

**EDUARDO JOSÉ DE ARRUDA**

**VISCOELASTICIDADE DE GÉIS DE COLÁGENO - TIPO I**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Eng<sup>a</sup>. Química sob a orientação do Prof.Dr. César C. Santana (FEQ) e co-orientação do Prof.Dr. Benedicto C.Vidal (IB).

**CAMPINAS / FEVEREIRO - 1996.**

UNIDADE	38C
N.º CHAMADA:	Unicamp
	Ar 69v
V.º	6
	27744
PAGE	667196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/96
N.º CPD	11.00088584-1

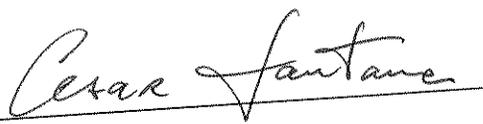
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Ar69v Arruda, Eduardo José de  
Viscoelasticidade de géis de colágeno-tipo I /  
Eduardo José de Arruda.--Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientadores: César C. Santana, Benedito C. Vidal.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Viscoelasticidade. 2. Reologia. 3. Colágeno. I.  
Santana, César C. II. Vidal, Benedito C. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. IV. Título.

**Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo Eng<sup>o</sup> Eduardo José de Arruda e aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 1996.**



**Prof. Dr. César Costapinto Santana**

Dissertação defendida e aprovada, em 27 de fevereiro de 1996, pela banca constituída pelos professores.



---

Prof. Dr. César Costapinto Santana



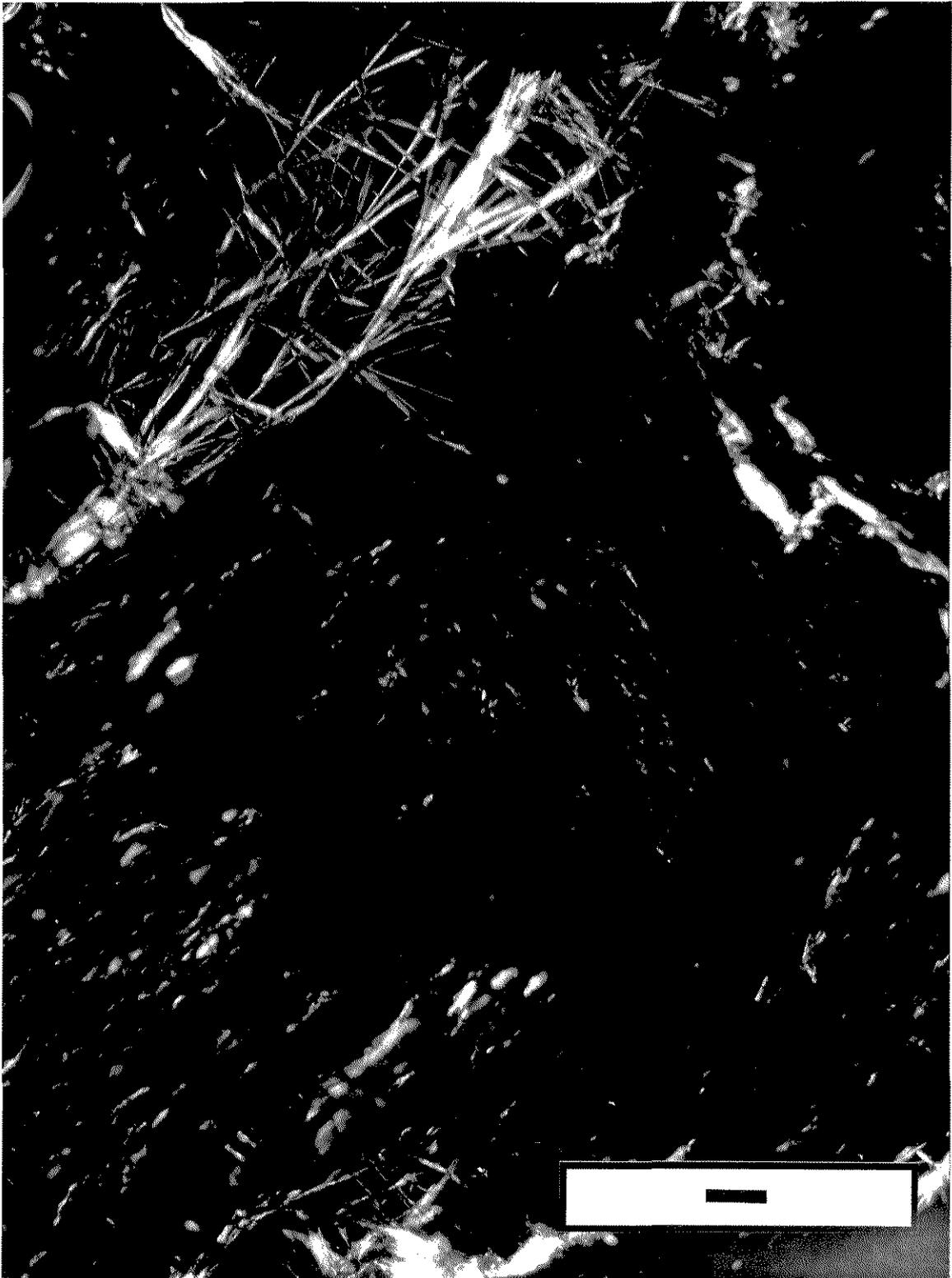
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cecília Amélia Carvalho Zavaglia



---

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro



**“Digno és Senhor, de receber glória e honra, e poder; porque tu criaste todas as coisas, e por tua vontade são e foram criadas.”**

**Apoc. 4:11**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita graça derramada em minha vida.

A minha família Ive, Aly e Dudu pelo amor, paciência e compreensão pelos momentos em que me ausentei.

Aos amigos e orientadores Prof. Dr. César Costapinto Santana e Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas diretrizes seguras e permanente incentivo.

À Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) pelo incentivo, oportunidade e manutenção concedidos pela figura dos Magnífico Reitor Pe. José Marinoni e Pró-reitor de Administração Pe. Segismundo Martinez Alvarez.

Aos amigos Prof. Dr. Everson Alves Miranda e Luiz Benedicto Pompeo Neto pelas críticas que ajudaram a suavizar os pontos à speros, polir o estilo e aguçar a clareza em pontos chaves.

A Capes pelo auxílio financeiro concedido.

A todos os técnicos e amigos que direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

# ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO	
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS .....	5
2.1.1. COLÓIDES MACROMOLECULARES .....	5
2.1.2. DIÁLISE .....	7
2.1.3. HIDRATAÇÃO PROTÉICA .....	8
2.1.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE GÉIS PROTÉICOS .....	10
2.1.5. MECANISMO DE GELIFICAÇÃO .....	11
2.1.6. LIGAÇÕES HIDROFÓBICAS .....	14
2.1.7. REOLOGIA E VISCOELASTICIDADE .....	15
2.2. COLÁGENO .....	35
2.2.1. FIBRILOGÊNESE .....	37
2.2.2. DIÂMETRO DAS FIBRAS COLÁGENAS.....	39
2.2.3. ESTABILIDADE TÉRMICA DO COLÁGENO.....	41
2.2.4. GÉIS DE COLÁGENO.....	43
2.2.5. REOLOGIA DO COLÁGENO .....	45

3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
	3.1. PREPARAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO .....	49
	3.2. PROCEDIMENTOS DA DIÁLISE .....	51
	3.3. AMOSTRAGEM .....	53
	3.4. DOSAGEM DO COLÁGENO .....	54
	3.5. RETICULAÇÃO (“CROSSLINKING”) .....	55
	3.6. MEDIDAS REOLÓGICAS .....	58
	3.6.1. EQUIPAMENTO .....	58
	3.6.2. LEVANTAMENTO DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS .....	60
4.	MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICAS .....	62
	4.1. MODELO DE KELVIN-VOIGT .....	62
	4.2. MODELO DE MAXWELL .....	64
	4.3. MODELO DE ZENER .....	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	71
6.	CONCLUSÕES / RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
	APÊNDICES .....	123
	APÊNDICE A: .....	TABELA A1
	APÊNDICE B: .....	TABELA B1
	APÊNDICE C .....	TABELA C1

## LISTAS DAS FIGURAS

Figura 1	Sistema coloidal fibrilar.....	6
Figura 2	Esquema e equação da dissociação, reorganização e hidratação de uma proteína fibrilar.....	13
Figura 3	Associação das moléculas de colágeno, mostrando a desorganização da água envolvente e a interação hidrofóbica entre as moléculas.....	15
Figura 4	Alongamento de um corpo cilíndrico.....	18
Figura 5	Escoamento laminar de um fluido newtoniano.....	20
Figura 6	Diagrama simplificado de uma mola.....	23
Figura 7	Deformação de um sólido elástico.....	24
Figura 8	Diagrama simplificado de um amortecedor.....	26
Figura 9	Diagrama simplificado de uma mola oscilando.....	27
Figura 10	Diagrama simplificado de um amortecedor oscilando.....	28
Figura 11	Esquema da deformação e tensão em função do tempo para o amortecedor.....	29
Figura 12	Esquema da deformação e tensão em função do tempo para o sólido.....	30
Figura 13	Deformação e tensão em função do tempo para o material viscoso.....	31
Figura 14	Composição do módulo complexo ( $G^*$ ) a partir dos módulos ( $G'$ ) e ( $G''$ ).....	32

Figura 15	Composição da Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) a partir dos módulos ( $\eta'$ ) e ( $\eta''$ ).....	34
Figura 16	Unidade molecular básica do colágeno tipo I.....	36
Figura 17	Fibrilogênese do colágeno.....	39
Figura 18	Empacotamento e diâmetro das fibras de colágeno.....	41
Figura 19	Monitoramento preliminar do meio dialisante.....	52
Figura 20	Monitoramento da diálise (gel e meio dialisante) a partir de seis ensaios independentes e padronizados.....	53
Figura 21	Espectro de absorção do colágeno na faixa ultravioleta.....	54
Figura 22	Representação esquemática das possíveis reações dos grupos aminos da lisina com o glutaraldeído; $n = 1,2,3,4,\dots,40$ ; $R-NH_2$ = resíduo da lisina; GLUT = cadeia carbônica da molécula de glutaraldeído.....	57
Figura 23	Esquema básico do reômetro rotativo.....	58
Figura 23A	Reograma de uma varredura de deformação para um gel no ponto isoelétrico (pI) .....	61
Figura 24	Esquema do modelo de Kelvin-Voigt, resultado da associação em paralelo de mola e amortecedor.....	63
Figura 25	Esquema do modelo de Maxwell, resultado da associação em série de mola e amortecedor.....	65
Figura 26	Esquema do modelo de Zenner, resultado da associação em série mola e amortecedor em paralelo com mola.....	68

Figura 27	Reograma da suspensão fibrosa (pH 2,50). (A) Deformação, (B) Frequência.....	71
Figura 28	Reograma do pré-gel (pH 3,50), após desfibrilamento do feixe. (A) Deformação, (B) Frequência.....	72
Figura 29	Reograma de uma estrutura no início da zona isoeletrica (pH 4,5 a pH 7,0). (A) Deformação, (B) Frequência.....	72
Figura 30	Reograma de estrutura em formação de trama (pH 4,80). (A) Deformação, (B) Frequência.....	73
Figura 31	Reograma de uma estrutura em trama (pH 5,0). (A) Deformação, (B) Frequência.....	73
Figura 32	Dosagem de colágeno com o pH nos pré-géis e géis ao longo da diálise.....	76
Figura 33	Variação de $G'$ (módulo elástico) com o pH dos pré-géis e géis obtidos ao longo da diálise.....	78
Figura 34	Variação de $G''$ (módulo viscoso) com o pH dos pré-géis e géis obtidos ao longo da diálise.....	79
Figura 35	Viscosidade complexa (resistência ao cisalhamento dinâmico) dos pré-géis e géis de colágeno ao longo da diálise.....	80
Figura 36	Ângulo de defasagem entre deformação e tensão nos pré-géis e géis de colágeno ao longo da diálise.....	81
Figura 37	Suspensão fibrosa de colágeno após precipitação. (Magnificação 85x. barra 250 $\mu$ m); pH 2,5; força iônica $85 \cdot 10^{-2}$ M (NaCl); tempo de diálise 0 horas; concentração média de colágeno 2,85% em peso.....	82

Figura 38	Detalhe de um feixe de fibras de colágeno. (Magnificação 340x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 2,5; força iônica $85 \cdot 10^{-2}$ M (NaCl); tempo de diálise 0 hora; concentração média em colágeno 2,85% em peso.....	83
Figura 39	Detalhe ampliado do feixe de fibras de colágeno. (Magnificação 1350x. barra 25 $\mu\text{m}$ ); pH 2,5; força iônica $85 \cdot 10^{-2}$ M (NaCl); tempo de diálise 0 hora; concentração média de colágeno 2,85% em peso.....	84
Figura 40	Feixe de colágeno desfibrilando (fibrilas). (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 3,5; força iônica $85 \cdot 10^{-4}$ M (NaCl); tempo de diálise 4 horas; concentração média em colágeno 1,0% em .... peso.....	85
Figura 41	Fibrilas se reorganizando no início da zona isoelétrica do colágeno. (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 4,5; força iônica $85 \cdot 10^{-5}$ M (NaCl); tempo de diálise 8 horas; concentração média em colágeno 1,25% em peso.....	86
Figura 42	Fibrilas se entrelaçando e iniciando a formação da trama (gel). (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 4,8; força iônica $85 \cdot 10^{-5}$ M (NaCl); tempo de diálise 12 horas; concentração média em colágeno 1,0% em peso.....	87
Figura 43	Os feixes começam a se definir, entrelaçam-se e inicia-se a formação de nós. (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 5,0; força iônica $85 \cdot 10^{-6}$ M (NaCl); tempo de diálise 14 horas; concentração média em colágeno 0,75% em peso.....	88

Figura 44	Trama fibrosa estruturada e nós aparentes. (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 5,25; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise aproximadamente 15 horas; concentração média em colágeno 1,0% em peso.....	89
Figura 45	Estrutura tridimensional com feixes de fibras e nós definidos no ponto isoelétrico. (Magnificação 220x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise 16 horas; concentração média em colágeno 1,5% em peso.....	90
Figura 46	Detalhe ampliado da estrutura fibrilar formada no ponto isoelétrico. (Magnificação 430x. barra 50 $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise 16 horas; concentração média em colágeno 1,5% em peso.....	91
Figura 47	Estrutura fibrilar do gel após extensa diálise. (Magnificação 85x. barra 250 $\mu\text{m}$ ); pH 6,8; tempo de diálise 30 horas; concentração média em colágeno 0,5% em peso.....	92
Figura 48	Detalhe de um nó fibrilar no gel extensamente dialisado. (Magnificação 2365x. barra 10 $\mu\text{m}$ ); pH 6,8; tempo de diálise 30 horas; concentração média em colágeno 0,5% em peso.....	93
Figura 49	Constantes ajustadas pelo modelo de Zener.....	94
Figura 50	Suspensão fibrosa precipitada e reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 2,5; força iônica $85 \cdot 10^{-2}$ M (NaCl); tempo de diálise 0 hora.....	96
Figura 51	Fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 3,5; força iônica $85 \cdot 10^{-4}$ M (NaCl); tempo de diálise 4 horas.....	97

Figura 52	Detalhe ampliado das fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 850x. barra 25 $\mu\text{m}$ ); pH 3,5; força iônica $85 \cdot 10^{-4}$ M (NaCl); tempo de diálise 4 horas....	98
Figura 53	Fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v, no início da zona isoelétrica. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 4,5; força iônica $85 \cdot 10^{-5}$ M (NaCl); tempo de diálise 8 horas.....	99
Figura 54	Trama fibrilar reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 4,8; força iônica $85 \cdot 10^{-5}$ M (NaCl); tempo de diálise 12 horas.....	100
Figura 55	Feixes entrelaçados e nós reticulados (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 5,0; força iônica $85 \cdot 10^{-6}$ M (NaCl); diálise 14 horas.....	101
Figura 56	Trama fibrosa com nós reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 5,25; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise aproximadamente 15 horas.....	102
Figura 57	Estrutura obtida no ponto isoelétrico e reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125 $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise 16 horas.....	103
Figura 58	Detalhe ampliado do feixe e nó fibrilar, no ponto isoelétrico, reticulado com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 850x. barra 25 $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica $85 \cdot 10^{-7}$ M (NaCl); tempo de diálise 16 horas.....	104

Figura 59	Suspensão fibrosa precipitada; pH 2,5; força iônica $85.10^{-2}$ M; diálise 0 hora.....	105
Figura 60	Suspensão reticulada; pH 2,5; $85.10^{-2}$ M; diálise 0 hora.....	105
Figura 61	Fibrilas hidratadas, pH 4,0; força iônica $85.10^{-4}$ M; diálise 4 horas.....	106
Figura 62	Fibrilas hidratadas e reticuladas; pH 4,0; $85.10^{-4}$ M; diálise 4 horas.....	106
Figura 63	Fibrilas na zona isoeletrica; pH 4,5; força iônica $85.10^{-5}$ M, diálise 8 horas.....	106.
Figura 64	Fibrilas na zona isoeletrica e reticuladas; pH 4,5; $85.10^{-5}$ M; diálise 8 horas.....	106
Figura 65	Tramas em formação; pH 4,8; força iônica $85.10^{-5}$ M; diálise 12 horas.....	107
Figura 66	Tramas em formação reticuladas; pH 4,8; $85.10^{-5}$ M; diálise 12 horas.....	107
Figura 67	Tramas, feixes e nós; pH 5,0; força iônica $85.10^{-6}$ M; diálise 8 horas 14 horas.....	107
Figura 68	Tramas, feixes e nós reticulados; pH 5,0; $85.10^{-6}$ M; diálise 14 horas.....	107
Figura 69	Estrutura no pI; pH 5,45; força iônica $85.10^{-7}$ M; diálise 16 horas.....	108
Figura 70	Estrutura tridimensional reticulada no pI; pH 5,45; $85.10^{-7}$ M; diálise 16 horas.....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RTT	Tendão da cauda do rato
Gal	Galactose
Glu	Glicose
FC	Suspensão “in natura” de colágeno na forma fibrilar.
XLC	Suspensão fibrilar reticulada por glutaraldeído.
HLA-XLC	Suspensão com glutaraldeído e ácido hialurônico.
$\lambda$	Tempo característico do material, relaxação (s)
T	Tempo característico do processo deformativo, observação (s)
$l_0$	Comprimento original (m)
l	Comprimento após tração (m)
f	Força tensora de tração (N)
K	Parâmetro material
$A_0$	Área da seccão transversal ( $m^2$ )
$\tau$	Tensão (Pa)
$\gamma$	Deformação (m)
G	Módulo de rigidez (Pa)
v	Velocidade (m/s)

$\eta$	Viscosidade newtoniana (Pa.s)
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )
$\tau_e$	Tensão cisalhante na mola (Pa)
$\tau_v$	Tensão cisalhante no amortecedor (Pa)
$\omega$	Frequência angular ( $s^{-1}$ )
$t$	Tempo (s)
$\tau_0$	Tensão máxima (Pa)
$\gamma_0$	Deformação Máxima (Pa)
$\delta$	Ângulo de defasagem entre tensão e deformação ( $^\circ$ )
$G^*$	Módulo complexo (Pa)
$G'$	Módulo de Armazenamento, elástico (Pa)
$G''$	Módulo de dissipação, viscoso (Pa)
$\text{tg } \delta$	Tangente de perda
$\eta^*$	Viscosidade complexa (Pa.s)
$\eta'$	Viscosidade Dinâmica (Pa.s)
$\eta''$	Componente da viscosidade complexa, elasticidade (Pa.s)
pH	Concentração hidrogênica
pI	Ponto isoelétrico.

