EDGAR YUJI EGAWA

**Caracterização Térmica e Reológica de Blendas de
Glicerol:Colágeno Tipo I de Diferentes Tecidos**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química Analítica)

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

**São Carlos
2007**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Kazumitsu Egawa e Júlia Egawa e aos meus irmãos Nancy, Edilson e Celso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas de trabalho e amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
I. INTRODUÇÃO.....	16
I.1. BIOMATERIAL.....	16
I.2. O COLÁGENO	16
<i>I.2.1. Colágeno como biomaterial</i>	<i>21</i>
I.3. O GLICEROL.....	22
<i>I.3.1. Utilizações do Glicerol/Glicerina.</i>	<i>25</i>
I.4. INFLUÊNCIA DO GLICEROL SOBRE O COLÁGENO.	26
I.5. REOLOGIA	30
<i>I.5.1. Materiais sólidos</i>	<i>30</i>
<i>I.5.2. Materiais Fluidos.....</i>	<i>32</i>
I.5.2.1. Fluidos Newtonianos ²⁹	34
I.5.2.2. Fluidos não-newtonianos independentes do tempo ²⁹	35
I.5.2.3. Fluidos Não-Newtonianos Dependentes do Tempo ²⁹	41
I.5.2.4. Materiais Viscoelásticos ²⁹	45
I.6. O GEL.	50
II. OBJETIVO	52
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53

III.1. OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES DE COLÁGENO ANIÔNICO	53
III.2. GLICEROL	53
III.3. PREPARAÇÃO DAS MISTURAS COLÁGENO:GLICEROL.....	53
III.4. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS:	55
<i>III.4.1. Liofilização</i>	<i>55</i>
<i>III.4.2. Espectroscopia Vibracional.....</i>	<i>56</i>
<i>III.4.3. Termogravimetria</i>	<i>56</i>
<i>III.4.4. Ensaios de Reologia</i>	<i>56</i>
III.4.4.1. Varredura de Deformação	56
III.4.4.2. Varredura de Frequência	57
III.4.4.3. Escoamento	57
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
IV.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE COLÁGENO	58
IV.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL.....	58
IV.3. ANÁLISE TÉRMICA - TERMOGRAVIMETRIA	66
IV.4. ENSAIOS DE REOLOGIA.....	74
<i>IV.4.1. Varredura de Deformação</i>	<i>75</i>
<i>IV.4.2. Varredura de Frequência.....</i>	<i>82</i>
<i>IV.4.3. Escoamento a temperatura constante.....</i>	<i>90</i>
<i>IV.4.4. Escoamento com varredura de temperatura</i>	<i>93</i>
V. CONCLUSÃO.....	102
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do colágeno: (a) tropocolágeno; (b) cadeia α e (c) forma de triplete. ...	18
Figura 2 - Esquema de formação da hélice tripla da molécula de colágeno ⁹	18
Figura 3 - Organização estrutural das moléculas de tropocolágeno de acordo com o modelo de Smith, para a formação da microfibrila: a) modelo quarto alternado pentafibrilar; b) periodicidade da microfibrila ¹⁰	19
Figura 4 - Organização do colágeno durante a fibrilogênese.	20
Figura 5 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln.	21
Figura 6 - Fórmula estrutural do glicerol.	23
Figura 7 - Representação da estrutura do glicerol.....	23
Figura 8 - Desnaturação do colágeno ¹⁹	27
Figura 9 - (a) Tensão elástica devido força normal e (b) Tensão de cisalhamento devido força lamelar.	31
Figura 10 - Geometria de placas paralelas.....	32
Figura 11 - Geometria de cone/placa.	33
Figura 12 - Esquema do experimento de Newton para determinar a viscosidade ²⁹	34
Figura 13 - (a) Tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento e (b) Viscosidade por taxa de cisalhamento.....	37
Figura 14 - Curvas de fluxos ou escoamento dos fluidos newtoniano e de Bingham.	40
Figura 15 - Evolução da pseudoplasticidade desde o comportamento newtoniano ideal ao viscoplástico ideal.....	41

Figura 16 - Forma gráfica de $\eta_a(t)$ linear para: (a) fluido tixotrópico newtoniano e (b) fluido tixotrópico pseudoplástico.	43
Figura 17 - Comportamento Anti-tixotrópico.	44
Figura 18 - Princípio da aplicação da oscilação senoidal para amostra usando geometria de placas paralelas.	46
Figura 19 - Esquema representativo do modelo de Voight.	48
Figura 20 - Esquema representativo do modelo de Maxwell.	49
Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho de glicerol ³⁸	59
Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho das soluções de colágeno de diferentes tecidos.	61
Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho do colágeno de pericárdio bovino e suas respectivas misturas com glicerol.	62
Figura 24 - Espectro de absorção na região do infravermelho do colágeno obtido a partir de tendão bovino e suas respectivas misturas com glicerol.	63
Figura 25 - Espectro de absorção na região do infravermelho de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas respectivas misturas com glicerol.	64
Figura 26 - Curvas Termogravimétricas e DTG para os colágenos obtidos de diferentes tipos de tecidos.	67
Figura 27 - Curvas Termogravimétricas e DTG de colágeno de pericárdio bovino liofilizado e suas misturas com glicerol.	69
Figura 28 - Curvas Termogravimétricas e DTG de colágeno CT liofilizado e suas misturas com glicerol.	71
Figura 29 - Curvas Termogravimétricas e DTG de colágeno CS liofilizada e suas misturas com glicerol.	73

Figura 30 - G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno de diferentes tecidos.	76
Figura 31 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.	78
Figura 32 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de tendão bovino e suas misturas com glicerol.	79
Figura 33 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas misturas com glicerol.	81
Figura 34 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de diferentes tecidos.	83
Figura 35 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.	84
Figura 36 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.	85
Figura 37 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.	86
Figura 38 - Curvas de viscosidade em função da varredura de frequência para os colágenos de diferentes tecidos.	87
Figura 39 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CP e suas misturas com glicerol.	88
Figura 40 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CT e suas misturas com glicerol.	89
Figura 41 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CS e suas misturas com glicerol.	89

Figura 42 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os colágenos de diferentes tecidos.....	90
Figura 43 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.	91
Figura 44 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.....	92
Figura 45 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.....	93
Figura 46 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno obtidos de diferentes tecidos.....	94
Figura 47 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.	95
Figura 48 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.....	96
Figura 49 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas misturas com glicerol.....	97
Figura 50 - Curvas de $d\eta/dT$ em função da temperatura para géis de colágeno obtidos de diferentes tecidos.....	98
Figura 51 - Curvas de $d\eta/dT$ em função da temperatura para géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.....	99
Figura 52 - Curvas de $d\eta/dT$ em função da temperatura para géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.....	100
Figura 53 - Curvas de $d\eta/dT$ em função da temperatura para géis de colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição e distribuição dos tipos de colágeno ⁷	17
Tabela 2 - Biomateriais derivados de colágeno empregados em medicina, odontologia e indústrias farmacêuticas.	22
Tabela 3 - Produção mundial de glicerina(x100 ton.) ¹⁷	24
Tabela 4 - Aplicações para o glicerol ¹⁸	26
Tabela 5 - Composição das misturas de colágeno CP	54
Tabela 6 - Composição das misturas de colágeno CT	55
Tabela 7 - Composição das misturas de colágeno CS	55
Tabela 8 - Valores para a relação de absorvância $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ para os colágeno de diferentes tecidos.....	61
Tabela 9 - Valores para a relação de absorvância $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ para os colágeno de diferentes tecidos e suas misturas	65
Tabela 10 - Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios dos colágenos de diferentes tecidos.	68
Tabela 11 - Tabela de percentagem de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno (CP) e suas misturas.....	70
Tabela 12 - Tabela de percentagens de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno CT e suas misturas	72
Tabela 13 - Tabela de percentagens de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno CS e suas misturas com glicerol.....	74
Tabela 14 - Valores dos módulos na região viscoelástica linear para as soluções de colágeno de diferentes tecidos.....	77

Tabela 15 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CP e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear.....	78
Tabela 16 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CT e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear	80
Tabela 17 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CS e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear.....	81
Tabela 18 - Temperaturas de desnaturação para os colágenos de diferentes tecidos.	98
Tabela 19 - Temperaturas de desnaturação para os colágenos e suas misturas.	101

Lista de Símbolos

F	Força
A_0	Área
E	Módulo Elástico
σ	Tensão Elástica
l	Dimensão Original
dl	Variação da Dimensão
G	Módulo de Cisalhamento
τ	Tensão de Cisalhamento
γ	Deformação de Cisalhamento
α	Ângulo de Deformação
η	Viscosidade
$\bar{\gamma}$	Deformação de Cisalhamento
Ω	Velocidade Radial
$\theta r/h$	Máxima Deformação
β	Ângulo de Cone
ϵ^*	Taxa de Deformação Elástica
Δv	Gradiente de Velocidade
h	Distância entre as Placas
K	Índice de Consistência
τ_y	Tensão Residual
δ	Ângulo de Defasagem
G'	Módulo Elástico ou Módulo de Armazenamento
G''	Módulo Viscoso ou Módulo de Perda
τ^*	Tensão Complexa
λ	Tempo de Relaxação
η^*	Viscosidade Complexa

Resumo

O colágeno possui características que fazem com seja amplamente utilizado como biomaterial. A termo-estabilidade do colágeno está diretamente relacionada a mudanças na sua estrutura (hélice tripla) via de regra quanto mais estável termicamente uma matriz, mais estável biologicamente será. Vários poliálcoois incluindo o glicerol têm apresentado um aumento na estabilidade térmica do colágeno tipo I, embora o tipo de interação não seja evidente. Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito da adição de glicerol sobre o colágeno aniônico obtido por tratamento alcalino (24 H) em três diferentes tecidos: pericárdio e tendão bovinos e serosa porcina. Para isto são utilizados a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), termogravimetria e reologia. Os espectros mostraram que o tratamento alcalino e a adição de glicerol não causam desnaturação da proteína de colágeno. A partir dos resultados das curvas termogravimétricas foi observado que o glicerol aumenta a temperatura de decomposição térmica do colágeno. Os resultados dos ensaios de reologia mais precisamente a varredura de deformação mostrou que as soluções de colágeno apresentam G' maior que G'' independente do tecido de origem, e a adição de glicerol não causa mudanças nesta propriedade das soluções. A varredura de frequência mostrou que as amostras têm características de um gel, sendo G' maior que G'' nas condições de estudo. O ensaio de escoamento a temperatura constante determinou o comportamento pseudoplástico das soluções, e a adição de glicerol causou aumento na viscosidade das soluções sem alterar tal característica. Os ensaios de escoamento com variação de temperatura permitiram determinar a temperatura de desnaturação do colágeno. A adição de glicerol aumentou apenas a temperatura de desnaturação do colágeno obtido por serosa porcina, sugerindo que esta solução é a mais sensível à adição de glicerol.

Abstract

Several characteristics make collagen widely applied as a biomaterial. The collagen thermal stability is directly related with its structure changes (triple helix), generally, the better is the thermal stability the better is the biological stability. Several polyols including glycerol, has shown an increasing on type I collagen denaturation. The objective of this work is to study the effect of glycerol when mixed with anionic collagen. Type I anionic collagen was obtained after alkaline treatment (24h) of bovine pericardium, bovine tendon and porcine serosa. FT-IR, thermogravimetry and rheology were used. The results of thermal analysis showed that glycerol indeed increases the collagen decomposition temperature. The rheological tests, precisely strain sweep, revealed that collagen samples have modulus G' prevailed on modulus G'' independent of tissue origin, and glycerol addition did not change these. The frequency sweep revealed that collagen and collagen:glycerol samples behave like a gel-like substance since both the storage and loss modulus showed dependence with frequency sweep and $G' > G''$ in all cases. Flow tests at constant temperature revealed that collagen solution behave like a pseudoplastic substance, and glycerol addition increase solution viscosity and did not change the pseudoplastic characteristic. Flow tests in function of temperature revealed collagen denaturation temperature, but glycerol addition alters thermal stability (increase of denaturation temperature) only for collagen obtained from porcine serosa.

I. Introdução

I.1. Biomaterial

É claramente necessário definirmos biomaterial. O termo “material” pode ser definido como substância para produção de objetos, o prefixo “bio” é geralmente relacionado à vida, então o biomaterial pode ser definido como uma substância útil na produção de objetos relacionados a vida ou um material produzido para um organismo vivo. Nenhuma dessas definições é particularmente completa e foram feitas muitas tentativas de fornecer uma definição mais realista em que as dicotomias acerca de ser natural ou um material sintético, possuir ou não atividade farmacológica, uso temporário ou permanente, interno ou externo ao corpo, entre outras, foram discutidas em maiores ou menores extensões.

Em novembro de 1982 foi chegado o consenso na Conferência sobre aplicação clínica de biomateriais que: “Um biomaterial é qualquer substância, não fármaco, ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural que pode ser usado por qualquer período de tempo, como uma parte ou o todo de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo¹”.

Dentro da grande variedade de biomateriais, o colágeno é amplamente aplicado.

I.2. O Colágeno

O colágeno é a principal proteína estrutural dos tecidos dos vertebrados, sendo responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas dentro do organismo. É a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrada na pele, ossos, tendões e nos dentes. As diferentes propriedades destes tecidos são em parte devido ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno². Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Além de seu papel estrutural nos

tecidos, o colágeno possui também outras características, tais como a função de orientar tecidos em desenvolvimento, que é altamente compatível na utilização como biomaterial^{3,4}.

A macromolécula de colágeno é um filamento semiflexível de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, sendo sua estrutura fundamental formada por uma unidade monomérica denominado tropocolágeno, com uma massa molecular média de 280000 Da, consistindo de três cadeias polipeptídicas (denominadas α). As cadeias formadoras do tropocolágeno apresentam-se na forma helicoidal e enrolam-se umas nas outras formando a hélice tripla sendo ligadas entre si por ligações de hidrogênio^{5,6}.

De acordo com sua estrutura primária das cadeias α que o constituem, o colágeno pode ser classificado em 28 tipos⁷. A tabela 1 mostra a composição de alguns tipos de colágeno, dentre eles o tipo I é o mais abundante.

Tabela 1 - Composição e distribuição dos tipos de colágeno⁷

TIPO	COMPOSIÇÃO	DISTRIBUIÇÃO
I	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$	Pele, tendão, ossos, córnea
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Cartilagem, humor vítreo
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Vasos sanguíneos, trato gastrointestinal
IV	$[\alpha_1(IV)]_2 \alpha_2(IV)$	Membrana basal

O colágeno utilizado para o desenvolvimento deste trabalho é o tipo I, que é formado por duas cadeias idênticas chamadas α_1 possuindo cerca de 1055 resíduos de aminoácidos cada e uma cadeia diferente chamada α_2 possuindo cerca de 1029 resíduos. Nas extremidades da estrutura helicoidal do tropocolágeno, existem pequenas regiões de cadeias polipeptídicas não helicoidais denominadas telopeptídeos com 16 e 25 aminoácidos nas regiões **N** e **C**-terminais, respectivamente (Figura 1)⁸.

a formação da α -hélice das cadeias, com estes resíduos localizando-se no interior da hélice onde não há espaço para cadeias laterais. A distância entre cada resíduo de Gly é $8,7 \text{ \AA}$.

