

# CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DE GÉIS DE COLÁGENO ANIÔNICO

M. M. Horn, A. F. Giglioti, V. C. A. Martins e A. M. G. Plepis

Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos, Brasil

e-mail: mariliahorn@iqsc.usp.br

**Abstract:** Anionic collagen gels derived from bovine pericardium were obtained in different times of alkaline hydrolysis and were characterized by electrophoresis and oscillatory rheology. Electrophoresis showed the presence of two bands corresponding to the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  chains, typical of collagen type I. Viscosity complex in function to the temperature provided the protein denaturation temperature that decrease with the increase in the hydrolysis time (increase of negative charges in tropocollagen). Anionic collagen gels are elastic since  $G' > G''$  and the presence of negative charges makes the tropocollagen molecules more solvated, reducing its mobility and reflecting an increase in the elastic modules.

**Palavras-chave:** colágeno aniônico, hidrólise alcalina, reologia.

## Introdução

A utilização de colágeno em aplicações médicas (reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões) está relacionada à baixa imunogenicidade, excelente biocompatibilidade, habilidade de promover o crescimento celular e a capacidade da reconstrução *in vitro* da estrutura microfibrilar encontrada em tecidos naturais [1].

O colágeno é a proteína mais abundante do reino animal, sendo que existem 29 tipos [2] distintos quimicamente entre si. O colágeno do tipo I é o mais abundante e é formado por duas cadeias idênticas chamadas  $\alpha_1$  e uma cadeia diferente  $\alpha_2$ . O arranjo dos aminoácidos nas cadeias  $\alpha$  consiste em tripletes em que o terceiro resíduo é a glicina. A forma mais comum, correspondente a um terço das estruturas é o tipo  $-(\text{Gly-X-Y})_n-$ , com X sendo prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp) [1].

O colágeno pode ser utilizado como um material injetável para a reparação de tecidos e como suporte de fármacos, bem como na preparação na forma de filmes, esponjas e membranas. Esta diversificação indica a necessidade de uma avaliação das características reológicas com o intuito de ajudar no controle e manipulação das suas propriedades físicas [3].

Neste trabalho foram utilizados géis de colágeno derivado de pericárdio bovino que foram preparados em diferentes tempos de hidrólise alcalina. A caracterização foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e medidas reológicas.

## Materiais e Métodos

**Colágeno Aniônico** – foi obtido por hidrólise alcalina de pericárdio bovino por tratamento [4] com uma solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  por períodos de 12, 24 ou 36 h a 25°C (PB12, PB24 e PB36), seguido de estabilização com uma solução contendo cloretos e sulfatos dos mesmos cátions. Após isso, foram realizadas lavagens com ácido bórico (3%), água destilada, EDTA 0,3% e água destilada novamente. Os géis foram obtidos por extração e homogeneização em solução de ácido acético pH 3,5 e estocados à temperatura de aproximadamente 5°C.

**Determinação das MM** – as massas molares foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS [5], com gel de 5% para empacotamento e 10% de separação. A razão  $\alpha_1/\alpha_2$  foi determinada por densitometria do gel, após coloração com Coomassie Blue. O padrão de proteínas de alta massa molecular (Sigma) utilizado foi uma mistura de: Miosina (205000 g mol<sup>-1</sup>),  $\beta$ -galactosidase (116000 g mol<sup>-1</sup>), Fosforilase b (97400 g mol<sup>-1</sup>), Albumina de Soro Bovino (66000 g mol<sup>-1</sup>), Ovalbumina (45000 g mol<sup>-1</sup>) e Anidrase Carbônica (29000 g mol<sup>-1</sup>).