## RESUMO

O estudo do comportamento viscoelástico dos géis de colágeno é importante para sua caracterização reológica visando-se aplicações em bioengenharia e práticas clínicas. Neste trabalho, as propriedades viscoelásticas dos géis de colágeno, obtidos a partir do tendão da cauda do rato (RTT), foram avaliadas e correlacionadas em função de variáveis de preparação (tempo de diálise, concentração de colágeno e pH, e da frequência de oscilação do reômetro (Haake CV20, no modo oscilante e configuração de placas paralelas). Os parâmetros reológicos avaliados foram: módulo de armazenamento ( $G'$ ), módulo de dissipação ( $G''$ ) e viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). O desenvolvimento da estrutura do gel durante a diálise foi acompanhado por micrografia óptica e correlacionado com os parâmetros reológicos medidos. A concentração de colágeno variou com o tempo de diálise devido à hidratação das fibras. Os géis mostraram estruturas fibrilares características, nas quais as fibras estavam entrelaçadas e formando anéis e/ou arranjos helicoidais. O modelo de Maxwell e de Zenner, mostraram-se apropriados para a descrição das características viscoelásticas dos géis de acordo com suas concentrações de colágeno: o modelo de Maxwell para baixas concentrações de colágeno (menor que 1% em peso) e o de Zenner modificado para concentrações moderadas de colágeno (de 1% até 2,50% em peso). Entretanto, altas concentrações de colágeno nos géis não propiciaram ajustes satisfatórios destes modelos clássicos. Aumento de pH na zona isoelétrica do colágeno (de pH 4,5 a 7,0) resultou em aumento linear do módulo viscoso e aumento exponencial do módulo elástico dos géis.

## ABSTRACT

The study of the viscoelastic behaviour of collagen gels is important for its rheological characterization aiming applications in bioengineering and clinical practice. Viscoelastic properties of native and crosslinked collagen gels obtained from rat tail tendon (RTT) were evaluated and correlated as a function of gel preparation variables (dialysis time, collagen concentration, and pH) and oscillation frequency. The rheological parameters evaluated were the storage module ( $G'$ ), dissipation module ( $G''$ ), and complex viscosity ( $\eta^*$ ), using a Haake CV20 rheometer operating with two parallel plate configuration in oscillating mode. The development of the fibrillar structure at the gel during dialysis was evaluated by optical photomicrography and correlated with the rheological parameters. The collagen concentration changed with dialysis time due to the hydration of the fibers. The gels showed a typical fibrillar structure in which the fibers were interwined forming either rings and/or helical arrangements. The models of Maxwell and Zenner showed to be appropriate to describe the viscoelastic behaviour of the gels. The Maxwell model was in a good agreement with the experimental rheological parameters for the low range collagen concentration (less than 1% by weight), while moderate collagen concentration range (1.0 % to 2.5% by weight) had a good fit by modified Zenner's model. However, high collagen concentration gels exhibited discrepancies using these classic models. Increasing the pH in the isoelectric zone (pH 4.5 to 7.0) resulted in the linear increase at the dissipation module and in exponential increase at the storage module.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

As propriedades biológicas do colágeno há muito tempo são conhecidas, e a sua capacidade de auto-agregação a partir de soluções conduzem a uma gama de aplicações clínicas e estruturais. Estes biomateriais obtidos a partir do colágeno podem ser apresentados nas formas de esponjas, membranas, suspensão injetável, etc. São também usados na produção de fibras sólidas (vasos sanguíneos, peles artificiais, tendões artificiais, material de sutura cirúrgica, suspensões microfibrilares para correções plásticas, películas oftálmicas para suporte de antibióticos, corticóides e anestésicos visando a cicatrização no pós-operatório ou controle de processos infecciosos (as restrições ficam por conta do antibiótico e de suas características físico-químicas).

Atualmente, busca-se a síntese do osso artificial, biocerâmicas osso-miméticas (fases minerais orientadas por matrizes protéicas), ou outras associações com materiais que uma vez implantados possam gerar estímulos elétricos por piezoelectricidade e, deste modo induzir à respostas seletivas, com base em interações específicas no reparo e remodelamento dos tecidos nervoso e ósseo (Piccirilli e Goissis, 1995). Estas pesquisas buscam correlações químicas e estruturais que envolvam características do biomaterial como a hidrofobicidade e a hidrofiliidade. Uma pesquisa recentemente sugeriu que a capacidade de retenção de água do biomaterial determina o nível total de mineralização (calcificação), o qual é iniciado e propagado via sítios de afinidade do colágeno (Golomb et al., 1993).

Este trabalho abordou o estudo da viscoelasticidade dos géis de colágeno tipo I. O colágeno foi obtido a partir da retirada e solubilização em solução acética de tendões da cauda de rato (RTT), seguida de precipitação por solução salina e reconstituição das fibras em meio não agitado.

A padronização da suspensão fibrilar reconstituída é feita por drenagem do líquido, seguindo-se a diálise da suspensão fibrosa envasada, sob refrigeração, com água destilada que é trocada por períodos pré-fixados.

Ao longo da diálise, devido ao aumento do pH e diminuição da força iônica no gel, ocorreu a formação de pré-géis e géis com distintos estados de agregação fibrilar, cujo comportamento reológico foi investigado em regime permanente na região viscoelástica linear.

O comportamento das fibras em meio aquoso pode ser observado, à medida que as concentrações de cloreto de sódio e ácido acético na suspensão fibrosa decrescia e ocorria a hidratação da fibra colágena, gerando-se assim os diversos estados de organização fibrilar dos pré-géis e géis. O comportamento reológico e fisico-químico dos géis, obtidos sob variação simultânea de pH e força iônica, resultou da sua estruturação fibrilar.

A utilização da oscilação forçada é um método de teste dinâmico não destrutivo para a investigação reológica destes estados de organização. A dosagem de colágeno para cada gel foi obtida por espectrofotometria e seu respectivo estado organizacional micrografado. Pode-se, assim, avaliar a hidratação da estrutura fibrilar, a influência da concentração de colágeno e a organização das fibras sobre as propriedades reológicas destes géis. A partir das micrografias ópticas de cada gel da sequência de auto-agregação, pode-se observar a intensidade do brilho do sistema fibrilar. Este brilho é consequência da sua birrefringência, propriedade óptica utilizada para avaliar os estados de agregação e quantificar o dano térmico das estruturas fibrilares.

Toda a sequência micrografada possibilitou uma análise pictórica, onde cada imagem estrutural pode servir de base para comparação de dados reológicos com físico-químicos.

O objetivo deste trabalho foi o levantamento experimental dos parâmetros reológicos, que possibilitassem estabelecer uma relação quantitativa entre as várias características estruturais ordenadas dos géis fibrilares com suas propriedades reológicas, utilizando-se para a descrição do comportamento fibrilar uma base molecular e estrutural das fibras colágenas, como também observar a influência do meio que governa a formação das estruturas.

Estas estruturas com geometrias definidas manifestam-se quando sujeitas a tensões dinâmicas cisalhantes e pode-se, deste modo, estudar a influência destas perturbações mecânicas sobre as estruturações protéicas, que foram sujeitas a uma temperatura limite para a qual interações hidrofóbicas se acentuam. Os ensaios reológicos foram realizados no limite superior da região viscoelástica linear (Rosenblatt et al., 1993). Estes dados experimentais revelam aspectos do mecanismo de gelificação, como também aspectos comportamentais e físicos-químicos da organização fibrilar de importancia na manufatura do colágeno em aplicações biotecnológicas e clínicas.

Esta dissertação está dividida em seis capítulos, além deste primeiro, que podem ser resumidos:

√ No capítulo 2 é realizado um levantamento da literatura relevante nas áreas de interesse, trata-se de conceitos como colóide macromolecular, diálise, hidratação protéica, mecanismos de gelificação, interações hidrofóbicas e conceitos fundamentais da viscoelasticidade e reologia. Em seguida, avalia-se especificamente o colágeno, a sua fibrilogênese (formação das fibras), o comportamento biomecânico das fibras, estabilidade térmica, características e mecanismos envolvidos como também trabalhos de reologia com colágeno.

Todas as informações obtidas serviram à investigação, avaliação e conclusão do trabalho proposto, onde procurou-se não apenas a simples transcrição dos trabalhos em pequenos textos, mas direcionou-se e enfocou-se os pontos fundamentais, como idéias, problemas e sugestões dos diversos autores.

√ No capítulo 3 os métodos, materiais e equipamentos são descritos, visando a repetibilidade dos ensaios que posteriormente serão realizados por outros pesquisadores. A metodologia segue uma ordem cronológica do desenvolvimento do trabalho, onde procurou-se expor de modo sintético e claro todos os seus passos e observações realizadas.

√ No capítulo 4 os modelos mecânicos são apresentados e deduzidos a partir de suas leis básicas, com considerações de comportamento a partir da análise das variáveis e condições impostas. Os ajustes gráficos para uma situação de interesse é mostrada indicando que o comportamento das estruturas fibrilares dos géis de colágeno podem ser ajustadas por modelos mecânicos simples, formados a partir da associação de mola(s) e amortecedor(es).

√ No capítulo 5 são expostos os resultados e as discussões, que conduzirão às principais conclusões, relacionando-se causas e efeitos e estabelecendo-se generalizações e princípios obtidos a partir dos experimentos, visando a elucidação de possíveis contradições. Sugeriu-se ainda a aplicabilidade dos resultados e a possibilidade de elaboração de uma teoria no tocante a rigificação fibrilar, como uma característica de materiais com elevado conteúdo hidrofóbico.

√ No capítulo 6 procurou-se expor as conclusões, fundamentando-se nos resultados obtidos e discutidos anteriormente, reafirmando-se a idéia principal e os pormenores do corpo do trabalho, que por si deverão responder às indagações e objetivos propostos inicialmente.

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O presente trabalho situa-se em região de interface entre a Reologia, Biologia, Química e Ciências dos Materiais. O colágeno é objeto de estudo, sob diversos aspectos, destas ciências. Devido à necessidade de introdução de conceitos para o entendimento das áreas de interesse envolvidas, foram colocados conceitos fundamentais, de utilidade em áreas de interesse. A dissertação de tais conceitos não é exaustiva, mas dirigida, a fim de que possa alcançar seu intento de ilustrar de um modo claro e objetivo os fundamentos aplicados.

#### **2.1.COLÓIDES MACROMOLECULARES**

O gel sendo um sistema complexo, procurou-se formular um modo razoável para entendê-lo, do ponto de vista coloidal. Uma busca na literatura foi realizada e encontrado que grande parte desta trata de modo simples o sistema coloidal, pela fixação de uma dimensão física, em faixas de tamanho da partícula, para a classificação dos sistemas. Diz-se, que se as dimensões forem encontradas na faixa de 1 - 10 nm, o sistema apresentará propriedades coloidais características. Esta aparente rigidez de classificação, acaba sendo atenuada pela tridimensionalidade do objeto, não havendo necessidade de que todas as suas dimensões físicas se incluam dentro da faixa predita. A observação em sistemas fibrilares, mostrou que somente duas dimensões, acabam se incluindo na faixa estipulada. A representação esquemática (Figura 1) sugere a possibilidade de sucessivas subdivisões de um cubo, gerando modelos com até três dimensões na faixa coloidal (Everett, 1988).

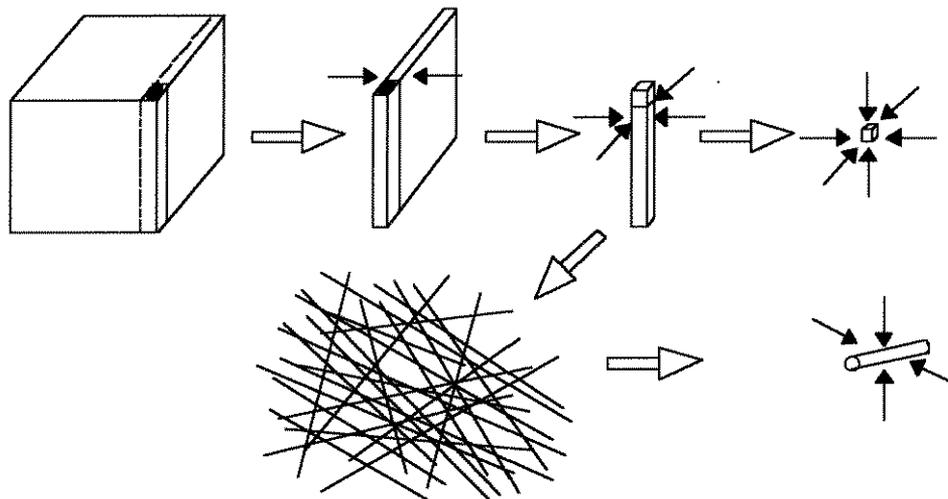


Figura 1. Sistema coloidal fibrilar. (Everett, 1988)

O primeiro corte sobre o cubo conduz a um sistema coloidal com uma dimensão (laminar), um novo corte sobre a lâmina, resulta em um sistema com duas dimensões na faixa coloidal (modelo fibrilar) e o corte seguinte a uma partícula com três dimensões coloidais ou sistema denominado corpuscular disperso. Por esta razão, os biocolóides macromoleculares, incluindo o colágeno, possuem em suas dimensões justificativa para sua inclusão na faixa de tamanho coloidal.

O colágeno é classificado como colóide macromolecular, portanto capaz de gerar, por agregação, um sistema gel fibrilar, pode-se, inicialmente observar que o gel é um sistema produzido a partir da junção de duas fases: uma fase dispersa macromolecular (proteína) e uma fase dispersante (água).

A gelificação resulta da insolubilização da proteína e dos fatores de meio (pH, força iônica, etc) que governam a formação dos distintos estados de organização fibrilar, ao longo da diálise na qual ocorre simultaneamente variação de pH e da força iônica. Forma-se, assim, pré-géis e géis fibrosos viscoelásticos.

### **2.1.2. DIÁLISE**

Este recurso é utilizado na preparação e purificação de macromoléculas, pela remoção seletiva e troca de contraíons de baixa massa molecular e outros componentes solventes (McPhie, 1971).

Vários fatores de importância sob o aspecto prático são evidenciados como a natureza da membrana, sua seletividade de massa molecular em relação ao fluxo de contaminantes - devendo reter alta massa molecular e permitir a saída de baixa massa molecular, a relação área superficial da membrana e o volume de solução a dialisar, relação entre o volume interno retido na membrana e o volume externo da solução dialisadora, a difusividade do meio interno e externo e a concentração da substância difusível para fora da membrana que se oporá ao escoamento externo.

O material da membrana deve possuir características próprias e altamente especializadas. Sua polimerização deve ser elevada e homogênea, condições necessárias para fabricação de película, que submetida à presença do solvente deve entumescer, formando uma verdadeira peneira molecular, cujos poros selecionarão a passagem dos solutos e solvente(s) com adequada massa molecular, enquanto deve limitar a passagem da proteína ou do material de interesse. Esta passagem livre de moléculas abaixo de um certo peso molecular, acaba por conceituar o peso molecular "cutoff" (Pohl, 1990).

