

REOLOGIA DE GEIS DE COLÁGENO E SUAS BLENIDAS COM PVA

Virginia C. Amaro Martins, Maitê G. Vanella, Ana Maria de G. Plepis

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - São Carlos – SP - Brasil

virginia@iqsc.usp.br

Abstract: Collagen gels are widely used to produce biomaterials in various forms like films, membranes, sponges, etc. In this work collagen gels obtained by different processes (anionic collagen gel obtained by alkaline hydrolysis and a commercial collagen gel) and their blends with polyvinyl alcohol (PVA) were analyzed by rheology. Studies of oscillatory rheology showed different effects for PVA/collagen interaction depending of which collagen was used. Therefore differences in collagen preparation process generate gels with peculiar properties that have distinct interactions with PVA.

Palavras-chave: colágeno, PVA, reologia, desnaturação.

Introdução

O colágeno é a matriz extracelular de vários tecidos tais como tendões, pele, ossos, cartilagens e outros tecidos conectivos. Suas propriedades como baixa antigenicidade, biodegradabilidade, não ser tóxico e sua arquitetura fibrilar ser inerente aos tecidos naturais, indicam o colágeno como uma excelente base para biomateriais [1]. Além das aplicações nas áreas médica, odontológica ainda pode ser utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica.

A estrutura básica do colágeno consiste de 3 cadeias polipeptídicas entrelaçadas formando uma hélice tripla, denominada de tropocolágeno. Essa estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio intercadeias e por moléculas de água estrutural [2]. Dentre os 29 tipos [3] de colágeno existentes, o mais comum é o do tipo I. O colágeno pode se combinar com polímeros para produzir sistemas híbridos (blendas) com propriedades dependentes da composição desses sistemas [4]. A principal propriedade para um polímero sintético ser usado para formar uma blenda com colágeno é sua solubilidade em água.

Álcool Polivinílico (PVA) é um polímero sintético solúvel em água, atóxico, altamente hidrofílico, biodegradável, biocompatível [5] e por isso amplamente estudado para aplicações biomédicas. Com a sua excelente capacidade de formação de filmes, PVA é um bom candidato para obtenção de membranas e hidrogéis.

Vários estudos têm sido realizados em relação a blendas de colágeno/PVA [6-9], mas embora nesses estudos o colágeno estudado seja o colágeno tipo I, não

existe um relacionamento entre o processamento para obtenção desse colágeno na forma de géis ou dispersões e sua interação com o PVA. Neste trabalho géis de colágeno obtidos por diferentes processamentos e suas blendas com PVA são analisados por reologia.

Materiais e Métodos

Obtenção do gel de colágeno aniônico por hidrólise alcalina (CA) [10] - tendão bovino foi tratado com solução alcalina na presença dos sais de K^+ , Na^+ e Ca^{++} , contendo 6% (v/v) de DMSO a 25°C por um período de 96h. O material foi equilibrado com cloretos e sulfatos de K^+ , Na^+ e Ca^{++} por 6h, seguido por remoção de sais residuais, com solução de ácido bórico 3% e solução de EDTA 0,3% pH 11. O colágeno foi extraído com solução de ácido acético 0,5 mol L^{-1} , obtendo-se uma concentração final de 1,3% (massa/massa), por liofilização.

Preparação do gel de colágeno comercial (CC) – Esse gel foi obtido por dispersão de material obtido de couro bovino (Novaprom Food Ingredients Ltda) em ácido acético 0,5 mol L^{-1} , homogeneizado e desaerado com concentração final de 2,3% (massa/massa), determinada por liofilização. Esse colágeno é utilizado na indústria de alimentos.

Álcool Polivinílico (PVA) – Sigma, com massa molar de 70000-100000, completamente hidrolisado.

Blendas de colágeno PVA – preparou-se 50 g de blenda por mistura do gel de colágeno (250mg de colágeno) e 750 mg PVA completando-se a massa com ácido acético 0,5 mol L^{-1} . A blenda formada foi homogeneizada e desaerada. As blendas foram denominadas de CA:PVA e CC:PVA, para os géis de colágeno aniônico e comercial, respectivamente

Reometria Dinâmica – Os experimentos 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 μ m. O sistema foi termostatizado 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 (η^*) foram obtidos em função da temperatura ou frequência angular na região viscoelástica. Os ensaios de varredura de temperatura foram feitos de 25 a 55°C a uma frequência constante de 1,0 Hz, deformação de 0,5% e uma razão de aquecimento de 0,5 °Cmin⁻¹, sendo os géis previamente estabilizados na temperatura inicial (25°C). Os ensaios de varredura de frequência foram feitos de 0,5 a 100 rad s⁻¹ com deformação de 0,5%, em temperaturas que variaram de 25 a 34,5°C.

