UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Maitê Golinelli Vanella Pedroso

**Estudo comparativo de colágeno hidrolisado
e comercial com adição de PVA.**

São Carlos

2009

Maitê Golinelli Vanella Pedroso

**Estudo comparativo de colágeno hidrolisado
e comercial com adição de PVA.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Química
Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2009

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por que sem Ele nada seria possível.

À Prof^a. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

À Virginia C. A. Martins pela amizade, incentivo, paciência e ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao meu marido, Paulo Henrique G. Pedroso, pela paciência, apoio, carinho e atenção.

Aos meus pais, Renato Vanella e Inez Golinelli Vanella, minha irmã Ingrid Golinelli Vanella e minha avó, Nair E. T. Golinelli, pela preocupação, apoio e carinho.

Aos amigos de Laboratório, Fabiana, Marília (Gaúcha), Aline, Klaus, Edson, Waldemir, Lucas e Murilo, pelo apoio nas horas difíceis e companhia diária.

Às secretárias Cláudia e Veroneide pelos serviços prestados, gentileza e dedicação.

A todo pessoal da Biblioteca e da Seção de Alunos, em especial para Eliana, Lia, Sônia, Solange, Wilneide, Vitória, Bernadete, Silvia e Andréia.

Aos amigos: que seriam muitos a serem citados, pelo incentivo, apoio e amizade.

À Novaprom Food Ingredients Ltda, Lins – SP, em especial a Beatriz Clark, diretora técnica, pelo fornecimento do colágeno comercial.

Aos amigos da Pós-graduação pela amizade e convivência no dia-a-dia.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

<i>I.1 - Biomateriais</i>	13
<i>I.2 – Colágeno</i>	13
<i>I.3 - Álcool Polivinílico (PVA)</i>	17
<i>I.4 - Interação Colágeno-PVA</i>	18
<i>I.5 - Reologia</i>	19
<i>I.5.1 – Viscosidade</i>	20
<i>I.5.2 – Elasticidade</i>	22
<i>I.5.3 – Viscoelasticidade Linear</i>	23
II. Objetivo	25
III. Metodologia	26
<i>III.1. Obtenção do colágeno hidrolisado</i>	26
<i>III.2. Colágeno comercial</i>	26
<i>III.3. Álcool polivinílico (PVA)</i>	27
<i>III.4. Preparação das blendas de Colágeno:PVA</i>	27
<i>III.5. Caracterização</i>	28
<i>III.5.1. Liofilização</i>	28
<i>III.5.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)</i>	29
<i>III.5.3. Estabilidade térmica</i>	29

III.5.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	30
III.5.5. Determinação da massa molecular (MM).....	30
III.5.6. Estudo reológico.....	32
IV. Resultados e discussão.....	33
IV.1. Colágeno	33
IV.2. Blendas.....	35
IV.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	37
IV.4. Análise térmica	42
IV.4.1 Termogravimetria	42
IV.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
IV.6. Ensaio de reologia.....	51
IV.6.1. Determinação da região viscoelástica.....	51
IV.6.2. Estudos reológicos com variação de Frequência.....	54
IV.6.3. Variação de viscosidade complexa (η^*) em função frequência angular..	58
IV.6.4. Análise de escoamento em função da temperatura.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla	14
Figura 2: Representação esquemática da estrutura da hélice tripla do colágeno.....	15
Figura 3: Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas. ..	16
Figura 4: Representação esquemática da estrutura do álcool polivinílico (PVA): (A) monômero; (B) Polímero	18
Figura 5: Escoamento de um fluido newtoniano com cisalhamento simples.....	20
Figura 6: Esquema com os possíveis ângulos de defasagem (DARBY, 1976).....	24
Figura 7: Esquema representativo da corrida de eletroforese.	31
Figura 8: Fotos digitais das amostras de colágeno após liofilização, (A) C24 (B) C96 e (C) CC.	33
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS para (A) Padrão(B) C24h, (C) C96h, (D) CC e (E) Padrão.....	34
Figura 10: Curva de calibração para determinação da massa molecular das amostras de colágeno. 1 - β -galactosidade, 2 - Fosforilase b, 3 - Albumina de Soro Bovino e 4 - Ovoalbumina.....	35
Figura 11: Fotos digitais das blendas após liofilização, (A) C24:PVA3 1:1, (B) C96:PVA3 1:1, (C) CC:PVA3 1:1, (D) C24:PVA7 1:3, (E) C96:PVA7 1:3, (F) CC:PVA7 1:3.	36

Figura 12: Espectro de absorção na região do infravermelho do PVA, (—) PVA 3 e (—) PVA7.37

Figura 13: Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras de colágeno, (—) C24, (—)C96 e (—) CC.38

Figura 14: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de C24 e blendas com PVA, (—) C24, (—)C24:PVA3 1:1, (—)C24:PVA3 1:3, (—)C24:PVA7 1:1 e (—)C24:PVA7 1:3.....39

Figura 15: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de C96 e blendas com PVA, (—) C96, (—)C96:PVA3 1:1, (—)C96:PVA3 1:3, (—)C96:PVA7 1:1 e (—)C96:PVA7 1:3.....40

Figura 16: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de CC e blendas com PVA, (—) CC, (—)CC:PVA3 1:1, (—)CC:PVA3 1:3, (—)CC:PVA7 1:1 e (—)CC:PVA7 1:3.....40

Figura 17: Possíveis ligações entre as moléculas de colágeno e de PVA, (a) Colágeno :PVA, (b) Colágeno:colágeno e (c) PVA:PVA.41

Figura 18: Curva TG (A) e DTG (B) das amostras de colágeno, (—) C24, (—)C96, (—)CC.42

Figura 19: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra C24 e suas blendas com PVA, (—) C24, (—)C24:PVA3 1:1, (—) C24:PVA3 1:3, (—)C24:PVA7 1:1, (—)C24:PVA7 1:3 e (—) PVA.43

Figura 20: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra C96 e suas blendas com PVA, (—) C96, (—)C96:PVA3 1:1, (—)C96:PVA3 1:3, (—)C96:PVA7 1:1, (—)C96:PVA7 1:3 e (—) PVA.44

Figura 21: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra CC e suas blendas com PVA, (—) CC, (—)CC:PVA3 1:1, (—)CC:PVA3 1:3, (—)CC:PVA7 1:1, (—)CC:PVA7 1:3 e (—) PVA.44

Figura 22: Curvas DSC para , (—) C24, (—)C96 e (—)CC.47

Figura 23: Fotomicrografias com aumento de 200x de (A) C24, (B) C96 e (C) CC.. 49

Figura 24: Fotomicrografias com aumento de 200x de (A) C24, (B) C24:PVA, (C) C96, (D) C96:PVA, (E) CC e (F) CC:PVA.50

Figura 25: Módulo elástico (A) e viscoso (B) em função da % de deformação para os colágenos C24, C96, CC, PVA3 e PVA7.....52

Figura 26: Módulo elástico (A) e modulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.53

Figura 27: Módulo elástico (A) e modulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.53

Figura 28: Módulo elástico (A) e modulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno CC e suas blendas com PVA.....54

Figura 29: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para as amostras de colágeno, PVA3 e PVA7.54

Figura 30: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.....	56
Figura 31: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.....	56
Figura 32: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno CC e suas blendas com PVA.	57
Figura 33: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para os colágenos C24, C96, CC, PVA3 e PVA7.....	58
Figura 34: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.	59
Figura 35: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.	60
Figura 36: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno CC e suas blendas com PVA.....	60
Figura 37: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.....	62
Figura 38: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.....	63
Figura 39: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno CC e suas blendas com PVA.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura utilizada para as blendas colágeno:PVA em suas diferentes proporções.	28
Tabela 2: Tabela de porcentagem de perda de massa das amostras de colágeno.....	43
Tabela 3: Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios das blendas de colágenos.	45
Tabela 4: Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios das blendas de colágenos.	46
Tabela 5: Tabela de valores de Td das blendas de colágeno e PVA.	48
Tabela 6: Temperatura de desnaturação (Td) para as amostras de C24 e suas blendas com PVA.	62
Tabela 7: Temperatura de desnaturação (Td) para as amostras de C96 e suas blendas com PVA.	64
Tabela 8: Temperatura de desnaturação (Td) para as amostras de CC e suas blendas com PVA.	65

LISTA DE SÍMBOLOS

F	Força
f	Força de resistência
A_0	Área
σ	Tensão de cisalhamento
l_0	Dimensão Original
ΔL	Variação da Dimensão
G	Módulo de Cisalhamento
τ	Tensão de Cisalhamento
γ	Taxa de Cisalhamento
α	Ângulo de Deformação
η	Viscosidade
$\bar{\gamma}$	Deformação de Cisalhamento
v	Gradiente de Velocidade
h	Distância entre as Placas
δ	Ângulo de Defasagem
G^*	Modulo Complexo
G'	Módulo Elástico ou Módulo de Armazenamento
G''	Módulo Viscoso ou Módulo de Perda
τ^*	Tensão Complexa
η^*	Viscosidade Complexa

RESUMO

O desenvolvimento de novos materiais tem sido baseado na mistura de dois ou mais polímeros ou biopolímeros, onde soluções destes são misturadas em diferentes proporções na tentativa de se obter materiais com propriedades distintas das de seus precursores. Neste trabalho foram analisadas blendas colágeno:PVA. O colágeno utilizado foi o tipo I, porém proveniente de duas formas diferentes, o colágeno comercial que foi cedido pela Novaprom Food Ingredients Ltda e o colágeno obtido a partir de tendão bovino por meio de hidrólise alcalina em diferentes tempos (24h e 96h). As blendas e os colágenos foram caracterizados por análise térmica (DTG e DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR) e análises reológicas. As curvas DSC mostraram que o colágeno comercial é o de maior temperatura de desnaturação e que a adição de PVA não altera essa temperatura. Já as curvas TG mostraram que o PVA, seja qual for sua massa molecular, aumenta a estabilidade térmica do colágeno. A microscopia eletrônica mostrou que os colágenos com tratamento alcalino apresentam uma estrutura fibrilar e pouco desorganizada, enquanto o colágeno comercial apresenta uma estrutura uma pouco mais compacta. Através do FT-IR foi possível observar que a presença de PVA nas blendas não influencia na presença dos picos, sugerindo que não há interação química entre os mesmos. A análise reológica permitiu comparar os módulos elástico (G') e viscoso (G'') dos géis em diferentes proporções, tendo todos eles valores de G' maior do que G'' , ou seja, podemos concluir que os materiais são mais elásticos do que viscosos. Observa-se também a influência na viscosidade dos géis com a adição de PVA ao mesmo, sendo a viscosidade maior com o aumento da massa de PVA adicionado.