**Medidas Reológicas** – Os ensaios de reologia oscilatória foram feitos em um reômetro AR – 1000N de deformação controlada da TA Instruments, com geometria cilíndrica duplo concêntrica e *gap* de 500 $\mu\text{m}$ . O sistema foi termostaticado por um banho circulatório modelo FS18 da Julabo com uma variação de temperatura de 0,1°C. Os ensaios de oscilação foram feitos a 25°C, frequência de 1,0 Hz e uma variação na tensão de oscilação de 0,001 a 50 Pa, para determinação da região viscoelástica. Os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) e a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) foram obtidos em função da temperatura ou frequência angular na região viscoelástica. Os ensaios de varredura de temperatura foram feitos de 25 a 65°C a uma frequência constante de 1,0 Hz, deformação de 1,0% e uma razão de aquecimento de 0,5 °C min<sup>-1</sup>, sendo os géis previamente estabilizados a 25°C. Os ensaios de varredura de frequência foram feitos de 0,5 a 100 rad s<sup>-1</sup> com deformação de 1,0%, em temperaturas que foram de 26 a 38°C.

## Resultados

A eletroforese em poliacrilamida/SDS dos géis de colágeno PB12, PB24 e PB36 (Figura 1) mostrou a presença das bandas correspondentes às cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ .

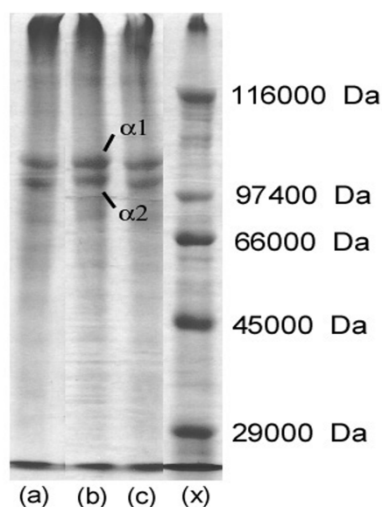


Figura 1: Eletroforese em gel poliacrilamida/SDS a 10% dos géis de PB: (a) 12h; (b) 24h; (c) 36h e (x) Padrão de alta massa molecular.

Para as medidas reológicas foi realizada a determinação das regiões viscoelásticas através da varredura dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da tensão de oscilação (Figura 2), sendo determinado o valor de deformação de 1% que foi utilizado para todas as outras medidas.

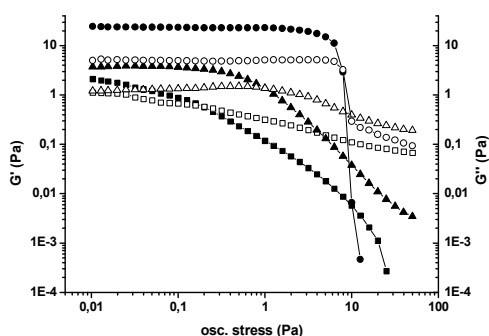


Figura 2: Módulos  $G'$  e  $G''$  em função da tensão de oscilação. PB12 —■—  $G'$ , —□—  $G''$ ; PB24 □7□  $G'$ , □8□  $G''$ ; PB36 —●—  $G'$ , —○—  $G''$ .

As curvas de viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) em função da temperatura mostram uma diminuição abrupta na magnitude da  $\eta^*$  em um pequeno intervalo de temperatura (Figura 3) refletindo o processo de desnaturação da proteína. A temperatura determinada pelo pico da curva da derivada  $d\eta^*/dT$  em função da temperatura fornece a temperatura de desnaturação ( $T_d$ ), como mostrado para o caso de PB36. Os valores

de  $T_d$  obtidos para os géis de colágeno estão na Tabela 1.

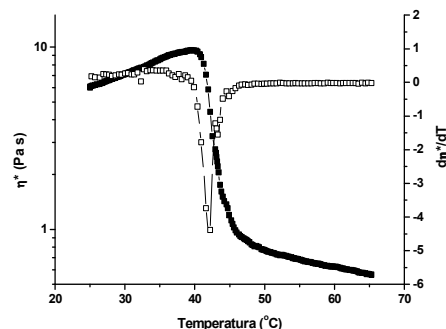


Figura 3: Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) em função da temperatura para o gel PB36 (□!□) e sua derivada  $d\eta^*/dT$  (□v□).

Tabela 1: Valores de  $T_d$  para os géis de colágeno

Gel	$T_d$ (°C)
PB12	44,5
PB24	43,5
PB36	42,2

A Figura 4 mostra  $G'$  e  $G''$  em função da frequência, a temperatura de 26°C, para todos os géis. Pode-se observar que ambos os módulos crescem com o aumento da frequência e que em todos os casos  $G' > G''$ .