A diálise é motivada por um gradiente de concentração do soluto em ambos os lados da membrana dialisadora (Thain, 1967; Stewart, 1977). O tempo requerido para o estabelecimento do equilíbrio é função da taxa entre a área da membrana e o volume de solução protéica a dialisar. Quando não houver mais gradiente de concentração, a difusão do soluto torna-se idêntico em ambas direções (equilíbrio). Percebe-se então a importância da troca do meio dialisante para a manutenção do gradiente e continuidade da diálise e a consequente hidratação das fibras, constituindo o gel. Há também na prática, a necessidade de se estabelecer o tempo de diálise, visando a recuperação ótima da proteína, pois há perdas devido a adsorção desta pela membrana.

A difusão do soluto depende da temperatura e viscosidade da solução. Embora o uso de alta temperatura aumente a taxa de difusão, em muitos casos a estabilidade da proteína requer a condução da diálise sob refrigeração. Com a necessidade deste procedimento a taxa de difusão é drasticamente reduzida em função do aumento de viscosidade do dialisado, levando ao desenvolvimento de membranas e estratégias específicas. Para acelerar a diálise de modo homogêneo pode-se utilizar sacos achatados para volumes de 0,1 mililitro até 20 mililitros, um contínuo escoamento que estes proporcionam, proverá uma máxima diferença na concentração da proteína e o meio dialisante. Dependendo do volume e da composição da amostra esta pode ser dialisada completamente entre duas a cinco horas (McPhie, 1971).

### **2.1.3. HIDRATAÇÃO PROTÉICA**

A conformação protéica é produto da interação da proteína com o solvente, principalmente a água, através de suas ligações peptídicas, de seus grupos ácidos e básicos da cadeia, além dos grupos de resíduos aminoácidos laterais carregados ou não (Nomura et al., 1977); (Shinyashiky et al., 1990); (Lazarev et al., 1992); (Burjanadze, 1992).

Todo o sistema protéico possui comportamento físico-químico e reológico fortemente influenciado não somente pela presença da água, mas também pela organização da proteína e fatores do meio; i.e., pH e força iônica. O meio influencia significativamente a hidratação, pois afetando a interação proteína-proteína e proteína-água, relatados como a base da gelificação (Cheftel et al., 1985), acabam por determinar muitas propriedades pela inter-relação destas forças. Os principais fatores de influência da hidratação, são: pH, força iônica, temperatura, solvente e concentração protéica.

As mudanças de pH afetam a ionização e a magnitude da carga líquida na molécula protéica, alterando as forças de interação, quer sejam atrativas ou repulsivas e ocasionando variação na habilidade de retenção de água pela proteína. No ponto isoelétrico (pI), neste pH a interação proteína-proteína é máxima, ocorrendo associação das proteínas, em gel particularmente um estado isoelétrico acaba por justificar um máximo de dispersão de luz (efeito Tyndall), força de gel (resistência ao cisalhamento) e decréscimo da hidratação (sinérese). Fixado o pI, este passa a ser o marco para avaliação do comportamento protéico. Acima ou abaixo do pI a proteína carregar-se-á negativamente ou positivamente e em consequência disto, moléculas de água poderão interagir com estas cargas adquiridas pela proteína. O fato pode ser observado sob o aspecto da repulsão molecular, pois, cadeias protéicas carregam cargas elétricas de mesmo sinal, ocasionando repulsão, cabe também uma análise da solubilidade da proteína em função do pH, onde a mínima solubilidade é obtida no pI (Bull e Breese, 1980; Fárfan, 1994).

A força iônica tem relação direta com a espécie e a concentração dos íons presentes no meio solvente, o que afeta a absorção de água e a solubilidade protéica. Sais neutros na concentração de 0,5 M até 1,0 M, aumentam a solubilidade de proteínas, efeito denominado “salting-in“ (Arakawa e Timasheff, 1984).

Uma interação eletrostática ocorre entre os íons com as cargas da proteína, o que provoca um decréscimo de atração eletrostática entre as cargas opostas das moléculas vizinhas e contribui a solvatação iônica para aumentar a receptividade da proteína pelo meio envolvente e portanto sua solubilidade.

A uma concentração salina excedente ao valor acima citado, a proteína decrescerá em solubilidade (diminuição da interação proteína-água e aumento da interação proteína-proteína), motivando a precipitação da proteína. Este efeito é denominado “salting-out“, resultado da competição entre a proteína e íons salinos por moléculas de água para sua solvatação. Em altas concentrações salinas, não há quantidade suficiente de moléculas de água para a solvatação protéica, a maioria da água presente está coordenando íons salinos. Portanto a interação proteína-proteína torna-se mais intensa que a interação proteína-água, conduzindo a associação protéica e precipitação (Nelson e Glatz, 1985; Shih et al., 1992).

O “salting-out“ de proteínas é afetado pela temperatura, quando o pH e força iônica são fixados. Esta solubilidade aumenta com a temperatura de 0°C a 40°C. Acima desta faixa, o movimento molecular tornar-se capaz de romper ligações envolvidas na estabilização de estruturas secundárias e terciárias, ocasionando a desnaturação e resultando num incremento da solubilidade (pela exposição de grupos hidrofílicos). No caso do colágeno, o aumento da temperatura dentro da faixa, conduz a uma acentuada formação de fibras por via hidrofóbica, além da absorção de água, o que resulta em gelificação.

#### **2.1.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO GEL PROTÉICO**

O mecanismo e a força que motiva a formação de um reticulado protéico tridimensional que caracteriza os géis protéicos, não é completamente entendido.

A formação deste reticulado é resultante de um balanço entre interações proteína-proteína e proteína-água, ou seja, entre forças atrativas e repulsivas das cadeias adjacentes dos polipeptídeos, podem ser atrativas: interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e ligações cruzadas “crosslinking(s)”. A intensidade destas atrações varia com a natureza da proteína, condições do meio e passos sequenciais da gelificação. Contrariamente, repulsões eletrostáticas (especialmente em valores de pH afastados do pI) e as interações proteína-água tendem a manter as cadeias fibrilares afastadas.

Como o gel é uma resultante do produto de atrações intermoleculares, a concentração protéica é de fundamental importância na probabilidade de contatos intermoleculares; em extremo a concentração pode justificar a agregação, apesar das condições desfavoráveis para a ocorrência desta. Os géis obtidos com diversos estados agregacionais possuem uma capacidade surpreendente de atração e retenção de água. Procura-se demonstrar que a capacidade de retenção da água pelo gel é realizada pela ação dos grupos ácidos e básicos ionizados e não ionizados, além de grupos CO e NH das ligações peptídicas descobertos, como centros de cargas negativas e positivas e que cria um sistema de retenção com multicamadas de água ao longo da cadeia do polipeptídeo, o que possivelmente, ainda aumenta a quantidade de água retida, por capilaridade no gel fibroso, sob resfriamento (Cheftel et al., 1985).

#### **2.1.5. MECANISMO DE GELIFICAÇÃO.**

Muitos tentam explicar as propriedades do gel protéico, e muitas teorias foram propostas. Destas, três teorias tem sido consideradas por cientistas coloidais, para alguns géis obtidos a partir de proteínas uma teoria torna-se mais provável que outra. Estas teorias são conhecidas como: adsorção do solvente, formação do reticulado tridimensional (“network”) e orientação da partícula (Meyer, 1975).

O soluto adsorve moléculas do solvente, sob resfriamento, formando partículas maiores pelo aumento das camadas ao redor do soluto, deste modo ocorre a imobilização do sistema e a rigidez. O suporte desta teoria depende da demonstração que a adsorção das moléculas solventes é extensiva e que a adsorção aumenta com o decréscimo de temperatura.

A formação de um reticulado tridimensional sempre terá características fibrilares. Este componente com capacidade de gelificar é fibroso e na estrutura este pode interagir entre si para a formação da fibra mais compacta. As fibras sob resfriamento formam um reticulado tridimensional com intervalos na cadeia. As ligações estabilizam como vínculo as fibras no reticulado. Estes vínculos podem-se conformar através de ligações primárias entre grupos funcionais (características de géis que expandem e encolhem dentro de certos limites), ligações secundárias - pontes de hidrogênio (características de géis frágeis), ou forças atrativas secundárias não localizadas (interações hidrofóbicas). Esta teoria explica a formação do gel em sistemas dependentes da temperatura, concentração, pH e concentração salina (força iônica).

A teoria da orientação particular postula a tendência do soluto e do solvente em se orientarem em definidas configurações espaciais através da influência de forças semelhantes as que ocorrem em cristais, tendo a estrutura formada habilidade de tomar e perder água sem distorção do “cristal”. Certas proteínas mosaico do tabaco, fibrinas, gelatina, miosina, actomiosina de músculo, ovalbumina dentre outras formam géis sob estas condições de orientação. O trabalho de Ferry (1980) encontrou nesta teoria da formação do reticulado tridimensional bom ajuste para os dados acumulados sobre o comportamento das proteínas.

A partir de uma solução protéica em direção ao processo de gelificação, seguem-se passos reversíveis, parte-se da dissociação da estrutura quaternária e terciária da proteína em unidades.

A Figura 2 representa uma dissociação (solubilização) e consequente reorganização com hidratação variável ao longo do processo (Cheftel et al., 1985).

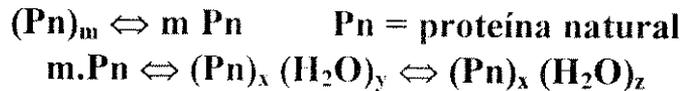
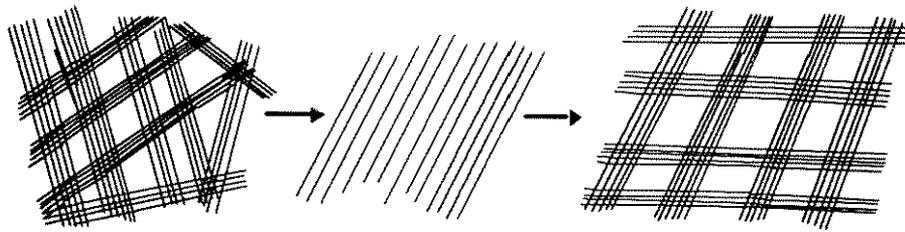


Figura 2. O esquema e a equação mostram a dissociação, reorganização e hidratação de uma proteína fibrilar.

Durante o processo de organização do sistema um ponto de interesse é o denominado ponto isoelétrico (pI) (Righetti e Caravaggio, 1976; Malamud e Drysdale, 1978; Vidal, Melo e Valdrighi, 1974), onde o polieletrólito apresenta uma carga líquida nula, o que caracteriza a ausência de forças repulsivas intermoleculares, provocando uma máxima interação proteína-proteína e, guiando o processo de gelificação a uma mínima hidratação e uma máxima força de gel, evidências que acentuam características, como: sinêrese (exsudação espontânea da água do gel em repouso) e efeito Tyndall (efeito óptico caracterizado por uma máxima dispersão de luz - tornando capaz a visualização a olho nú de fibras constituintes do gel).

O conteúdo de grupos hidrofóbicos da proteína estabelece critérios para a gelificação em função da sua quantidade. O conteúdo hidrofóbico estando presente numa concentração maior que 31,5%, estas proteínas exibirão sua gelificação dependente de sua concentração.

Enquanto se a quantidade de grupos hidrofóbicos variar entre 22% e 31,5% estas não exibirão mudanças no pH próprio de gelificação, quando a concentração da proteína no meio for alterada.

### 2.1.6. INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS

Este fenômeno é bastante evidente quando da homogeneização de soluções protéicas fibrosas. A interação hidrofóbica é uma das principais forças na conformação dos polipeptídeos em água. Estas ligações tendem a estabilizar os resíduos laterais apolares dos polipeptídeos, os quais devem ser resguardados do contato com a água (Némethy, 1967), e também atua entre fibras protéicas dispersas e hidratadas contribuindo intensamente neste caso para a estabilização quando comparada às interações eletrostáticas (Wallace, 1990). A água, por suas características polares, tende a associar-se fortemente através da formação de pontes de hidrogênio com a proteína (Figura 3). Esta parte lateral do resíduo hidrofóbico interfere na associação, provocando um auto-arranjo das moléculas de água, mais ordenado, ao redor destes grupos não polares; isolando-os do contato com a água. Quando, porém, as moléculas de proteína vierem a se associar, ocorrerá desordenação desta água envolvente (Piez e Trus, 1977).

Este processo, apesar do não favorecimento entálpico, produz uma suficiente mudança entrópica para assegurar o deslocamento do equilíbrio para a direita. Cálculos e experimentos com substâncias modelos indicaram que a força média de uma ligação hidrofóbica, é pequena, 1 a 2  $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ , em termos de energia livre. Quando, entretanto, uma molécula protéica possui em torno de 30% de aminoácidos laterais apolares, o número de interações hidrofóbicas nesta molécula é intensificado e a sua estabilização acentuada.

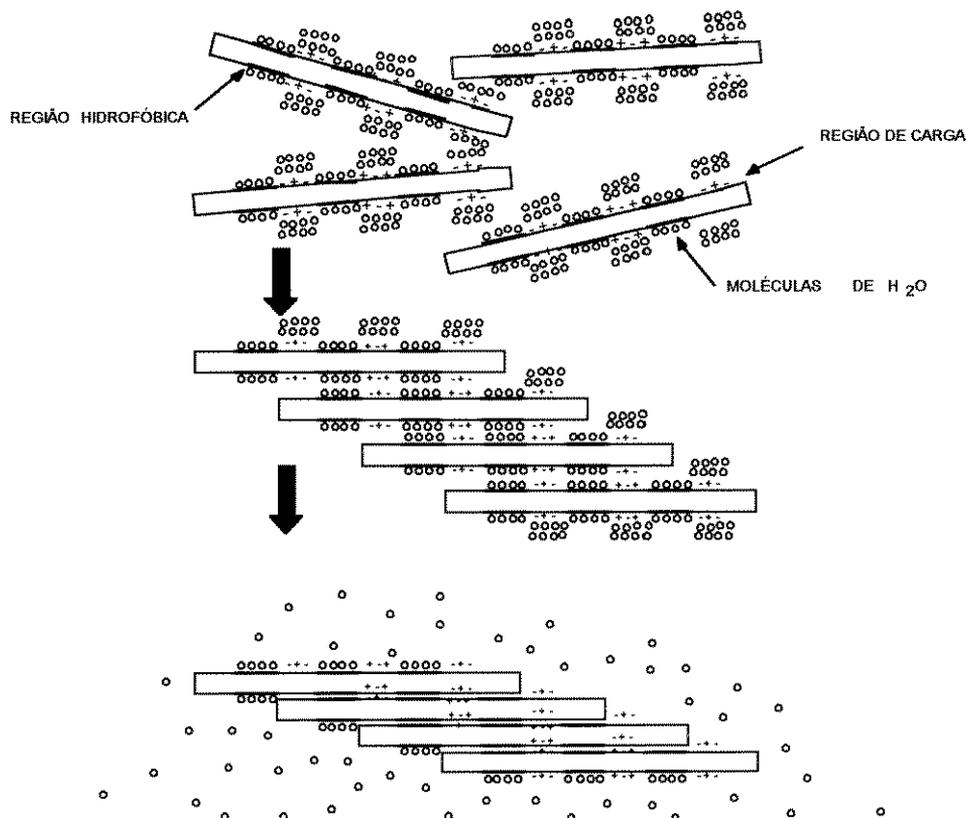


Figura 3. Esquema da associação das moléculas de colágeno, mostrando a desorganização da água envolvente e a interação hidrofóbica entre as moléculas

### 2.1.7. REOLOGIA E VISCOELASTICIDADE

A reologia, alicerçada em princípios matemáticos da mecânica do contínuo, reinterpreta as idéias de tensão e deformação no estudo da microestrutura dos corpos envolvidos no processo deformativo, descreve a sua deformação no tempo, sob a influência das tensões, estuda e investiga as propriedades mecânicas como também o comportamento de corpos reais deformáveis.

O comportamento dos corpos reais é intermediário aos sólidos e líquidos ideais, enquanto sólidos podem estar sujeitos a tensão e cisalhamento, líquidos podem apenas sofrer cisalhamento (Schramm, 1994).

Esta classificação do comportamento reológico dos materiais que relatam sua resposta a tensões aplicadas, é estendida pela introdução do tempo de escala para o processo deformativo, não havendo exclusividade dos termos viscosidade e elasticidade associados respectivamente a um líquido e um sólido; pois o líquido pode apresentar propriedades de sólidos e vice-versa, a depender das tensões aplicadas, do tempo e da frequência utilizada, devendo sua classificação ao seu comportamento reológico.

O número de Débora (Reiner,1964) baseado na canção bíblica da profetisa Débora (Jz 5:5) após importante vitória sobre o general Sísera (1300 a.C), é parte do seu canto de vitória “ As montanhas se derreteram diante do Senhor, e até o Sinai diante do Senhor Deus de Israel.”, demonstra a razão do escoamento, por ter o homem um tempo finito de observação, enquanto o tempo de observação para Deus é infinito, ou seja, tudo escoar desde que se espere tempo suficiente. Portanto a magnitude do número adimensional definirá a diferença das características de comportamento entre sólido e líquido.

$$D_e = \frac{\lambda}{T}$$

$\lambda$  = tempo de relaxação

T = tempo de observação

O  $\lambda$  é um tempo característico do material. No modelo de Maxwell este pode ser entendido a partir da aplicação de uma deformação constante sobre o material, no momento em que a tensão for removida, esta irá relaxar exponencialmente de um valor de equilíbrio até zero e este tempo constante de decrescimento é chamado tempo de relaxação. O tempo de observação T é o tempo característico do processo de deformação (Bird et al., 1987).