ABSTRACT

The development of new materials has been based on the mix of two or more polymers or biopolymers where solutions are mixed in different portions trying to get materials with distinct properties from their precursors. In this work different collagen solutions and collagen-PVA blends were analyzed. The used collagen was the type I, however obtained from two different forms, the commercial collagen that was provided by Novaprom Food Ingredients Ltda and the collagen obtained from bovine tendon by alkaline hydrolysis in different times (24h and 96h). The blends and collagen were characterized by thermal analysis (DTG and DSC), electronic scan microscopy (ESM), infrared absorption spectroscopy (FT-IR) and rheological analysis. DSC curves showed that the commercial collagen has the highest denaturing temperature and that the addition of PVA does not change this temperature. In other hand, TG curves showed that PVA, in any given molecular weight, increases collagen thermal stability. Electronic microscopy shows that collagen with alkali treatment have a fibrillar and little disorganized structure, insofar, the commercial collagen have a little more compact structure. By FT-IR it was to possible observe that the presence of PVA on blends have no influence on the peaks, suggesting that there is no chemical interaction between then. Rheological analysis allow to compare the elastic module (G') and the viscous module (G'') from blends in different proportions. All the obtained values for G' are higher than G'' , so it can be conclude that samples are more elastic than viscous.

I. Introdução

I.1 - Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material utilizado para produzir dispositivos para a substituição de uma parte ou de uma função do corpo de uma maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (PARK; LAKES, 2007). Materiais de aplicação médica destacam-se nesse cenário, onde diversos biomateriais têm sido desenvolvidos visando numerosas finalidades como, por exemplo: próteses, lentes, enxertos, stents, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea entre outros.

A biocompatibilidade e a biodegradabilidade geralmente são problemas na utilização de polímeros sintéticos nos tecidos aplicados (BURG; PORTER; KELLAM, 2000). Por isso o estudo de novos materiais tem sido baseado na mistura de dois ou mais polímeros ou biopolímeros, onde soluções destes são misturadas em diferentes proporções obtendo-se, muitas vezes, materiais com propriedades distintas das de seus precursores. Entre esses biomateriais destacam-se os estudos com colágeno (CEN et al., 2008), quitosana (COUTO; HONG; MANO, 2009; PRABAHARAN; 2008) e celulose (HEINZE; KOSCHELLA, 2005). Entre os polímeros encontram-se os polióis como o álcool polivinílico (PVA) (LAI; DU; LI, 2007, YUO et al., 2007) e o glicerol (SIONKOWSKA, 2006)

I.2 – Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, sendo encontrado em várias partes da estrutura biológica animal, como por exemplo, na pele, nos ossos, nos tendões e nos dentes (PARK, 1984; PATINO et al., 2002). Sua principal característica é a formação de

fibras insolúveis com alta força elástica, com capacidade de hidratação e reabsorção e baixa antigenicidade. As fibras de colágeno começam a aparecer durante o desenvolvimento embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos. Mais tarde, torna-se, responsável pela integridade dos tecidos, dos ossos, cartilagens, pele e estrutura de vasos sanguíneos e outros órgãos, correspondendo à cerca de 30% da proteína total e a 6% em peso do corpo humano (FRIESS, 1998). Com grande resistência à tração, a principal função do colágeno é acomodar e modular as forças mecânicas externas e internas que são exercidas no organismo.

O colágeno é um filamento de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formado fundamentalmente por uma unidade denominada tropocolágeno. Este, por sua vez, é constituído por três cadeias polipeptídicas denominadas α , que possuem forma helicoidal. Como mostrado na Figura 1, estas cadeias enrolam-se umas nas outras formando a hélice tripla, através da formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam esta estrutura (SIONKOWSKA, 2006).

Figura 1: Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla (SIONKOWSKA, 2006).

Atualmente são conhecidos 29 tipos de colágeno (SÖDERHÄLL et al., 2007), os quais se diferenciam na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais. O mais comumente encontrado e conhecido químicamente e estruturalmente é o colágeno do tipo I, o qual é formado por duas cadeias idênticas chamadas α_1 , possuindo cerca de 1.055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente α_2 , possuindo cerca de 1.029 resíduos.

Para a formação da hélice tripla (Figura 2) é necessária a ocorrência de resíduo de glicina (Gly) a cada terceira posição ao longo da cadeia e uma unidade repetitiva do triplete Gly-X-Y na sequência de aminoácidos, onde X e Y são freqüentemente os aminoácidos prolina e hidroxiprolina. A forma mais comum, correspondente a um terço das estruturas é o tipo $-(\text{Gly-X-Y})_n-$, com X sendo geralmente prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp). No restante das cadeias, X e Y correspondem a outros aminoácidos essenciais para a organização do colágeno em fibras (BRODSKY; RAMSHAW, 1997).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura da hélice tripla do colágeno (adaptado de BRODSKY; RAMSHAW, 1997).

O aumento da temperatura resulta em alterações na estrutura do colágeno, acarretando mudanças enormes nas suas propriedades físicas. Isso porque, a partir de certa

temperatura ocorre a destruição da estrutura tridimensional da hélice tripla do tropocolágeno, provocando a sua desnaturação e produzindo uma estrutura desorganizada conhecida como gelatina.

Para o colágeno tipo I a formação de fibras ocorre em pH 7,0, sendo este o pH onde se tem a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja zero (colágeno nativo). Esta resultante pode ser modificada para se obter um colágeno carregado negativamente, isto é possível através de hidrólise alcalina (Figura 3) dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes na cadeia α do tropocolágeno (BET, GOISSIS, LACERDA; 2001; LACERDA, PLEPIS, GOISSIS; 1998). Este tratamento remove células da matriz de colágeno nativo e pode adicionar até 130 cargas negativas na molécula (BET, GOISSIS, LACERDA; 2001), melhorando as propriedades piezoelétricas do colágeno (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996), o qual promove a osteogênese.

Figura 3: Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996).

O colágeno possui características distintas como biomaterial quando comparado com um polímero sintético, sendo a mais importante, o modo de interação com os tecidos do corpo. Isso está associado com propriedades naturais que incluem baixa resposta imunológica,

baixa toxicidade, a habilidade de promover o crescimento celular e a reconstrução *in vitro* da estrutura microfibrilar encontrada em tecidos naturais (LEE; SINGLA; LEE, 2001)

Algumas das características do colágeno que favorecem o seu uso como biomaterial são (LEE; SINGLA; LEE, 2001): ocorrer em grande quantidade no reino animal, constituindo aproximadamente um terço das proteínas; ser uma das proteínas mais conhecidas química e estruturalmente, apresentando baixo índice de alergenicidade; ser biocompatível; poder ter sua estrutura química e suas propriedades modificadas; possuir grande resistência à tração e baixa elasticidade; poder servir como matriz de liberação de fármacos; ter habilidade de suportar e induzir o crescimento celular; ser um material que pode ser trabalhado em diversas formas, como gel, membranas, filmes, esponjas e outras; ter estrutura (entrelaçada ou de fibras orientadas) que permite a retenção de grande quantidade de água; e ser biodegradável.

1.3 - Álcool Polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico (PVA), como mostrado na Figura 4, é um polímero sintético solúvel em água, atóxico, altamente hidrofílico, biodegradável, biocompatível (YUO et al., 2007) e por isso tem sido 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.

Os polímeros formados por ele têm grande aplicação como sistema de liberação de fármacos (AZEVEDO, 2002). Como o PVA é uma substância bioinerte, este tem sido muito estudado devido às propriedades anteriormente mencionadas.