Resultados

Os módulos de armazenamento (G' , módulo elástico) e o de perda (G'' , viscoso) refletem a elasticidade e a dissipação de energia, respectivamente, como característica das propriedades viscoelásticas do material. A determinação da região viscoelástica (região linear) foi feita em função da deformação.

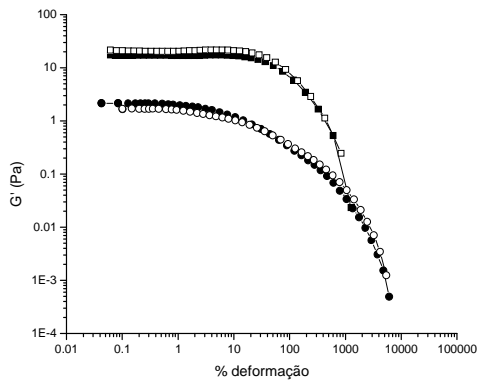


Figura 1: Módulo elástico em função da % de deformação para os géis de: —■— Colágeno aniônico (CA); —□— Blenda CA:PVA; —●— Colágeno comercial (CC); —○— Blenda CC:PVA.

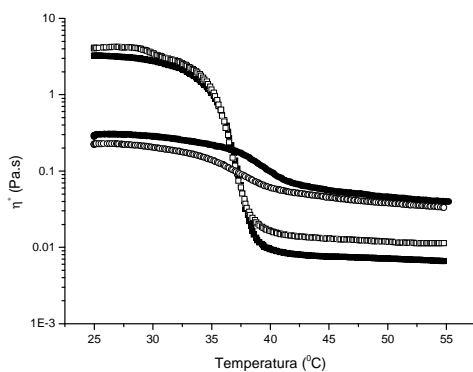


Figura 2. Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para os géis de: —■— Colágeno aniônico (CA); —□— Blenda CA:PVA; —●— Colágeno comercial (CC); —○— Blenda CC:PVA.

A figura 1 mostra G' versus % de deformação. A deformação de 0,5% foi escolhida para a determinação

dos demais parâmetros de oscilação dinâmica por fazer parte da região viscoelástica em todos os géis.

A Figura 2 mostra as curvas de variação de viscosidade complexa (η^*) em função da varredura de temperatura, a frequência de 1,0 Hz e deformação de 0,5%. Pode-se observar uma diminuição abrupta nos valores de η^* (~4 para 0,008 Pa s) entre 30 e 40°C para CA e CA:PVA e uma faixa maior (30-45°C) e menos abrupta (~0,25 para 0,05 Pa s) para o CC e CC:PVA.

Essa diminuição de η^* reflete a ruptura da hélice tripla da estrutura colagênica, ou seja, a sua desnaturação. A temperatura de desnaturação (T_d) para cada gel foi obtida pelo pico da primeira derivada das curvas da Figura 2, e seus valores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Temperatura de desnaturação (T_d) para os géis de colágeno e suas blends com PVA.

Gel	T_d (°C)
CA	34,9
CA:PVA	34,3
CC	38,3
CC:PVA	36,2

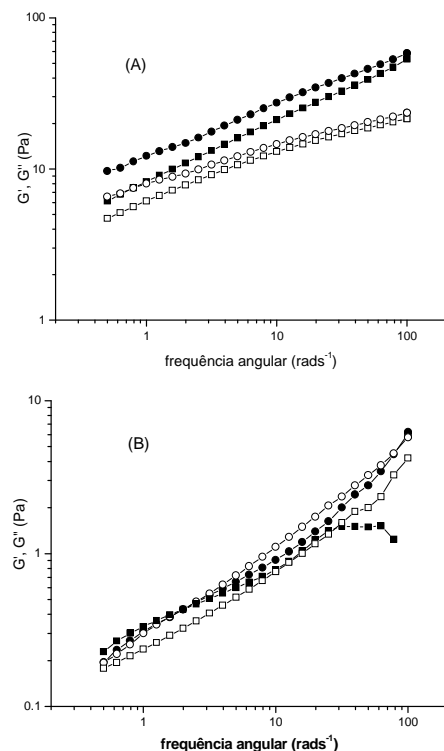


Figura 3: Módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência angular para: (A) Colágeno aniônico (CA) —■— G' , —□— G'' ; Blenda CA:PVA —●— G' , —○— G'' . (B) Colágeno comercial (CC) —■— G' , —□— G'' ; Blenda CC:PVA —●— G' , —○— G'' .