Para um sólido perfeitamente elástico (hookeano) o tempo de relaxação ( $\lambda$ ) é infinito e é nulo para um líquido perfeitamente viscoso (newtoniano). Portanto um determinado material pode apresentar comportamento sólido por ter um tempo de relaxação elevado, ou o processo deformativo transcorreu com rapidez. Pode-se partir da proposição que sólido é o material que não muda seu perfil quando submetido a uma dada tensão e líquido aquele que tem seu perfil continuamente modificado, consequência do escoar.

$$D_e \rightarrow 0 \text{ (viscoso)}$$

$$D_e \rightarrow 1 \text{ (viscoelástico)}$$

$$D_e \rightarrow \infty \text{ (elástico)}$$

Quando um sistema material é sujeito a uma coleção de forças, um ou ambos poderão ocorrer (incluindo suas partículas componentes): movimento rotacional e movimento translacional (Tschoeg, 1989), o que resulta numa deformação. Ao centrar atenção à deformação resultante da aplicação de um conjunto de forças (carga), esta deformação dependerá das características e propriedades do material, podendo ser recuperada (reversível, elástica) ou irreversível (viscosa, plástica, permanente) ou poderá, ainda, cumprir ambos os papéis recuperando em parte e dissipando em parte (comportamento viscoelástico).

A intenção da Ciência sempre foi a quantificação e a previsão de fenômenos, exprimindo o comportamento do sistema material na forma de equações constitutivas, portanto relacionando especificamente as propriedades do sistema material, de modo que este possa independer da geometria e dimensões do sistema, havendo dependência direta apenas da natureza do sistema material.

Para este equacionamento, considerar o alongamento de um corpo cilíndrico é conveniente, aplica-se uma força ( $f$ ) na direção axial do bastonete, uma deformação será obtida. A Figura 4 abaixo mostra que a partir de um comprimento original ( $l_0$ ) passa-se a um comprimento ( $l$ ), como resultado da deformação. Ao assumir a resposta elástica do material, pode-se dizer que o alongamento  $\Delta l = l - l_0$ , será diretamente proporcional a força tensora ( $f$ ),

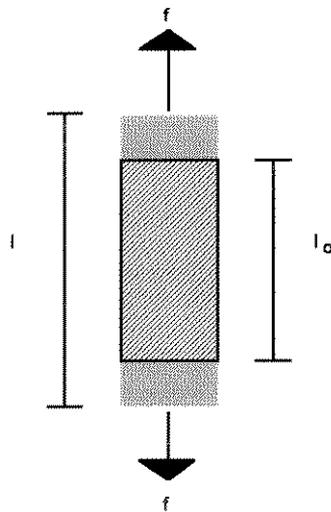


Figura 4. Alongamento de um bastonete cilíndrico

matematicamente expressa como:

$$f = K \cdot \Delta l$$

Onde  $K$  deve ser um parâmetro material que dependa apenas do sistema material. Mas quando o material é submetido a uma força de tração ( $f$ ), a espécie do material irá diferir em comportamento: um cilindro de látex, irá se distender mais que um cilindro de aço, para as mesmas dimensões assumidas. Portanto, pode-se perceber que ( $K$ ) não é parâmetro material, pois depende não apenas da natureza do material mas também das dimensões do objeto.

Para originar uma equação constitutiva e obter para esta um parâmetro material ( $K$ ), deve-se obter uma constante de proporcionalidade independente da geometria do sistema material. Os dois parâmetros determinantes, o tamanho e a forma de um corpo cilíndrico de secção uniforme são respectivamente o comprimento e a área seccional. Experimentos mostram que para um alongamento de razoável magnitude, a força requerida para produção do alongamento é diretamente proporcional a área original seccional ( $A_0$ ), e inversamente proporcional ao comprimento ( $l_0$ ). Ao extrapolar esta verdade para qualquer que seja a forma e secção, obtém-se:

$$f = \frac{E \cdot A_0 \cdot \Delta l}{l}, \text{ onde}$$

$$E = \frac{K \cdot l_0}{\Delta_0}$$

Deste modo  $E$  não dependerá da geometria do sistema material, e representa característica das propriedades do material. Para um material elástico ( $E$ ) é propriedade material e conhecido como módulo de elasticidade longitudinal.

Com o arranjo conveniente a equação acima torna-se:

$$\tau = E \cdot \gamma, \text{ onde}$$

$$\tau = \frac{f}{A_0}$$

Tensão = intensidade da força

$$\gamma = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Deformação = alongamento fracional

$\tau$  e  $\gamma$  são denominados tensão cisalhante e deformação respectivamente através do qual é descrito um particular tipo de deformação (extensão uniaxial), e referida como equação constitutiva porque independe do tamanho e forma do material. Hooke formulou a primeira equação constitutiva para sólidos. Em suas próprias palavras “O poder de uma mola está na mesma proporção com a tensão da mesma“. Hooke fez uso de uma mola estendida para simplificação de um corpo elástico. A proporcionalidade entre a tensão ( $\tau$ ) e a deformação ( $\gamma$ ) expressa pela equação acima é a chamada Lei de Hooke, e o material obedecendo a esta equação reológica de estado, é denominado sólido hookeano. Considerando-se agora o escoamento laminar de um líquido, pode-se colocá-lo entre duas placas paralelas e movimentar, p. ex., a placa superior (Figura 5).

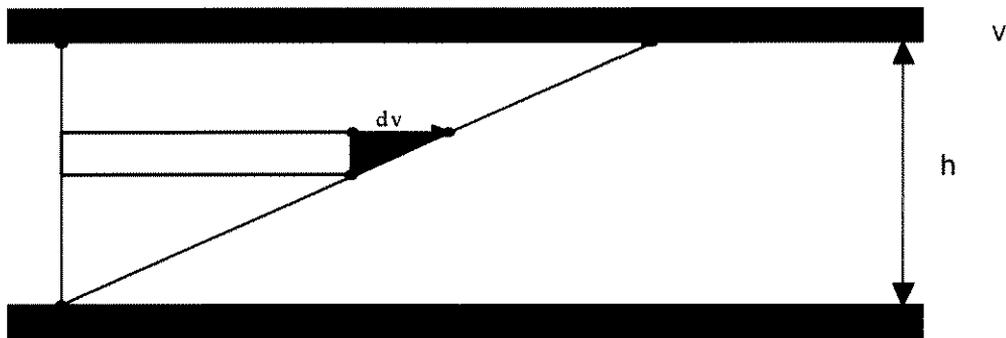


Figura 5. Escoamento cisalhante laminar de um fluido newtoniano.

Se a velocidade da placa móvel não for muito grande, o perfil de velocidade será atingido após o estabelecimento do regime permanente. Sendo  $h$  a separação entre placas e a velocidade de qualquer ponto em  $x$  será dada por:  $v_x = v \cdot (y)$ . (Princípio da Aderência).

Se  $f$  é a força friccional resistindo ao movimento das placas paralelas adjacentes à camada do líquido, sendo a área de contato ( $a$ ), então a força ( $f$ ) resistiva será proporcional a área de contato para que a velocidade decresça na direção ( $y$ ), i.e., o gradiente cisalhante  $\frac{dv_x}{dy}$ . Expressa na forma de uma equação constitutiva:

$$f = \eta \cdot a \cdot \left( \frac{dv_x}{dy} \right)$$

onde a constante de proporcionalidade ( $\eta$ ) é denominada viscosidade. A viscosidade, portanto, é uma propriedade material, independente da geometria. Esta equação constitutiva que expressa a proporcionalidade entre tensão e taxa de deformação foi introduzida por Newton, considerando as propriedades de um fluido hipotético, ocupando todo o espaço entre as placas.

$$\frac{f}{a} = \eta \cdot \left( \frac{dv_x}{dy} \right)$$

Sendo:  $\tau = \frac{f}{a}$                       Tensão Cisalhante (“Shear Stress”)

$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy}$                       Taxa de Deformação (“Shear Rate”).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

A analogia é imediata entre o comportamento elástico e o comportamento viscoso, se compararmos as equações.

$$f = \frac{E \cdot A_0 \cdot l}{l_0} \qquad f = \eta \cdot a \cdot \left( \frac{dv_x}{dy} \right)$$

$$\frac{f}{A_0} = \frac{E \cdot \Delta l}{l_0} \qquad \frac{f}{a} = \eta \cdot \left( \frac{dv_x}{dy} \right)$$

$$\tau = E \cdot \gamma \qquad \tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Portanto  $\tau = E \cdot \gamma$  e  $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$ , são ambas equações constitutivas, nas quais a espécie particular de tensão, está relacionada à deformação, expressa como ( $\gamma$ ) no sistema material elástico ou como taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) num escoamento, ainda que, uma característica da propriedade do sistema material (um módulo elástico ou viscoso) independentemente da forma e do tamanho do material que se pretenda descrever. Tal conceito pode ser estendido ao equacionamento para uma série de tensões, deduzindo uma resposta puramente elástica, puramente viscosa ou um misto de ambas (viscoelástica).

No presente trabalho o interesse é o comportamento viscoelástico linear do gel colágeno, no qual a razão da tensão para a deformação é função somente do tempo e não da magnitude da deformação e onde experimentalmente encontrada se as tensões de deformação são pequenas.

Portanto, cabe a definição e modelos mecânicos suportes para compreensão do comportamento elástico ideal (mola) e o comportamento viscoso ideal (amortecedor) (Haake, 1992; Haag, 1990). O material real possui um comportamento misto, exibem ambos os comportamentos, o elástico e o viscoso, ou seja, comportamento viscoelástico.

O comportamento elástico é representado por uma mola perfeitamente elástica e qualquer força aplicada na mesma será diretamente proporcional a deformação.

$$\tau_e = \mathbf{G} \cdot \gamma, \text{ onde} \quad \tau_e = \text{tensão cisalhante} \quad (1)$$

$\mathbf{G}$  = módulo de rigidez

$\gamma_e$  = deformação

$$F \propto \gamma \text{ (Lei de Hooke)}$$

Quando a mola é puxada de A para B (Figura 6), uma força F é necessária; quando relaxamos a força aplicada a mola que estava no ponto (B) retorna a (A). O tempo gasto a este retorno é denominado tempo de relaxação e, toda energia aplicada é armazenada e devolvida pela mola.

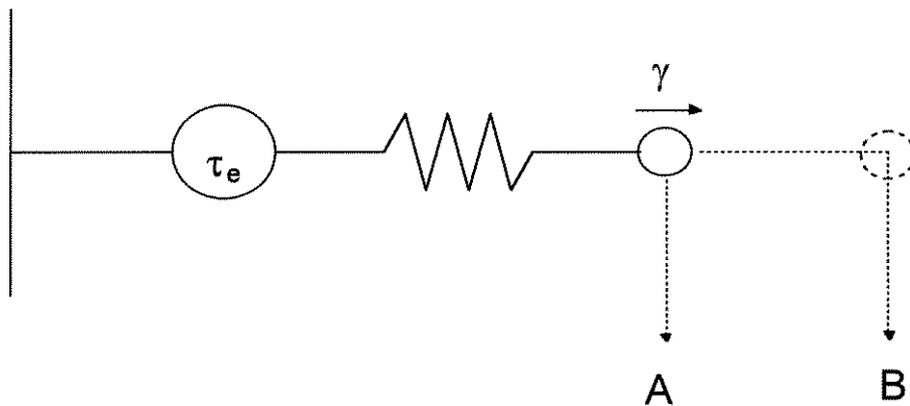


Figura 6. Diagrama simplificado de uma mola.

Apesar da analogia acima (mola tracionada) associar-se à tensão normal, o comportamento elástico de um sólido em cisalhamento é mais próximo do ensaio reológico (Figura 7)

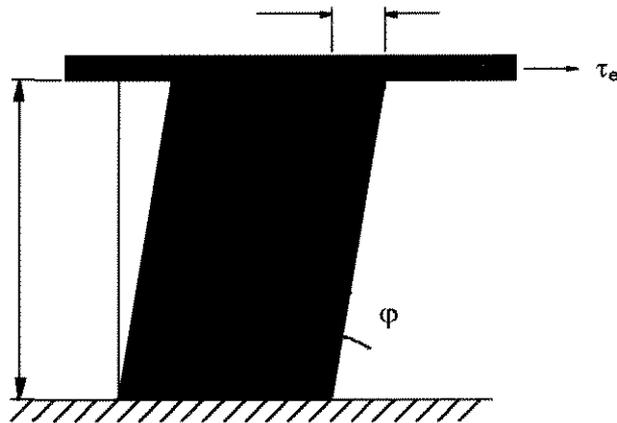


Figura 7. Deformação de um sólido elástico.

$$\tau_e = G \cdot \varphi$$

$\tau_e$  = Tensão cisalhante

$G$  = módulo de rigidez

$\varphi$  = Ângulo de distorção

O comportamento viscoso é representado por um amortecedor perfeitamente dissipativo, contendo um líquido Newtoniano com uma viscosidade fixa( $\eta$ ) e pode ser expresso como:

$$\tau_v = \eta \cdot \dot{\gamma}, \text{ onde} \quad \dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy} \quad (2)$$

$\tau_v$  = tensão cisalhante

$\dot{\gamma}$  = taxa de cisalhamento, definida por

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$$

Quando for puxado o êmbolo da posição A para a posição B (Figura 8) uma força será medida. Esta força é independente da deformação ( $\gamma$ ), mas será proporcional à taxa de deformação.

$$F \propto \dot{\gamma}$$

Quando for libertado o êmbolo em B ele não retornará a A, o que significa que não há armazenamento de energia, mas dissipação térmica.

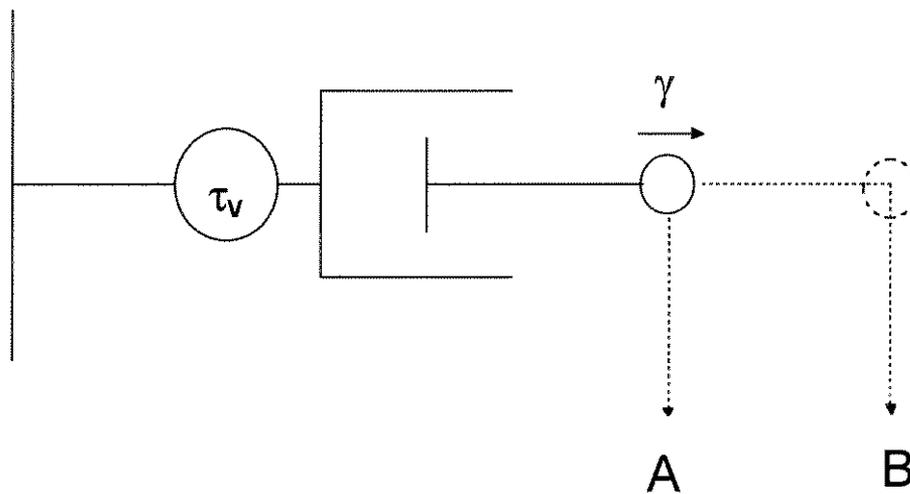


Figura 8. Diagrama simplificado de um amortecedor.

Pode-se resumir os comportamentos da substância elástica ideal em: a energia aplicada é recuperável e a força é proporcional a deformação ( $\gamma$ ). Na substância viscosa ideal: a energia investida é dissipada e a força é proporcional à taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), independentemente do grau de deformação.

Considere-se agora que os elementos ideais sejam submetidos a deformações oscilantes, observe inicialmente a representação da mola - elemento armazenador - (Figura 9).

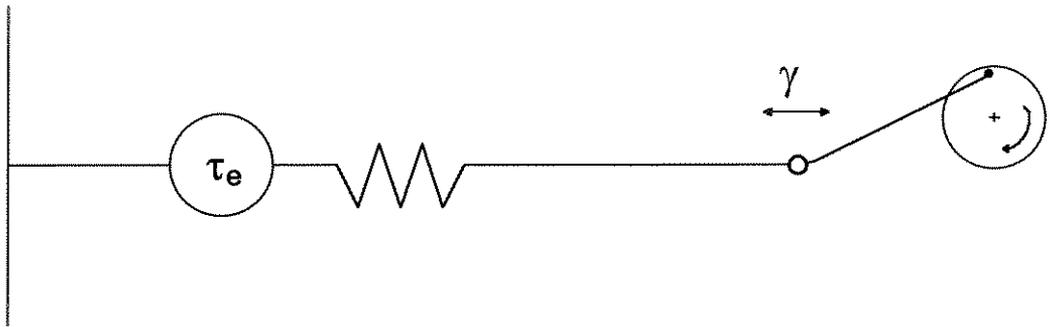


Figura 9. Diagrama simplificado de uma mola oscilando.

A deformação produzida na mola é representada como:

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad \gamma_0 = \text{amplitude máxima de deformação} \quad (3)$$

$\omega$  = velocidade angular (1/s)

$t$  = tempo ( s )

Substituindo (3) em (1), resulta:

$$\tau_e = G \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (4)$$

mostrando que a deformação e a tensão de cisalhamento estão em fase.