Figura 4: Representação esquemática da estrutura do álcool polivinílico (PVA): (A) monômero; (B) Polímero

(GUERRINI, 2006)

1.4 - Interação Colágeno-PVA

Materiais para aplicações biomédicas devem possuir boas propriedades físico-químicas e mecânicas bem como biocompatibilidade. Apesar de os biopolímeros apresentarem boa biocompatibilidade, eles apresentam propriedades mecânicas pobres, como por exemplo, o colágeno. Seu uso como biomaterial é muitas vezes impedida por insuficiência de propriedades mecânicas. Em contrapartida, vários polímeros sintéticos comercialmente disponíveis, mesmo tendo as propriedades físicas necessária, não são aceitáveis do ponto de vista da biocompatibilidade. Além disso, a hidrofiliicidade dos polímeros sintéticos tem grande influência na preparação de blendas, pois a superfície e capacidade de hidrofiliicidade das blendas poliméricas afetam principalmente seu comportamento biológico.

Um meio possível para contornar o problema é o a associação das propriedades dos polímeros naturais e sintéticos através da mistura de polímeros, onde soluções destes são misturadas em diferentes proporções obtendo-se, muitas vezes, materiais com propriedades distintas das de seus precursores.

As blendas poliméricas sintéticas e de polímeros naturais representam uma classe de materiais que tem atraído grande atenção na área de bioaplicação, como biomaterial, devido à variedade das formas que podem ser obtidas.

Alguns estudos têm sido realizados em relação a blendas de colágeno/PVA (SIONKOWSKA; SKOPINSKA, WISNIEWSKI, 2004; LESINSKY; FRITZ; BRAUN, 2005; DEGIRMENBASI; KALYON; BIRINCI, 2006; LAI; DU; LI, 2007), pois a desnaturação térmica do colágeno depende fortemente do teor de água no biopolímero, e como o PVA é um polímero altamente hidrofílico, espera-se que com esta mistura o colágeno torne-se mais estável termicamente.

Estas misturas poliméricas de colágeno e PVA têm sido estudadas como biomateriais em uma ampla gama de aplicações, abrangendo de suturas a membranas para hemodiálise, e é possível encontrar na literatura estudos de citotoxicidade e citocompatibilidade (GOUGH; SCOTCHFORD; DOWNES, 2002; UCHINO et al., 2006; PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2006), de estabilidade térmica (SARTI; SCANDOLA, 1995; SIONKOWSKA; SKOPINSKA, WISNIEWSKI, 2004; SIONKOWSKA et al., 2009;) e de análise reológica (LAI; DU; LI, 2007), porém em poucos estudos o colágeno utilizado sofreu tratamento alcalino ou foi feita uma comparação de colágenos obtidos de fontes diferentes (LAI; LI; LI, 2008; FRIESS; SCHLAPP, 2001; SHANMUGASUNDARAM, RAVIKUMAR, BABU, 2004).

1.5 - Reologia

A palavra reologia vem do grego rheo= fluxo logos= estudo, sendo sugerido pela primeira vez pelo professor Eugene Cook Bingham no começo do século XX, para descrever o fluxo, no caso de materiais líquidos e deformação, no caso de materiais sólidos, porém teve sua definição aceita somente com a fundação da sociedade Americana de Reologia em 1929 (STEEFE, 1996).

A reologia é a ciência que se preocupa com a descrição das propriedades mecânicas dos materiais sob várias condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de

escoar e/ou acumular deformações reversíveis. O principal objetivo da reologia é compreender a estrutura do material e projetar o seu comportamento até mesmo em uma situação substancialmente diferente, muitas vezes mais complexa, do que as realizadas no ensaio ou teste reológico, a partir da relação entre a tensão aplicada sobre um corpo (ou material) e a resposta deste, a deformação, a tal esforço aplicado (RAO,2007).

1.5.1 – Viscosidade

A viscosidade é uma importante propriedade dos líquidos, no escoamento de fluidos, devido à resistência que as moléculas do mesmo oferecem ao seu movimento relativo, há a ação de forças dissipativas. A viscosidade é a propriedade do fluido que caracteriza esse atrito interno (ANCEY , 2005).

Se considerarmos um material contido entre duas placas paralelas, sendo uma estacionária e a outra em movimento longitudinal ao sistema após a aplicação de uma força (F) paralelamente a placa, sistema representado na Figura 5, temos como resultado o aparecimento da tensão de cisalhamento (τ) no sistema.

Quando temos um fluido, a variação da deformação na unidade de tempo é definida como taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), ou seja, quando um ponto qualquer presente no meio contínuo sofrer um deslocamento com gradiente de viscosidade, estará caracterizado a presença da taxa de cisalhamento.

Figura 5: Escoamento de um fluido newtoniano com cisalhamento simples (BARNES; HUTTON, 1989).

No sistema quando se aplica uma força (F), verifica-se o aparecimento de uma força de resistência (f), de mesma intensidade e com direção contrária ao movimento da placa adjacente à camada de líquido.

A viscosidade de cisalhamento ou simplesmente viscosidade é uma propriedade do material independente da sua geometria e é representada pela equação:

$$\eta = \frac{\text{tensão de cisalhamento } (\tau)}{\text{taxa de cisalhamento } (\gamma)} \quad (\text{Eq. 1})$$

A lei de Newton para escoamento foi aceita inicialmente para qualquer líquido, mais tarde verificaram-se suas limitações. A viscosidade pode ser afetada com intensidade variável principalmente pela temperatura, pressão, tempo de cisalhamento e taxa de cisalhamento.

1.5.1.1 – Classificação reológica dos fluidos.

Quanto à deformação, os fluidos podem ser classificados em (FERREIRA et al., 2005):

- Reversíveis ou elásticos: são sistemas que não escoam; sua deformação é reversível e o sistema obedece à Lei de Hooke.

- Irreversíveis ou viscosos: são sistemas que escoam; sua deformação é irreversível e o sistema obedece à Lei de Newton, de viscosidade constante.

Também podem ser classificados quanto à relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento:

- Fluidos Newtonianos: esses fluidos apresentam uma relação linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento, ou seja, a viscosidade mantém-se constante com a variação na taxa de cisalhamento.

- Fluidos Não Newtonianos: Ao contrário dos fluidos newtonianos, os fluidos não-newtonianos não apresentam uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, isto é, os valores da viscosidade mudam com a variação nos valores da taxa de cisalhamento. Esses valores de viscosidade são considerados como viscosidade aparente, podendo aumentar ou diminuir, de acordo com as características de cada fluido. Para alguns fluidos, os valores de viscosidade diminuem com o aumento da taxa de cisalhamento; nesse caso, diz-se que o material possui comportamento pseudoplástico. Quando o contrário acontece, ou seja, a viscosidade aumenta com aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento dilatante.

Além disso, os fluidos não newtonianos ainda podem ser classificados em: dependentes e independentes do tempo.

1.5.2 – Elasticidade

A elasticidade é uma propriedade importante no estudo dos sólidos. Um material que possua propriedades elásticas sofre deformação quando submetido a uma força qualquer. Quando a força atuante no sistema for removida, a deformação será removida, não existindo deformação permanente para um corpo elástico “ideal” (TONELI; MURR; PARK, 2005)

Ao aplicar-se uma força (f) paralelamente ao sistema, uma elongação (ΔL) e uma deformação ($\bar{\gamma}$) são obtidas como resultado da alteração do comprimento inicial que o corpo possuía.

A elongação depende da intensidade da força (f) aplicada, essa proporcionalidade é definida por uma constante elástica, propriedade do material e também da geometria do sistema.

A equação a seguir representa a força (f) da seguinte maneira:

$$f = G \cdot A_0 \cdot \Delta L \frac{1}{l_0} \quad (Eq. 2)$$

sendo G representa a constante elástica do material.

A constante de proporcionalidade G, também chamado módulo elástico e é uma propriedade característica do material.

1.5.3 – Viscoelasticidade Linear

A amplitude de tensão ou deformação de cisalhamento deve ser pequena para assegurar que as medidas fiquem dentro de um regime viscoelástico linear, ou seja, a região onde as equações viscoelásticas lineares se aplicam.

Quando o sistema está sob condições dinâmicas, pode-se definir ângulo de defasagem (δ), como sendo o ângulo entre as respostas obtidas da deformação e da tensão. O ângulo de defasagem é zero quando no sistema é aplicada uma deformação e as respostas obtidas indicam que a deformação e a tensão estão em fase, resultados encontrados em sistemas puramente elásticos. Para o sistema nas quais as respostas obtidas da tensão em relação à deformação são defasadas em 90°, são caracterizados como sistemas puramente viscosos (DARBY, 1976). Já para o caso dos sistemas viscoelásticos, os ângulos de defasagem estão compreendidos entre os dois casos acima citados, ou seja, entre a ausência de defasagem e a defasagem de 90° e são observados em condições experimentais conforme a Figura 6.

Figura 6: Esquema com os possíveis ângulos de defasagem (DARBY, 1976).

A relação entre a amplitude máxima de tensão e a amplitude máxima de deformação define o módulo complexo G^* , que fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas de qualquer substância através de suas duas componentes a elástica definida em G' como módulo de rigidez, que é a medida da energia armazenada e devolvida pelo material (módulo de armazenamento de cisalhamento), sendo associada com a contribuição elástica. E a outra é definida como G'' sendo a componente viscosa, estando associado com a deformação (fora de fase), chamado módulo de dissipação, ou seja, é a medida da energia dissipada pelo material, normalmente na forma de calor.

II. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo comparar o comportamento reológico de colágeno hidrolisado e colágeno comercial com a adição de PVA. Para isso foram utilizadas duas fontes de colágeno, o colágeno comercial e o colágeno aniônico de tendão bovino por hidrólise alcalina em diferentes tempos (24h e 96h), e o álcool polivinílico (PVA) comercial de duas massa molares diferentes (30000-70000 / 70000-100000) em diferentes proporções.