Pelas interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação das microfibrilas, a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo, que podem ser vistas no microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino de 4nm. Com base nos dados obtidos por difração de raios-X e microscopia eletrônica, foram propostos alguns modelos para a microfibrila, sendo o mais aceito aquele proposto por SMITH¹⁰, que consiste de cinco moléculas de tropocolágeno justapostas ao longo do eixo longitudinal, deslocadas uma da outra de um quarto de seu comprimento, sendo portanto denominado de modelo de quarto alternado pentafibrilar (Figura 3)¹⁰.

Figura 3 - Organização estrutural das moléculas de tropocolágeno de acordo com o modelo de Smith, para a formação da microfibrila: a) modelo quarto alternado pentafibrilar; b) periodicidade da microfibrila¹⁰.

Formadas as microfibrilas, inicia-se o processo de agregação denominado fibrilogênese¹¹, para formar fibrilas insolúveis (Figura 4). Esse processo, *in vitro*, mostrou ser dependente da temperatura, força iônica e acidez, e as fibrilas reconstituídas têm características estruturais idênticas às aquelas formadas *in vivo*¹².

Figura 4 - Organização do colágeno durante a fibrillogênese.

Para o colágeno tipo I a formação de fibras ocorre de forma espontânea a pH 7,0 (neutro), ou seja, é a condição na qual tem-se a interação eletrostática ideal entre as moléculas de tropocolágeno. Com uma distribuição periódica de resíduos de aminoácidos carregados presentes no tropocolágeno, ocorre uma maior interação entre suas moléculas. Porém, a distribuição de cargas na molécula de colágeno pode ser modificada por reações químicas específicas nos aminoácidos.

Essas modificações são mais especificamente a esterificação, acilação e desaminação dos grupos ϵ -amino da lisina ou proteção de grupos guanidino dos resíduos de arginina, para dar origem a materiais biocompatíveis e com propriedades físicas bastante diferenciadas daquelas do colágeno nativo. Os materiais resultantes são matrizes colagênicas carregadas positiva ou negativamente^{13,14}. Um outro processo interessante para a preparação de materiais de colágeno carregados negativamente a pH 7,4 é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno (Figura 5). Esta modificação conduz a um aumento total de até 125 cargas por unidade de tropocolágeno¹⁵.

Figura 5 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Algumas aplicações potenciais para este novo material podem ser antecipadas como, recobrimento de próteses cardiovasculares, preparação de géis injetáveis com melhores propriedades reológicas, devido ao efeito da repulsão eletrostática em matrizes de colágeno mais eficientes para sistema de liberação de fármacos catiônicos baseado nas propriedades de troca iônica e ainda como suporte para crescimento de tecido ósseo¹⁵.

I.2.1. Colágeno como biomaterial

O colágeno possui algumas propriedades naturais, as quais fazem com que ele seja utilizado amplamente como matéria-prima para produção de biomateriais, tais como:

- Baixo índice de alergenicidade (2%);
- Biodegradabilidade;
- Habilidade em promover crescimento celular;
- Fácil obtenção.

Cada vez mais, vem sendo despertado o interesse em colágeno modificado quimicamente com a finalidade de produzir materiais com propriedades especiais. Modificações químicas em matrizes colagênicas constituem-se em alternativas de elevado

potencial para melhorar ou modificar as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas, ou físico-químicas, para atender necessidades específicas na área de biomateriais. A Tabela 2 mostra algumas aplicações de colágeno como biomaterial.

Tabela 2 - Biomateriais derivados de colágeno empregados em medicina, odontologia e indústrias farmacêuticas¹⁶.

Categoria	Aplicação
Odontologia	Membranas: membranas periodontais, implantes dentários; Compósitos: Biocerâmicas do tipo hidroxiapatita:colágeno
Medicina	Membranas protetoras e cicatrizantes: atelocolágeno, colágeno:elastina, colágeno com propriedades fibrinolíticas anticoagulantes e antiplaquetárias, colágeno:células (queratinócitos, fibroblastos, condrócitos) Esponjas: agentes hemostáticos Reconstrução de tecidos: colágeno:cerâmicas fosfatadas (preenchimento de cavidades ósseas), materiais para reconstrução plástica (correção de retorno urinário, prevenção precoce de miopia, etc) Revestimento: Próteses vasculares Preenchimento: Colágeno injetável Próteses: Confeção de válvulas cardíacas
Indústria Farmacêutica	Medicamentos de ação retardada: antibióticos, corticóides, hormônios e hemostáticos, nas formas de películas ou esponjas: Quimioterapia programada
Cosméticos	Agentes hidratantes

I.3. O Glicerol.

O Glicerol (1,2,3 – Propanotriol, glicerina) de fórmula molecular $C_3H_8O_6$ apresenta a fórmula estrutural como apresentado na figura 6, pode ser encontrado em todas as gorduras e óleos e é um intermediário importante dos seres vivos. O termo glicerol se

aplica ao composto puro, ou seja, ao 1,2,3-Propanotriol enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95% ou mais de glicerol na sua composição¹⁷.

Figura 6 - Fórmula estrutural do glicerol.

A figura 7 mostra uma representação por bolas e bastões do glicerol onde é possível observar sua estrutura tridimensional.

Figura 7 - Representação da estrutura do glicerol.

Até 1949 toda glicerina era obtida a partir de glicerídios existentes em gorduras e óleos, mas a descoberta de novas vias para produzir glicerol a partir de propileno e de açúcar aumentou a produção de glicerina sintética, até atingir um máximo (60% da produção) em 1965¹⁷.

A glicerina natural, produzida a partir de óleos e gorduras, pode ser obtida como subproduto na produção de sabão, biocombustíveis, ácidos graxos, álcoois de ácidos

graxos, etc. A glicerina assim obtida representava, em 1988, cerca de 93% da produção de glicerina de 1992 a 1998.

A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou purificada. São comercializados dois tipos de glicerina natural. O primeiro impõe uma especificação de 80% de glicerol, enquanto o segundo impõe como especificação 88 a 91% de glicerol. Quanto à glicerina purificada é classificada em glicerina técnica (99,5% de glicerol) ou glicerina farmacêutica (86% ou 99,5% de glicerol)¹⁷. A tabela 3 lista a produção mundial de glicerina.

Tabela 3 - Produção mundial de glicerina(x100 ton.)¹⁷

Produções	1992	1993	1994	1995	1996
Sabão	210	209	208	210	200
Ácidos Graxos	268	274	281	286	315
Biocombustíveis	6	27	58	40	35
Álcoois de Ácidos Graxos	78	101	109	99	115
Outros Ésteres	--	--	--	15	15
Substituto de Gordura	--	--	--	--	8
Glicerina Sintética	78	72	62	80	50
Outros	--	--	--	--	15

A partir de 1995 a crescente oferta de glicerol produzido como sub-produto do biodiesel fez baixar seu preço. Foi assim necessário encontrar novas saídas para a utilização da glicerina¹⁷. Como mencionado anteriormente, a glicerina produzida na reação de transesterificação encontra-se contaminada principalmente por mono e diglicerídios,

sabão, metanol, água e catalisador. Assim, a glicerina obtida na transesterificação pode sofrer apenas uma neutralização ácida e ser enviada para armazenamento. Contudo, se não existir escoamento para a glicerina tal qual ela é recuperada do processo de produção de biodiesel ou se não for economicamente atrativa a sua venda, pode ser necessário proceder a sua purificação.

Este processo de purificação da glicerina envolve a recuperação dos sais presentes na glicerina para posterior utilização com fertilizantes, e a recuperação do álcool e da água por evaporação, de forma a produzir uma glicerina com 80 a 88% de glicerol¹⁷.

O refino da glicerina para cumprir as especificações rígidas impostas para a utilização em alimentos, embalagem de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e biomateriais, é geralmente alcançado através da destilação seguida de tratamento em carvão ativado. No entanto, em alguns casos é possível alcançar o grau de pureza suficiente através da utilização de resinas de permuta iônica (resinas catiônicas e aniônicas). A extensão da purificação da glicerina depende muito da utilização a ser dada e dos requisitos a serem cumpridos, nomeadamente, a quantidade de glicerol que deve incluir.

I.3.1. Utilizações do Glicerol/Glicerina.

Devido à combinação das suas propriedades físicas e químicas, o glicerol apresenta uma ampla gama de aplicações. O fato de não ser tóxico, incolor e inodoro são propriedades apreciadas pela indústria. O glicerol é utilizado amplamente para medicamentos e cosméticos, isso faz com que seja aplicado também clinicamente¹⁸. A tabela 4 apresenta algumas aplicações para o glicerol.

Tabela 4 - Aplicações para o glicerol¹⁸

Aplicações	Consumo Global(%)
Cosmética/Farmacêutica	28
Resinas	6
Alimentos e Bebidas	8
Poligliceróis	12
Tabaco	3
Filmes de Celulose	5
Ésteres	13

I.4. Influência do glicerol sobre o colágeno.

A termoestabilidade do colágeno está diretamente relacionada com as mudanças de sua estrutura, acarretando mudanças nas suas propriedades físicas quando em solução, devido à destruição da estrutura tridimensional da hélice tripla do colágeno. Assim, o aumento de temperatura pode superar as interações que estabilizam a estrutura helicoidal, provocando a sua desnaturação (estrutura desorganizada, figura 8)¹⁹. Esta mudança estrutural ocorre abruptamente a uma determinada temperatura, denominada de temperatura de fusão (T_m) ou de desnaturação (T_d), que pode ser alterada pela ação do solvente, pH ou reagentes de reticulação. Um outro índice utilizado para a determinação da estabilidade térmica de matrizes colagênicas é a temperatura de encolhimento (T_s), que corresponde à temperatura média entre a qual estas matrizes contraem-se 1/3 de comprimento original. Via de regra quanto maior a estabilidade térmica de uma matriz, mais estável biologicamente será¹⁹.

Figura 8 - Desnaturação do colágeno¹⁹.

Novas técnicas, tais como a obtenção de colágeno quimicamente modificado, têm sido introduzidas visando melhorar o desempenho do colágeno como biomaterial, as quais utilizam-se de novos reagentes tais como éteres glicídicos, azida ou glicerol, sendo este último utilizado no presente trabalho.

Vários poliálcoois incluindo o glicerol têm apresentado um relativo aumento na temperatura de desnaturação do colágeno do tipo I²⁰. Estudos mais recentes revelaram que com o aumento na temperatura de desnaturação o glicerol aumenta a estabilidade das ligações estruturais da hélice tripla²¹ embora não esteja evidente o tipo de interação entre o colágeno e o glicerol, sabe-se que em solução aquosa o glicerol une-se ao colágeno, enquanto que o colágeno desnaturado não se liga nem repele o glicerol²¹. Por outro lado o glicerol causa inibição do processo de fibrilogênese^{22,23} desestabilizando o processo de agregação²⁴. Foi determinado por difração de raios-X e pressão osmótica²⁵ que a adição de glicerol afeta o balanço das forças de atração e repulsão entre as moléculas de tropocolágeno, diminuindo a intensidade das forças de atração. Este efeito se dá pela substituição da água pelo glicerol em pontos cruciais na estrutura externa da molécula onde ocorrem ligações de hidrogênio, entre as cadeias de tropocolágeno, embora tais locais não

sejam bem definidos acredita-se que a seqüência Gly – X – Hyl – Gly – His – Arg próximos ao fim das cadeias, portanto as regiões terminais denominadas telopeptídeos, sejam as mais prováveis²⁶.

Sabe-se que o colágeno possui cinco tipos de regimes de água²⁷

- tipos I e II: associadas à estrutura molecular da tripla hélice por meio de ligações hidrogênio;
- tipos III e IV: associadas à estrutura microfibrilar por duas e uma ligação hidrogênio, respectivamente;
- tipo V: água livre.

A desnaturação térmica causa o desdobramento da molécula, gerando uma estrutura desorganizada, que leva a exposição de seu núcleo hidrofóbico. Energeticamente esta conformação é desfavorável, e a forma desnaturada da proteína é ainda menos estável na presença do glicerol que quando em sua forma íntegra. Para proteínas globulares na presença do glicerol, os agregados são energeticamente mais favoráveis em comparação com a forma monomérica²⁰.

O glicerol inibe a formação de fibras do colágeno tipo I, agindo de forma oposta à observada em proteínas globulares, estabilizando a molécula de colágeno levando a um aumento moderado de temperatura (por volta de 1°C por 1 mol L⁻¹ de glicerol)²⁴.

Na e colaboradores²⁰ sugeriram que o efeito de estabilização do glicerol é alcançado pela ligação com a superfície da molécula de colágeno, pela incorporação dos grupos hidroxilas nas ligações hidrogênio das moléculas de água interna à cadeia de hélice tripla (água dos tipos I e II). Desta forma, o glicerol estabiliza a camada de solvatação e compete com as moléculas de água, provavelmente devido sua maior capacidade de formar ligações de hidrogênio; cada molécula de glicerol contém três grupos hidroxila. A presença dos grupos hidroxila na estrutura do solvente é importante para a estabilização do colágeno devido à formação de ligações de hidrogênio adicionais, por outro lado, o maior volume das

moléculas de glicerol o impede de substituir as moléculas de água presentes no interior da cadeia α (águas dos tipos I e II). Portanto deve-se assumir que o glicerol substitui as águas dos tipos III e IV relativas às ligações que formam as microfibrilas, não aumenta o número de ligações hidrogênio das águas tipo I e II intercadeias²⁴. Supõe-se que o glicerol faz ligações hidrogênio com os resíduos de Hyp-OH levando uma estabilização individual de cadeias polipeptídicas, não aumentando o número de ligações de hidrogênio intercadeias.

De fato, estudos mostraram que os valores de entalpia não dependem da concentração de glicerol, que confirma a sugestão de que não há formação de ligações hidrogênio adicionais derivadas do glicerol, reforçando a idéia de que o glicerol se liga à superfície do colágeno competindo com a água em alguma extensão²⁴.

Na²¹ determinou que a adição de glicerol à solução de colágeno resulta na diminuição da razão de desnaturação do colágeno a uma temperatura constante de 40,5°C e causa um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno. Na observou que a adição de glicerol não altera a dependência da taxa de aquecimento com a temperatura de desnaturação, e determinou um aumento linear da mesma com a concentração de glicerol. Como a temperatura de desnaturação aumenta com a taxa de aquecimento, foi considerado que o desdobramento da hélice tripla é muito lenta para acompanhar a variação de temperatura. Dessa forma foi sugerido que a maior temperatura de desnaturação do colágeno em glicerol é reflexo da menor taxa de desnaturação e não devido ao aumento da estabilidade de equilíbrio da proteína²¹. Porém após a determinação da temperatura de fusão no equilíbrio do colágeno em diferentes concentrações de glicerol pôde ser observado que o glicerol aumenta de fato a estabilidade térmica do colágeno tipo I²¹.