Submete-se agora um amortecedor - elemento dissipativo - a uma deformação oscilante (Figura 10).

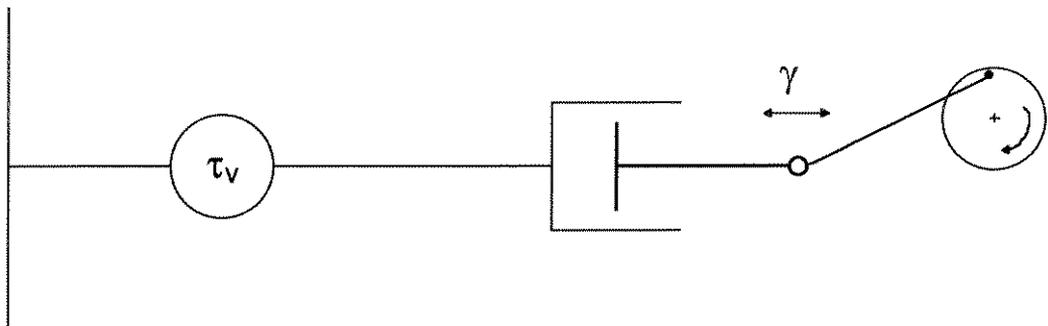


Figura 10. Diagrama simplificado de um amortecedor oscilando.

A deformação ao qual o amortecedor é submetido é idêntica a anterior.

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$$

$\gamma_0 =$  máxima deformação

$\omega =$  velocidade angular

tomando (2):  $\tau_v = \eta \cdot \dot{\gamma}$        $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (5)$$

Substituindo a equação (5) em (2), resulta a tensão cisalhante que atua no amortecedor. A tensão resposta está defasada de  $90^\circ$  em relação a deformação, em função da dissipação total da energia aplicada.

$$\tau_v = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (6)$$

Figura 11 expressa estes resultados graficamente:

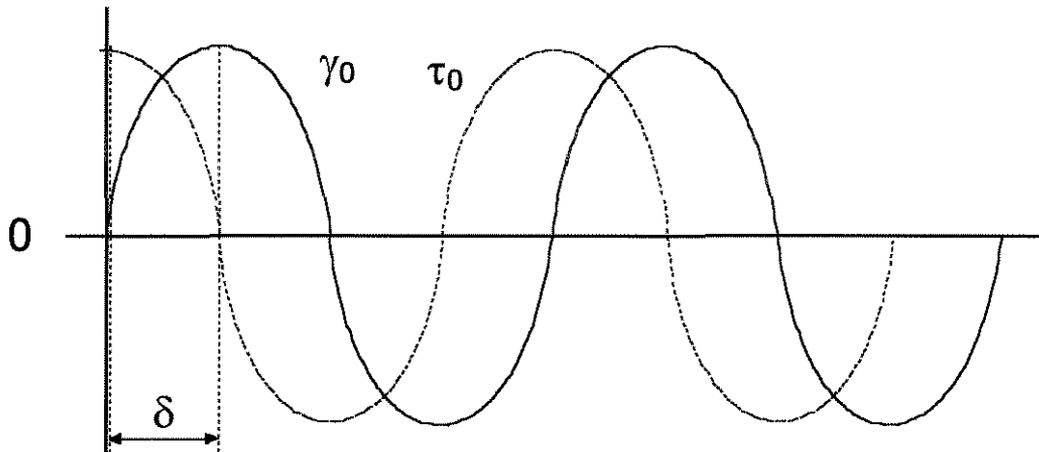


Figura 11. Deformação e tensão em função do tempo para o amortecedor.

Os limites que expressam o comportamento elástico e viscoso são visíveis e pode-se observar que uma defasagem, é um indicador de quanto a substância é viscoelástica sob uma determinada condição experimental.

Se não há defasagem, ou seja, zero grau ( $0^\circ$ ) entre a deformação e a tensão, a substância é descrita como puramente elástica, pode observar que a deformação e a tensão estão em fase (Figura 12).

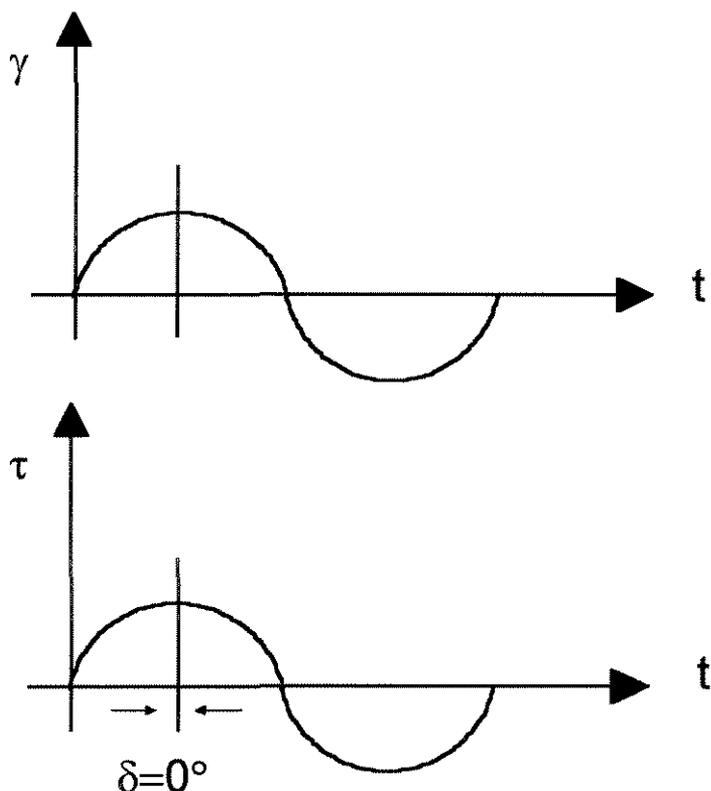


Figura 12. Deformação e tensão em função do tempo para o material elástico

Se a defasagem é noventa graus ( $90^\circ$ ) (Figura 13), a substância é descrita como puramente viscosa. Pode-se inferir via ângulo de defasagem, que uma defasagem de quarenta e cinco graus ( $45^\circ$ ) indicará um comportamento da substância de cinquenta por cento (50%) elástico e cinquenta por cento (50%) viscoso.

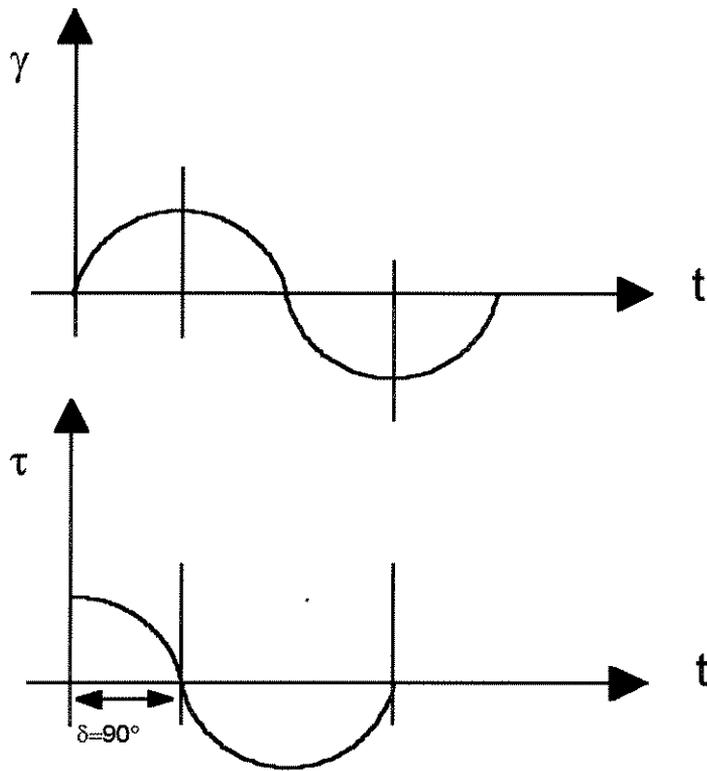


Figura 13. Deformação e tensão em função do tempo para o material viscoso.

Quando da aplicação de uma deformação senoidal ao material, a frequência angular ( $\omega$ ) e/ou a frequência ( $f$ ) e a amplitude de deformação são parâmetros fixados. A tensão cisalhante é medida como uma função do tempo variando senoidalmente com defasagem e amplitude. Matematicamente, os sinais podem estar em fase (elástico) ou fora de fase (viscoso), o que depende do comportamento do material viscoelástico.

$$\tau = \tau_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad \delta = \text{mudança de fase} \quad (7)$$

$\tau_0$  = tensão máxima

A equação expandida trigonometricamente mostra a contribuição da componente elástica (em fase) e viscosa (fora de fase).

$$\tau = \tau_0 \cdot [\cos \delta \cdot \sin(\omega \cdot t) + \sin \delta \cdot \cos(\omega \cdot t)] \quad (8)$$

Define-se agora a magnitude do módulo complexo  $|G^*|$  resultante a partir das duas contribuições (Figura 14):

$$|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (9)$$

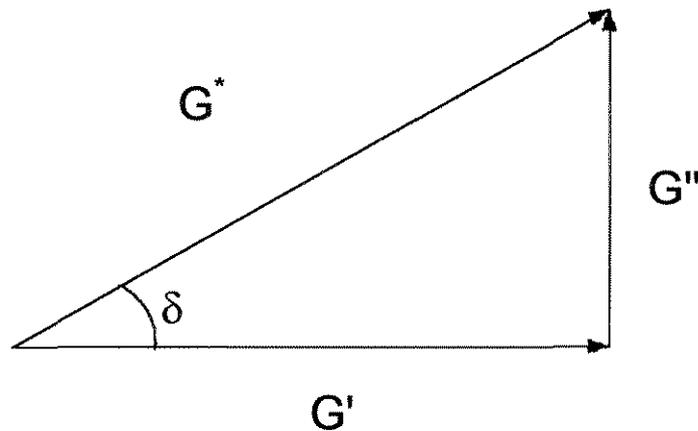


Figura 14. Módulo complexo ( $G^*$ ) a partir dos módulos ( $G'$ ) e ( $G''$ ).

O módulo complexo dá uma medida da resistência do material à deformação. Considerando-se o termo em fase com a deformação, a componente elástica, é definida como o módulo de armazenamento ou, ainda, rigidez ( $G'$ ), que é proporcional à energia estocada a partir do processo deformativo e utilizada para reorganização da microestrutura do material na relaxação.

$$G' = |G^*| \cdot \cos \delta = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta \quad (10)$$

enquanto a componente viscosa ( $G''$ ), módulo de perda, é proporcional à parte da energia do processo deformativo dissipada - normalmente na forma térmica, determinada por:

$$G'' = |G^*| \cdot \sin \delta = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin \delta \quad (11)$$

Se o material é puramente elástico (i.e., mola), a defasagem entre tensão e deformação será zero grau ( $\delta = 0^\circ$ ) e  $G^* \cong G'$ , pois  $G'' = 0$ . Se, ao contrário, o material, for puramente viscoso (i.e., amortecedor) a defasagem entre tensão e deformação será noventa graus ( $\delta = 90^\circ$ ) e  $G^* = G''$ , pois  $G' = 0$ .

Uma alternativa para o módulo complexo, para avaliar a resistência a deformação, é a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) esquematizada na Figura 15.

$$\eta^* = \frac{|G^*|}{\omega} = \frac{\tau_0}{(\gamma_0 \cdot \omega)} \quad (12)$$

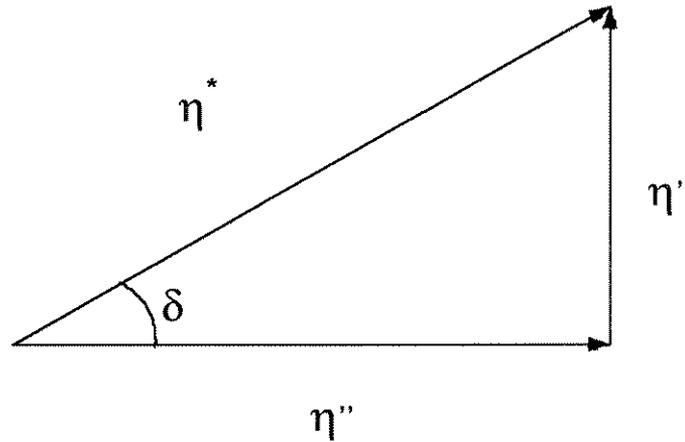


Figura 15. Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) a partir dos módulos ( $\eta'$ ) e ( $\eta''$ ).

que expressa uma medida da magnitude da resistência total ao cisalhamento dinâmico (i.e., a razão entre a máxima tensão cisalhante ( $\tau_0$ ) e a máxima taxa de cisalhamento dinâmico ( $\gamma_0 \cdot \omega$ )). Pode-se separar em duas componentes, uma elástica ( $\eta''$ ), e uma viscosa ( $\eta'$ ), relatando a dependência da frequência, da taxa de cisalhamento ou da deformação, de um processo que pode-se alterar, por exemplo uma gelificação. Equações (13) e (14) expressas abaixo:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} = \frac{\tau_0}{(\gamma_0 \cdot \omega)} \cdot \sin \delta = \eta^* \cdot \sin \delta \quad (13)$$

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} = \frac{\tau_0}{(\gamma_0 \cdot \omega)} \cdot \cos \delta = \eta^* \cdot \cos \delta \quad (14)$$

Pode-se agora reescrever a equação (8), ou seja a tensão em função dos módulos  $G'$  e  $G''$  ou das viscosidades  $\eta'$  e  $\eta''$ .

$$\tau = G' \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + G'' \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (15)$$

$$\tau = \eta'' \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \sin(\omega \cdot t) + \eta' \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (16)$$

O parâmetro viscoelástico denominado por definição de tangente de perda ( $\tan \delta$ ), razão entre a energia dissipada ( $G''$ ) e a energia armazenada ( $G'$ ), que informa a quantidade de energia dissipada por ciclo de deformação, e determina como as propriedades físicas macroscópicas da amostra amortecem as vibrações livres, atenuam as ondas de deformação propagadas e afetam a frequência da resposta ressonante a partir da estrutura da amostra, ou seja, resumidamente informa se o material é mais caracteristicamente elástico ou viscoso.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \frac{\cos \delta}{\sin \delta} \quad (17)$$

## 2.2. COLÁGENO

O colágeno é uma proteína fibrosa abundante na natureza. No homem, totaliza um terço da proteína corpórea, presente nas cartilagens, ligamentos, tendões, pele, ossos, olhos e órgãos internos. Sua composição em glicina, prolina, hidroxiprolina e alanina soma 65% dos aminoácidos totais.

Esta proteína é caracterizada pelo baixo teor de cistina e triptofano. Sua unidade molecular é o tropocolágeno, sendo a unidade protéica mais longa que se conhece (massa molecular de 300 kD) com 1,5 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento, onde três cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha 1(\text{I})$  e uma  $\alpha 1$  em hélice) se entrelaçam formando uma super-hélice (Figura 16).

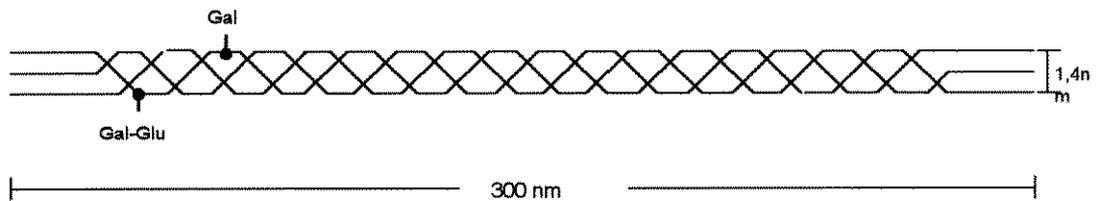


Figura 16. Unidade molecular básica do colágeno tipo I.

Esta super-hélice é estabilizada pela aproximação das hélices por pontes de hidrogênio entre glicina e hidroxiprolina, o que justifica, a necessidade de que todo terceiro aminoácido na sequência deve ser glicina.

Este aminoácido está presente com um conteúdo molar de 33%. O colágeno é caracterizado por sequências de glicina-X-prolina, glicina-X-hidroxiprolina e glicina-prolina-hidroxiprolina. Estas sequências justificam a acomodação dos anéis volumosos dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina na estrutura espacial do colágeno. (Rich e Crick, 1961; Kopple, 1966; Dickerson e Geis, 1969; Wold, 1975; Elias, 1977 e 1987; Mandelkern, 1983; Vidal, 1990

A natureza do resíduo lateral aminoácido, devido a sua composição química, estado eletroquímico e tamanho, tem grande importância nas propriedades físicas e químicas desta proteína (Gustavson, 1956; Wallace, 1990a e b). Os grupos hidrofílicos (polares) e hidrofóbicos (não polares) e a sua distribuição na superfície da proteína são determinantes da solubilidade da proteína. A solubilidade da proteína também é dependente da força iônica, da polaridade do solvente, do pH e da temperatura. A solubilidade, é portanto, um produto das interações entre proteína-proteína, proteína-água e proteína-íons.

Os fatores de influência na rigidez estrutural do colágeno, são os teores de prolina e hidroxiprolina, as pontes de hidrogênio mútuas no entrelaçamento da super-hélice e o número de reticulação (“crosslinking” natural). Este último é particularmente importante, pois é uma ligação de caráter covalente relacionada a características e a idade do material biológico, que ocorrem nas regiões telopeptídicas (regiões terminais não helicoidais do tropocolágeno), interna a tríplice hélice (estrutura terciária) e entre as trílices hélices (estruturas quaternárias) (Yamauchi e Mechanic, 1988).