III. Metodologia

III.1. Obtenção do colágeno hidrolisado

Para a obtenção das amostras de colágeno foi utilizado tendão bovino que foi limpo e cortado em pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento. Este foi então tratado com uma solução fortemente alcalina (pH ~13) na presença de sais de cloretos e sulfatos de cálcio, potássio e sódio por um período de 24 ou 96 horas. Esse tratamento com solução alcalina provoca a hidrólise de grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln presentes na estrutura primária do tropocolágeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Após a remoção desta solução os materiais foram tratados com uma segunda solução de sulfatos e cloretos de sódio, potássio e cálcio para estabilização da hélice tripla do colágeno. Então o material foi lavado com solução de ácido bórico (3%), solução de EDTA (0,3%) pH 11 e com água deionizada até pH próximo à neutralidade.

Este material foi então homogeneizada em ácido acético (HAc) 0,5 mol L⁻¹, passado por peneira e armazenado sob refrigeração. Para facilitar discussões futuras a amostra que permaneceu 24 h na solução alcalina foi nomeada de C24 e a amostra que permaneceu por 96 h foi chamada de C96.

III.2. Colágeno comercial

O colágeno comercial utilizado foi cedido pela Novaprom Food Ingredients Ltda – Lins /SP, sendo um colágeno do tipo I, comumente utilizado na área alimentícia. O mesmo é proveniente de couro bovino e se apresentava em forma de finas partículas sólidas e secas. Para a obtenção do colágeno industrial o couro bovino é processado sob temperatura

controlada, pH controlado e trituração e moagem diferenciadas, sendo utilizados métodos suaves, com pHs próximos da neutralidade (5-8) e faixas moderadas de temperatura (30-75°C) (GIANNI, 2002).

Para a preparação das amostras com colágeno industrial o mesmo foi suspenso em ácido acético 0,5 mol L⁻¹, passado por peneira e armazenada sob refrigeração. Para facilitar discussões futuras esta amostra foi chamada de CC.

III.3. Álcool polivinílico (PVA)

O PVA utilizado foi o comercial da marca Sigma com duas massas moleculares diferentes: o de 30000-70000 tendo este um grau de hidrolise de 87-90 % e o de 70000-100000 sendo este 90-95 % hidrolisado.

III.4. Preparação das blendas de Colágeno:PVA

A partir das amostras de colágeno foram preparadas 50 g de mistura colágeno-PVA nas proporções 1:1 e 1:3, em massa, pela adição do PVA (30000-70000 ou 70000-100000) ao colágeno. A adição do PVA foi feita lentamente sob agitação constante à temperatura ambiente.

Todas as blendas mantiveram a concentração de colágeno constante (em massa) mesmo após o acréscimo do PVA. Estas foram homogeneizadas, desaeradas e guardadas sob refrigeração. Para facilitar discussões futuras as blendas foram nomeadas e são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Nomenclatura utilizada para as blendas colágeno:PVA em suas diferentes proporções.

Colágeno	PVA (MM . 10 ³)	Proporção	Nomenclatura
C24	30-70	1:1	C24:PVA3 1:1
		1:3	C24:PVA3 1:3
	70-100	1:1	C24:PVA7 1:1
		1:3	C24:PVA7 1:3
C96	30-70	1:1	C96:PVA3 1:1
		1:3	C96:PVA3 1:3
	70-100	1:1	C96:PVA7 1:1
		1:3	C96:PVA7 1:3
CC	30-70	1:1	CC:PVA3 1:1
		1:3	CC:PVA3 1:3
	70-100	1:1	CC:PVA7 1:1
		1:3	CC:PVA7 1:3

III.5. Caracterização

III.5.1. Liofilização

A concentração das amostras de colágeno foi determinada através de liofilização. Para isso cerca de 2 mL das mesmas (C24, C96 e CC) foi colocado em tubos de ensaio previamente tarados. Esses materiais foram pesados, congelados, liofilizados até peso constante. O equipamento utilizado foi um liofilizador da marca Edwards Brasil Ltda modelo Modulyo. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

III.5.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos a partir das amostras de colágeno e colágeno:PVA através de filmes secos sob placa de silício utilizando-se um espectrofotômetro Bomem MB-Séries com variação de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

III.5.3. Estabilidade térmica

Para o estudo de estabilidade térmica foram utilizadas amostras liofilizadas de colágeno e colágeno:PVA. Estas foram preparadas colocando as amostras já homogeneizadas em formas de Teflon®, congelado-as e posteriormente liofilizado-as.

III.5.3.1. Termogravimetria (TG)

O TG foi feito com amostras liofilizadas de aproximadamente 6 mg em atmosfera de ar sintético, com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na faixa de 25 $^{\circ}\text{C}$ a 800 $^{\circ}\text{C}$. O aparelho utilizado foi um analisador da TA Instruments, modelo TGA-2050

III.5.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O DSC foi feito em atmosfera de ar sintético, com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na faixa de 5 $^{\circ}\text{C}$ a 450 $^{\circ}\text{C}$. Foram utilizadas amostras liofilizadas de aproximadamente 10 mg, que foram deixadas em solução tampão de fosfato 0,13 mol L^{-1} por 24h para observação da temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno. Antes da análise, o

material foi deixado em papel de filtro por 2 min com um peso de 107 g para eliminar o excesso de água. O aparelho utilizado foi um analisador da TA Instruments, modelo DSC-2010.

III.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias foram obtidas da secção transversal das amostras liofilizadas obtidas como descrito para os ensaios de estabilidade térmica. Essas amostras foram coladas em suportes com fita adesiva condutora e recobertas com uma fina camada de ouro de 20 nm em um metalizador Balsers modelo SDC 050. O equipamento utilizado foi um microscópio da marca ZEISS modelo LEO-440.

III.5.5. Determinação da massa molecular (MM)

As massas moleculares (MM) das amostras de colágeno foram determinadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970) As concentrações dos géis utilizados foram de 7% para o gel de resolução e de 5% para o de empilhamento.

As amostras foram preparadas a partir dos colágeno por diluição dos mesmos com ácido acético obtendo-se uma concentração final de aproximadamente $3,0 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Foram misturados 100 μL desta com 50 μL de tampão da amostra (Tris-HCl 2 mol.L^{-1} pH 6,8, EDTA $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,5%), seguindo para o aquecimento em banho maria por cerca de 3 min.

Como referência utilizou-se o padrão de alto massa molecular (Sigma), que é uma mistura de: β -galactosidade (MM: 116.000 g/mol), Fosforilase b (MM: 97.400 g/mol), Albumina de Soro Bovino (BSA) (MM 66.000 g/mol), Ovoalbumina (MM 45.000 g/mol).

As condições para eletroforese foram inicialmente de 20 mA e 75 V. Ao final da eletroforese o gel foi fixado com uma solução de metanol:água:HAc (5:4:1) e as zonas correspondentes às proteínas foram reveladas com corante Comassie Brilhante Azul R-250. Em seguida, o excesso de corante foi removido com HAc 7%, e finalmente o gel foi deixado para secar entre duas folhas de celofane com uma solução de metanol:glicerol:água (30:3:67).

A Figura 7 mostra o esquema representativo de uma corrida de eletroforese.

Figura 7: Esquema representativo da corrida de eletroforese (Embrapa).

As massas moleculares foram calculadas em função dos valores dos Fatores de Retenção (R_f) dos padrões, que são dados por:

$$R_f = \frac{\text{Distância migrada pela proteína}}{\text{Distância migrada pelo corante}} \quad (\text{Eq. 3})$$

A partir dos valores de Rf construiu-se uma curva de calibração do tipo log da massa molar vs Rf, sendo determinadas as massas moleculares do colágeno por interpolação.

III.5.6. Estudo reológico

O estudo reológico foi feito com as amostras de colágeno aniônico, de colágeno comercial e também com suas respectivas blendas com PVA (30000-70000 ou 70000-100000) na proporção 1:1 e 1:3 (massa/massa).

Este estudo foi efetuado em um aparelho AR – 1000N de tensão controlada da TA Instruments, com geometria cilíndrica duplo concêntrica e “gap” de 500 μm e a temperatura de 25°C. A região viscoelástica foi obtida através de varredura de tensão de 0,001 a 50 Pa, onde G' e G'' foram medidos como função da deformação à frequência constante de 1,0 Hz. Ensaio de varredura de frequência foram realizados de 0,5 a 300 rad s^{-1} e deformação de 0,5 %. A varredura de temperatura foi obtida de 25 a 55 °C com razão de aquecimento de 0,5 °C min^{-1} e uma frequência de 1,0 Hz e deformação de 0,5 %.

IV. Resultados e discussão

IV.1. Colágeno

Para a preparação das amostras de colágeno foram utilizadas duas fontes de colágeno diferentes, o colágeno aniônico (C24 e C96) e colágeno comercial (CC), porém ambos os colágenos do tipo I. Estas amostras foram preparadas através da homogeneização do colágeno em ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A concentração de colágeno em cada amostra foi determinada por processo de liofilização e obtida através da média de três amostras independentes. As concentrações determinadas foram $2,30 \pm 0,01\%$, $1,17 \pm 0,005\%$ e $1,31 \pm 0,005\%$ em massa de colágeno para CC, C24 e C96 respectivamente. A Figura 8 mostra o aspecto das amostras após a liofilização.