I.5. Reologia

O termo reologia foi criado como derivação do termo grego “rheos” que significa fluir. A reologia é o estudo do escoamento e deformação dos materiais e esta definição foi aceita desde a criação da Sociedade Americana de Reologia em 1929²⁸.

A princípio somente as características de um material sólido completamente elástico (Hookeano) e de um líquido ideal (Newtoniano) eram discutidos. Porém, quase todos os materiais possuem as características de sólido e líquido sob condições apropriadas, isto é, são viscoelásticos.

I.5.1. Materiais sólidos

A tensão em um material é definida como força F por unidade de área A_0 , que leva ao processo de deformação ou compressão definida como a taxa de variação na dimensão relativa à dimensão original. O efeito da tração (tensão elástica) num bloco retangular está mostrado na figura 9 a. A aplicação de uma tensão de cisalhamento em uma amostra é relativamente mais complexa como mostra a figura 9 b, entretanto pode ser considerado como um gradiente que age paralela à superfície fixa. Para uma deformação elástica o deslocamento é dl/l , sendo l é a dimensão original e dl é a variação gerada pela aplicação da força ou tensão.

O módulo elástico ou de Young E é dado por:

$$E = \sigma/\varepsilon = (F/A_0)/(dl/l)$$

Sendo σ a tensão elástica, ε a deformação elástica e A_0 a área. Como A_0 tende a mudar a medida que a amostra é deformada, a tensão real pode ser definida como F/A , com A sendo a área de deformação.

Para a tensão de cisalhamento (quando a força aplicada é lamelar) a tangente do ângulo α fornece a deformação de cisalhamento que também é dl/l . Para pequenas

deformações $\tan \alpha \cong \alpha$. Considerando tensão de cisalhamento τ e deformação de cisalhamento γ , o módulo de cisalhamento G pode ser escrito como:

$$G = \tau/\gamma = (F/A_0)/\tan \alpha$$

Figura 9 - (a) Tensão elástica devido força normal e (b) Tensão de cisalhamento devido força lamelar.

Se considerarmos que $\tan \alpha \cong \alpha$ então:

$$G \cong F/(A_0 \alpha)$$

Como a deformação é adimensional, nas unidades do sistema internacional o módulo é dado por N m^{-2} ou Pa. Um dos problemas é que raramente, ou nunca, tal definição de módulo de cisalhamento é realizado em um material cúbico e regular como foi ilustrado na figura 9 b. Na prática é utilizado o sistema de “geometria” que consiste de uma base fixa e uma superfície móvel como mostra a figura 10. Com esse sistema é possível determinar a máxima deformação (na borda) por $\theta r/h$. Nesta discussão inicial é considerado que a tensão é aplicada na amostra e então é medida a deformação como uma mudança nas dimensões, contudo é freqüentemente mais aplicável ter uma deformação conhecida e medir a força

aplicada. Como a tensão e a deformação estão intimamente relacionadas é importante definir qual é a variável dependente e qual é a independente.

Figura 10 - Geometria de placas paralelas.

I.5.2. Materiais Fluidos

As definições descritas anteriormente se aplicam apenas em materiais sólidos idealmente elásticos (Hookeanos) para qualquer tensão, deformação e tempo. Para fluidos a tensão depende mais da taxa de variação da deformação pelo tempo que a quantidade da deformação. A viscosidade de cisalhamento η é definida por:

$$\eta = \tau / (d\gamma/d\tau) = \tau / \bar{\gamma}$$

Sendo η a viscosidade de cisalhamento, τ a tensão de cisalhamento, γ a deformação de cisalhamento e $\bar{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento. A unidade de viscosidade no sistema internacional é Pa s, para a água a viscosidade é de 10^{-3} Pa s a 20°C . Uma geometria de cisalhamento constante está ilustrada na figura 11. A taxa de cisalhamento para este sistema é constante ao longo do gap (distância entre as placas), e é dado por $\bar{\gamma} = \Omega/\beta$, com Ω sendo a velocidade radial da rotação em rad s^{-1} e o ângulo de cone β é medido em radianos. A viscosidade, que pode ser relacionada com a viscosidade de cisalhamento

elongacional ou extensora também pode ser definida por $\bar{\eta} = \sigma/\dot{\epsilon}^*$ sendo σ a tensão elástica, $\dot{\epsilon}^*$ a taxa de deformação elástica.

Figura 11 - Geometria de cone/placa.

As definições dadas anteriormente a respeito de $G(E)$ e $\eta(\bar{\eta})$ são, a princípio, rigorosas, mas têm aplicação limitada. Isso porque a taxa de tensão para deformação do sólido e do líquido são independentes da deformação e são constantes (independentes das taxas de deformação) somente com $\gamma(\bar{\gamma}) \rightarrow 0$.

A Lei de Newton para viscosidade representou um grande passo para a compreensão do comportamento dos fluidos sob escoamento obtido por cisalhamento, este modelo idealizado impõe que a viscosidade é uma propriedade física imutável, variando apenas mediante a variação de temperatura e pressão. Portanto sem grande utilidade para uma significativa parcela de fluidos, cujas viscosidades deixam de ser um coeficiente para se tornar uma propriedade que varia de acordo com as condições com as quais o fluido se depara.

A dependência da viscosidade com o tempo ou taxa de deformação e as características inerentes aos sólidos quando presentes em fluidos viscosos, em conjunto ou separadamente, formam a base do que se convencionou chamar de fenômenos não-newtonianos. De tão numerosos, a ponto do próprio modelo idealizado poder ser

considerado como exceção e não a regra, foram divididos em três grandes classes: os independentes do tempo, os dependentes do tempo e os viscoelásticos²⁹.

I.5.2.1. Fluidos Newtonianos²⁹

Nos fluidos podem ocorrer formas de deformação como ocorre nos sólidos, porém nos fluidos as deformações envolvem um escoamento. O tipo mais comum de deformação nos fluidos é por cisalhamento simples, que foi o método adotado por Newton para elaborar sua lei de viscosidade, como mostra a figura 12.

Figura 12 - Esquema do experimento de Newton para determinar a viscosidade²⁹.

Quando o fluido está confinado entre duas placas paralelas e planas, ele está submetido ao movimento da placa superior em relação à inferior estacionária. Este movimento gera um gradiente de velocidade do fluido de zero na placa estacionária até o valor máximo igual a velocidade da placa superior. Este gradiente será tanto maior quanto for maior a força que age na placa superior. Desta forma tem-se que:

$$\frac{\Delta v}{h} \propto \frac{F}{A}$$

Sendo Δv o gradiente de velocidade gerado pela força lamelar, h a distância entre a placa móvel e a estacionária, F a força que causa o deslocamento e A a área da superfície. Como:

$$\frac{F}{A} = \tau$$

Com τ sendo a tensão de cisalhamento, então:

$$\tau \propto \frac{\Delta v}{h}$$

O comportamento newtoniano tem as seguintes características a temperatura e pressão constantes:

- (i) A única tensão gerada no cisalhamento simples é a tensão de cisalhamento.
- (ii) A viscosidade de cisalhamento não varia com a taxa de cisalhamento.
- (iii) A viscosidade é constante com o tempo de cisalhamento e a tensão no líquido cai a zero assim que o cisalhamento cessa
- (iv) A viscosidade medida em diferentes tipos de deformação seguem uma proporção simples, por exemplo, a viscosidade medida num fluxo de extensão uniaxial é sempre o triplo do valor medido no fluxo de cisalhamento simples.

O fluido que mostrar qualquer desvio desses comportamentos é um fluido não newtoniano.

I.5.2.2. Fluidos não-newtonianos independentes do tempo²⁹

Os comportamentos independentes do tempo podem ser incluídos em duas categorias: um onde o fluido é essencialmente viscoso, mas sua viscosidade aparente varia com a taxa de deformação e outra em que o fluido é de alguma forma estruturado tendo um comportamento plástico antes de escoar como um fluido viscoso. A primeira categoria, por ser majoritariamente representada pelos fenômenos relacionados com a Lei da potência de Ostwald, é denominada genericamente de fenômenos da potência. Já a segunda, recebe o nome de viscoplasticidade.

I.5.2.2.1. Fenômenos da Potência²⁹

Ao examinar determinados fluidos sob escoamento cisalhante, Ostwald de Waale verificou que os mesmos exibiam um comportamento diferente do proposto por Newton no tocante ao comportamento da viscosidade frente ao cisalhamento aplicado. Ao contrário dos fluidos newtonianos, os fluidos examinados apresentavam uma relação tensão de cisalhamento (τ) por taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) não linear em que a inclinação variava de forma também não linear com a taxa de deformação. Tomando por base a Lei de Newton propôs o seguinte modelo:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n$$

sendo n é o índice da potência e K o índice de consistência do fluido, o qual está relacionado com a viscosidade aparente (η_a) da seguinte forma:

como:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

então:

$$K = \eta_a \dot{\gamma}^{1-n}$$

De forma clara, a equação $\tau = K \dot{\gamma}^n$ se reduz ao modelo de Newton quando $n = 1$. Como o índice de consistência não varia nem com a tensão de cisalhamento nem com a taxa de deformação, é o índice n que fará a distinção entre os comportamentos newtoniano e da potência. De forma que:

- Se $n < 1$, a relação $\tau / \dot{\gamma} = \eta_a$ será decrescente na medida em que $\dot{\gamma}$ for aumentada;
- Se $n > 1$, ocorrerá o contrário.

Sendo assim, quanto mais distante o índice da potência estiver do valor unitário, mais distante o fluido estará do comportamento newtoniano. Estes comportamentos estão confrontados com o newtoniano na figura 13.

Figura 13 - (a) Tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento e (b) Viscosidade por taxa de cisalhamento.

No fenômeno que se caracteriza pela curva de fluxo pseudoplástico, a viscosidade aparente diminui com a taxa de deformação e $0 < n < 1$. E o fenômeno caracterizado pela dilatância onde $n > 1$, a viscosidade aparente aumenta com a taxa de deformação.

A pseudoplasticidade é o fenômeno da potência que ocorre com maior frequência. Nos fluidos que apresentam este comportamento, a viscosidade aparente cai de um valor máximo não infinito e constante, verificado em taxas de deformação próxima de zero, η_0 , na medida em que a taxa de deformação é aumentada até se estabilizar e assumir um valor novamente constante, η_{∞} , a partir de um valor crítico para a taxa de deformação, $\bar{\gamma}_{\infty}$. Este comportamento pode ser explicado por uma das três razões abaixo:

- Existência no sistema líquido de partículas assimétricas que estando, no repouso, orientadas de forma aleatória, assumem uma orientação preferencial na direção do escoamento;

- Sistemas líquidos constituídos de moléculas grandes e flexíveis que passam de uma configuração aleatoriamente enovelada no repouso, para uma orientada na direção do escoamento, assumindo uma forma quase linear; e
- Existência de moléculas que em repouso se encontram altamente solvatadas, têm as camadas de solvatação destruídas pela ação do cisalhamento.

No primeiro caso, a orientação das partículas induzida pelo cisalhamento tem como oponente a desorientação patrocinada pelo movimento browniano, principalmente se as partículas forem bem pequenas. Moléculas grandes e flexíveis, como as poliméricas, devido ao elevado grau de enrolamento produzem vários pontos de contato entre seus segmentos ao longo de seu segmento. Estes pontos de contato atuam de forma a evitar o livre movimento destas moléculas, de forma que confere ao sistema uma viscosidade maior em taxas de deformação mais baixas. Na medida em que o cisalhamento imposto é capaz de iniciar a eliminação dos pontos de contato, alinhando as moléculas na direção do cisalhamento, a viscosidade aparente será paulatinamente diminuída até que o equilíbrio seja alcançado novamente.

No caso das moléculas altamente solvatadas, a destruição da camada de solvatação, devido a ação do cisalhamento aplicado, provoca diminuição na magnitude da interação molecular e do tamanho efetivo da molécula e, por conseguinte, da viscosidade do sistema.

O fenômeno oposto a pseudoplasticidade é conhecido como dilatância. Este termo foi utilizado pela primeira vez por Reynolds ao observar que alguns sistemas se expandiam volumetricamente sob o cisalhamento. Estudando soluções concentradas de areia e água, Reynolds deduziu que este comportamento anômalo se devia ao fato de que estas suspensões, quando em repouso, apresentavam uma quantidade mínima de vazios (espaço entre os grânulos de areia) e que o líquido era suficiente apenas para preenchê-los. Sob cisalhamento suave, o líquido lubrificava as partículas facilitando seus movimentos

relativos. Aumentos posteriores na taxa de deformação provocavam expansão no material e aumento na quantidade de vazios, deste ponto em diante o líquido não era mais suficiente para a lubrificação das partículas em movimento. O aumento da viscosidade aparente do sistema era então evidenciado pela necessidade de se aumentar a tensão de cisalhamento para manter o movimento das partículas.

A dilatância é comum aos materiais com mais de uma fase, desde que uma delas seja constituída de partículas grandes e assimétricas, que dificultam o empacotamento mesmo sob elevadas taxas de deformação.

Por ser um fenômeno pouco comum, não se encontram na literatura estudos que relacionem diversos possíveis fatores controladores da dilatância e sim apenas suposições.

I.5.2.2.2. Viscoplasticidade²⁹

A viscoplasticidade, como idealizada por Bingham, é um fenômeno caracterizado pela existência de um valor residual para a tensão de cisalhamento, o qual deve ser excedido para que o material apresente um fluxo viscoso. Este comportamento é comum às composições altamente concentradas em que a interação partícula-partícula desempenha um papel importante. Sistemas que são considerados líquidos como lamas, poupas de frutas e suspensões concentradas, quando têm sua concentração de sólido elevada além do valor crítico, favorecem à formação de um “esqueleto” por parte das partículas antes dispersas. Este “esqueleto” além de ser responsável pelo aumento da viscosidade do sistema, impede que o mesmo flua normalmente, sendo necessário a sua destruição para que o material realize um escoamento viscoso.

Analisando alguns sistemas bifásicos com alto teor de sólidos, Bingham verificou que antes de escoar como um fluido newtoniano, estes sistemas se comportavam como sólido plástico e os chamou de fluidos viscoplásticos. Posteriormente propôs um modelo matemático idealizado, o qual passou a ser a equação constitutiva dos Fluidos de Bingham:

$$\tau = \tau_y + \mu_p \cdot \bar{\gamma} \quad \text{para } \tau > \tau_y$$

sendo τ_y a tensão residual, μ_p a viscosidade plástica e $\bar{\gamma}$ a taxa de deformação.

Graficamente este comportamento assume a forma mostrada na figura 14.