A unidade básica do colágeno tem uma geometria cilíndrica. Um bastonete cilíndrico semi-flexível segundo Henri et al.(1983), com alto grau de cristalinidade e agrega-se axialmente. Por ser uma proteína estrutural, suas propriedades mecânicas mais notáveis são a rigidez e a resistência à deformação, resultado de sua combinação dos aminoácido prolina e hidroxiprolina e a sua distribuição sequencial na molécula.

### **2.2.1 FIBRILOGÊNESE**

Uma molécula de colágeno apresenta repetições de 68 nm periódicas entre uma e outra unidade.

Esta relação periódica entre comprimento da molécula e o espaçamento levou à Teoria do Empacotamento “Quarter Staggered”. (Wood e Keech, 1960; Petruska e Hodge, 1964; Smith, 1968; Piez e Miller, 1974; Veis, 1982; Kuhn, 1982; Piez, 1982; Trelstad, 1982). Este processo de auto-montagem é o provocativo para que as moléculas do colágeno possam organizar-se em fibras, resultando em um empacotamento extremamente ordenado (Gelman et al., 1979; Brodsky e Elkenberry, 1982; Capaldi e Chapman, 1982; Vidal, 1984).

A unidade básica do colágeno possui em suas extremidades regiões não-helicoidais (telopectídicas), de importância na associação das unidades básicas em microfibras e formação subsequente das fibras nativas, sugere interações específicas, quer “in-vivo” ou “in-vitro” (Veis e Payne, 1988; Na, 1989a,b; Wallace, 1992; Vidal, 1995).

A fibrilogênese do colágeno “in vitro” demonstrou que este é possuidor de memória térmica - habilidade da solução de colágeno relembrar sua história térmica, ou seja a natureza e as interações intermoleculares são resguardadas sob uma condição térmica imposta (Payne e King, 1986).

As subestruturas iniciam-se com a combinação de duas moléculas até a interação de cinco, resultando numa microfibrila com 4 nm, que pode então crescer, agregando-se nas extremidades para formar fibras. Este processo é comum para a maioria das proteínas fibrosas e que ocupam posição equivalente ou quasi-equivalente na montagem molecular (Figura 17).

Uma fibra é um polímero cristalizável, com extrema orientação, e que retém estas características em uma faixa de temperatura (0°C - 40°C). Em biopolímeros protéicos lineares obtidos “in vitro” suas propriedades viscoelásticas dependerão da concentração, do comprimento, do diâmetro, da rigidez, e interações entre filamentos, sendo a agregação lateral fortemente dependente do pH e força iônica do meio (Janmey et al., 1991).

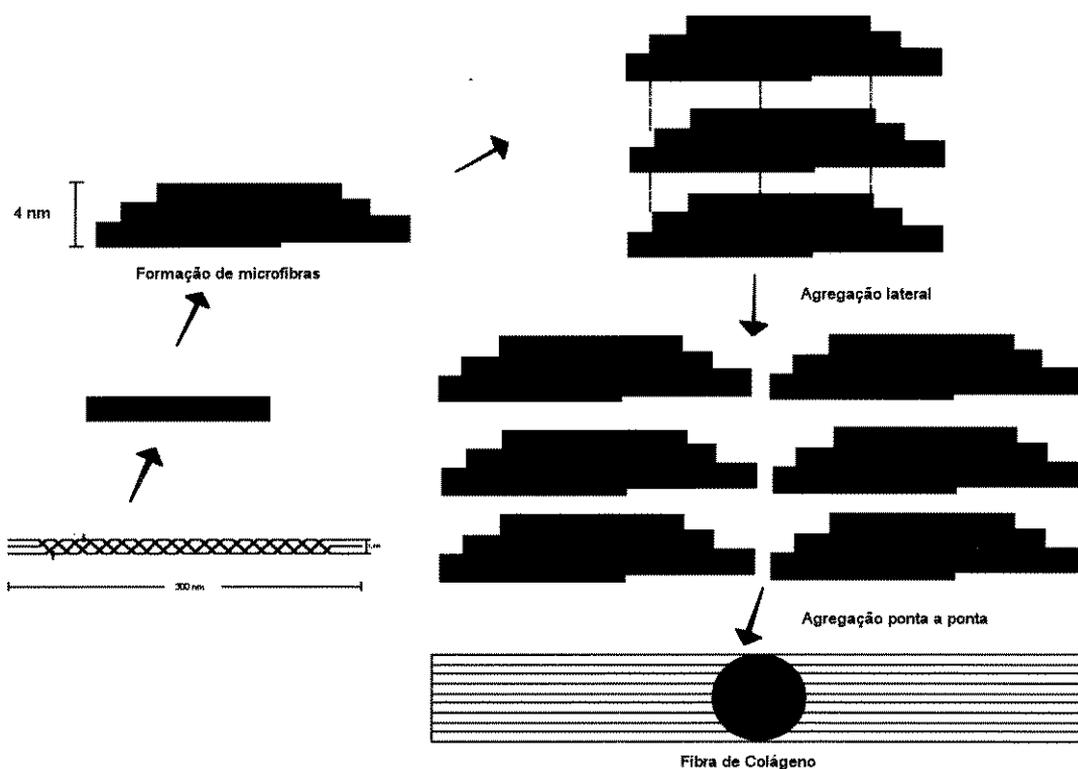


Figura 17. Fibrillogênese do colágeno.

### 2.2.2. DIÂMETRO DAS FIBRAS COLÁGENAS

O diâmetro da fibra colágena, a sua orientação espacial, a natureza e a quantidade de substâncias não colagênicas interfibrilares proteoglicanas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas, etc, acabam ditando as propriedades biomecânicas “in vivo” dos tecidos. Dados provenientes da aplicação de técnicas de microscopia de elétrons e difração de raios-X revelam o empacotamento ordenado, incluindo as microfibras. A interpretação dos dados lançam luz para o entendimento dos tendões úmidos no que se refere a suas propriedades viscoelásticas (dissipação e armazenamento), como também seu alongamento (estiramento) durante o crescimento, havendo fortes evidências de deslizamento e/ou extensão destas unidades na fibra quando estas são submetidas ao esforço mecânico (Light e Bailey, 1982; Vidal, B.C, 1995).

Nas fibras naturais de tendões, pode-se notar uma variação de diâmetros. Nos diâmetros menores, em torno de 15 nm, quase não se nota a periodicidade. No entanto, para grandes diâmetros (400-500 nm), característica de uma fibra madura, esta já possui uma periodicidade de aproximadamente 68 nm, para o ordenamento lateral de uma unidade colágena de 300 nm. Isto ocorre na maturação do tendão através do “crosslinking” ceto-amino, resultado do envelhecimento do animal e que provoca um aumento do diâmetro da fibra (Parry, 1978).

Para o tendão da cauda do rato (RTT), as fibras no nascimento são uniformes, possuindo diâmetros de 30 nm, sendo que as microfibras que as compõe possuem diâmetros em torno de 4 nm, fracamente empacotadas. Aos quinze dias, porém, a maioria das fibras possuem um crescimento significativo e seus diâmetros passam a oscilar em torno de 100 nm e seus componentes microfibrilares já são mais empacotados. Com 45 dias estas já estão por volta de 250 nm e o processo continua atingindo um tamanho máximo de diâmetro de 450 nm, no interior do feixe fibroso, em 150 dias. Pode-se notar que esta variação não é uniforme ao longo do diâmetro do tendão. Na composição do tendão as fibras com os maiores diâmetros estão no centro do feixe fibroso e as menores na periferia do tendão (Torps et al., 1978).

A variação dos diâmetros das fibras e a sua estrutura determinam a biomecânica dos tendões “in vivo” e “in vitro” e as propriedades viscoelásticas podem estar relacionadas a função biomecânica de alguns tipos de tecidos (Scott et al., 1981; Vilarta e Vidal, 1989; Vidal e Carvalho, 1990; Carvalho e Vidal, 1994; Carvalho, 1995). O diâmetro das fibras consideradas acima desempenham um papel predominante na descrição das propriedades de regulação biomecânica dos tecidos conectivos.

A Figura 18 mostra que a um grande diâmetro da fibra está associado ao máximo de resistência a tração (ao estiramento) (I). As fibras de diâmetros menores (II) proporcionam um máximo de elasticidade. A combinação de (I) e (II) leva ao caso (III), no qual pode-se observar uma combinação das duas características, resistência a tração e ao cisalhamento.

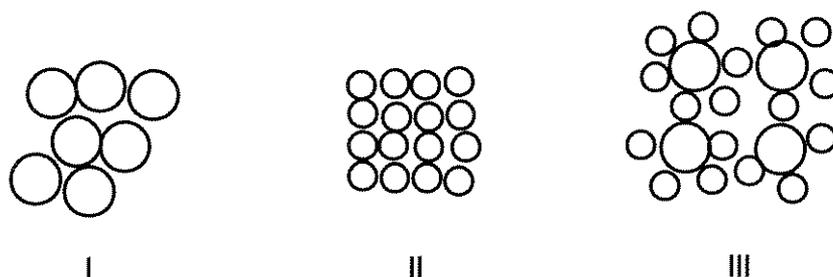


Figura 18. Empacotamento e diâmetro das fibras de colágeno.

### 2.2.3. ESTABILIDADE TÉRMICA DO COLÁGENO

A estabilidade térmica do colágeno, ou da super-hélice, depende de interações cooperativas. Quando aumenta-se a temperatura, pode-se verificar grandes mudanças de propriedades físicas.

A primeira reside na diminuição da resistência ao escoamento, ou seja, abruptamente diminui o atrito molecular, indicando que as unidades protéicas perderam sua forma característica de cilindro.

O poder rotatório - medida do desvio angular que uma substância opticamente ativa imprime ao plano de vibração de um feixe de radiação plano polarizado - a diversas temperaturas é alterado em função da destruição da estrutura helicoidal nos filamentos, em solução. Deste modo pode-se observar que as forças cooperativas que estabilizavam a conformação super-hélice foram vencidas pelo movimento térmico (agitação molecular), gerando uma estrutura filamentosa desorganizada e aleatória; denominada gelatina. Isto ocorre de modo abrupto, dentro de uma faixa bem estreita de temperatura, revelando que a super-hélice é estabilizada por interações cooperativas relativamente fracas e em grande número e, dependente das interações laterais dos aminoácidos.

A literatura define a destruição de cinquenta por cento das estruturas super-hélices como a temperatura característica de fusão (tf). Toma-se a temperatura de fusão como um critério de estabilidade em solução, ou seja, a manutenção de sua conformação helicoidal. Para fibras de colágeno, o índice comparável é a temperatura de retração (tr), em que há um encurtamento pronunciado da fibra. Como não há um único tipo de colágeno, atualmente 19 tipos estão identificados, espera-se ter diferentes pontos. O conteúdo de prolina e hidroxiprolina do colágeno é que lhe confere capacidade de resistência térmica, quer em solução, quer em fibra (Stryer, 1992). Relaciona-se um maior conteúdo de iminoácido (composto orgânico nitrogenado com anel heterocíclico) com aumento da resistência térmica. O tendão da cauda do rato (RTT) contém um total de 238 aminoácidos prolina e hidroxiprolina por mil, o qual informa, a respeito da estabilidade térmica do material, devendo as tf e tr situar-se respectivamente em 39 °C e 65 °C.

O colágeno estruturalmente destruído em água transforma-se em gelatina, uma proteína solúvel, que arrefecida não se regenera em colágeno. A massa molecular desta proteína solúvel é um terço do colágeno em solução (Morrison e Boid, 1985). O tratamento térmico separa os cabos da super-hélice, cindindo as ligações por pontes de hidrogênio intercatenares e substituindo-as por moléculas de água, impedindo a renaturação à conformação original. O colágeno reconstituído, por conter uma população heterogênea de fibras, inclui-se moléculas num estado não fibrilar, mostra múltiplas transições na temperatura de desnaturação, em função de diferença de empacotamento, concentração de colágeno, tamanho da fibra e nível de “crosslinking”. As temperaturas são sempre maiores quando comparadas ao colágeno em solução (Wallace et al., 1986).

#### **2.2.4. GÉIS DE COLÁGENO**

A precipitação de microfibras a partir de soluções colagênicas levam a observar que estas possuem uma natural capacidade de auto-organização, onde , agregadas e retendo água, transformam-se em géis de colágeno. A arquitetura destes agregados podem ser observadas em vários níveis como função da temperatura e outros fatores de influência, onde conformações helicóides, planares ou não, são obtidas a partir da auto-organização destas microfibras. Várias arquiteturas helicóides (“twist”) microfibrilares estão correlacionadas à estrutura de cristais líquidos, e estas obtidas “in vitro” são muito semelhantes aos padrões que descrevem numerosas matrizes de colágeno “in vivo” (Bouligand et al., 1985).

O comportamento das partículas coloidais em meio aquoso não é dissociado do conceito de uma carga líquida; citando-se como exemplo o caso de um polieletrólito (Scopes, 1987). Esta observação sobre carga líquida reside no fato de que a estabilidade destas dispersões coloidais são extremamente sensíveis à adição de eletrólitos, o que evidencia a existência de cargas nas partículas.

A superfície da proteína se torna carregada por ionização dos resíduos aminoácidos das  $\alpha$ -hélices, conduzida pela ionização de grupos ácidos (carboxilas), os quais geram cargas negativas (-) e grupos básicos (aminos e outros) que geram cargas positivas (+). A extensão superficial e a magnitude das cargas dependerão do pKa (pH onde 50% dos grupos presentes estão ionizados) destes grupos superficiais e do pH a que estes estão submetidos. A coexistência destas cargas superficiais poderá ser reduzida a zero no pI, pela supressão da ionização por decréscimo de pH, com referência aos grupos ácidos e aumento de pH, referindo-se aos grupos básicos. Deste modo, pode-se perceber uma via de mão dupla, no tocante a variação das cargas, quando ocorre variação do pH sobre o sistema colágeno.

As alterações de cargas superficiais dos resíduos aminoácidos, no meio aquoso, obtido por uma variação de pH e força iônica, conduzem a uma variação na solubilidade do colágeno ao longo do processo e governa a formação do gel. A formação do gel está fortemente ligada aos resíduos laterais de aminoácidos básicos (lisina, arginina, histidina e, principalmente, a arginina) com seu grupo guanidil (Grabar e Morel, 1950), pela capacidade de hidratação. Esta hidratação dá-se em níveis. A primeira água adsorvida, a estrutural, é incorporada dentro da super-hélice. A segunda água é de contorno, associada ao lado polar da cadeia e localizada nas regiões inter-helicoidais das fibras colágenas. Esta apesar de não possuir uma interação tão intensa quanto a água estrutural, afeta a rigidez em maior grau, plastificando os movimentos do lado da cadeia, alterando o deslizamento destas unidades. Finalmente, a água livre no gel interfibrilar. O termo gelificar implica na formação de uma massa insolúvel fibrosa, altamente hidratada; onde interações específicas proteína-proteína (colágeno-colágeno) são requeridas e necessárias; e conduz à formação de um reticulado tridimensional (“network”) (Hermansson, 1978). As forças intermoleculares que atuam no gel, traduzem o campo de tensão (Holland, 1991).

## 2.2.5. REOLOGIA DO COLÁGENO

A verificação das propriedades viscoelásticas da gelatina, estrutura superhélice (colágeno) desnaturada para moléculas em forma globular (gelatina), datam da década de 50. A partir da década de 60, a possibilidade da extração enzimática do colágeno em solução de ácido clorídrico (pH=2), acabou por conduzir à quantificação das propriedades viscoelásticas das soluções colágenas. Medidas da viscosidade dinâmica e módulo de rigidez, como também a viscosidade em escoamento permanente, informam fatos como associação das moléculas cilíndricas longas, com formação de estruturas “network” em solução dependendo da concentração. Este fato mostra que existe uma dependência da rigidez com a concentração ( $G \propto C^m$ ), com  $m$  variando de 3,3 em solução colágena diluída numa faixa de frequência de 1 a  $10 \text{ s}^{-1}$  e em géis com a contribuição de “crosslinkings” trifuncionais na estrutura “network” para a elasticidade  $m$  iguala-se a 3,67. A viscosidade dinâmica é variável e dependente da frequência ( $\eta' \propto C^n$ ), onde  $n$  é função da frequência variando de 3,2 ( $0,5 \text{ s}^{-1}$ ) a 2,2 ( $20 \text{ s}^{-1}$ ). O comportamento reológico não pode ser explicado por teoria não newtoniana (simplesmente por viscosidade), mesmo em soluções colágenas diluídas, pois há manifestação de fortes atrações intermoleculares e formação de estruturas géis “network” (Fukada e Date, 1963).

A partir da década de 80 trabalhou-se com a estrutura do colágeno ou estrutura similar (vírus mosaico do tabaco) em solução concentrada. O comportamento da macromolécula cilíndrica em solução foi avaliado e, acabou por equacionar, a partir de experimentos, que o tempo de relaxação rotacional é muito dependente da massa molecular e da concentração. Relatou-se, ainda, a forte dependência da viscosidade cinemática pela massa molecular e sugeriu que a dificuldade de preparação dos cristais líquidos, a partir de peptídeos, pode ser predita acima de uma concentração crítica pela equação.