Figura 8: Fotos digitais das amostras de colágeno após liofilização, (A) C24 (B) C96 e (C) CC.

É possível notar a semelhança entre as amostras após a liofilização, através das fotos. Independentemente da fonte e do tempo de tratamento a aparência das amostras após a liofilização é a mesma, estas apresentaram um aspecto esponjoso, macio e de coloração esbranquiçada.

As massas moleculares dos componentes protéicos presentes nas amostras de colágeno foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS 10%. A Figura 9 mostra a foto digital da eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS.

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS para (A) Padrão (B) C24h, (C) C96h, (D) CC e (E) Padrão.

A Figura 10 mostra a curva de calibração, que tem como equação $\text{Log}(\text{MM}) = 5,33 - 0,71R_f$ e o valor do índice de correlação linear é de 0,946.

Figura 10: Curva de calibração para determinação da massa molecular das amostras de colágeno. 1 - β -galactosidade, 2 - Fosforilase b, 3 - Albumina de Soro Bovino e 4 - Ovoalbumina.

Os valores das massas moleculares, obtidos por interpolação na curva de calibração mostram que as amostras são caracterizadas pela presença de bandas com valores próximos aos descritos para cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e suas massas moleculares são aproximadamente 103 k Da e 101 k Da, típicas de colágeno tipo I. A ação desnaturante do lauril sulfato de sódio (SDS) não permite afirmar que forma de hélice tripla do colágeno encontra-se intacta apesar dos resultados mostrarem frações de proteínas típicas para o mesmo. (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001)

IV.2. Blendas

As blendas obtidas pela mistura das amostras de colágeno com PVA apresentaram após a liofilização, um aspecto esponjoso, porém mais firme que os das amostras só de colágeno. Estas blendas diferem entre si pela coloração esbranquiçada que aumenta conforme se aumenta a proporção de PVA presente na blenda. Sendo assim é possível notar que as

blendas na proporção de 1:3 são mais esbranquiçadas que as na proporção 1:1. A Figura 11 mostra o aspecto de todas as blendas colágeno:PVA após a liofilização.

Figura 11: Fotos digitais das blendas após liofilização, (A) C24:PVA3 1:1, (B) C96:PVA3 1:1, (C) CC:PVA3 1:1, (D) C24:PVA7 1:3, (E) C96:PVA7 1:3, (F) CC:PVA7 1:3.

IV.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho para o PVA, como mostrada na Figura 12, apresentou uma banda intensa de absorção na região de 3424 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo OH, uma banda de absorção correspondente ao estiramento -CH ocorrendo em 2930 cm^{-1} e uma banda de absorção na região de 1094 cm^{-1} de forte intensidade devido ao estiramento da ligação C-O. Não existe diferença entre os espectros dos PVA de diferentes massas molares.

Figura 12: Espectro de absorção na região do infravermelho do PVA, (—) PVA 3, (—) PVA7.

O espectro no infravermelho para as amostras de colágeno apresentou as principais bandas características em 1.658 cm^{-1} , típica de amida I, devido ao estiramento da carbonila; em 1.552 cm^{-1} , relacionado à amida II, devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N; em 1.235 cm^{-1} , correspondem as vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H; em 1.450 cm^{-1} , correspondente a estereoquímica dos

anéis pirrolidínicos e próximo a 3.350cm^{-1} , devido ao estiramento O–H (SIONKOWSKA et al., 2004).

A partir da análise dos espectros é possível observar que os picos de absorção foram preservados para todas as amostras e que não ocorre o aparecimento de novos picos. Sendo assim podemos afirmar que não existe diferenças visível entre as amostras de colágeno, não importando a origem ou o tratamento que ocorre no mesmo.

Figura 13: Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras de colágeno, (—) C24, (—) C96 e (—) CC.

Através da relação da absorbância das bandas em 1235cm^{-1} e 1450cm^{-1} que se referem à banda da amida III e estereoquímica dos anéis pirrolidínicos, pode-se verificar a integridade da hélice tripla do colágeno. A primeira é sensível à presença de estrutura secundária do tropocolágeno, já a segunda independe dessa estrutura. Sendo assim, por meio da determinação da razão entre as absorbâncias nas bandas de números de onda 1235 e 1450cm^{-1} podemos avaliar a integridade da hélice tripla. Quando a estrutura helicoidal do tropocolágeno permanece íntegra o valor da relação $1235/1450\text{cm}^{-1}$ é próximo de um, quando

esta estrutura encontra-se desnaturada esses valores estão por volta de 0,5 (SILVESTER; YANNAS; FORBES, 1989)

Todos os valores encontrados foram próximos da unidade, sendo de 1,03, 1,04 e 1,04 para C24, C96 e CC respectivamente. Portanto a estrutura helicoidal do colágeno não se encontra desnaturada e é possível afirmar que o tratamento alcalino sofrido pelas amostras de colágeno ou o método utilizado para a preparação do colágeno industrial não alterou essa estrutura.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram os espectros na região do infravermelho das diferentes amostras de colágeno e suas respectivas blendas com PVA. O PVA apresenta um pico de absorção próximo à 1450 cm^{-1} que pode interferir nos valores da relação $1235/1450\text{ cm}^{-1}$, e portanto, esta não foi calculada para as blendas colágeno:PVA.

Figura 14: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de C24 e blendas com PVA, (—) C24,

(—)C24:PVA3 1:1, (—)C24:PVA3 1:3, (—)C24:PVA7 1:1 e (—)C24:PVA7 1:3.

Figura 15: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de C96 e blendas com PVA, (—) C96, (—)C96:PVA3 1:1, (—)C96:PVA3 1:3, (—)C96:PVA7 1:1 e (—)C96:PVA7 1:3.

Figura 16: Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de CC e blendas com PVA, (—) CC, (—)CC:PVA3 1:1, (—)CC:PVA3 1:3, (—)CC:PVA7 1:1 e (—)CC:PVA7 1:3.

A partir da análise dos espectros na região do infravermelho das blends colágeno:PVA é possível observar que os picos de absorção referentes ao colágeno foram preservados e o não aparecimento de novos picos sugere que não há interação química entre os mesmos.

Como o colágeno é um doador de hidrogênio, era esperada a formação de ligações com o grupo hidroxila do PVA, porém, segundo estudos da literatura essa interação só é notada em soluções com uma concentração muito baixa de PVA (LAI; DU; LI, 2007). Para concentrações maiores de PVA a formação de ligações de hidrogênio entre estas duas macromoléculas diferentes concorre com a formação de vínculos entre as moléculas do mesmo polímero, como é mostrado na Figura 17.

Figura 17: Possíveis ligações entre as moléculas de colágeno e de PVA, (a) Colágeno :PVA, (b) Colágeno:colágeno e (c) PVA:PVA (LAI; DU; LI, 2007).

IV.4. Análise térmica

IV.4.1 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas para as amostras liofilizadas de colágeno (Figura 18) mostram que a decomposição ocorreu em três estágios de perda de massa. O primeiro atribuído à perda de água estrutural na faixa de 25 a 200°C, o segundo a decomposição térmica do colágeno na faixa de 200 a 400°C e o terceiro à carbonização do material acima de 400°C.

Figura 18: Curva TG (A) e DTG (B) das amostras de colágeno, (—) C24, (—) C96, (—) CC.

A Tabela 2 mostra as porcentagens de perda relativas das amostras liofilizadas de colágeno e seus respectivos estágios de perda de massa. As amostras perderam praticamente a mesma porcentagem de massa nos três estágios, mostrando assim que para o estudo termogravimétrico, nenhuma diferença entre os colágenos é notada, mesmo que estes tenham sido obtidos de tecidos diferentes, tendão bovino (C24 e C96) e couro bovino (CC), ou que tenham sido tratados em soluções alcalinas.

Tabela 2: Tabela de porcentagem de perda de massa das amostras de colágeno.

Colágeno	Porcentagem de Perda de Massa (%)		
	1° Estágio (25 a 200°C)	2° Estágio (200 a 400°C)	3° Estágio (400 a 700°C)
C24	12,8	43,4	42,3
C96	13,5	46,2	38,4
CC	13,9	44,1	40,7

As Figuras 19, 20 e 21 mostram as curvas termogravimétricas e sua primeira derivada, das amostras de colágeno da amostra de PVA e de suas blendas. As curvas de PVA apresentaram um comportamento típico, independente do massas molecular, por isso foi apresentada somente uma curva, referente ao PVA3.

Figura 19: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra C24 e suas blendas com PVA, (—) C24, (—)C24:PVA3 1:1, (—) C24:PVA3 1:3, (—)C24:PVA7 1:1, (—)C24:PVA7 1:3e (—) PVA.

Figura 20: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra C96 e suas blends com PVA, (—) C96, (—) C96:PVA3 1:1, (—) C96:PVA3 1:3, (—) C96:PVA7 1:1, (—) C96:PVA7 1:3 e (—) PVA.

Figura 21: Curva (A) TG e (B) DTG da amostra CC e suas blends com PVA, (—) CC, (—) CC:PVA3 1:1, (—) CC:PVA3 1:3, (—) CC:PVA7 1:1, (—) CC:PVA7 1:3 e (—) PVA.