Figura 14 - Curvas de fluxos ou escoamento dos fluidos newtoniano e de Bingham.

Embora alguns autores considerem o fluido de Bingham como um plástico ideal, tal comportamento não é verificado em sistemas poliméricos que exibem viscoplasticidade. Para estes sistemas, geralmente compósitos particulados de alta concentração, o modelo mais adequado é o proposto por Herschel e Bulkley em que à tensão residual, τ_y , é somado o produto $K(\bar{\gamma})^n$ da lei da potência em lugar de $\mu_p \bar{\gamma}$ do modelo de Bingham, ou seja,

$$\tau = \tau_y + K \bar{\gamma}^n$$

Assim como o fluido de Bingham é um fluido newtoniano com tensão residual, o de Herschel-Bulkley é um da potência que não escoar até que $\tau > \tau_y$. O comportamento binghamniano é o limite superior do comportamento pseudoplástico que se inicia após o newtoniano. Isso pode ser melhor visualizado na figura 15, onde se verifica o deslocamento para a esquerda e a retificação das curvas características dos materiais pseudoplásticos quando as mesmas se aproximam dos limites inferior e superior.

Figura 15 - Evolução da pseudoplasticidade desde o comportamento newtoniano ideal ao viscoplástico ideal.

I.5.2.3. Fluidos Não-Newtonianos Dependentes do Tempo²⁹

Enquanto o efeito da taxa de deformação foi considerado para modificações instantâneas, o efeito do tempo assume grande importância quando a estrutura aleatória dos sistemas líquidos muda de forma gradual frente a um campo de cisalhamento. Neste contexto, a mudança gradual é definida com aquela em que a transição e a velocidade em que ocorre podem ser experimentalmente monitorados. Do ponto de vista geral, todos os processos dependem do tempo, todavia alguns ocorrem de forma tão rápida que ainda não se dispõe de meios para aferi-los. Desta forma o foco deve ser dado ao escoamento daqueles sistemas que apresentam algum tipo de heterogeneidade e que demandem tempo para ocorrer.

A heterogeneidade no escoamento é caracterizada pela presença de duas ou mais fases que interagem entre si e produzem perturbações locais nas linhas de fluxo. Dentre os fatores que causam heterogeneidade podem ser citados: forças interfaciais, ligações de hidrogênio e outras interações moleculares. Além disso, existe a tendência de uma das partes da fase dispersa se cristalizar durante o escoamento, aumentando sua fração volumétrica às custas da fase contínua que lhe providencia volume livre e

lubrificação. Estas perturbações são mais relevantes com o aumento da concentração, podendo gerar aumento ou diminuição da viscosidade aparente do sistema dependendo da forma como a “estrutura” interna do líquido será alterada: se destruída ou ampliada. Os processos caracterizados pela destruição estrutural pela ação do tempo fazem parte do fenômeno conhecido como tixotropia. Os processos contrários recebem o nome de não tixotrópicos.

I.5.2.3.1. Tixotropia²⁹

A tixotropia é um fenômeno caracterizado pela diminuição da viscosidade aparente do líquido com o tempo de aplicação de uma dada taxa de deformação. Este fenômeno isotérmico e reversível é fruto de destruição gradual da “estrutura” construída pelas partículas da fase dispersa, cuja força de ligação não resiste à ação do cisalhamento imposto. O fenômeno é considerado reversível porque após a retirada do esforço externo, as ligações quebradas são reconstituídas dando vida nova à “estruturas” internas. Diferentemente do processo de quebra das ligações, o processo de reconstrução é por vezes muito mais lento sendo necessário um tempo maior de repouso para que o processo se complete. Caso isso não ocorra pode haver mascaramento do fenômeno e o material pode ser erroneamente caracterizado como independente do tempo. A tixotropia pode ser também mascarada se a taxa de deformação for muito alta. Neste caso a “estrutura” interna pode ser imediatamente destruída.

A queda da viscosidade aparente com o tempo de aplicação do cisalhamento obedece a regras definidas. Qualquer que seja a taxa de deformação aplicada existirá um tempo a partir do qual a viscosidade se estabiliza: tempo de estabilização t_e . Este tempo será tanto menor quanto maior for a taxa de deformação, sendo que o menor valor para a viscosidade será aquele correspondente a um tempo de estabilização igual a zero. Tempo de estabilização nulo significa para um fluido dependente do tempo, que o mesmo foi submetido a uma taxa de deformação maior ou igual à taxa de deformação crítica. Para este

caso o valor crítico para a taxa de deformação é aquele a partir do qual as rupturas de ligações possíveis foram executadas num tempo $t = 0$.

Existem duas possibilidades de variação da viscosidade aparente com o tempo. Se após a estabilização com o tempo numa dada taxa de variação o sistema tixotrópico mostrar-se insensível a aumentos na taxa de deformação, ou seja, tornar-se newtoniano o seu comportamento será como mostrado na figura 16 a. Caso o sistema apresente diminuição na viscosidade após a estabilização com o tempo devido à acréscimos posteriores na taxa de deformação, o formato da curva de dependência $\eta_a(t)$ será equivalente ao mostrado na figura 16 b.

Figura 16 - Forma gráfica de $\eta_a(t)$ linear para: (a) fluido tixotrópico newtoniano e (b) fluido tixotrópico pseudoplástico.

Esta diferenciação pode ser visualizada de outra maneira: se no tempo $t = 0$ aumentos na taxa de deformação não produzirem queda na viscosidade aparente, o fluido é newtoniano após a estabilização com o tempo. Todavia, se for caracterizada uma queda na viscosidade aparente, o fluido será pseudoplástico.

I.5.2.3.2. Fenômenos Não-Tixotrópicos²⁹

Nos fenômenos contrários a tixotropia, chamados de não tixotrópicos, a estruturação dos sistemas líquidos ocorre de forma gradual numa taxa de deformação constante. Em alguns sistemas esta estruturação cresce em velocidade e magnitude quanto maior for a taxa de deformação aplicada. Outros só apresentam este comportamento em taxas de deformação exclusiva, acima das quais ocorre o fenômeno inverso. Este comportamentos aparentemente antagônicos são os responsáveis pelas confusões causadas na denominação do fenômeno caracterizado pelo aumento da viscosidade aparente com o tempo.

Alguns autores denominam este fenômeno como anti-tixotropia; outros por tixotropia negativa e grande parte de reopexia. Navarro e Alsina³⁰ denominaram a anti-tixotropia como o fenômeno reversível de aumento na viscosidade aparente com o tempo sob taxa de deformação constante. Este comportamento mantém-se inalterado até que a taxa de deformação limite seja atingida, como pode ser observado na figura 17. Já por reopexia se entenderá a solidificação de sistemas tixotrópicos sob a influência de movimentos cisalhantes suaves como definido por Wilkinson³¹.

A anti-tixotropia é perfeitamente explicada pelas teorias aplicadas à tixotropia, só que no sentido inverso. Todavia deve ser acrescentado que as partículas da fase dispersa devem possuir uma tendência à aglomeração, a qual é aumentada pela ação do cisalhamento imposto.

Figura 17 - Comportamento Anti-tixotrópico.

Embora não seja tão comum como a tixotropia, a anti-tixotropia ocorre com mais frequência do que a reopexia. Mesmo que todos os sistemas tixotrópicos aumentem de viscosidade com a redução da intensidade do cisalhamento, o termo reopexia deve ser usado nos casos em que este comportamento tiver ocorrido em velocidades superiores às convencionalmente esperadas para movimentos suaves. Isto torna ainda mais raro de ser observado. Freundlich, em 1935, observou ao preparar suspensões de pasta de gesso, que seu material demorava cerca de 40 minutos para se ressolidificar em repouso, ao passo que este processo ocorria em apenas 20 segundos se o líquido heterogêneo fosse suavemente agitado por um bastão de vidro.

I.5.2.4. Materiais Viscoelásticos²⁹

Como foi descrito anteriormente, todo material pode se comportar como líquido e sólido dependendo da escala de tempo da medida reológica. Num tempo muito longo, materiais “sólidos” escoam como líquidos se mantivermos a tensão. O vidro por exemplo não é de todo um sólido, mas um fluido altamente viscoso ($\eta = 10^{12}$ Pa s). Por outro lado, a intervalos de tempo extremamente curtos (equivalentes a altas frequências), tais como 10^{-8} s, a água se comporta como um sólido. Portanto praticamente todos os materiais são viscoelásticos. A escala de tempo da deformação determina a proporção das propriedades viscosidade (fluido) e a elasticidade (sólido) de um dado material.

Nos textos de reologia é comum descrever o comportamento do material pela “equação constitutiva”. Por exemplo, a temperatura e pressão constantes, a tensão de cisalhamento pode ser dada por:

$$\tau = f(\gamma, \dot{\gamma}, t, \dots)_{T,P}$$

Para um sólido elástico $\tau = \gamma G$, para um fluido viscoso $\tau = \dot{\gamma} \eta$, e para um material viscoelástico simples $\tau = f(\gamma, \dot{\gamma})$. Algumas soluções são extremamente complexas então a tensão real depende sensivelmente da deformação (e da taxa de deformação).

Em toda descrição anterior foi considerado que a tensão e a deformação aplicada eram do tipo não oscilatórios. No cone e na placa do viscosímetro descrito anteriormente, por exemplo, foi considerado uma rotação na mesma direção, este ainda é o método mais comum para caracterizar um sólido ou um líquido, entretanto experimentos de deformação oscilatória têm sido aplicados mais amplamente nos últimos anos.

Tal fato é reflexo da melhoria dos equipamentos e também dos programas (softwares) fazendo com que a reologia torne-se cada vez mais um experimento de rotina. A figura 18 mostra o princípio da técnica oscilatória: uma oscilação senoidal com máxima deformação γ_M e frequência ω é aplicada na amostra por meio de uma geometria de placas paralelas. Se o material for perfeitamente elástico então a onda de tensão resultante estará exatamente em concordância de fase com a onda de deformação. Por outro lado, quando a taxa de variação da oscilação senoidal é máxima e a deformação é zero, para sistemas puramente viscosos, a onda de tensão resultante estará a 90° , ou seja, em total oposição de fase em relação a onda de deformação imposta. De forma geral a onda de tensão apresentará uma defasagem δ com $(0 < \delta < 90^\circ)$, então δ , é a medida da razão viscosidade/elasticidade do material a uma dada frequência ω .

Figura 18 - Princípio da aplicação da oscilação senoidal para amostra usando geometria de placas paralelas.

A resposta elástica ou componente elástica (em concordância de fase) e a resposta ou componente viscoso (em oposição de fase) da onda de tensão são separadas pelo software. Para a componente em concordância de fase foi atribuído o nome de módulo de armazenamento ou módulo elástico G' e para a componente em oposição de fase, módulo de perda ou módulo viscoso G'' e são definidos por:

$$G^* = \tau^*/\gamma_M = (G'^2 + G''^2)^{1/2}$$

Sendo G^* o módulo de cisalhamento complexo, τ^* a tensão complexa e γ_M a deformação máxima. A viscosidade dinâmica, η^* , é igual a G^*/ω e $\tan \delta$ é a razão G''/G' .

A descrição anterior somente é verdadeira para pequenas deformações. Como as medidas de viscoelasticidade consideram o acoplamento da deformação e da taxa de deformação (frequência) gera um grande problema, isso porque somente a um limite de pequenas deformações os valores de G' , G'' e η^* podem ser obtidos.

I.5.2.4.1. Analogias mecânicas para materiais viscoelásticos³².

Todo fenômeno passa a ser melhor entendido quando está relacionado com um modelo simples, geralmente mecânico, de funcionamento conhecido. Portanto é justificável o uso de uma mola para representar a capacidade de deformação reversível dos materiais puramente elásticos. Do mesmo modo, um pistão atuando irreversivelmente sobre um fluido contido num recipiente fechado, ou seja, um amortecedor, serve para representar o caráter da deformação viscosa. Desta forma, as várias nuances da viscoelasticidade podem ser representadas por associações de molas e amortecedores. Estas associações recebem o nome de modelos ou analogias mecânicas e são úteis na idealização dos materiais viscoelásticos. Os dois modelos clássicos mais conhecidos são de Voight e de Maxwell²⁹.

O modelo de Voight é resultado da associação em paralelo dos elementos mola e amortecedor. A mola possui o módulo elástico constante e o amortecedor possui a viscosidade constante. No modelo a deformação aplicada ao sistema resulta na mesma

deformação presente nos dois elementos. E a tensão aplicada ao sistema é igual a somatória das tensões nos dois elementos. A figura 19 mostra um esquema representativo do modelo de Voight.

Figura 19 - Esquema representativo do modelo de Voight.

Para este modelo, a tensão de cisalhamento e suas componentes variam com o sentido do escoamento, e sua equação reológica é dada por:

$$\tau = G \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

Sendo τ a tensão de cisalhamento, G o módulo de cisalhamento, γ_0 a amplitude máxima da deformação de cisalhamento, ω a velocidade angular, t o tempo e η a viscosidade.

No modelo de Voigt respostas puramente elásticas são obtidas com $G \gg \eta$ e respostas puramente viscosas com $\eta \gg G$. O módulo de armazenamento G' e o de perda G'' assumem de maneira aproximada as identidades:

$$G' = G$$

$$G'' = \eta \cdot \omega$$

Os materiais que se ajustam ao modelo de Voight sofrem deformação de forma não permanente, as substâncias que são caracterizadas por este comportamento são chamadas de sólidos viscoelásticos. Os sólidos viscoelásticos possuem memória reológica, definida como o tempo necessário para que a substância deformada volte a sua posição de equilíbrio, também conhecido como tempo de relaxação do material.

O modelo de Maxwell é resultado da associação em série dos elementos mola e amortecedor. A mola possui o módulo elástico constante e o amortecedor possui a viscosidade constante. No modelo a tensão aplicada ao sistema resulta na mesma tensão presente nos dois elementos, e a deformação aplicada ao sistema é igual a somatória das deformações nos dois elementos. A figura 20 mostra um esquema representativo do modelo de Maxwell.

Figura 20 - Esquema representativo do modelo de Maxwell.

Para esta modelagem onde a tensão de cisalhamento e suas componentes variam com o sentido do escoamento é dada por:

$$\tau = \left\{ \frac{G \cdot (\lambda \cdot \omega)^2 \cdot \gamma_0}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2} \right\} \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) + \left\{ \frac{G \cdot \lambda \cdot \omega \cdot \gamma_0}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2} \right\} \cdot \text{cos}(\omega \cdot t)$$

Sendo τ a tensão de cisalhamento, G módulo de cisalhamento, λ o tempo de relaxação, γ_0 a amplitude máxima de deformação de cisalhamento, ω a velocidade angular e t o tempo.