O sistema perde fluidez acima desta concentração crítica, e exibe transição vítrea ( Doi, 1975) - passagem de um estado vítreo (amorfo) para um estado elastomérico, cadeias amorfas se afastam e adquirem sua mobilidade, tornando-se mais flexíveis.

As propriedades reológicas de géis aquosos de ovalbumina termicamente desnaturada, com “crosslinking” e pressupondo estruturas filamentosas, mostraram bom ajuste para que equação do tipo Maxwell possa descrever o seu comportamento reológico. As propriedades reológicas do sistema depende não somente das forças intermoleculares, mas também das propriedades geométricas da fase estruturada. O alto valor de  $G'$  só pode ser explicado a partir da elevada rigidez das cadeias coloidais e que um fenômeno reológico, em sistemas “crosslinking”, como uma sobretensão (“overshoot”) de um escoamento permanente, só pode ser explicado por alguma não homogeneidade da microestrutura da amostra (Kamphuis e Jongschaap, 1985).

Uma revisão do comportamento de suspensões concentradas, em diversas geometrias de fluxo, mostra que um número reduzido de experimentos bastou para a predição de modelos e a determinação da viscosidade das suspensões macroscópicas. A importância da análise da viscosidade do líquido da suspensão foi relatada para a determinação da influência de efeitos interparticulares e resumizou que suspensões concentradas de fibras rígidas exibem propriedades reológicas comparadas àquelas de fluídos poliméricos cristalinos, para qual o modelo de cilindros rígidos foi usado na derivação das propriedades de fluxo. Na predição, a partir de baixas concentrações, a viscosidade deve aumentar rapidamente com o aumento da concentração das partículas, porque as interações entre partículas aumentam rapidamente, formando-se aglomerados mais compactos. Entretanto, a um nível crítico de concentração, os empacotamentos randômicos cessam para possibilitar e promover aumento na concentração de partículas implicando progressivamente estruturas anisotrópicas mais ordenadas (líquido cristalino) de cilindros rígidos, que podem deslizar um sobre o outro.

Em resumo, pode-se dizer que acima de um nível crítico de concentração de partículas, implica em decréscimo progressivo da viscosidade do sistema (pois um aumento de partículas no meio, deveria aumentar o atrito interno quando as partículas escoarem), pelo menos até um elevado nível de concentração (fenômenos e orientação interna). Estes fenômenos não são observados em sistemas de suspensão macroscópica. Fluxos cisalhantes de suspensão de fibras longas exibiram altos níveis de tensão, nos quais o alinhamento das fibras ocorreram, durante deformações transientes. (Metzner, 1985).

A hipótese de Bueche-Ferry obedece a dinâmica de Rouse para polímeros líquidos (polímeros fundidos, soluções poliméricas concentradas, géis e borrachas), em curto tempo de escala, quer em regime de viscoelasticidade linear ou não. O ponto essencial da hipótese de Ferry-Bueche relata que interações em emaranhados ou qualquer tipo de interação intermolecular são irrelevantes num curto tempo de escala. A relação linear entre a tensão e a orientação da ligação química, é um resultado que destaca e, que pode ser acompanhada por técnicas espectroscópicas, ópticas, NMR e difração de raio-x. Estes modos operacionais aplicados na reologia, no campo de sistemas materiais não homogêneos, abrem novos horizontes de investigação. (Doi, 1987).

Ainda nesta década de 80, o uso de colágeno fibrilar para aplicações biomédicas foi intensificado, e ocorreu a necessidade da caracterização reológica do material para aplicações específicas. Um trabalho de reologia neste sentido foi realizado por Wallace et al. (1989), no qual submetem-se várias suspensões (fibrilar natural de colágeno (FC), suspensão fibrilar colágena “cross-linked” por solução de glutaraldeído (XLC) e uma suspensão fibrilar colágena “cross-linked” por glutaraldeído com ácido hialurônico (HLA-XLC)) a uma grande variedade de regimes de fluxo. As suspensões XLC foram as que mais resistiram à deformação e escoamento em comparação às suspensões FC. Submetidas a uma placa porosa as suspensões XLC separaram-se em duas fases distintas, uma compacta fibrosa com alto teor de sólidos e a outra contendo baixo teor em colágeno.

A adição de HLA ao XLC formou uma mistura mais facilmente deformável sob tensão e facilitou a passagem por placa porosa. Portanto, para a aplicação específica a que se destina como correção de defeitos de derme. A suspensão HLA-XLC mostrou-se vantajosa sobre XLC nominalmente por mais baixo poder antigênico e grande resistência a forças compressivas “in situ”, facilitou a injeção e não causou inchaço na região da aplicação. Oportunamente, o trabalho citou que há fortes evidências que microfibras colágenas contribuíram às propriedades viscosas, em função de sua alta densidade no meio, impedindo a movimentação de fibras maiores e reduzindo o número de contato fibra-fibra e o aumento do emaranhado fibrilar. Possivelmente, por formação de uma camada estabilizante ao redor das fibras maiores.

No final da década de 80 e início da década de 90 ocorreu a avaliação das forças hidrofóbicas e tentativa para o seu completo entendimento em dispersão colágena fibrilar que servem à dispersão do comportamento reológico através da mudança de rigidez destas mesmas fibras. As interações ocorrem nas fibras, quando o lado aminoácido apolar das cadeias, nas adjacências das moléculas, podem justapor-se muito proximamente, para efetuar uma interação hidrofóbica. O aumento destas interações com uma faixa de temperatura foi mostrado Rosenblatt et al. (1993). A mudança de rigidez também apresenta mudança na fração volumétrica do solvente nas fibras.(teoria de Flory-Mathenson estendida).

Recentemente, reportou-se os efeitos da ramsana (polissacarídeo linear), nas propriedades viscométricas de colágeno reconstituído, para a preparação de géis injetáveis em pH neutro, para correções plásticas e suporte de liberação controlada de drogas. Mostrou-se que apesar do aumento da viscosidade e do comportamento não-newtoniano, houve redução na força de extrusão para estas suspensões. A hidrólise foi inibida, e controlada a degradação do tecido colágeno. As diferenças de comportamento foram explicadas pelo papel da ramsana na orientação e/ou expansão da estrutura fibrilar (Goes e Goissis, 1995).

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PREPARAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO

Para preparação e obtenção do gel nativo de colágeno, excetuando-se a extração dos feixes fibrosos, todos os outros procedimentos foram conduzidos, sob refrigeração entre 4°C e 8°C, visando manter a integridade do material extraído, minimizar o crescimento bacteriano, aumentar a solubilidade do colágeno, assegurar sua conformação natural, regular sua organização em fibras (fibrilogênese) e retardar a reticulação (“crosslinking”) intermolecular.

Animais machos jovens, tipo Whistars, com 90 dias de confinamento ( $299,26 \pm 26,87\text{g}$ ) e alimentados com ração padrão, foram utilizados para obtenção dos tendões de cauda (Rhodes e Miller, 1978). O órgão foi escolhido pelo alto teor e pureza de colágeno do tipo I, além de animais jovens possuírem baixo teor de “crosslinking” natural (maior capacidade de solubilização) e a escolha desta fonte foi um cuidado preliminar para a obtenção de quantidade e tipo químico especificado (Butzow e Eichhorn, 1968). Após o sacrifício dos animais, as caudas foram seccionadas, envolvidas em papel alumínio e estocadas a -18°C. Para a preparação dos géis foram descongeladas e os feixes de colágeno extraídos por estilete de aço e limpos por raspagem dos tecidos aderentes, lavados alternadamente em água destilada e uma fraca solução de peróxido de hidrogênio ( $10^{-2}$  volumes) por duas vezes, e por fim uma lavagem exaustiva com água destilada.

As fibras, em seguida, foram colocadas em solução acética 0,5M (pH 2,5) por um período de 12 horas, para induzir o entumescimento e otimizar a extração.

O solvente ácido possui capacidade de solubilização dos tecidos com baixo teor de “crosslinking” natural, como também de fibras com predominância de “crosslinking” aldo-amino, limitando deste modo, a extração de colágeno de porções, como pele, e alguns tendões de organismos jovens, desde que a forma mais estável de “crosslinking” o ceto-amino prevalece nos outros tecidos e acentua-se com a idade. Com este primeiro procedimento conseguimos a solubilização dos feixes de fibras colágenas em unidades monoméricas.

As moléculas nativas solubilizadas foram precipitadas (Englards e Sheifter, 1990) por adição 1:1 de solução de cloreto de sódio 1,7 M (Rhodes e Miller, 1978). O teor de colágeno encontrado foi de aproximadamente 3,5 mg/ml e o precipitado visível imediatamente à adição da solução salina, formando agregados gelatinosos, observa-se uma lentidão da reconstituição fibrilar, devido a hidratação das fibras, por este motivo, o precipitado é deixado por 12 horas para uma melhor orientação e reconstituição fibrilar, o que favorecerá a ordenação e homogeneização do material obtido.

Bouligand et al. (1985), observaram que o tempo de formação do precipitado foi dependente da concentração de colágeno no solvente acético, e que as microfibras colagênicas organizaram-se em géis com estruturas de maior ordenamento em sistemas não agitados.

Após a precipitação, o material foi filtrado em mantas duplas de tecido de polietileno e o agregado assim obtido, não foi totalmente transparente e estável em relação exsudação - perda espontânea de água pelo material. Devido a necessidade de homogeneização e padronização, o volume foi drenado, por filtração, a 85% do volume original.

A agitação que foi introduzida, acentua durante a drenagem, causou o aumento do diâmetro dos feixes fibrosos, além de aumentar a opalescência do precipitado.

O material foi envasado em sacos finos de diálise e purificado do ácido extrator e do sal precipitante, podendo deste modo experimentar, ao longo de uma variação de pH e força iônica, uma capacidade variável de retenção de água e distintos estados organizacionais. O aumento de diâmetro do feixe fibrilar e da opacidade foi, possivelmente, uma consequência da dissociação e exposição, via agitação mecânica, de grupos hidrofóbicos da molécula protéica, responsáveis em parte pela atração proteína-proteína.

### **3.2.PROCEDIMENTOS DA DIÁLISE**

O tubo de diálise comercial normalmente vem embebido em plastificante (glicerina), contendo traços de componentes sulfurosos e metais pesados. Alguns destes contaminantes afetam drasticamente a proteína, devendo ser removidos. O fabricante recomenda respectivamente embebição em água destilada, em solução acética 0.01 N e em solução diluída de EDTA com suficiente tempo de contato em cada solução. Os pesquisadores, na prática, empregam tratamentos mais enérgicos para isenção dos impurificantes. No presente caso foi utilizado embebimento e fervura por uma hora e lavagem exaustiva com água destilada. Os tubos de diálise foram estocados, após arrefecimento, em água destilada sob refrigeração com troca periódica do meio.

Ogston (1960) trabalhou com diálise e mostrou que uma agitação no difusato, produziu aumento na taxa de escoamento dos componentes de baixa massa molecular através da membrana e se acentuou, ainda mais, quando além do difusato o meio dialisante foi agitado. O trabalho relatou, que sob ótimas condições, a taxa de diálise foi dobrada em relação a ausência de agitação. Na ausência agitação a viscosidade do meio governou a taxa de diálise. Para produção de géis, sob condições de auto-agregação fibrilar, foi escolhido um processo de diálise estacionária, a fim de evitar dano a estrutura do gel em formação.

Para estabelecimento do tempo médio de exaustão do meio dialisante, visando a padronização e controle da diálise, ensaios preliminares foram realizados em recipientes de 3.000 mililitros com um volume total de 70 mililitros de suspensão colágena padronizado por drenagem a 85% do volume inicial, e distribuídos em 14 sacos de diálise, de igual volume, e postos a dialisar. Inicialmente trocou-se o meio dialisante a cada 12 horas. Observou-se que o meio exauriu sua capacidade de exaustão em torno de 2 horas (Figura 19). A partir desta constatação, estipulou-se trocas periódicas de meio dialisante a cada 2 horas para a obtenção dos diversos géis.

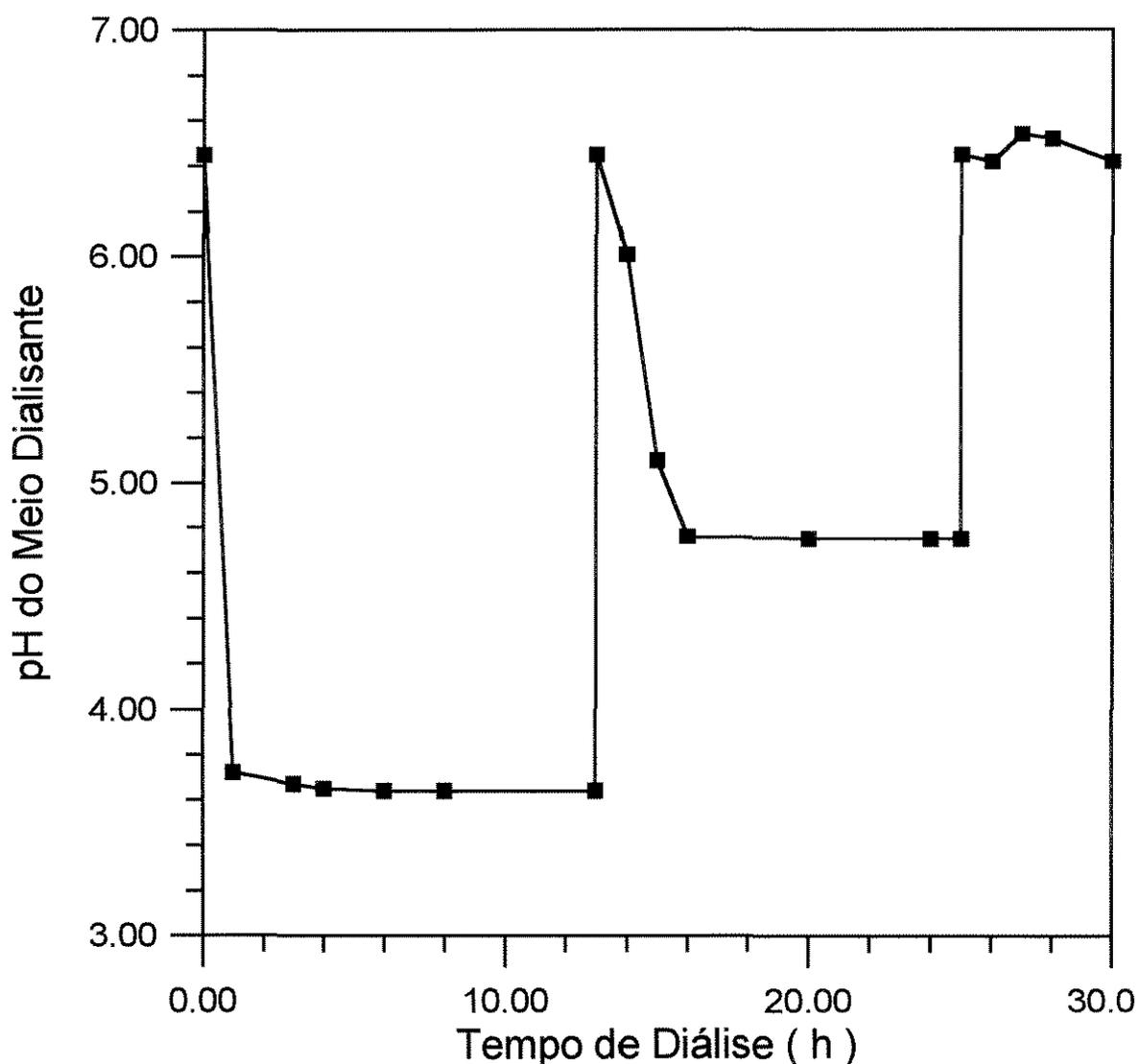


Figura 19. Monitoramento preliminar do meio dialisante.

### 3.3. AMOSTRAGEM

As amostras foram tomadas após envase e diálise do precipitado fibroso em sacos de diálise de acetato de celulose (2,5mm x 5,0 mm) com volumes de 5 mililitros, preenchidos com uma seringa graduada, e compactados por agitação.

Colocados a dialisar contra água destilada (pH 6,8) em frasco de vidro de 3.000 mililitros, com troca do meio dialisante de duas em duas horas, retirando, em média dois sacos de diálise, por um período contínuo de 18 horas a temperatura constante. O gel foi retirado e armazenado por 12 horas para os ensaios de reologia e a dosagem do teor de colágeno em separado. Na Figura 20 pode-se observar o comportamento do meio dialisante e do gel durante a diálise.