A curva TG obtida para a amostra de PVA3 mostrou comportamento típico (THOMAS et al., 2001), com quatro estágios, o primeiro estágio na faixa de 25 a 200 °C com 5,8% de perda de água, o segundo estágio na faixa de 200 a 400 °C com 61,5% de perda característica da degradação das ligações tipo (C-OH), o terceiro estágio na faixa de 400 à

500 °C com 19,4% de perda, caracterizado pela quebra da cadeia polimérica tipo (C-C) e o quarto estágio referente a carbonização acima de 500 °C com perda de 13,3 %.

As blendas apresentaram os mesmos quatro estágios de perda de massa observados para o PVA. Nestes casos a decomposição térmica do colágeno (200 a 400 °C) acontece em uma faixa de temperatura dentro do intervalo em que ocorre a decomposição térmica do PVA (250 a 400 °C e 400 a 500°C), não sendo assim possível calcular a porcentagem de perda de colágeno e a de PVA separadamente. Portanto os intervalos foram divididos em faixas de 25 a 200 °C devido à perda de água estrutural (primeiro estágio), 200 a 500°C relativo à decomposição térmica do colágeno e do PVA (terceiro e quarto estágio) e o intervalo de 500 a 700 °C relativo à carbonização do material (quarto estágio).

Através das curvas termogravimétricas observa-se que a temperatura inicial da decomposição do colágeno não varia. A presença de PVA aumenta essa temperatura independentemente da massa molar, porem quanto maior a quantidade de PVA maior a temperatura inicial de decomposição. Estes resultados sugerem que a presença de PVA aumenta a estabilidade térmica do colágeno (Tabela 3).

Tabela 3: Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios das blendas de colágenos.

	Temp. (°C)		Temp. (°C)		Temp.(°C)
C24	127	C96	125	CC	123
C24:PVA3 1:1	130	C96:PVA3 1:1	127	C24:PVA3 1:1	190
C24:PVA3 1:3	212	C96:PVA3 1:3	205	C24:PVA3 1:3	202
C24:PVA7 1:1	202	C96:PVA7 1:1	200	C24:PVA7 1:1	190
C24:PVA7 1:3	215	C96:PVA7 1:3	207	C24:PVA7 1:3	202

A Tabela 4 mostra as porcentagens de perda relativas às amostras liofilizadas de todas as blendas de colágeno:PVA e seus respectivos estágios de perda de massa.

Tabela 4: Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios das blendas de colágenos.

Amostra	Porcentagem de Perda de Massa (%)		
	1° Estágio (25 a 200°C)	2° Estágio e 3° Estágio (200 a 500°C)	4° Estágio (500 a 700°C)
C24:PVA3 1:1	9,0	65,7	23,0
C24:PVA3 1:3	7,4	73,9	16,9
C24:PVA7 1:1	7,9	65,2	24,8
C24:PVA7 1:3	7,5	75,8	14,6
C96:PVA3 1:1	10,4	66,1	23,4
C96:PVA3 1:3	7,2	82,7	8,5
C96:PVA7 1:1	8,0	66,9	22,9
C96:PVA7 1:3	6,9	86,9	4,6
CC:PVA3 1:1	9,9	63,3	24,8
CC:PVA3 1:3	6,2	84,1	7,3
CC:PVA7 1:1	9,4	64,9	23,3
CC:PVA7 1:3	6,9	84,7	6,7

De acordo com a perda de massa do primeiro estágio, verificou-se que, aumentando a quantidade de PVA nas blendas, menor é a quantidade de água perdida. No segundo estágio,

notou-se que a porcentagem de degradação das blendas aumenta com o aumento da quantidade de PVA. Isto também fica evidente na porcentagem de resíduo restante dos materiais a temperaturas superiores a 500 °C.

Analizando a Tabela 3 é possível notar que a massa molar do PVA não gera variação que possa ser considerada significativa em nenhum dos estágios, o que significa que essa diferença de massa não tem influencia para os estudos termogravimétricos.

IV.4.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Nesta técnica, a amostra a ser investigada e um material de referência é aquecida concomitantemente e submetidos a um programa controlado de temperatura. O princípio básico é manter a diferença de temperatura de uma amostra e de uma referência constante. Para que assim, a técnica forneça uma curva que representa a diferença entre as energias entregues para a amostra e a referência, registrada em função da temperatura ou do tempo.

As curvas DSC obtida para as amostras de colágeno (C24, C96 e CC) estão mostradas na Figura 22.

Figura 22: Curvas DSC para , (—) C24, (—)C96 e (—)CC.

As temperaturas de desnaturação (T_d) para as soluções de colágeno C24, C96 e CC são respectivamente de 48,6°C, 41,4°C e 52,7°C. É possível notar que os valores de T_d são menores para o colágeno que passou por tratamento alcalino do que para CC e que o tempo de tratamento alcalino influi no valor de T_d : quanto maior o tempo de tratamento, menor a T_d , como já observado em trabalhos anteriores do grupo (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2008). A Tabela 5 apresenta os valores de T_d para todas amostras de colágeno e blendas colágeno:PVA.

Tabela 5: Tabela de valores de T_d das blendas de colágeno e PVA.

<i>Solução</i>	<i>T_d (°C)</i>
C24	48,6
C24:PVA3 1:1	47,6
C24:PVA3 1:3	48,1
C24:PVA7 1:1	47,2
C24:PVA7 1:3	47,8
C96	41,4
C96:PVA3 1:1	41,8
C96:PVA3 1:3	42,1
C96:PVA7 1:1	42,4
C96:PVA7 1:3	42,6
CC	52,7
CC:PVA3 1:1	51,6
CC:PVA3 1:3	52,8
CC:PVA7 1:1	51,9
CC:PVA7 1:3	52,2

A adição de PVA nas amostras não gera uma variação de Td que possa ser considerada significativa, pois a variação nas amostras (C24 e suas blendas, C96 e suas blendas e CC e suas blendas) é muito pequena, apesar da variação de Td entre as amostras ser grande, sendo assim é possível afirmar que a presença do PVA não altera a Td do colágeno.

IV.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise morfológica das amostras de colágeno foram feitas fotomicrografias da superfície destas amostras liofilizadas. A amostra C24 (Figura 23 A) apresentou uma estrutura amorfa e desorganizada assim como a amostra C96 (Figuras 23B). Para as amostras de CC (Figuras 23C) notou-se a mesma estrutura amorfa e desorganizada, porém menos compacta que para as amostras de colágeno aniônico.

Figura 23: Fotomicrografias com aumento de 200x de (A) C24, (B) C96 e (C) CC.

Para observar possíveis alterações morfológicas após a incorporação do PVA nas amostras foram feitas micrografias de um corte transversal das amostras liofilizadas, comparando-se amostras com e sem PVA (Figura 24). Analisando as micrografias verifica-se que morfológicamente não se observam alterações após a adição de PVA.

Figura 24: Fotomicrografias com aumento de 200x de (A) C24, (B) C24:PVA, (C) C96, (D) C96:PVA, (E) CC e (F) CC:PVA.

IV.6. Ensaios de reologia

O estudo reológico é importante quando se visam aplicações biomédicas para o material, pois o conhecimento dos materiais possui uma importância prática muito grande tanto na produção de matérias-primas quanto na sua transformação em produtos. Os parâmetros avaliados foram: módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e viscosidade complexa (η^*).

IV.6.1. Determinação da região viscoelástica

Os módulos de armazenamento G' , módulo elástico e o de perda G'' , módulo viscoso, refletem o armazenamento e a dissipação de energia, respectivamente, como característica das propriedades viscoelásticas do material.

O termo viscoelasticidade refere-se ao comportamento no qual um material possui simultaneamente propriedades viscosas e elásticas, ou seja, possui uma propriedade encontrada nos líquidos de resistir ao escoamento e possui também uma propriedade elástica encontrada nos sólidos, onde o material sofre deformação quando submetido a uma força qualquer, sendo essa deformação removida quando a força atuante for removida do sistema.

Para a caracterização reológica das amostras é primordial a determinação da região viscoelástica linear das soluções a serem analisadas. A região viscoelástica linear é aquela em que a amostra responde à força ou tensão aplicada de uma forma homogênea, isto é, os módulos de armazenamento e perda são constantes a uma dada faixa de deformação. Este ensaio é importante, pois define a região de deformação a ser adotada nos ensaios reológicos e através deste ensaio também é possível determinar a deformação máxima que a amostra é capaz de suportar.

A determinação da região viscoelástica (região linear) para os materiais em estudo foi feita em função da deformação. A Figura 25 mostra G' e G'' em função da porcentagem de deformação. Observa-se que as amostras de colágeno têm comportamento estável (constante) até cerca de 10% de deformação, diminuindo rapidamente após este valor, porém as amostras de PVA tem comportamento constante somente até cerca de 0,5% de deformação. Assim a deformação de 0,5% foi escolhida para a determinação dos demais parâmetros de oscilação dinâmica por fazer parte da região viscoelástica para todas as amostras.

Figura 25: Módulo elástico (A) e viscoso (B) em função da % de deformação para os colágenos C24, C96, CC, PVA3 e PVA7.

A Figura 26, 27 e 28 mostram respectivamente as curvas de G' e G'' em função da deformação para a amostra de C24, C96, CC e suas blendas com PVA. Observa-se que em todas as amostras o comportamento constante ocorre até 10% de deformação, ou seja a presença de PVA não altera a região viscoelástica linear observada para o colágeno. Assim escolheu-se 0,5% de deformação para as medidas posteriores.