No modelo de Maxwell respostas puramente viscosas são obtidas com $G \gg \eta$ e respostas puramente elásticas com $\eta \gg G$. Os módulos de armazenamento G' e perda G'' assumem de maneira aproximada as seguintes identidades.

$$G' = \frac{G(\lambda\omega)^2}{1 + (\lambda\omega)^2}$$

$$G'' = \frac{G\lambda\omega}{1 + (\lambda\omega)^2}$$

Sendo G o módulo de cisalhamento, λ o tempo de relaxação e ω a velocidade angular.

Os materiais que se ajustam ao modelo de Maxwell sofrem deformação de forma permanente, as substâncias que são caracterizadas por este comportamento são chamadas de líquidos viscoelásticos. Os líquidos viscoelásticos não possuem memória reológica.

I.6. O gel.

Dorothy Jordan-Lloyd³³ definiu o gel como: “a condição coloidal, o gel, é aquele que é mais fácil reconhecer que definir” desde então seu entendimento científico passou por um grande avanço e atualmente o campo de géis de polímero é uma vasta área de pesquisa. Uma enorme gama de pesquisadores de diferentes áreas tais como físicos, químicos, engenheiros químicos, biólogos trabalham com diferentes tipos de géis fazendo com que seja impossível chegar a uma definição consistente sobre o que constitui um gel.

Flory e Stockmayer^{34,35} deram uma grande contribuição no campo quando tentaram incluir um critério estrutural na definição de um gel, como uma rede infinita, estrutura tri-dimensional, coesão, encadeamento, etc. Flory posteriormente propôs uma classificação do gel baseado em:

- 1. Estrutura lamelar bem organizada,
- 2. Rede polimérica covalente; completamente desorganizada,
- 3. Rede polimérica através de agregação física predominantemente desordenada, porém com regiões ordenadas,
- 4. Estrutura particular desordenada.

Uma outra definição proposta por Burchard e Ross-Murphy³⁶ afirmava que o gel “apresenta um patamar na parte real do módulo complexo que se estende numa faixa de frequência, isto é, são sólidos viscoelásticos”.

Posteriormente Almdal e colaboradores³⁷ propuseram que o gel é uma rede polimérica intumescida que consiste de dois ou mais componentes com um deles sendo líquido e em maior quantidade, mas devem apresentar valores de G' que formam um patamar que se estende na ordem de segundos e G'' deve ser menor que o módulo de armazenamento na mesma região.

II. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de soluções de colágeno aniônico tipo I a partir de diferentes tipos de tecidos: pericárdio bovino, tendão bovino, e serosa porciana, e a partir dessas, a preparação de misturas de colágeno:glicerol em diferentes proporções, com a finalidade de estudar o efeito da adição de glicerol nas soluções de colágeno através espectrometria na região do infravermelho (FTIR), por termogravimetria (TGA) e análises reológicas.

III. Materiais e Métodos

III.1. Obtenção das soluções de colágeno aniônico

As soluções de colágeno aniônico foram preparadas a partir de pericárdio (CP) e tendão bovino (CT) e serosa porcina (CS) por tratamento com uma solução alcalina contendo 6% de dimetilsulfóxido e sais de cálcio, potássio e sódio por um período de 24 horas com agitação ocasional. 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. Após estabilização os materiais foram lavados com ácido bórico 3%, água destilada, solução de EDTA 0,3% a pH 11 e com água desionizada. A solução de colágeno foi obtida em ácido acético pH 3,5 após estabilização e homogeneização e armazenada em geladeira¹⁵.

III.2. Glicerol

O glicerol utilizado foi o comercial para análise Aldrich, teor 99,5%, densidade $1,261 \text{ g cm}^{-3}$ e massa molecular de $92,10 \text{ g mol}^{-1}$.

III.3. Preparação das misturas colágeno:glicerol

A partir das soluções de colágeno obtidas dos diferentes tecidos por tratamento alcalino, foram preparadas 50 g das amostras de proporções 1:0, 1:5 e 1:10, em massa, de colágeno:glicerol pela adição de glicerol comercial sobre o colágeno. As misturas foram homogeneizadas com agitador mecânico e posteriormente desaeradas em desecador. As soluções foram denominadas da seguinte forma: tecido de origem e proporção de colágeno:glicerol, ou seja, amostras derivadas de pericárdio foram denominadas de CP (colágeno de pericárdio) seguido da proporção em massa de colágeno:glicerol. As amostras

obtidas de tendão e serosa receberam seguiram a mesma abordagem para nomenclatura, CT e CS respectivamente.

Para a preparação das misturas de colágeno:glicerol foi necessária a padronização das concentrações da solução de colágeno, devido à diluição causada pela adição de glicerol na solução. Como a diluição máxima ocorre com a mistura de proporção de 1:10 de glicerol (adição de 3,75g de solução à mistura), as misturas de 1:0 e 1:5 tiveram as concentrações corrigidas com adição de ácido acético a pH 3,5. Desta forma todas as soluções mantiveram as concentrações de colágeno em massa iguais (0,75% em massa) mesmo após a adição de diferentes proporções de glicerol.

Após a determinação, por liofilização, da concentração das soluções de colágeno, foram preparadas as amostras de concentração 0,75% em massa de colágeno e suas misturas com glicerol. As misturas de colágeno CP (colágeno pericárdio), CT (colágeno tendão) e CS (colágeno serosa), foram obtidas nas proporções apresentadas na tabela 5, 6 e 7 respectivamente. As misturas de proporção 1:5 apresentam portanto 20% da massa de colágeno em solução e a solução de proporção 1:10 apresenta 10% da massa de colágeno também em relação a solução pura.

Tabela 5 - Composição das misturas de colágeno CP

Colágeno CP	1:0	1:5	1:10
Massa de colágeno (g)	29,53	29,53	29,53
Massa de HAc (g)	20,47	18,60	16,73
Massa de glicerol (g)	--X--	1,87	3,74

Tabela 6 - Composição das misturas de colágeno CT

Colágeno CT	1:0	1:5	1:10
Massa de colágeno (g)	39,47	39,47	39,47
Massa de HAc (g)	10,53	8,66	6,79
Massa de glicerol (g)	--X--	1,87	3,74

Tabela 7 - Composição das misturas de colágeno CS

Colágeno CS	1:0	1:5	1:10
Massa de colágeno (g)	44,64	44,64	44,64
Massa de HAc (g)	5,36	3,49	1,62
Massa de glicerol (g)	--X--	1,87	3,74

III.4. Caracterização dos materiais:

III.4.1. Liofilização

As concentrações das soluções de colágeno foram determinadas por liofilização a partir de alíquotas de 4 g das amostras previamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas até atingir uma massa constante pela utilização de um liofilizador modelo Modulyo Freeze Dryer Edwards. Foram realizadas para cada amostra três liofilizações de oito horas.

O processo de liofilização também foi utilizado para preparação das amostras utilizadas na termogravimetria.

III.4.2. Espectroscopia Vibracional

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} em placas de silício. As amostras foram colocadas sobre a placa de silício e deixadas em repouso por 5 min para secagem.

III.4.3. Termogravimetria

As análises foram realizadas em amostras liofilizadas na forma de esponjas de aproximadamente 10 mg, com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão de aquecimento de 10°C min^{-1} , sob fluxo de O_2 , utilizando-se um equipamento TGA 2050 da TA Instruments.

III.4.4. Ensaios de Reologia

Os estudos de reologia foram realizados tanto com as soluções de colágeno aniônico obtidos a partir de diferentes tecidos como também com suas respectivas misturas com glicerol a 1:5 e 1:10 na razão massa/massa. Nestes experimentos, foi utilizado um reômetro AR – 1000N de deformação controlada da TA Instruments, com geometria de placas paralelas de aço, de 40mm e um gap de 0,5mm. Os ensaios com variação de temperatura foram efetivados com temperatura controla por sistema peltier.

O anexo A mostra uma figura que ilustra o reometro adotado neste trabalho.

III.4.4.1. Varredura de Deformação

Os ensaios de oscilação controlada foram efetivados a 25°C, força normal de 0,01 N, tensão de cisalhamento de 0,1 Pa. A tensão de oscilação variou de 0,01 a 300 Pa com frequência de 1 Hz.

III.4.4.2. Varredura de Frequência

Os ensaios de varredura de frequência foram efetivados com deformação fixada em 0,3%, com frequência angular variando de 0,1 a 100 rad s⁻¹ a 25⁰C, força normal 0,01 N e tensão de cisalhamento 0,1 Pa.

III.4.4.3. Escoamento

Foram adotados dois tipos de ensaios de escoamento neste trabalho, o primeiro a temperatura constante de 25⁰C, força normal de 0,01 N e tensão de cisalhamento variando de 0,5 a 150 Pa. Outro ensaio foi dado com variação de temperatura de 25,0 a 60,0⁰C, com razão de aquecimento de 0,5⁰C min⁻¹ e cisalhamento de 100 s⁻¹.

IV. Resultados e Discussão

IV.1. Determinação da concentração das soluções de colágeno

A concentração de colágeno foi determinada por processo de liofilização. As concentrações apresentadas foram a média de três liofilizações independentes de cada amostra de colágeno. Para o colágeno de pericárdio bovino (CP) a concentração determinada foi de 1,27%, o colágeno de tendão bovino (CT) apresentou 0,95% e o colágeno de serosa porcina (CS) 0,84% em massa de colágeno, valores usualmente obtidos no laboratório de Biomateriais do IQSC.

IV.2. Espectroscopia Vibracional

A radiação na região do infravermelho é aquela que compreende a região do espectro eletromagnético entre o visível e a micro onda. A região mais utilizada é a porção entre 4000 cm^{-1} e 666 cm^{-1} .

A absorção na região do infravermelho depende do aumento da energia de vibração ou de rotação associado com uma ligação covalente, desde que esse aumento resulte numa variação do momento dipolar da molécula. Isso significa que quase todas as moléculas contendo ligações covalentes mostrarão algum grau de absorção seletiva no infravermelho. As únicas exceções são os elementos diatômicos como H_2 , N_2 e O_2 porque apenas nesse caso não há nenhum momento dipolar. Nos espectros na região do infravermelho, a frequência e a absortividade devidas a uma determinada ligação mostra apenas pequenas alterações quando se muda sua vizinhança. As linhas saem tão alargadas que se possam unir³⁸.

Geralmente os espectros obtidos são colocados num gráfico em função da porcentagem de transmitância, em vez de absorbância, fazendo com que as bandas de absorção apareçam na curva como depressões e não como máximos³⁹.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho do glicerol (Figura 21) mostra uma banda intensa de absorção na região de $3650\text{--}3584\text{ cm}^{-1}$ que corresponde à vibração de estiramento do grupo OH de álcool, uma banda de absorção na região que compreende $1260\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ de forte intensidade devido ao estiramento da ligação C-O. A banda de absorção correspondente ao estiramento CH ocorre em 3000 cm^{-1} . Em álcoois primários e secundários as vibrações da ligação OH interferem na ligação CH produzindo duas bandas de absorção, uma próxima de 1420 cm^{-1} e outra em 1330 cm^{-1} , que pode ser observado no espectro⁴⁰.

Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho de glicerol³⁸.

Os espectros de absorção na região do infravermelho obtidos para as amostras de colágeno e suas misturas mostram duas bandas em 1658 e 1550 cm^{-1} , correspondentes a bandas da amida I e II, devidas respectivamente a deformação axial da ligação C=O e a deformação angular da ligação N-H juntamente com o estiramento de C-N. Na região entre $600\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, aparece na forma de uma banda larga e de intensidade média devido à

deformação angular fora do plano da ligação N-H. Estas bandas são tipicamente encontradas em proteínas^{41,42}.

As bandas características da integridade da hélice tripla da estrutura do colágeno são encontradas em 1235 e 1450 cm^{-1} . A primeira corresponde às vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H enquanto a segunda corresponde a ligação C-H nos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina. Enquanto a primeira é sensível à presença de estrutura secundária do tropocolágeno a segunda independe dessa estrutura. Desta forma a análise de espectroscopia no infravermelho é uma forma de avaliar a integridade da hélice tripla, por meio da determinação da razão entre as absorbâncias nas bandas de números de onda 1235 e 1450 cm^{-1} . Essa integridade da estrutura secundária do tropocolágeno pode ser verificada quando o valor da relação 1235/1450 cm^{-1} for próximo da unidade, enquanto para estruturas desnaturadas esses valores estão por volta de 0,5⁴¹. A figura 22 mostra os espectros dos colágenos obtidos dos diferentes tecidos.

Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho das soluções de colágeno de diferentes tecidos.

A tabela 8 mostra os valores obtidos para a relação $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ que avalia a integridade da hélice tripla do colágeno, observando-se que independente do tecido de origem, as soluções são constituídas de colágeno não desnaturado. Portanto o tratamento alcalino não causa desnaturação da proteína.

Tabela 8 - Valores para a relação de absorbância $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ para os colágeno de diferentes tecidos

Tecido de origem	Valor da Razão
Pericárdio	1,00
Tendão	0,95

Serosa	1,00
--------	------

O espectro de absorção na região do infravermelho para o colágeno de pericárdio bovino e suas respectivas misturas com glicerol está mostrado na figura 23. O glicerol apresenta um pico de absorção em 1420 cm^{-1} que pode interferir no espectro do colágeno, mais precisamente no pico de absorção em 1450 cm^{-1} . Esta interferência pode causar um deslocamento no pico em 1450 cm^{-1} , o que de fato ocorre. O pico em 1450 referente à absorção da ligação C-H nos anéis pirrolidínicos para a mistura de proporção 1:5 foi deslocado para 1456 cm^{-1} e o pico da mistura 1:10 foi deslocado para 1458 cm^{-1} .

Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho do colágeno de pericárdio bovino e suas respectivas misturas com glicerol.

Para a solução de colágeno obtida a partir de tendão bovino, foram obtidos resultados análogos aos observados no pericárdio, ou seja, foi observado um deslocamento no pico de absorção em 1450 cm^{-1} do colágeno em função do pico de absorção em 1420 cm^{-1} do glicerol. Para a mistura de proporção 1:5 o pico foi deslocado para 1460 cm^{-1} e para a mistura de proporção 1:10 o pico foi deslocado para 1452 cm^{-1} como pode ser observado no espectro de absorção na região do infravermelho para o colágeno de tendão, figura 24.

Figura 24 - Espectro de absorção na região do infravermelho do colágeno obtido a partir de tendão bovino e suas respectivas misturas com glicerol.

A figura 25 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras obtidas de serosa porcina e suas respectivas misturas com glicerol. Da mesma forma como foi observada nos dois casos anteriores, ocorreu um deslocamento no pico relativo à absorção das ligações C-H dos anéis pirrolidínicos do colágeno na presença de

glicerol. A mistura de proporção 1:5 e a mistura de proporção 1:10 apresentaram seus picos em 1460 cm^{-1} .

Figura 25 - Espectro de absorção na região do infravermelho de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas respectivas misturas com glicerol.

A partir da análise dos espectros na região do infravermelho das misturas de colágeno:glicerol é possível observar também que os picos de absorção referentes à proteína de colágeno foram preservados e o não aparecimento de novos picos sugere que não há interação química entre o colágeno e glicerol.