A Figura 3 mostra um comportamento crescente para G' e G'' em função da frequência angular, a $T=25^\circ\text{C}$ e 0,5% de deformação.

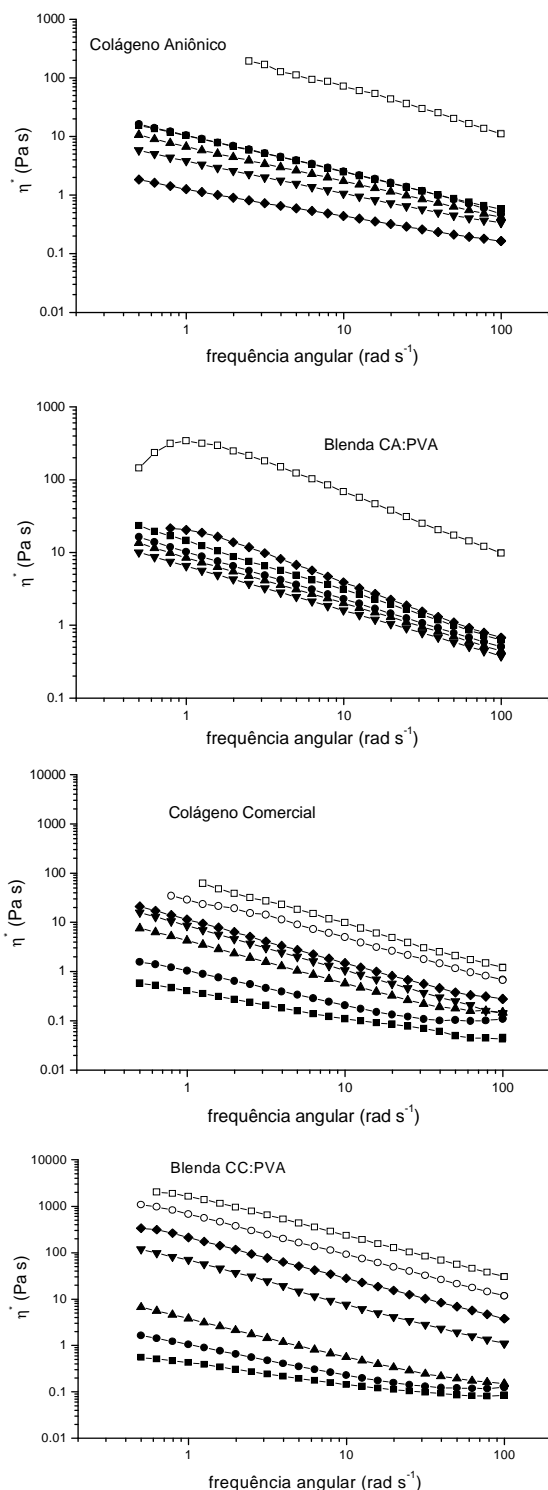


Figura 4: Viscosidade complexa em função da frequência angular a temperaturas de: —■— 25, —●— 30, —▲— 31, —▼— 32, —◆— 33, —□— 33,5°C para CA e CA:PVA; e —■— 25, —●— 27, —▲— 29, —▼— 31, —◆— 33, —○— 34, —□— 34,5°C para CC e CC:PVA.

Para o CA ocorre um aumento nos módulos com a adição PVA. Para CC, a presença de PVA provoca também um aumento nos valores dos módulos, mas em menores proporções. Além disso, pode-se verificar que para CC ocorre um cruzamento entre G' e G'' com o aumento da frequência em 12,6 rad s⁻¹, enquanto para CC:PVA ocorre em 1,99 rad s⁻¹. Após esta inversão portanto, o material passa a ter um comportamento viscoso.

Quando esse mesmo experimento é realizado a temperaturas maiores ocorre um aumento de G' e G'' , principalmente na presença de PVA e não é observada a inversão entre G' e G'' (resultados não mostrados).

A variação da η^* em função da frequência angular a diferentes temperaturas (Figura 4) mostra que a viscosidade diminui com o aumento da frequência. Para o CA o aumento de temperatura diminui a viscosidade até 33°C. A temperatura de 33,5°C a viscosidade aumenta cerca de 28 vezes em relação aos valores para 25°C. Para a blenda CA:PVA a diminuição da viscosidade com a temperatura ocorre até 32°C. Para 33°C já se observa um pequeno aumento nos valores de viscosidade, contudo a 33,5°C se tem um aumento 22 vezes maior que a 25°C.