Figura 26: Módulo elástico (A) e módulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.

Figura 27: Módulo elástico (A) e módulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.

Figura 28: Módulo elástico (A) e módulo viscoso (B) em função da % de deformação para o colágeno CC e suas blendas com PVA.

IV.6.2. Estudos reológicos com variação de Frequência.

Neste ensaio a resposta do material é monitorada com o aumento da frequência angular dentro de uma amplitude de deformação e temperatura constantes. Este ensaio reológico foi realizado a uma temperatura de 25°C e a uma deformação de $0,5\%$.

A Figura 29 mostra as mudanças no módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para as amostras de colágeno e PVA.

Figura 29: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para as amostras de colágeno, PVA3 e PVA7.

Na frequência de 1 Hz ($6,28 \text{ rad s}^{-1}$), a solução C24 apresentou um G' em torno de 27 Pa e um G'' em torno de 14 Pa, possuindo os maiores valores de G' e G'' . O colágeno C96 apresentou nesta mesma deformação, valores intermediários nesta comparação, tendo G' em torno de 16 Pa e G'' em torno de 13 Pa. O colágeno CC apresentou os menores valores relativos de seus módulos, com G' em torno de 3,5 Pa e G'' em torno de 1 Pa. O módulo elástico (G') pode ser considerado como a extensão da formação do gel. O colágeno pode ser classificado como um colóide macromolecular, e, portanto, capaz de gerar, por agregação um sistema gel fibrilar, que é um sistema produzido a partir da junção de duas fases: uma fase dispersa macromolecular (colágeno ou proteína) e uma fase dispersante (água).

Apesar de serem de fontes diferentes, todas as amostras de colágeno apresentaram G' sempre maior que G'' , o que significa que as amostras são predominantemente elásticas., ou seja a resposta elástica do material é mais forte que a resposta viscosa. Os sistemas em estudo têm um comportamento predominantemente do tipo sólido.

As amostras de PVA apresentaram em uma frequência de 6 rad s^{-1} , um G' em torno de 0,005 Pa e um G'' em torno de 0,06 Pa, ou seja, $G'' > G'$, mostrando que as amostras têm predominantemente um caráter mais viscoso, independente da massa molecular.

As Figuras 30 e 31 mostram respectivamente as mudanças nos módulos G' e G'' em função da frequência para os colágenos C24, C96 e suas blendas com PVA. Com a adição de PVA a magnitude de G' e G'' aumenta com o aumento da frequência angular e G' é muito maior que G'' para todos os valores da frequência angular, com grande dependência da frequência, indicando comportamento típico de gel.

Figura 30: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno C24 e suas blends com PVA.

Figura 31: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno C96 e suas blends com PVA.

A adição de PVA aos colágenos C24 e C96 mostra um comportamento crescente tanto para G' quanto para G'' , porém G' permanece sempre maior que G'' , o que significa que as amostras são predominantemente elásticas. Mesmo com a adição de PVA as amostras apresentaram G' maior que G'' o que significa que a presença de PVA, independentemente da massa molecular, não altera o caráter elástico mostrado pelas soluções de colágeno.

A adição de PVA3 ao colágeno aniônico gera um aumento maior dos módulos que o PVA7. Este aumento sugere que a molécula de PVA com menor massa molecular facilita a competição dos grupos hidroxilas do poliol com as moléculas de água presentes na estrutura colagênicas no que se refere a formação de ligações de hidrogênio.

As amostras de colágeno CC apresentam resultados diferentes como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32: Curvas G' (A) e G'' (B) em função da frequência angular para o colágeno CC e suas blends com PVA.

A adição de PVA ao colágeno CC gera uma diminuição nos módulos e apesar do comportamento crescente para G' e G'' permanecer para todas as proporções, estes se cruzam a aproximadamente 60 rad s^{-1} , ou seja, G'' torna-se maior que G' e após esta inversão, o material passa a ter um comportamento viscoso. Nota-se também que o PVA3, de menor massa molecular, tem uma maior influencia nessa diminuição. Para o modulo elástico, em aproximadamente 6 rad s^{-1} , esses valores passam de 3,5 para 1,0 e 0,4 nas amostras de CC, CC:PVA3 1:1 e CC:PVA3 1:3, respectivamente e para as amostras CC:PVA7 os valores ficaram próximos de CC:PVA3 1:1. Os valores de G' diminuem até oito vezes enquanto os valores de G'' sofrem uma diminuição de até duas vezes com a adição do PVA.

O comportamento na varredura de frequência angular para os colágenos C24 e C96 é diferente do colágeno CC, provavelmente devido à metodologia de extração do colágeno ser diferenciada. Os colágenos C24 e C96 são extraídos por tratamento alcalino, obtendo-se uma maior quantidade de cargas negativas presentes no tropocolágeno (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Já para o colágeno CC a extração ocorre por tratamento com pH entre 5-8 (GIANINI, 2002), gerando um material sem cargas adicionais.

IV.6.3. Variação de viscosidade complexa (η^*) em função frequência angular

A viscosidade complexa foi determinada a temperatura de 25°C e deformação de 0,5% constantes em função da varredura de frequência angular, sendo possível traçar uma curva, mostrando o tipo de escoamento dos materiais. A Figura 33 mostra as curvas de viscosidade em função da varredura de frequência angular para as soluções de C24, C96, CC, PVA3 e PVA7.

Figura 33: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para os colágenos C24, C96, CC, PVA3 e PVA7.

As curvas para as amostras de PVA apresentaram uma viscosidade complexa constante com o aumento da frequência, o que caracteriza um comportamento newtoniano. Já as amostras de colágeno, apresentaram um decaimento da viscosidade complexa com o aumento da frequência e por isso são denominadas pseudoplásticas no que se refere seu escoamento. Materiais pseudoplásticos são caracterizados pela diminuição dos valores de viscosidade com o aumento da frequência angular. O comportamento pseudoplástico é desejável em processos onde a viscosidade em fluxo deve ser menor que a viscosidade em repouso, possibilitando, por exemplo, uma maior facilidade para que produtos farmacêuticos sejam aplicados por seringas ou capilares. Para os colágenos em estudo, observa-se que há grande diferença entre o colágeno aniônico e o comercial, sendo que o colágeno aniônico chega a ser 25 vezes maior que o comercial.

As Figuras 34, 35 e 36 mostram respectivamente as curvas de viscosidade complexa em função da frequência angular para as amostras de C24, C96, CC e suas blendas com PVA.

Figura 34: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.

Figura 35: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.

Figura 36: Viscosidade complexa (η^*) em função da frequência angular para o colágeno CC e suas blendas com PVA.

Assim como nas amostras de colágeno as curvas para as amostras de colágeno:PVA apresentaram um comportamento pseudoplástico, já que mostram uma diminuição da

viscosidade complexa com o aumento da frequência, ou seja a adição de PVA não causou alteração nesta característica, e pouco alterou os valores de η^* para os colágenos aniônicos.

É possível observar que as soluções de colágeno apresentam a baixas frequências, viscosidades diferentes, sendo que $C24 > C96 > CC$ e a presença de PVA afeta em maior proporção o CC. Isto pode ser observado, por exemplo, na frequência angular de 1 rad s^{-1} , tendo-se viscosidade de 16, 8 e 1 Pa s, respectivamente. Com o aumento da frequência os colágenos aniônicos tendem a valores de viscosidade próximos, e em aproximadamente 100 rad s^{-1} os valores observados foram de 0,5 e 0,6 Pa s, sugerindo que a diferença de carga presente a altas frequências não influencia na viscosidade. A presença de PVA modifica a viscosidade em função da massa molecular, sendo que para a menor massa molecular a viscosidade em função da frequência é a menor, porém esta diferença é maior no C24 verificando-se uma diferença de 19 Pa s.

IV.6.4. Análise de escoamento em função da temperatura

O ensaio reológico de viscosidade complexa com varredura de temperatura foi utilizado para mostrar como a temperatura influencia na viscosidade complexa das amostras e para determinar a temperatura de desnaturação (T_d) da proteína. Neste caso, foi utilizada uma frequência de 1,0 Hz e uma deformação de 0,5%. A Figura 37 mostra as curvas de variação de viscosidade complexa (η^*) em função da varredura de temperatura para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.

Figura 37: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno C24 e suas blendas com PVA.

A temperatura de desnaturação para cada amostra foi obtida pelo pico da primeira derivada das curvas da Figura 37, e seus valores estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Temperatura de desnaturação (T_d) para as amostras de C24 e suas blendas com PVA.

<i>Solução</i>	<i>T_d (°C)</i>
C24	40,2
C24:PVA3 1:1	40,1
C24:PVA3 1:3	39,8
C24:PVA7 1:1	39,9
C24:PVA7 1:3	39,7

A viscosidade permaneceu constante até por volta de 30°C para esses materiais, decaindo de forma mais acentuada a partir deste ponto. Essa diminuição de η^* reflete a ruptura da hélice tripla da estrutura colagênica, ou seja, a sua desnaturação (LAI; LI; LI 2008).

Não foi observado variação significativa na temperatura de desnaturação do colágeno C24 devido a adição de PVA nas proporções adotadas.

Os resultados obtidos para o colágeno C96 estão apresentados na Figura 38.

Figura 38: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno C96 e suas blendas com PVA.