Os espectros das misturas de colágeno:glicerol apresentaram uma forte absorção na região de $3650 - 3584\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento OH de álcool e uma banda adicional de baixa frequência na região entre $3550 - 3200\text{ cm}^{-1}$ de OH de solução, uma banda de forte intensidade na região compreendida por $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ da frequência de

estiramento CO de álcool. É possível observar que algumas bandas de absorção do colágeno permaneceram inalteradas, as duas bandas de absorção em 1658 e 1550 cm^{-1} correspondentes às bandas da amida I e II devidas respectivamente a deformação axial da ligação C=O e a deformação angular da ligação N-H juntamente com o estiramento de C-N, bandas típicas encontradas em proteínas, permanecem inalteradas.

O pico de absorção em 1450 cm^{-1} do colágeno sofreu um pequeno deslocamento devido a interferência causada pelo pico de absorção em 1420 cm^{-1} do glicerol.

Os resultados de espectroscopia na região do infravermelho para as soluções de colágeno de diferentes tecidos e suas respectivas misturas com glicerol mostraram valores da relação $1235/1450\text{cm}^{-1}$ superiores àquele encontrado para a proteína desnaturada ou gelatina⁴³ portanto a estrutura da hélice tripla do colágeno permaneceu inalterada mesmo após a adição de glicerol, ou seja, o glicerol não causa desnaturação do colágeno em solução. A tabela 9 mostra a os valores da razão para todas as amostras.

Tabela 9 - Valores para a relação de absorbância $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ para os colágeno de diferentes tecidos e suas misturas

Tecido de Origem	Proporção da mistura		
	1:0	1:5	1:10
Pericárdio	1,00	0,85	0,78
Tendão	0,95	0,82	0,86
Serosa	1,00	0,89	0,87

Os valores da razão de absorbância $1235/1450\text{ cm}^{-1}$ podem ter sido afetados devido a interferência causada pelo glicerol, o pico em 1420 pode além de deslocar causar o efeito de ampliação da intensidade do sinal. Como os valores são inversamente proporcionais o aumento na absorbância em 1450 cm^{-1} causa uma diminuição no valor da

razão, o que pode justificar a diminuição observada nos valores da razão para as misturas, independente do tecido de origem.

IV.3. Análise térmica - Termogravimetria

Na análise térmica, as propriedades físicas de um material são avaliadas em função de um programa controlado de temperatura. Os efeitos de temperatura sobre colágeno e suas misturas foram estudados utilizando-se a técnica de análise termogravimétrica (TG/DTG).

As técnicas termoanalíticas tem sido definidas como sendo métodos nos quais se mede a variação de uma determinada propriedade física de uma amostra em função do tempo ou da temperatura. Esta definição foi proposta por Mackenzie⁴⁴ e aceita pela confederação Internacional de Análise Térmica (ICTA).

O tipo mais comum de experimentos empregando esta técnica é a “Termogravimetria Dinâmica”, em que se submete a amostra a uma variação constante de temperatura (controlada por um programador), em um forno, enquanto uma balança monitora sua massa.

O aparelho utilizado para a técnica é chamado “termobalança” e para que se tenha resultados, é preciso que se originem produtos de decomposição térmica voláteis, ou que ocorra incorporação de átomos ou moléculas, provenientes dos gases da atmosfera do forno, respectivamente aumentando ou diminuindo a massa original da amostra.

A técnica TG (Termogravimetria) é essencialmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas num experimento, sendo seus resultados fundamentalmente de ordem quantitativa⁴⁵.

Na análise termogravimétrica a variação da massa de uma amostra, em atmosfera controlada, é continuamente acompanhada em função do tempo ou temperatura.

O gráfico de peso ou porcentagem em peso em função do tempo é chamado de curva termogravimétrica.

As curvas termogravimétricas e suas primeiras derivadas dW/dT para os colágenos mostram que as amostras de colágeno apresentam três estágios de porcentagem de perda de massa atribuídos à perda de água estrutural de 25 a 200°C (primeiro estágio), decomposição térmica do colágeno de 200 a 420°C (segundo estágio) e a carbonização do material de 420 a 750°C (terceiro estágio), como pode ser observado na figura 26.

Figura 26 - Curvas Termogravimétricas e DTG para os colágenos obtidos de diferentes tipos de tecidos.

A tabela 10 mostra as porcentagens de perda relativas às amostras liofilizadas de colágeno em seus respectivos estágios de perda de massa.

Tabela 10 - Tabela de porcentagem de perda de massa nos respectivos estágios dos colágenos de diferentes tecidos.

Tecido de Origem	Porcentagem de Perda de Massa		
	1º Estágio 25 a 200°C	2º Estágio 200 a 420°C	3º Estágio 420 a 750°C
CP (Pericárdio)	16,28	48,73	34,99
CT (Tendão)	17,29	42,81	39,90
CS (Serosa)	17,73	44,10	38,17

As misturas com glicerol apresentaram quatro estágios de perda de massa, devido à presença de glicerol, estes são compreendidos de 25 a 110°C devido à perda de água estrutural (primeiro estágio), 110 a 250°C relativo a decomposição térmica do glicerol (segundo estágio), 250 a 420°C relativo à decomposição térmica do colágeno (terceiro estágio) e o intervalo de 420 a 750°C relativo à carbonização do material (quarto estágio). Como pôde ser observado nas curvas termogravimétricas dos colágenos sem a adição de glicerol, a faixa de temperatura onde o colágeno inicia a decomposição está compreendida de 200 a 420°C. A interpretação dos resultados das misturas pode seguir dois caminhos:

- O glicerol causa um grande aumento na temperatura de decomposição térmica do colágeno, mais especificamente da mistura colágeno-glicerol, independente do tecido de origem, deslocando a faixa de temperatura de decomposição para 250 a 420°C, causando um aumento de 50°C, confirmando o efeito de solvatação na camada externa da proteína gerando o efeito de blindagem fazendo com que a mistura colágeno-glicerol seja mais estável termicamente em relação à proteína pura em solução aquosa, ou;

- O glicerol não causa efeito na temperatura de decomposição térmica do colágeno. Considerando que colágeno puro já começa a se decompor a 200°C, portanto dentro da faixa de decomposição do glicerol, o que ocorre é uma sobreposição de eventos térmicos dentro dessa faixa de temperatura. Em poucas palavras, o colágeno decompõe-se térmicamente juntamente com o glicerol à 200°C fazendo com que nenhum efeito seja observado.

É importante observar que independente da abordagem dada nas duas interpretações, o estágio de decomposição do colágeno não sofre alteração no que se refere o término do evento, ou seja, o colágeno e a mistura colágeno-glicerol se decompõe totalmente a 420°C em qualquer proporção de mistura independentemente do tecido de origem.

A figura 27 mostra as curvas termogravimétricas do colágeno obtido a partir de pericárdio bovino (CP) e suas respectivas misturas.

Figura 27 - Curvas Termogravimétricas e DTG de colágeno de pericárdio bovino liofilizado e suas misturas com glicerol.

As faixas de temperatura que determinam o estágio de perda de massa e as porcentagens de perda de massa para o colágeno estão mostrados na tabela 11. Para um melhor efeito comparativo os resultados do colágeno CP 1:0 (sem adição de glicerol) estão mostrados junto a tabela, é importante lembrar que para esta amostra a curva termogravimétrica apresenta apenas três estágios de perda de massa. O primeiro estágio está compreendido no intervalo de 25 a 100°C relativo à perda de água estrutural, pois a amostra foi liofilizada e não possui água livre, o estágio de perda relativo a decomposição térmica do colágeno, segundo estágio portanto têm início em 200°C e término em 420°C, e o terceiro estágio de carbonização entre 420 e 750°C.

Tabela 11 - Tabela de percentagem de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno (CP) e suas misturas

Proporção de Glicerol	Porcentagem de perda de massa			
	1º Estágio 25 a 110°C	2º Estágio 110 a 250°C	3º Estágio 250 a 420°C	4º Estágio 420 a 750°C
1:0	16,28		48,73	34,99
1:5	17,81	64,34	9,90	8,46
1:10	12,31	78,20	5,59	3,90

A partir dos resultados observados na tabela 11 para o colágeno CP, é provável que a primeira abordagem descrita anteriormente seja a mais adequada. O colágeno puro apresentou uma porcentagem de perda de massa de 48,73%. A mistura de proporção 1:5 apresenta 20% da massa de colágeno e a mistura 1:10 apresenta 10% da massa de colágeno em relação a mistura pura, portanto deveria apresentar estágios de perda proporcionais à quantidade de colágeno presente em cada amostra. Seria esperado uma perda de 9,77% para a mistura 1:5 e 4,87% de massa para a mistura 1:10 seguindo as devidas proporções. Comparando-se os valores esperados com os obtidos, foi observado que para a mistura 1:5 houve uma diferença de 0,15% para mais e um aumento de 0,72%

para a mistura 1:10, sugerindo que a mistura colágeno-glicerol tem seu estágio de perda bem definido entre 250 a 420^oC, e que não há sobreposição de eventos térmicos na faixa que compreende a decomposição térmica do glicerol. Portanto o glicerol causa um efeito de estabilização térmica do colágeno, sendo que o colágeno puro inicia o processo de decomposição térmica em 200^oC e a mistura colágeno-glicerol inicia a decomposição térmica em 250^oC.

O colágeno obtido a partir de tendão bovino apresentou uma curva termogravimétrica análoga a de pericárdio como mostra a figura 28.

Figura 28 - Curvas Termogravimétricas e DTG de colágeno CT liofilizado e suas misturas com glicerol.

Esperava-se que a mistura de colágeno CT 1:5 apresentasse uma perda de 8,56% no estágio relativo à decomposição térmica de colágeno, valor este que corresponde a 20% da massa de colágeno em relação à solução pura presente na mistura, porém foi observado uma perda de 8,67%, um aumento de 0,11%, e a mistura 1:10 deveria apresentar

uma porcentagem de perda de 4,28%, relativo a 10% da massa de colágeno presente na mistura em relação ao colágeno de tendão 1:0 (colágeno puro), porém apresentou uma perda de 4,87% um aumento de 0,59%. Estes resultados apresentaram uma grande similaridade com relação ao observado no colágeno CP, e sugere que a mistura colágeno-glicerol é mais estável termicamente. Como foi observado para o colágeno CP, o estágio de perda relativo a mistura colágeno-glicerol é compreendido entre 250 e 420°C. A tabela 12 mostra as porcentagens de perda de massa em seus respectivos estágios para o colágeno CT seguindo a mesma construção da tabela anterior, o estágio de perda para o colágeno CT 1:0 é compreendido entre 200°C a 420°C referente ao segundo estágio.

Tabela 12 - Tabela de porcentagens de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno CT e suas misturas

Proporção de Glicerol	Porcentagem de perda de massa			
	1º Estágio 25 a 110°C	2º Estágio 110 a 250°C	3º Estágio 250 a 420°C	4º Estágio 420 a 750°C
1:0	17,29		42,81	39,90
1:5	17,22	67,24	8,67	7,62
1:10	23,48	68,40	4,87	3,25

A figura 29 mostra as curvas termogravimétricas e suas respectivas derivadas para o colágeno CS e suas misturas com glicerol, foram obtidos resultados similares aos observados nos colágenos CP e CT.

Figura 29 - Curvas Termogravimetricas e DTG de colágeno CS liofilizada e suas misturas com glicerol.

Os valores de porcentagem de perda para os colágenos CS também apresentaram um pequeno desvio do valor estimado, tabela 13. A mistura 1:5 apresentou um desvio de 0,41% para mais e a mistura 1:10 apresentou um desvio e 0,39% também para mais, dado que seguindo as devidas proporções das misturas a porcentagem de perda de massa relativa ao colágeno está dentro da porcentagem de massa de colágeno em cada mistura, sugerindo também que o glicerol causa um grande efeito na temperatura de decomposição térmica colágeno. As misturas colágeno-glicerol de serosa porcina também iniciaram o processo de decomposição em 250^oC e terminaram a 420^oC.

Tabela 13 - Tabela de percentagens de perda de massa nos respectivos estágios do colágeno CS e suas misturas com glicerol.

Proporção de Glicerol	Porcentagem de perda de massa			
	1º Estágio 25 a 110°C	2º Estágio 110 a 250°C	3º Estágio 250 a 420°C	4º Estágio 420 a 750°C
1:0	17,73		44,10	38,17
1:5	9,38	74,20	9,23	7,19
1:10	17,76	73,46	4,79	3,99

Pelos resultados de termogravimetria foi observado que o glicerol causa um aumento na temperatura de decomposição do colágeno, independente do tecido de origem. As duas proporções de glicerol adotadas causaram o mesmo efeito de estabilização, deslocando a faixa de temperatura de 200 a 420°C para 250 a 420°C. Analisando as percentagens de perda para os colágenos, foi observado que as misturas tinham um pequeno deslocamento para mais em relação ao esperado na mistura, esse aumento na percentagem de perda de massa pode ser atribuído ao fato de que neste estágio ocorre a decomposição da mistura colágeno:glicerol, justificando a maior perda de massa.

IV.4. Ensaios de reologia.

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 decifrar 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 aplicado²⁹.

Os ensaios reológicos foram desenvolvidos com geometria de placas paralelas de 40 mm de diâmetro e gap de 0,5 mm. Primeiramente a região viscoelástica linear (região

de trabalho) foi determinada pela varredura de deformação a uma frequência constante de 1,0 Hz. Todos os subseqüentes ensaios foram efetivados a deformação constante dentro da região viscoelástica linear.

IV.4.1. Varredura de Deformação

Para a devida 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 solução 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 ou em outras palavras a tensão e a deformação estão relacionadas linearmente e o comportamento do fluido pode ser descrito como uma simples função do tempo. Este ensaio é importante, pois define a região de deformação a ser adotada nos demais ensaios reológicos e também é possível determinar a deformação máxima que a amostra é capaz de suportar.

A partir de uma varredura de deformação controlada pôde ser observado que o colágeno apresenta o módulo de armazenamento G' maior que o módulo de perda G'' , ou seja, o colágeno apresenta uma característica elástica predominante. Neste tipo de análise foi aplicada uma força de cisalhamento na amostra e, então medida a resposta do material pela porcentagem de deformação.

A figura 30 mostra as curvas de G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno de diferentes tecidos. Independente do tecido de origem as soluções de colágeno mostraram uma região viscoelástica linear definida em até 10% de deformação.

Figura 30 - G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno de diferentes tecidos.

