeno e hidrogéis reticulados e com apatitas..... | 43 |
| Figura 18 – Entumescimento dos hidrogéis..... | 45 |
| Figura 19 – DRX das apatitas e hidrogéis..... | 47 |
| Figura 20 – MEV da hidroxiapatita de cálcio (HAp) | 48 |
| Figura 21 – MEV da estrôncio-apatita (SrAp) | 48 |
| Figura 22 – MEV do colágeno..... | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 23 – MEV do Col2..... | 50 |
| Figura 24 – MEV do Col2C025..... | 51 |
| Figura 25 – MEV do Col2C025H10..... | 52 |
| Figura 26 – MEV do Col2C025S10..... | 52 |
| Figura 27 – TGA e DTG do Col2 e hidrogéis..... | 54 |
| Figura 28 – DSC de 25 a 400 °C e 5 °C.min ⁻¹ | 55 |
| Figura 29 – DSC realizado de 20 a 60 °C com rampa de 1 °C.min ⁻¹ | 56 |
| Figura 30 – Microscopias das apatitas com as regiões analisadas por EDS..... | 57 |
| Figura 31 – Microscopia do colágeno e região analisada por EDS..... | 58 |
| Figura 32 – Fotos do processo de extração do colágeno das peles de Tilápia..... | 63 |
| Figura 33 – Hidrogéis testados com 0,05% de riboflavina e 1,3% de colágeno..... | 64 |
| Figura 34 – FTIR das amostras Col2C025S5 e Col2C025S75..... | 65 |
| Figura 35 – Microscopia óptica do hidrogel Col2C025H5..... | 66 |
| Figura 36 – Microscopia óptica do hidrogel Col2C015H10..... | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Tamanho crítico de lesões ósseas | 17 |
| Tabela 2 – Sistema cristalino das apatitas e dimensões da célula cristalina..... | 20 |
| Tabela 3 – Principais tipos de colágeno e os tecidos que constituem..... | 24 |
| Tabela 4 – Hidrogéis encontrados na literatura | 27 |
| Tabela 5 – Hidrogéis e suas siglas | 36 |
| Tabela 6 – Bandas do FTIR das apatitas, colágeno e hidrogéis | 44 |
| Tabela 7 – Entalpia dos eventos térmicos das amostras com SrAp..... | 55 |
| Tabela 8 – Análise química por EDS das apatitas | 57 |
| Tabela 9 – Análise química por EDS do colágeno | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|--|
| FTIR | Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier. |
| EDS | Espectroscopia de Energia Dispersiva. |
| FAO | Organização para alimentação e agricultura. |
| DTG | Termogravimetria Derivada |
| TGA | Análise Termogravimétrica |
| DSC | Varredura Diferencial de Calorimetria |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| HAp | Hidroxiapatita de cálcio |
| SrAp | Estrôncio-hidroxiapatita |
| EDS | Espectroscopia de energia dispersiva |
| DRX | Difração de Raios-X |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 15 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 3.1 | Arcabouço..... | 16 |
| 3.1.1 | <i>Lesões ósseas</i> | 16 |
| 3.1.2 | <i>Engenharia de tecidos</i> | 18 |
| 3.2 | Apatitas..... | 19 |
| 3.3 | Colágeno | 23 |
| 3.4 | Hidrogéis..... | 27 |
| 3.5 | Curcumina..... | 29 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 | Obtenções das matérias-primas e reagentes..... | 32 |
| 4.1.1 | <i>Colágeno</i> | 32 |
| 4.1.2 | <i>Síntese das apatitas</i> | 34 |
| 4.1.3 | <i>Hidrogéis</i> | 35 |
| 4.2 | Caracterizações..... | 37 |
| 4.2.1 | <i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR</i> | 37 |
| 4.2.2 | <i>Entumescimento</i> | 38 |
| 4.2.3 | <i>Difração de Raios-X - DRX</i> | 39 |
| 4.2.4 | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV</i> | 39 |
| 4.2.5 | <i>Análise Termogravimétrica - TGA</i> | 39 |
| 4.2.6 | <i>Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC</i> | 40 |
| 4.2.7 | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva – MEV/EDS</i> | 40 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 5.1 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR | 41 |
| 5.2 | Entumescimento | 44 |
| 5.3 | Difração de Raios-X - DRX | 45 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.4 | Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV | 47 |
| 5.5 | Análise Termogravimétrica - TGA | 53 |
| 5.6 | Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC | 54 |
| 5.7 | Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva – MEV/EDS | 56 |
| 6 | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 60 |
| | APÊNDICE A – FOTOS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO COLÁGENO | 63 |
| | APÊNDICE B – HIDROGEL DE TESTE RETICULADO COM RIBOFLAVINA | 64 |
| | APÊNDICE C – FTIR DE HIDROGÉIS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SR-APATITA | 65 |
| | APÊNDICE D – MICROSCOPIA ÓPTICA DOS HIDROGÉIS | 66 |