Assim como ocorreu para o colágeno de C24 e suas blendas com PVA, a viscosidade dos materiais permaneceu constante até aproximadamente 30 °C, decaindo de forma acentuada a partir dessa temperatura. A Td para cada amostra estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Temperatura de desnaturação (T_d) para as amostras de C96 e suas blends com PVA.

<i>Solução</i>	<i>T_d (°C)</i>
C96	37,0
C96:PVA3 1:1	36,7
C96:PVA3 1:3	36,8
C96:PVA7 1:1	37,0
C96:PVA7 1:3	36,9

O colágeno C96 também não apresentou um aumento na temperatura de desnaturação devido a adição de PVA nas proporções adotadas.

Os resultados encontrados para as amostras de CC encontram-se na Figura 39.

Figura 39: Viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura para o colágeno CC e suas blends com PVA.

A viscosidade do colágeno CC é muito menor e apesar de permanecer constante até aproximadamente 30 °C, o decaimento após esta temperatura ocorre de uma forma bem menos acentuada, que para os colágenos aniônicos C24 e C96. A Td para cada amostra foi descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Temperatura de desnaturação (Td) para as amostras de CC e suas blendas com PVA.

<i>Solução</i>	<i>Td (°C)</i>
CC	38,1
CC:PVA3 1:1	37,6
CC:PVA3 1:3	37,5
CC:PVA7 1:1	37,8
CC:PVA7 1:3	37,6

As amostras de colágeno CC também não apresentaram uma variação que possa ser considerada significativa na Td com a adição de PVA.

Comparando-se os valores de Td para C24, C96 e CC obtidos pelos ensaios reológicos observa-se que todos estão relativamente próximos, sendo $C24 > C96 \sim CC$.

Comparando os resultados obtidos através dos ensaios reológicos com os obtidos por DSC, nota-se uma certa diferença nos valores obtidos, com CC sendo muito maior que os colágenos aniônicos.

Essa diferença de Td encontrada entre as medidas deve-se ao fato das amostras utilizadas para as medidas de DSC estarem no estado sólido, pois as amostras foram liofilizadas levando a uma reorganização na estrutura fibrilar. No caso do CC a reorganização fibrilar deve ser maior que no caso do colágeno aniônico cujas cargas negativas geradas pelo tratamento alcalino ocasionam uma repulsão eletrostática dificultando o rearranjo fibrilar.

V. Conclusões

Através da Espectroscopia no Infravermelho foi possível observar que nas proporções utilizadas não ocorreram interações do PVA com as moléculas de colágeno, já que não observou-se a formação de novas bandas ou o deslocamento nas destas.

Através dos valores de Td é possível afirmar que tanto nas soluções de colágeno quanto as blendas (Colágeno:PVA) a estrutura colagênicas mantém-se integra. Após a liofilização os materiais apresentam uma estrutura densa e porosa, que se torna mais firme com a adição de PVA.

As amostras de colágeno são todas predominantemente elásticas e que a adição de PVA as mesmas aumenta a elasticidade para o C24 e C96, mas diminui para o CC, o que sugere que as interações entre os colágenos são diferentes, muito possivelmente por causa das cargas negativas que os colágenos C24 e C96 possuem.

Portanto, embora todas as amostras de colágeno tenham sido obtidas de fonte bovina e sejam de colágeno tipo I, as diferenças no tecido de origem e no processo de obtenção geram amostras com propriedades diferentes e, conseqüentemente com diferentes interações com outros polímeros.

VI. Referências Bibliográficas

ANCEY, C. **Notebook introduction to fluid rheology**. Suisse, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, p. 118, 2005.

AZEVEDO, M. M. Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos, 2002. 40f.
Monografia (Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia) - Instituto de Química da UNICAMP, UNICAMP, Campinas, 2002.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p 45-949, 2009.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines e glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1074-1079, 2001.

BRODSKY, B.; RAMSHAW, J.A.M. The Collagen Triple-Helix Structure **Matrix Biology**, v. 15, p. 545-554, 1997.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

CEN, L.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 492-495, 2008.

COUTO, D.S.; HONG, Z.; MANO, J.F. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 115–123, 2009.

DARBY, R. **Viscoelastic Fluids: An Introduction to their Properties and Behavior**. New York: Marcel Dekker, 1050 p, 1976.

DEGIRMENBASI, N.; KALYON, D. M.; BIRINCI, E. Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, p. 42-9, 2006.

EMBRAPA. Disponível em:<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06f1.htm>. Acesso em: 20 abr.2008

FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista Escola de Minas**, v. 58, p. 83-87, 2005.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 113-136, 1998.

- FRIESS, W.; SCHLAPP, M. Effects of processing conditions on the rheological behavior of collagen dispersions. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** v. 51, p. 259-265, 2001.
- GIANINI, B. C. **Processo para obtenção de colágeno não desnaturado em forma de fibra.** BR n. PI0203122-1, 10 set. 2002.
- GOUGH, J. E.; SCOTCHFORD, C. A.; DOWNES, S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. **Wiley Periodicals**, v. 61, n. 1, p. 121-130, 2002.
- GUERRINI, L. M.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; DE OLIVEIRA, M. P. Eletrofiação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 286-293, 2006.
- HEINZE, T.; KOSCHELLA, A., Solvents applied in the field of cellulose chemistry - a mini review. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 84-90, 2005.
- LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G. ; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, p. 267-271, 1998.
- LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAI, G.; DU, Z.; LI, G. The reological behavior of collagen dispersion/poly(vinyl alcohol) blends. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 19, p. 81-88, 2007.
- LAI, G.; LI, Y.; LI, G. Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 285-291, 2008.
- LEE C. H.; SINGLA A.; LEE Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.
- LESINSKY, D.; FRITZ, J.; BRAUN, R. Biological degradation of PVA/CH blends in terrestrial and aquatic conditions. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 197-201, 2005.
- PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polyvinyl alcohol-glycine composite membranes: preparation, characterization, drug release and cytocompatibility studies. **Biomedical materials**, v. 2, p. 49-55, 2006.
- PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials science and engineering.** New York:Springer, p. 561, 2007.
- PATINO, M.G.; NEIDERS, M.E.; ANDREANA, S.; NOBLE, B.; COHEN, R. E. Collagen: an Overview. **Implant Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 280-285, 2002.

- PLEPIS, A. M. D.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. **Polymer Engineering and Science**, v. 36, p. 2932–2938, 1996.
- PRABAHARAN, M. Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 5, p. 23, 2008.
- RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. New York: Springer, p. 482, 2007.
- SART, I. B.; SCANDOLA, M. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. **Biomaterials**, v. 16, p. 785-792, 1995.
- SHANMUGASUNDARAM, N.; RAVIKUMAR, T.; BABU, M. Comparative Physico-chemical and in Vitro Properties of Fibrillated Collagen Scaffolds from Different Sources. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 18, p. 247-64, 2004.
- SHIMAZAKI, J.; TANAKA, J.; TSUBOTA, K.; Amniotic Membrane Immobilized Poly(vinyl alcohol) Hybrid Polymer as an Artificial Cornea Scaffold That Supports a Stratified and Differentiated Corneal Epithelium. **Journal of Biomedical Materials**, v. 81, p. 201-206, 2006.
- SILVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. **Thrombosis Research**, v. 55, p. 135-148, 1989.
- SIONKOWSKA, A.; PŁANECKA, A.; KOZŁOWSKA, J.; WIŚNIEWSKA, J.S.; Collagen fibril formation in poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 144, p. 71-74, 2009.
- SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 305-312, 2006.
- SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA, J.; WISNIEWSKI, M. Photochemical stability of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 117-25, 2004.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular Interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 735, 2004.
- SÖDERHÄLL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T.; RUSCHENDORF, F.; ESPARZA-GORDILLO, J.; WORM, M.; GRUBER, C.; MAYR, G.; ALBRECHT, M.; ROHDE, K.; SCHULZ, H.; WAHN, U.; HUMBNER, N.; LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with Atopic Dermatitis. **PLoS Biol**, v. 5, n. 9, p. 1952-1961, 2007.
- STEEFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press, 412p, 1996.
- TANIHARA, M. Fabrication of poly(vinyl alcohol)-apatite hybrids through biomimetic process. **Journal European Ceramic Society**, v. 27, n. 2, p. 1585-88, 2007.

THOMAS, P. S.; GUERBOIS J.-P.; RUSSELL G. F.; BRISCOE B. J. Ftir study of the thermal degradation of poly(vinyl alcohol). **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 64, p. 501-508, 2001.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Review: Estudo da Reologia de Polissacarídeos Utilizados Na Indústria De Alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

UCHINO, Y., SHIMMURA, S., MIYASHITA, H., TAGUCHI, T., KOBAYASHI, H., SHIMAZAKI, J.; TANAKA, J., TSUBOTA, K.; Amniotic Membrane Immobilized Poly(vinyl alcohol) Hybrid Polymer as an Artificial Cornea Scaffold That Supports a Stratified and Differentiated Corneal Epithelium. **Journal of Biomedical Materials**, v. 81, p. 201-206, 2006.

YUO, C. H.; MIYAZAKI, T.; ISHIDA, E., ASHIZUKA; M., OHTSUKI, C.; TANIHARA, M. Fabrication of poly(vinyl alcohol)-apatite hybrids through biomimetic process. **Journal European Ceramic Society**, v. 27, n. 2, p. 1585-88, 2007.