A solução de colágeno a partir de pericárdio bovino (CP) apresentou G' em torno de 50 Pa e um G'' em torno de 10 Pa, possuindo os menores valores de G' e G'' . O colágeno CS apresentou valores de seus módulos intermediários nesta comparação, apresentando G' em torno de 90 Pa e G'' em torno de 25 Pa. O colágeno CT apresentou os maiores valores relativos de seus módulos, com G' em torno de 190 e G'' em torno de 50 Pa. Esses valores são bastante condizentes com o observado no momento de preparo das soluções de colágeno. O colágeno adotado neste trabalho é o colágeno do tipo I, porém obtido de diferentes tecidos, portanto apresentando diferentes características. Visualmente as três soluções apresentavam viscosidades diferentes, sendo que a solução mais “fluida” é a solução a partir de pericárdio e a solução mais “viscosa” a solução de colágeno a partir de tendão. A solução obtida de serosa porcina apresenta características intermediárias às outras duas.

A tabela 14 mostra os valores dos módulos G' e G'' na região viscoelástica linear. As diferentes características das soluções de colágeno tipo I obtidas de diferentes tipos de tecidos é observada pelos valores dos módulos de armazenamento e perda.

Tabela 14 - Valores dos módulos na região viscoelástica linear para as soluções de colágeno de diferentes tecidos

Colágeno	Módulos (Pa)	
	G'	G''
CP	50	10
CT	190	50
CS	90	25

A figura 31 mostra as curvas de G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol. É possível observar que a adição gradativa de glicerol aumenta de forma pouco pronunciada ambos os módulos, com G' apresentando um aumento de cerca 5 Pa e G'' um aumento de 2 Pa para a maior adição de glicerol na mistura 1:10, portanto não ocorre uma alteração significativa nas propriedades viscoelásticas das matrizes, com G' (50 Pa) > G'' (10. Pa), sendo a região viscoelástica linear observada até 10% de deformação.

Figura 31 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

A tabela 15 mostra os valores dos módulos em função da deformação para as soluções de colágeno CP e suas misturas com glicerol dentro da região viscoelástica linear. A adição de glicerol não causa uma grande mudança nos valores dos módulos, porém é possível observar que a adição de glicerol causa um aumento maior em G' .

Tabela 15 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CP e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear

Proporção da mistura	Módulos (Pa)	
	G'	G''
1:0	50	10
1:5	52	11
1:10	55	12

Os resultados de oscilação para os géis de colágeno obtido a partir de tendão bovino apresentaram resultados análogos aos observados no colágeno de pericárdio, porém é possível observar uma grande diferença nos valores dos módulos G' e G'' , enquanto que para as amostras de pericárdio apresentaram os valores de G' em torno de 50 Pa, o gel obtido por tendão bovino apresentou um valor em torno de 190 Pa, o módulo de perda apresentou um valor por volta de 50 Pa, sendo portanto um colágeno mais elástico e fluido que o obtido a partir de pericárdio bovino, mas a característica elástica ($G' > G''$) permaneceu inalterada, a região viscoelástica linear foi observada em até cerca de 10% de deformação. A figura 32 apresenta as curvas de G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir do tendão bovino.

Figura 32 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de tendão bovino e suas misturas com glicerol.

A tabela 16 mostra os valores dos módulos G' e G'' em função da temperatura para as soluções de colágeno CT e suas misturas com glicerol. O aumento no módulo G' foi de 80 Pa para a adição de glicerol na proporção 1:10, e o aumento no módulo G'' foi de 10 Pa para a máxima adição de glicerol.

Tabela 16 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CT e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear

Proporção da mistura	Módulos (Pa)	
	G'	G''
1:0	190	50
1:5	210	55
1:10	270	60

A característica elástica das soluções de colágeno também foi observada no material obtido a partir de serosa porcina e suas respectivas misturas com glicerol. O módulo G' para o colágeno sem adição de glicerol foi de 90 Pa, a mistura 1:5 apresentou um valor de G' igual a 180 Pa e a mistura 1:10 apresentou 230 Pa. O módulo de perda também apresentou uma diferença relativamente maior, G'' para o colágeno sem adição de glicerol, 25 Pa, a mistura 1:5 apresentou um valor de 40 Pa e a mistura 1:10 um valor de 55 Pa. A figura 33 apresenta os módulos em função da deformação para os materiais obtidos a partir da serosa porcina.

Figura 33 - G' e G'' em função da deformação para os géis de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas misturas com glicerol.

A tabela 17 mostra os valores dos módulos de armazenamento e perda para as soluções de colágeno CS. O colágeno obtido a partir de serosa porcina mostrou ser mais sensível a adição de glicerol, passando por uma grande variação nos valores dos módulos, porém sem alterar sua característica elástica. O aumento em G' é maior em relação a G'' . A região viscoelástica foi determinada em até 10% de deformação.

Tabela 17 - Valores dos módulos G' e G'' em função da deformação para as soluções de colágeno CS e suas misturas com glicerol na região viscoelástica linear

Proporção da mistura	Módulos (Pa)	
	G'	G''
1:0	90	25
1:5	180	40
1:10	230	55

Em todos os ensaios de varredura de deformação a região viscoelástica linear foi determinada em até 10% de deformação, independente do tecido de origem e da proporção de glicerol da mistura. Para os demais ensaios reológicos foi adotado 0,3% de deformação, pois a elevadas deformações não existirá linearidade entre tensão e a taxa de cisalhamento²⁹.

Os ensaios de varredura de deformação mostraram claramente a diferença na característica viscoelásticas das soluções. Analisando as curvas das soluções de colágenos puros, isto é, na proporção 1:0, verificou-se que a solução de colágeno obtida por pericárdio bovino apresenta a menor característica elástica ou módulo elástico G' de 50 Pa e também a menor característica viscosa ou módulo perda com G'' de 10 Pa. A solução de colágeno obtido de tendão bovino apresentou um módulo G' quase quatro vezes maior e um módulo G'' cinco vezes maior. A solução de colágeno obtido por serosa porcina apresentou valores dos módulos intermediários às duas amostras.

A diferença na viscoelasticidade das amostras de colágeno obtidas de diferentes tecidos pode ser atribuída à característica e a função que estes tecidos desempenham no organismo, ou seja, as diferentes disposições e formação das fibras de colágeno. Enquanto o pericárdio e a serosa possuem função de revestimento, o tendão tem função de sustentação e locomoção.

IV.4.2. Varredura de Frequência

Outro ensaio adotado foi o de deformação controlada através da varredura de frequência. É monitorada a resposta do material ao aumento da frequência (taxa de deformação) dentro de uma amplitude constante (deformação) numa temperatura constante. Para este ensaio reológico foi adotado 0,3% de deformação, valor dentro da região viscoelástica linear, acima de tudo um valor baixo de deformação pois a elevadas deformações não existirá linearidade entre tensão e a taxa de cisalhamento²⁹. Este ensaio é útil para a determinação ou caracterização da natureza da solução e, de certa forma este

ensaio reológico fornece a “impressão digital” da amostra, de modo que a variação dos módulos G' e G'' são apresentados de uma forma mais nítida graficamente⁴⁶. As curvas de varredura de frequência mostram que o módulo elástico ou de armazenamento G' é maior que o módulo viscoso ou de perda G'' , como foi determinada na varredura de deformação. É importante observar a dependência dos módulos com a frequência, ocorre uma variação dos módulos em relação à mesma, sugerindo que as amostras têm características de um gel. Nestes sistemas de forma geral, a modelagem mecânica mais adequada é a de Voight (discutida anteriormente), para materiais que passam por uma deformação não permanente, em outras palavras, tais materiais apresentam memória reológica (voltam ao estado inicial ao cessar a deformação aplicada).

A figura 34 mostra as curvas de G' e G'' para as soluções de colágeno CP, CS e CT, que permitem melhor visualização da variação dos módulos em função da frequência.

Figura 34 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de diferentes tecidos.

A figura 34 mostra uma grande diferença entre as curvas de G' e G'' em função da frequência para as amostras de diferentes tecidos. A amostra obtida de pericárdio

mostrou os menores valores de G' e G'' , ou seja, menos “gelatinosa”. Tal fato é bastante condizente com o observado no momento da preparação da amostra, que mostrou-se a mais “fluida” em comparação às outras duas amostras obtidas de tendão e serosa. A amostra de tendão mostrou os maiores valores de G' e G'' , sendo esta amostra aquela que mostrou-se mais “gelatinosa” ou mais “fluida”. A amostra de serosa porcina apresentou valores de seus módulos intermediários aos dois primeiros, porém mais próximo às características observadas no tendão.

Foram efetuados também ensaios de varredura de frequência nas misturas de colágeno:glicerol, para analisar o efeito causado pelo glicerol em amostras de colágeno tipo I obtidos de diferentes tecidos.

A figura 35 mostra as curvas de G' e G'' para as soluções de colágeno de pericárdio bovino CP e suas misturas, elas permitem melhor visualização dos aumentos nos módulos causados pela adição gradativa de glicerol nas soluções.

Figura 35 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

A adição de glicerol nas amostras de colágeno CP causou um grande aumento no módulo G'' (módulo viscoso ou módulo de perda), porém não causa alterações na mesma magnitude no módulo G' (módulo elástico ou módulo de armazenamento), porém G' permaneceu maior que G'' . Em poucas palavras o glicerol não altera a característica viscoelástica da amostra de colágeno CP.

As curvas relativas às amostras de colágeno de tendão bovino CT estão mostradas na figura 36, mostrando uma variação dos módulos em função da frequência, e também a predominância do módulo elástico frente ao módulo viscoso, caracterizando portanto um gel. A adição de diferentes proporções de glicerol nas amostras não causou alteração dessas características mas a crescente adição de glicerol aumentou ambos os módulos, como já havia sido observado nos ensaios de varredura de deformação.

Figura 36 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.

O colágeno obtido a partir de serosa porcina apresentou resultados análogos, como pode ser observado na figura 37. Como nos dois casos anteriores a partir dos ensaios

por varredura de frequência, foi possível classificar as soluções de colágeno CS como géis, portanto apresentam uma curva em que ocorre uma dependência dos módulos com a frequência. O aumento nos valores de ambos os módulos causados pela adição de glicerol também pôde ser observada de forma mais clara visualmente a partir da curva.

Figura 37 - G' e G'' em função da frequência para os géis de colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.

A partir dos resultados de varredura de frequência foi observado que módulo de armazenamento ou módulo elástico G' prevalece sobre o módulo de perda ou módulo viscoso G'' , e a amostra apresenta dependência com a frequência de varredura. Essas são características de que a solução trata-se de um gel de polímero onde suas cadeias permanecem ligadas constantemente⁴⁷. A partir dos mesmos ensaios reológicos é possível traçar uma curva de viscosidade em função da frequência. Estas curvas podem fornecer informações sobre o tipo de escoamento que a amostra apresenta frente ao cisalhamento imposto sob deformação controlada. Este ensaio pode ser adotado como complemento à curva de varredura de frequência, sendo possível determinar a variação da viscosidade. A

figura 38 mostra as curvas de viscosidade em função da varredura de frequência para os colágenos obtidos de diferentes tecidos.

Figura 38 - Curvas de viscosidade em função da varredura de frequência para os colágenos de diferentes tecidos.

A partir destas curvas é possível observar o decaimento da viscosidade com o aumento da frequência, caracterizando um comportamento pseudoplástico no que se refere seu escoamento. Este comportamento pode ser explicado pela existência de moléculas que em repouso se encontram altamente solvatadas e têm as camadas de solvatação destruídas pela ação do cisalhamento. Este fenômeno é comum em soluções poliméricas com baixa concentração, portanto, o resultado é o esperado para as amostras de colágeno de diferentes tecidos adotadas neste trabalho, que foram preparadas mantendo-se a concentração de proteína em 0,75% em massa. Nesta mesma curva é possível observar que as soluções de colágeno apresentam viscosidades diferentes. O colágeno de pericárdio com a menor viscosidade, a serosa apresenta valor intermediário e o colágeno de tendão bovino apresentando a maior viscosidade. A figura 39 mostra as curvas de viscosidade em função da temperatura para o colágeno CP e suas respectivas misturas com glicerol.

Figura 39 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CP e suas misturas com glicerol.

A adição de glicerol não causa alteração na característica pseudoplástica das soluções de colágeno CP, observando-se apenas um pequeno aumento na viscosidade das misturas em relação à solução pura. A figura 40 mostra as curvas de viscosidade em função da temperatura para as soluções de colágeno CT e suas misturas com glicerol.

Figura 40 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CT e suas misturas com glicerol.

Foi observado um resultado análogo ao do colágeno CP, porém com uma menor influência na viscosidade das soluções. A figura 41 mostra as curvas de viscosidade em função da frequência para as soluções de colágeno CS e suas misturas com glicerol.

Figura 41 - Curvas de viscosidade em função da frequência para o colágeno CS e suas misturas com glicerol.

Igualmente aos dois anteriores, não houve mudança na característica pseudoplástica das soluções de colágeno após a adição de glicerol, mas é possível observar que a solução de colágeno CS teve sua viscosidade mais influenciada pela adição de glicerol, causando um maior aumento na viscosidade.

IV.4.3. Escoamento a temperatura constante

Os ensaios de escoamento foram realizados a temperatura constante de 25,0°C com a tensão de cisalhamento variando de 0.5 a 150 Pa. A partir deste ensaio pode-se fazer algumas importantes correlações entre tensão de cisalhamento ou a taxa de cisalhamento com a viscosidade permitindo o entendimento das características fundamentais do comportamento do fluido⁴⁷. Estas correlações são mais bem visualizadas graficamente através das curvas de escoamento. A figura 42 mostra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os colágenos de diferentes tecidos.

Figura 42 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os colágenos de diferentes tecidos.

Estes resultados mostram o comportamento da solução de colágeno, ou gel de colágeno (como foi caracterizado pela varredura de frequência), como uma substância pseudoplástica²⁹, ou seja, apresenta uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sugerindo que as moléculas de colágeno se orientam paralelamente na direção do escoamento, onde as camadas do solvente que envolvem as partículas são parcialmente afastadas, causando uma diminuição das interações intermoleculares que também são responsáveis pela resistência inicial da substância ao escoamento⁴⁷ (formação de um ligeiro patamar no início da curva). Pode ser notado também uma relativa diferença entre as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, mas com resultados análogos aos já observados nos ensaios de varredura de deformação, com o colágeno obtido a partir de tendão bovino apresenta maior viscosidade relativa, o colágeno de pericárdio com a menor viscosidade, e o colágeno de serosa com valores intermediários aos outros dois.

A figura 43 mostra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

Figura 43 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

São resultados análogos aos observados na comparação entre os colágenos de diferentes tecidos feita anteriormente. Os resultados mostram o comportamento da solução de colágeno como uma substância pseudoplástica²⁹, apresentando uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, independente da proporção de glicerol adotada, sugerindo que as moléculas de colágeno se orientam paralelamente na direção do escoamento, onde as camadas do solvente que envolvem as partículas são parcialmente afastadas, mesmo com a presença de glicerol. Sugerindo que o glicerol não causa efeito nesta propriedade do material obtido a partir de pericárdio bovino.