Para CC e sua blenda com PVA tem-se um aumento da viscosidade com o aumento da temperatura.

Discussão

O comportamento viscoelástico para todos os géis mostrou G' maior que G'' ou seja, os géis são predominantemente elásticos. Contudo observou-se que os géis de CA são 10 vezes mais elásticos do que aqueles de CC, além da extensão da região viscoelástica também ser menor para CC.

A adição de PVA nos géis de colágeno estudados aumenta a elasticidade para o CA e diminui para CC, sugerindo que as interações entre PVA e os géis de colágeno sejam diferentes. A variação de G' em função de ω vem a confirmar esta proposição, pois para CC com o aumento de ω ocorre uma inversão entre G' e G'' tendo-se um gel com características mais viscosas e na presença de PVA essa inversão ocorre em ω menor.

Os módulos G' e G'' em função de ω perdem a linearidade acima de 34°C em todos os casos, demonstrando que as características dos modos de relaxação que estão associados à estrutura do tropocolágeno estão sendo alteradas devido à desnaturação.

A diminuição da η^* com o aumento da temperatura ocorre devido à desnaturação da proteína. A diferença existente nessa transição para os géis estudados, com CA tendo uma diminuição abrupta de aproximadamente 4 Pa s enquanto que para CC essa diminuição é de 0,2 Pa s pode estar refletindo uma maior homogeneidade na estrutura do gel de CA em relação ao de CC.

A temperatura de desnaturação para CA na presença de PVA é pouco menor que a do CA, enquanto que para CC essa diminuição é de cerca de 2°C, ou seja, em ambos os casos observa-se que o PVA desestabiliza termicamente a hélice tripla favorecendo a ruptura das ligações de hidrogênio e a remoção de água estrutural que suportam a estrutura do colágeno. Existem em literatura, trabalhos que são contraditórios quanto ao efeito de álcoois na estrutura do tropocolágeno, no que tange ao seu efeito na estabilização ou não da hélice tripla. [9,11].

A diminuição de η^* em função ω indica que esses géis têm um comportamento *shear thinning* independentemente da presença de PVA. Contudo a presença desse políol a temperaturas mais próximas da temperatura de desnaturação faz com que a η^* seja maior, provavelmente devido a uma maior solvatação da proteína. A diferença de comportamento entre CA e CC para a η^* versus ω a temperaturas menores que 33°C deve estar relacionada com diferenças estruturais presentes no tropocolágeno em função do método de obtenção do colágeno.

Portanto, embora ambos os géis de colágeno sejam obtidos de fonte bovina, as diferenças no tecido de origem e no processo de obtenção geram géis com diferenciadas propriedades reológicas, além de diferentes interações com outros polímeros.

Agradecimentos

À Novaprom Food Ingredients Ltda pelo fornecimento do colágeno comercial.

Referências

- [1] Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y. (2001), “Biomedical applications of collagen” *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 1-22.
- [2] Brodsky, B., Ramshaw, J.A.M. (1997) “The Collagen Triple-Helix Structure” *Matrix Biology*, v. 15, p. 545-54
- [3] Shöderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschemann, 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.
- [4] Sionkowska, A. (2006) “The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends” *Polymer Degradation and Stability*, v.91, p.305-12.
- [5] You, C. H., Miyazaki, T., Ishida, E., Ashizuka, M., Ohtsuki, C., Tanihara, M. (2007) “Fabrication of poly(vinyl alcohol)-apatite hybrids through biomimetic process” *Journal European Ceramic Society*, v. 27, n.2-3, p.1585-88.
- [6] Sionkowska, A., Skopińska, J., Wisniewski, M. (2004) “Photochemical stability of collagen/poly(vinyl alcohol) blends” *Polymer Degradation and Stability*, v.83, p.117-25.
- [7] Lešinský, D., Fritz, J., Braun, R. (2005) “Biological degradation of PVA/CH blends in terrestrial and aquatic conditions” *Bioresource Technology*, v.96, p. 197-201.
- [8] Degirmenbasi, N., Kalyon, D.M., Birinci, E. (2006) “Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol)” *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, v.48, p. 42-9.
- [9] Lai, G., Du, Z., Li, G. (2007) “The rheological behavior of collagen dispersion/poly(vinyl alcohol) blends” *Korea-Australia Rheology Journal*, v. 19, n.2, p.81-8.
- [10] 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.
- [11] Usha, R., Ramasami, T. (2004), “The effects of urea and *n*-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity using DSC, circular dichroism and viscosity” *Thermochimica Acta*, v.409, p.201-6.