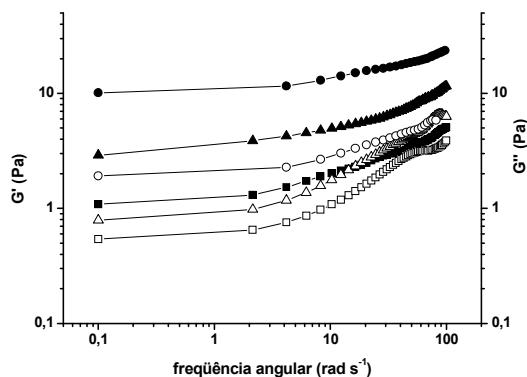


Figura 4: Módulos  $G'$  e  $G''$  em função da frequência angular a temperatura de 26°C, deformação de 1%. PB12 —■—  $G'$ , —□—  $G''$ ; PB24 □7□  $G'$ , □8□  $G''$ ; PB36 —●—  $G'$ , —○—  $G''$ .

O tempo de hidrólise afeta os módulos, pois quanto maior o tempo de hidrólise maior  $G'$  e  $G''$  e maior a diferença existentes entre ambos. Comparando-se PB12 e PB36, observa-se que a 0,1  $\text{rad s}^{-1}$  tem-se para PB12,  $G'$  sendo o dobro de  $G''$ , enquanto para PB36 nesta mesma frequência tem-se que  $G'$  é 5 vezes maior que  $G''$ .

A Figura 5 mostra, em escala logarítmica, que a  $\eta^*$  diminui linearmente em função da frequência angular e que quanto maior a temperatura maior a  $\eta^*$ . Com o aumento no tempo de hidrólise tem-se um deslocamento para valores maiores de  $\eta^*$  como observado para PB36 especialmente quando a varredura ocorre a temperaturas superiores a 33°C.

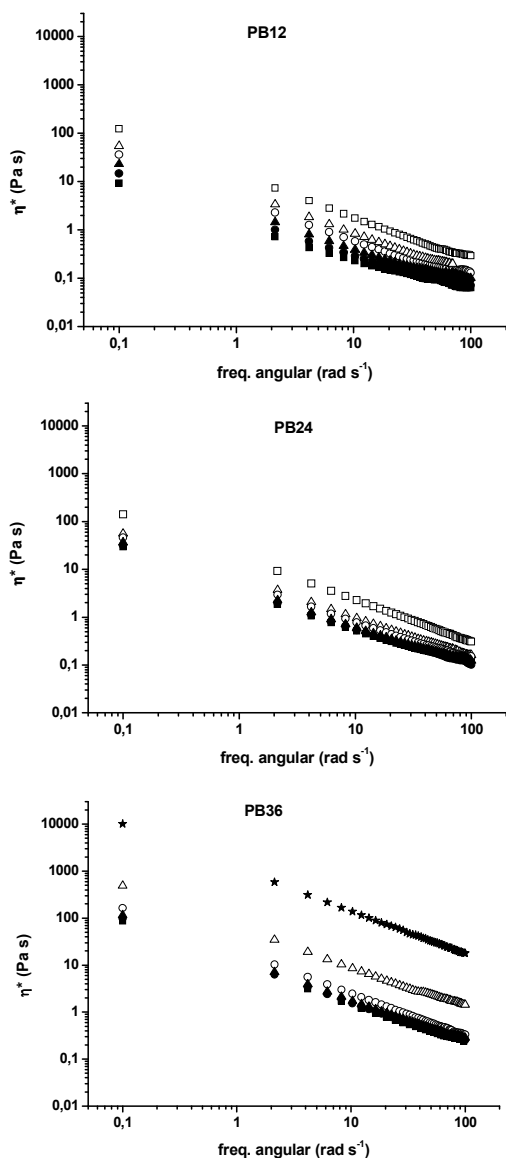


Figura 5: Viscosidade complexa em função da frequência angular a diferentes temperaturas: □ 26°C; □ 28°C; □ 30°C; □ 32°C; □ 33°C; □ 34°C; □ 35°C.