Resultados similares foram observados para as amostras de colágeno obtido a partir de tendão bovino, como mostra a figura 44. Porém pode ser observado um aumento maior na viscosidade para as misturas 1:5 e 1:10 se comparado aos resultados do colágeno CP.

Figura 44 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.

O colágeno obtido a partir de serosa porcina apresentou resultados análogos aos observados nos dois anteriores. A figura 45 mostra as curvas para o colágeno de serosa. Foi possível observar que a crescente adição de glicerol causou um pequeno

aumento na viscosidade da solução de colágeno, sendo que o efeito mais pronunciado foi observado na mistura de colágeno de serosa porcina 1:10 glicerol.

Figura 45 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.

IV.4.4. Escoamento com varredura de temperatura

O último ensaio reológico adotado foi o de escoamento com varredura de temperatura, para determinação da viscosidade dos géis de colágeno em função da temperatura. Este ensaio além de mostrar como a temperatura influencia na viscosidade da amostra, é possível determinar a temperatura de desnaturação da proteína de colágeno a partir da primeira derivada da curva, onde o ponto de inflexão define a temperatura de desnaturação.

A figura 46 mostra as curvas de viscosidade em função da temperatura para as amostras de diferentes tecidos. O colágeno CP apresentou a menor viscosidade (0,40 Pa s), permanecendo constante até 38°C. O colágeno CT apresentou a maior viscosidade, por volta de 1,2 Pa s e assim se manteve até 37°C, já o colágeno CS apresentou uma viscosidade intermediária de 0,8 Pa s constante até 37°C. Acerca destes resultados, é

possível concluir que independente do tecido de origem o gel de colágeno apresenta uma viscosidade constante até 37 – 38°C, passando por uma grande diminuição a partir desta temperatura.

Figura 46 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno obtidos de diferentes tecidos.

As curvas de viscosidade para os géis de colágeno obtido a partir de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol estão mostradas na figura 47. Foi possível observar que a adição do glicerol não causou mudança na viscosidade do colágeno por volta de 0,40 Pa s. A viscosidade permaneceu constante até por volta de 38°C para esses materiais, decaindo de forma mais acentuada a partir deste ponto.

Figura 47 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

Os resultados para os géis de colágeno obtido a partir de tendão bovino estão apresentados na figura 48, da mesma forma que foi observado para o colágeno obtido de pericárdio bovino, a adição de glicerol não causou mudanças na viscosidade do material, valor em torno de 1,2 Pa s. A viscosidade dos materiais a partir de colágeno de tendão bovino permaneceu constante até 37°C, decaindo de forma acentuada a partir dessa temperatura.

Figura 48 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.

Os resultados desse ensaio para o colágeno a partir de serosa estão mostrados na figura 49, porém neste caso, a adição de glicerol na proporção 1:10 causou um aumento na viscosidade do material. Enquanto as amostras 1:0 e 1:5 apresentaram viscosidade em torno de 0,8 Pa.s, a mistura 1:10 apresentou 1,1 Pa.s de viscosidade na região linear. A viscosidade das amostras de colágeno obtido de serosa porcina manteve-se constante até 37°C e apresentou uma grande diminuição a partir desta temperatura.

Figura 49 - Curvas de viscosidade em função da temperatura para géis de colágeno obtido a partir de serosa porcina e suas misturas com glicerol.

A partir das curvas de viscosidade em função da temperatura apresentadas anteriormente é possível determinar a temperatura de desnaturação do colágeno que se dá no ponto de inflexão das mesmas, dessa forma, apenas um tratamento matemático (primeira derivada) fornecerá a temperatura onde ocorre a desnaturação, esta temperatura corresponde a temperatura no pico da curva $d\eta/dT$. A temperatura de desnaturação corresponde a temperatura limite em que a estrutura de hélice tripla do colágeno permanece íntegra.

As curvas $d\eta/dT$ em função da temperatura para os géis de colágeno de diferentes tecidos estão mostrados na figura 50. As temperaturas de desnaturação para as amostras obtidas de diferentes tecidos apresentaram uma temperatura de desnaturação equivalente, em torno de $40,0^{\circ}\text{C}$, como pode ser observado na tabela 18.

Figura 50 - Curvas de dn/dT em função da temperatura para géis de colágeno obtidos de diferentes tecidos.

Tabela 18 - Temperaturas de desnaturação para os colágenos de diferentes tecidos.

Tecido de Origem	Temperatura de Desnaturação ($^{\circ}\text{C}$)
CP	40,0
CT	38,3
CS	39,3

As curvas dn/dT do colágeno de pericárdio bovino estão apresentados na figura 51, as temperaturas de desnaturação foram $41,1^{\circ}\text{C}$ para o colágeno sem adição de glicerol, $41,8^{\circ}\text{C}$ para a mistura 1:5 e $41,8^{\circ}\text{C}$ para a mistura 1:10. Portanto não foi observado um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno CP devido a adição de glicerol nas proporções adotadas.

Figura 51 - Curvas de dn/dT em função da temperatura para géis de colágeno de pericárdio bovino e suas misturas com glicerol.

A figura 52 mostra as curvas dn/dT em função da temperatura para os géis de colágeno a partir de tendão bovino. As temperaturas de desnaturação determinadas foram: 38,3°C para o colágeno de tendão, 38,6°C para a mistura 1:5 e 39,0°C para a mistura 1:10. O colágeno CT também não apresentou um aumento na temperatura de desnaturação devido a adição de glicerol nas proporções adotadas neste trabalho, resultado análogo ao observado nas amostras derivadas de pericárdio bovino.

Figura 52 - Curvas de dn/dT em função da temperatura para géis de colágeno de tendão bovino e suas misturas com glicerol.

As temperaturas de desnaturação para as amostras de colágeno de serosa foram: $39,3^{\circ}\text{C}$ para o colágeno, $40,0^{\circ}\text{C}$ para a mistura 1:5 e $42,1^{\circ}\text{C}$ para a mistura 1:10 como mostra a figura 53. Para a amostra de colágeno de serosa foi observado um pequeno aumento da temperatura de desnaturação. Este resultado sugere que o gel de colágeno CS deve ser mais sensível a adição de glicerol, se comparado aos outros dois géis adotados neste trabalho.

Figura 53 - Curvas de dn/dT em função da temperatura para géis de colágeno de serosa porcina e suas misturas com glicerol.

Foi possível observar que o glicerol causou um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno obtido de serosa porcina, não causando efeito nos outros dois géis. A tabela 19 mostra as temperaturas de desnaturação das diferentes amostras de colágeno e suas respectivas misturas com glicerol.

Tabela 19 - Temperaturas de desnaturação para os colágenos e suas misturas.

Tecido de origem	Temperatura de desnaturação (°C)		
	1:0	1:5	1:10
Pericárdio	40,0	41,8	41,8
Tendão	38,3	38,6	39,0
Serosa	39,3	40,0	42,1

V. Conclusão.

Os espectros de absorção na região do infravermelho mostraram que a adição de glicerol não causa a desnaturação da proteína de colágeno.

As curvas termogravimétricas mostraram que o glicerol aumenta a temperatura de decomposição térmica do colágeno.

Os ensaios de reologia mostram que o glicerol causa alterações nas propriedades viscoelásticas das soluções colagênicas, tanto o módulo elástico quanto o módulo de armazenamento aumentaram, prevalecendo a característica elástica. As soluções podem ser classificadas como géis, como foi observado pelos ensaios de varredura de frequência, os ensaios de escoamento a temperatura constante mostraram que as amostras apresentam um comportamento pseudoplástico, a adição gradativa de glicerol causou um aumento na viscosidade dos géis e um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno de serosa porcina, porém para as soluções de colágeno obtidas de tendão e pericárdio não foi observado o mesmo efeito, sugerindo que o colágeno de serosa é mais sensível à adição de glicerol.

VI. Referências Bibliográficas.

- 1- WILLIAMS, D. **Definitions in biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 9 p.
- 2- VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen** London: Academic Press, 1980. 113 p.
- 3- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.**, v. 221, p. 1-22, 2001.
- 4- HOFFMAN, A. S. Intelligent polymers in medicine and biotechnology. **Artif. Organs**, v. 19, p. 458-67, 1995.
- 5- EASTOE, J. E. Composition of collagen and allied proteins In: RAMACHANDRAN, G. N. **Treatise on collagen**. London: Academic Press, v. 1, p. 1-71, 1967.
- 6- BRODSKY, B.; RAMSHAW, J. A. M. The collagen triple-helix structure matrix. **Biology**, v.15, p. 545-554, 1997.
- 7- SATO, K.; YOMOGIDA, K.; WADA, T.; YORIHUZI, T.; NISHIMUNE, Y.; HOSOKAWA, N.; NAGATA, K. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 37678-37684, 2002.
- 8- CHAPMAN, J. A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K.. M.; KADLER, K. E. The collagen fibril-a model system studing the staining and fixation of a protein. **Electron Micros Rev.**, v. 3, p. 1443-182, 1990
- 9- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.
- 10- SMITH, J. W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, v. 219, p. 157-163, 1968.
- 11- VEIS, A. Collagen fibrillogenesis. **Connect. Tis. Res.**, v. 10, p. 11, 1982
- 12- PIEZ, K. A. Structure and assembly of the native collagen fibril. **Connect. Tis. Res.**, v. 10, p. 25-36, 1982
- 13- NICOLAS, F. L.; GAGNIEU, C. H. Denatured thiolated collagen II Cross-linking by oxidation. **Biomaterials**, v. 18, p. 815-821, 1997
- 14- RADHIKA, M.; SEHGAL, P. K. Studies on the desamination of bovine collagen. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 35, p. 497-503, 1997
- 15- 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. **Quim. Nova**, v. 21, p. 267-71, 1998.
- 16- FRIESS, W. Collagen – Biomaterial for drug delivery. **European .J. Pharm. Biopharm.**, p. 113-136, 1998

-
- 17- BENAZZI, L. B. **Estudo do comportamento de fases de sistemas contendo glicerol e óleo de oliva em propano na presença de surfactante**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.
- 18- SEGUR, J. B. **Uses of glycerine in glycerol**. New York:Reinhold, 1953. 78 p.
- 19- ENCELLE. INC. Disponível em:<<http://www.encele.com/products/ematriz.htm>>. Acesso em: 25 nov. 2005.
- 20- NA, G. C.; BUTZ, L. J.; BAILEY, D. G.; CARROL, R. J. In vitro collagen fibril assembly in glycerol solution: evidence for a helical cooperative mechanism involving microfibrils. **Biochemistry**, v. 25, p. 958-966, 1986
- 21- NA, G.C. Interaction of Calf Skin collagen with glycerol: Linked function analysis. **Biochemistry**, v. 25, p. 967-973, 1986
- 22- RATHI, A.; PADMAVATHI, S.; CHANDRAKASAN, G. Influence of monosaccharides on the fibrillogenesis of type I collagen **Biochem. Med. Metab. Biol.**, v. 42, p. 209-215, 1989
- 23- HAYASHI, T.; NAGAI, Y. Factors affecting the interactions of collagen molecules as observed by *in vitro* fibril formation **J. Biochem.**, v. 72, p. 749-758, 1972
- 24- PENCOVA, R.; GOSHEV, I.; GORINSTEIN, S.; NEDOV, P. Stabilizing effect of glycerol on collagen type I isolated from different species. **Food Chem.**, v. 66, p. 483-487, 1999
- 25- LEONARDI, L.; RUGGERI, A.; ROVERY, N.; BIGI, A.; REALE, E. Light microscopy, electron microscopy, and X-ray diffraction analysis of glycerinated collagen fibers **J. Ultrastruct. Res.**, v. 85, p. 228-237, 1983
- 26- KUZNETSOVA, N.; CHI, S. L.; LEIKIN, S. Sugars and polyols inhibit fibrillogenesis of type I collagen by disrupting hydrogen-bonded water bridges between the Helices **Biochemistry**, v. 37, p. 11888-11895, 1998
- 27- PINERI, M. H.; ESCOUBES, M.; ROCHE, G. Water-collagen interactions: calorimetric and mechanical experiments. **Biopolymers**, v. 17, p. 2799-2815, 1978
- 28- KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological Characterization of Polymer Gel. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 533-562, 1998
- 29- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros** Caxias do Sul:Educs, 1997. 256 p.
- 30- NAVARRO, R. F.; ALSINA, O. L. S. Influência da concentração de aluminas nas propriedades reológicas de suspensões de alumina em polimetil siloxano - I; pseudo plasticidade. **Rev. Bras. Eng.**, v. 8, n. 1, p. 63-77, 1991.
- 31- WILKINSON, W. L. **Non-newtonian fluids** New York:Pergamon Press, 1960. 58 p.
- 32- TORRES, M. A. **Propriedades viscosas e viscoelásticas de soluções e géis de quitosana**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

-
- 33- LLOYD, D. J. **Colloid chemistry**. New York:J. Alexander, 1926. 767 p.
- 34- FLORY, P. J. Molecular size distribution in three dimensional polymer I. gelation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 63, p. 3083-3090, 1941
- 35- STOCKMAYER, W. H. Molecular distribution in condensation polymers. **J. Polym.Sci.**, v. 11, p. 424, 1953
- 36- BURCHARD, W.; ROSS-MURPHY, S. B. **Polymers and Gels**. London:Elsevier Applied Science, 1990. 19 p.
- 37- ALMDAL, K.; DYRE, J.; HVIDT, S.; KRAMER, O. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. **Polym. Gels Network**, v. 1, p. 5-17, 1993
- 38- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 3. ed. New York:Jonh Wiley, 1974. 73 p.
- 39- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre:Bookman, 2002. 363 p.
- 40- HAZIMAH, A. H. ; OOI, T. L.; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. **Journal of Oil Palm. Research**, v. 15, p. 1-5, 2003.
- 41- PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier-transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions - deconvolution of the amide i-band for conformational studies. **Biopolymers**, v. 27, p. 1749-1760, 1988.
- 42- GEORGE, A.; VEIS, A. FT-IR in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, v. 30, p. 2372-2377, 1991.
- 43- SILVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. **Thromb. Res.**, v. 55, p. 135-148, 1989.
- 44- MACKENZIE, R. C. Nomenclature in thermal analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 37, p. 441-444, 1974
- 45- CAVALHEIRO, E. T. G.; IONASHIRO, M.; BREVIGLIERI, S. T.; MARINO, G.; CHIERICE, G. O. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas **Quim. Nova**, v. 18, n. 3, p. 305-308, 1994.
- 46- NEWMAN, S.; CLOITRE, M.; ALLAIN, C.; FORGACS, G.; BEYSENS, D. Viscosity and elasticity during collagen assembly in vitro: relevance to matrix-driven translocation. **Biopolymers**, v. 41, p. 337-347, 1997.
- 47- WOLFGANG, F.; SCHLAPP, M. Effects of processing conditions on the rheological behavior of collagen dispersions. **European J. Pharm. Biopharm.**, v. 51, p. 259-265, 2001.

ANEXO A

Esquema de um reometro.