## Discussão

A obtenção de géis de colágeno aniônico ocorre por hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias  $\alpha$  do tropocolágeno [6], conforme ilustra a Figura 6. Este tratamento provoca um aumento no número de cargas negativas na molécula do tropocolágeno.

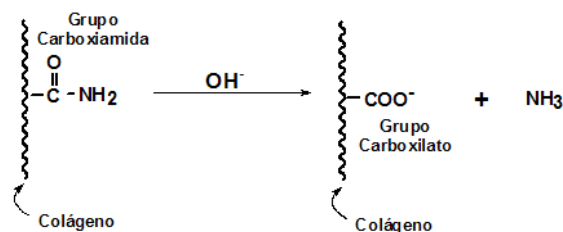


Figura 6: Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamida dos resíduos de Asn e Gln.

Através dos resultados obtidos por eletroforese foi possível observar que para todos os géis as relações  $\alpha_1/\alpha_2$  foram próximas de 2:1, confirmando a predominância de colágeno do tipo I, o principal componente do pericárdio bovino. Todos os géis foram caracterizados pela presença de duas bandas que correspondem às massas moleculares de 103250 e 95200 que estão relacionadas com as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , respectivamente.

A diminuição abrupta da viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) em um pequeno intervalo de temperatura (Figura 3) é indicativo do colapso da estrutura em tripla hélice para uma estrutura randômica (desnaturação). O valor da temperatura de desnaturação para os géis de colágeno aniônico tende a diminuir com o aumento do tempo de hidrólise, como já observado para membranas ou esponjas preparadas a partir desses géis [7]. Isso ocorre, pois a estrutura da tripla hélice do colágeno é estabilizada por ligações de hidrogênio intercadeias e por moléculas de água estrutural, que são alteradas pelo aumento no conteúdo de cargas negativas obtido pela hidrólise dos grupos carboxiamidas, ocorrendo uma maior repulsão entre as moléculas de tropocolágeno.

Os géis de colágeno aniônico têm caráter predominantemente elástico, ou seja,  $G' > G''$ . O aumento do número de cargas negativas presentes no tropocolágeno aumenta os módulos  $G'$  e  $G''$  devido a uma maior solvatação fazendo com o tropocolágeno tenha uma menor flexibilidade ou mobilidade (longo tempo de relaxação) e o gel tenha um comportamento de um sólido (não elástico).

A diminuição de  $\eta^*$  em função da frequência indica que esses géis de colágeno têm um comportamento *shear thinning*. A diferença existente entre os deslocamentos nas curvas de  $\eta^*$  versus  $\omega$  a temperaturas de 33 e 34°C nos géis de tempos de hidrólise diferentes pode estar relacionada também com o conteúdo maior de cargas negativas presentes na proteína que aumenta a repulsão entre as cadeias e facilita a solvatação levando a um aumento na  $\eta^*$ .

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida.

---

**Referências**

- [1] Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y. (2001), “Biomedical applications of collagen” *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 1-22.
- [2] Shöderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschemdorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., Lee, Y. (2007) “Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with Atopic Dermatitis” *PLoS Biology*, v. 5, p. 1952-61.
- [3] Lai, G., Li, Y., Li, G. (2008) “Effect of concentration and temperature on rheological behavior of collagen solutions” *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 113-22.
- [4] Bet, M.R., Goissis, G., Lacerda, C.A. (2001), “Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains” *Biomacromolecules*, v.2, p. 1074-9.
- [5] Laemmli, U.K. (1970) “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage” *Nature*, v.277, p. 680-5.
- [6] Giglioti, A.F. (2005), *Matrizes acelulares de colágeno: elastina a partir da desvitalização de pericárdio bovino: caracterização química, físico-química e estrutural*, Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 80 p., mar.
- [7] Horn, M.M., Martins, V.C.A., Plepis, A.M.G. (2006), “Avaliação morfológica e térmica de matrizes de quitosana:colágeno”, In: *Anais do IV Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, Caxambú, 08-11 ago.