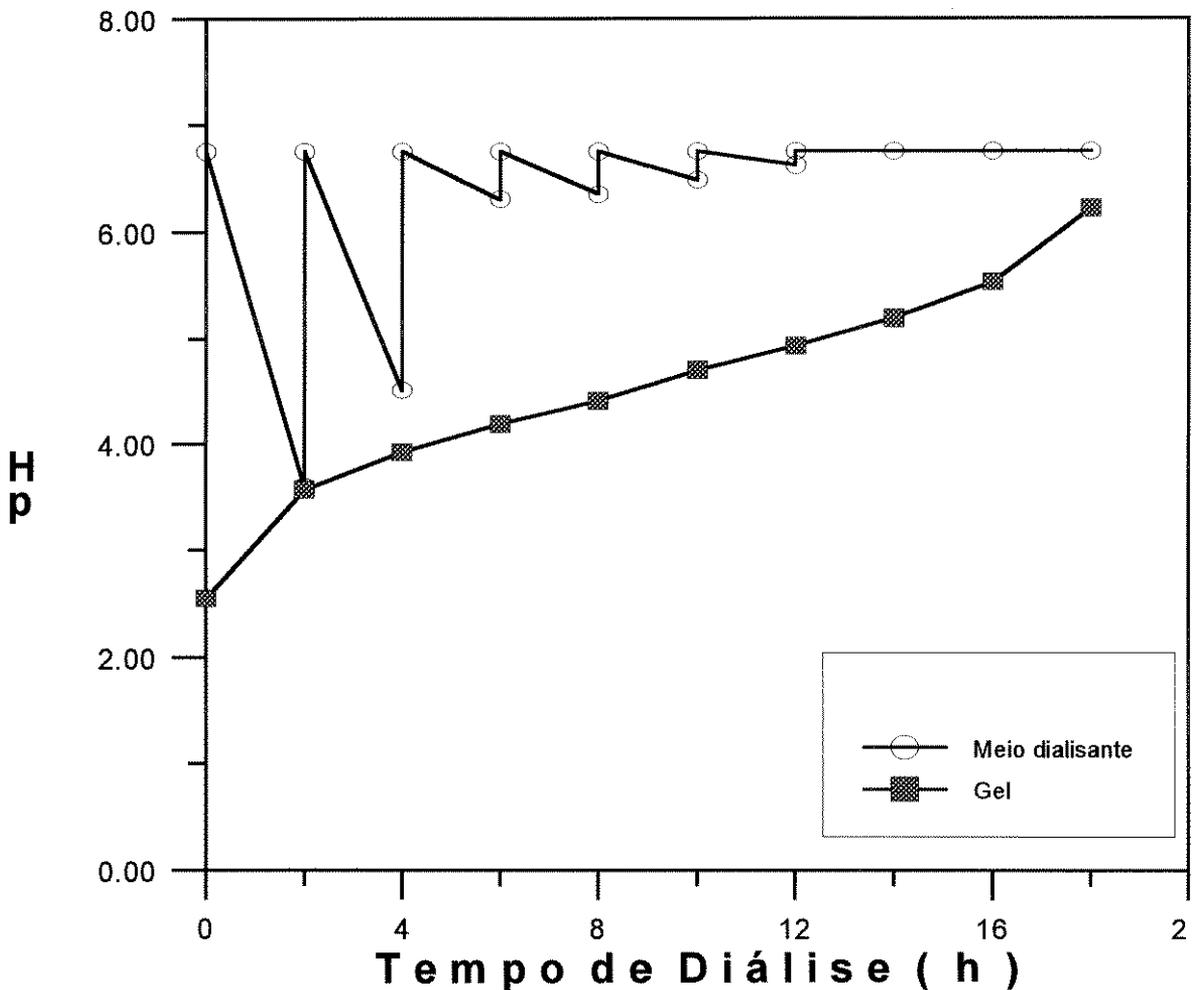


Figura 20. Monitoramento do meio dialisante e do gel.

### 3.4. DOSAGEM DO COLÁGENO

Os procedimentos de dosagem espectrofotométricas podem ser empregados para o colágeno em solução ou hidrolisados (Vidal, 1986). A base metodológica consiste em observar que o colágeno é uma proteína com baixo teor em triptofano e tirosina, cuja localização, em quantidades mínimas, se encontram nas extremidades não helicoidais (telopeptídicas). Como consequência deste fato, o colágeno não apresenta absorvância em  $\lambda=280$  nm, mas apresentando hipercromatismo a  $\lambda=227$  nm (aumento de absorvância por desnaturação da amostra). Este fato torna-se importante para a detecção do grau de desnaturação do colágeno, ou seja, a mesma amostra possui maior absorvância desnaturada (gelatina) do que quando comparada “in natura”(colágeno) - devido à maior exposição das ligações peptídicas. Na Figura 21 pode-se observar. A simples dosagem de hidroxiprolina, tomada como base metodológica para dosagem do colágeno, não informa deste fato.

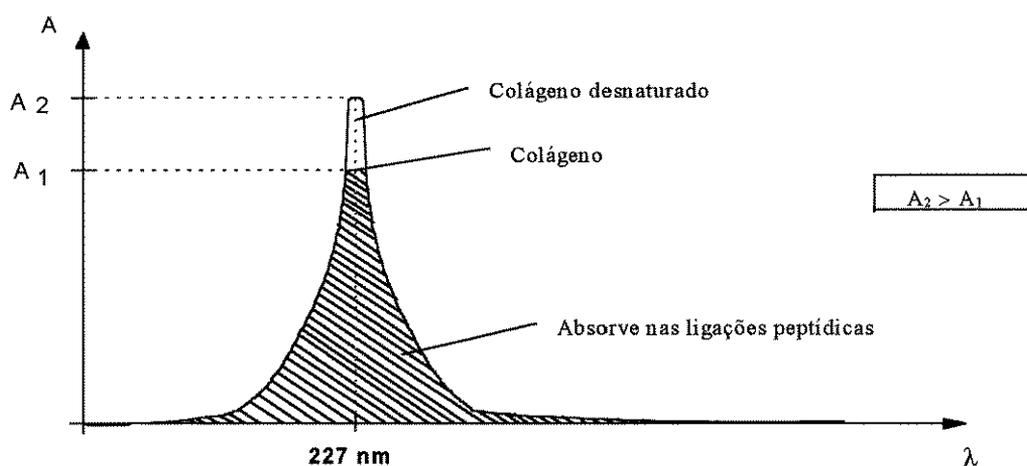


Figura 21. Espectro de absorção na faixa ultravioleta do colágeno.

Para a determinação quantitativa de colágeno em gel, foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi U2000, empregando como padrão uma solução de gelatina de 1 mg/ml (Becton, Dickinson & Cia). Para tanto foi tomado 100 mg de gelatina padrão e a solubilizada com 50 ml de ácido acético a 3% volume por volume, aquecendo-se a solução a 40°C em estufa para solubilização da gelatina e, após arrefecimento, elevou-se a 100 ml com solução acética a 3% volume por volume.

A quantificação foi feita por espectrofotômetro a  $\lambda=235$  nm, obtendo-se uma absorvância de  $A_{235\text{nm}}^{1\text{cm}} = 0,735$  a partir do qual, foram desnaturados os diversos géis colágenos, a 60°C por 2 horas, arrefecidos a temperatura ambiente e submetidos a quantificação a 235 nm, calculando-se o teor de colágeno em gelatina, a partir da absorvância de cada amostra do gel desnaturado.

### 3.5. RETICULAÇÃO (“CROSSLINKING”)

Os géis obtidos, a partir das fibras reconstituídas “in vitro”, padronizadas e dialisadas, foram colocados na razão de 10:1 ( 1 mililitro de gel para 0,1 mililitro de solução a 0,25% em volume de glutaraldeído) em contato e mantido o sistema, sob refrigeração, para difusão e reticulação (“crosslinking”) (Eillet e Gull, 1972; (Stenzel et al., 1975; Cheung e Nimmi, 1982; Ninmi et al., 1988), obtendo-se, desta forma, “crosslinking” intermoleculares do tipo aldo-amino.

Muitos estudos com a utilização deste fixante, informam que a fixação é rápida na superfície da fibra colagênica, seguida de polimerização do monômero glutaraldeído e, acentuando-se com o aumento da concentração do fixante. A utilização de altas concentrações de glutaraldeído interessam quando há fixação de tecido colagênico.

Os trabalhos mais recentes (Simionescu et al., 1991; Ruijgrok et al., 1994; Yoshioka et al., 1995) enfatizam a importância do tempo de contato para a fixação e a concentração de glutaraldeído para a determinação da natureza do reticulado intermolecular produzido. Como citado anteriormente, a intensa polimerização superficial das fibras colágenas devido a altas concentrações de glutaraldeído, resultando uma rápida polimerização no sítio, que acaba por prejudicar a difusão das moléculas do fixante glutaraldeído para os interstícios das fibras mais largas, por impedimento estérico e por produção de novos sítios de nucleação, nos quais novas moléculas de glutaraldeído poder-se-ão fixar, polimerizando-se.

Como o “crosslinking” intermolecular envolve a reação dos grupos aminos superficiais ( $-NH_2$ ) dos resíduos do peptídeo lisina com grupos aldeídos ( $-CHO$ ) do glutaraldeído, todas possibilidades são expostas a seguir (Figura 22), mas somente estruturas, como III, IV, VI e VIII podem representar “crosslinking” formado entre cadeias peptídicas. A polimerização do glutaraldeído é necessária para ligar grandes espaços vazios entre dois sítios da reação. As moléculas de glutaraldeído não podem ligar espaços intramoleculares acima de 1,5 nm. Esta polimerização do glutaraldeído é incrementada por altas concentrações de fixante, pH alcalino e aumento prolongado de temperatura, adicionando-se a isto a importância dos grupos aminos na catálise da polimerização e o nível de água da matriz colagênica.

A reticulação de matrizes colagênicas em meio aquoso por ser rápida e irreversível, acaba por impermeabilizar a superfície desta matriz, impedindo a penetração de outras moléculas de glutaraldeído no seu interior, o que acaba por formar um material bastante heterogêneo. No entanto, esta reticulação visa à redução da solubilidade do material, aumento da resistência à degradação proteolítica e, ao mesmo tempo conferir certa fluidez ao gel (por interpor-se entre as microfibras, afastando-as e impedindo interação entre estas).

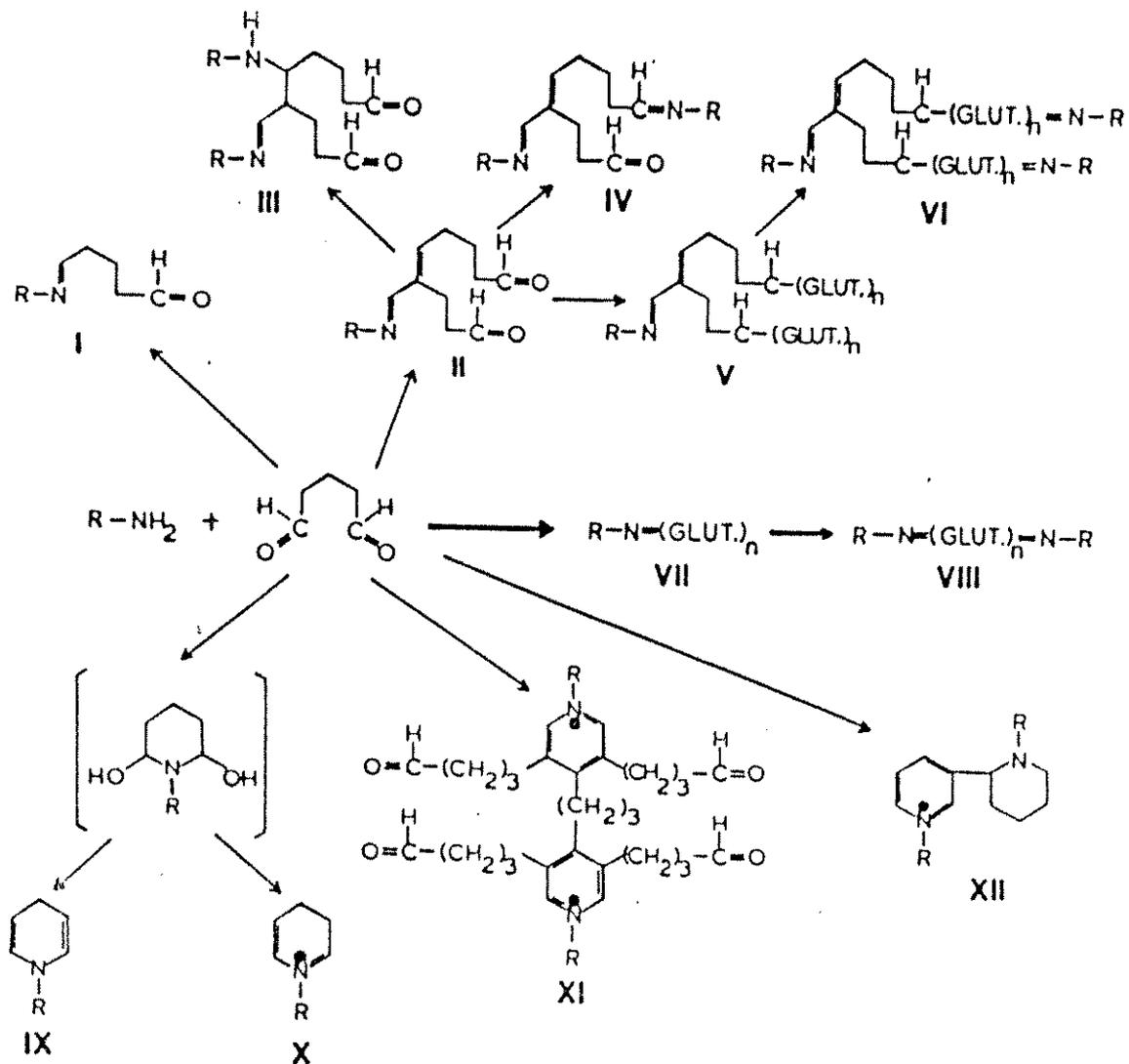


Figura 22. Representação esquemática das possíveis reações dos grupos aminos da lisina com o glutaraldeído;  $n = 1,2,3,4,\dots,40$ ;  $R-NH_2$  = resíduo da lisina; GLUT = cadeia carbônica da molécula de glutaraldeído.

### 3.6. MEDIDAS REOLÓGICAS

#### 3.6.1 EQUIPAMENTO

As propriedades dinâmicas dos materiais viscoelásticos foram medidas com um reômetro rotativo Haake CV20 com banho termostatizante (Figura 23).

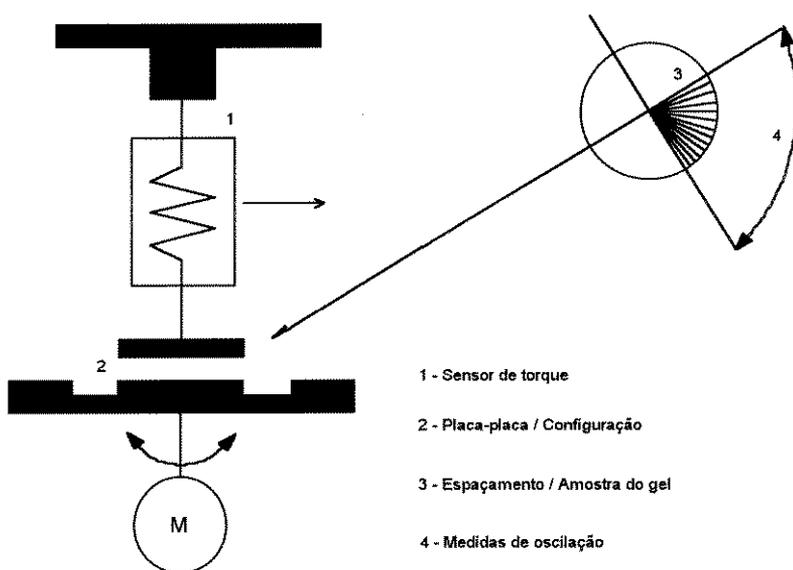


Figura 23. Esquema do sistema básico do reômetro rotativo.

Ao invés da aplicação de uma taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) - que poderia orientar as fibras e destruir a estrutura formada (“net work”), uma oscilação cisalhante deformante ( $\gamma$ ) é aplicada com frequência e amplitude especificadas.

Estas medidas de oscilação forçada providenciam um método não destrutivo, relatando quão estável e elástico é o material como função da deformação e da frequência.

Amostras viscoelásticas reagem a esta deformação oscilante com um atraso da tensão, caracterizada pela defasagem em referência à deformação. A deformação oscilante e a tensão são medidas e transmitidas ao equipamento (Rotovisco RV20). O teste dinâmico é feito através de uma configuração de placas paralelas, podendo-se avaliar um espectro de frequências de 0,05 a 10 Hertz com amplitude de deformação de  $0,3^\circ$  a  $10^\circ$  realizado num sistema couette.

O resultado do teste consiste de dois sinais senoidais para o ensaio reológico e a correspondente temperatura da amostra. Ambos os sinais, tensão e deformação, são caracterizados por sua amplitude e defasagem entre si. Para simplificar os testes de oscilação, um “software” permite uma corrida de testes completa por prévio ajuste das condições de medida. Uma análise de Fourier “on line” da deformação e tensão emite resultados básicos (defasagem, amplitude da deformação e tensão) que são processados para a obtenção da viscosidade complexa ( $\eta^*$ ), viscosidade dinâmica ( $\eta'$ ), módulo complexo ( $G^*$ ), módulo de perda ( $G''$ ), módulo de armazenamento ( $G'$ ) e tangente de perda ( $\tan\delta$ )

A maior dificuldade do equipamento é a habilidade em medir a tensão de cisalhamento como uma função do tempo, uma vez que a deformação aplicada também varia com o tempo. Obtidas estas informações, poder-se-á calcular os vários parâmetros viscoelásticos, avaliando-se a magnitude das componentes elástica e viscosa de modo a se poder caracterizar o material viscoelástico. Foram realizados dois testes de varredura de deformação e de varredura de frequência.

### 3.6.2 LEVANTAMENTO DE PARÂMETROS REOLÓGICOS

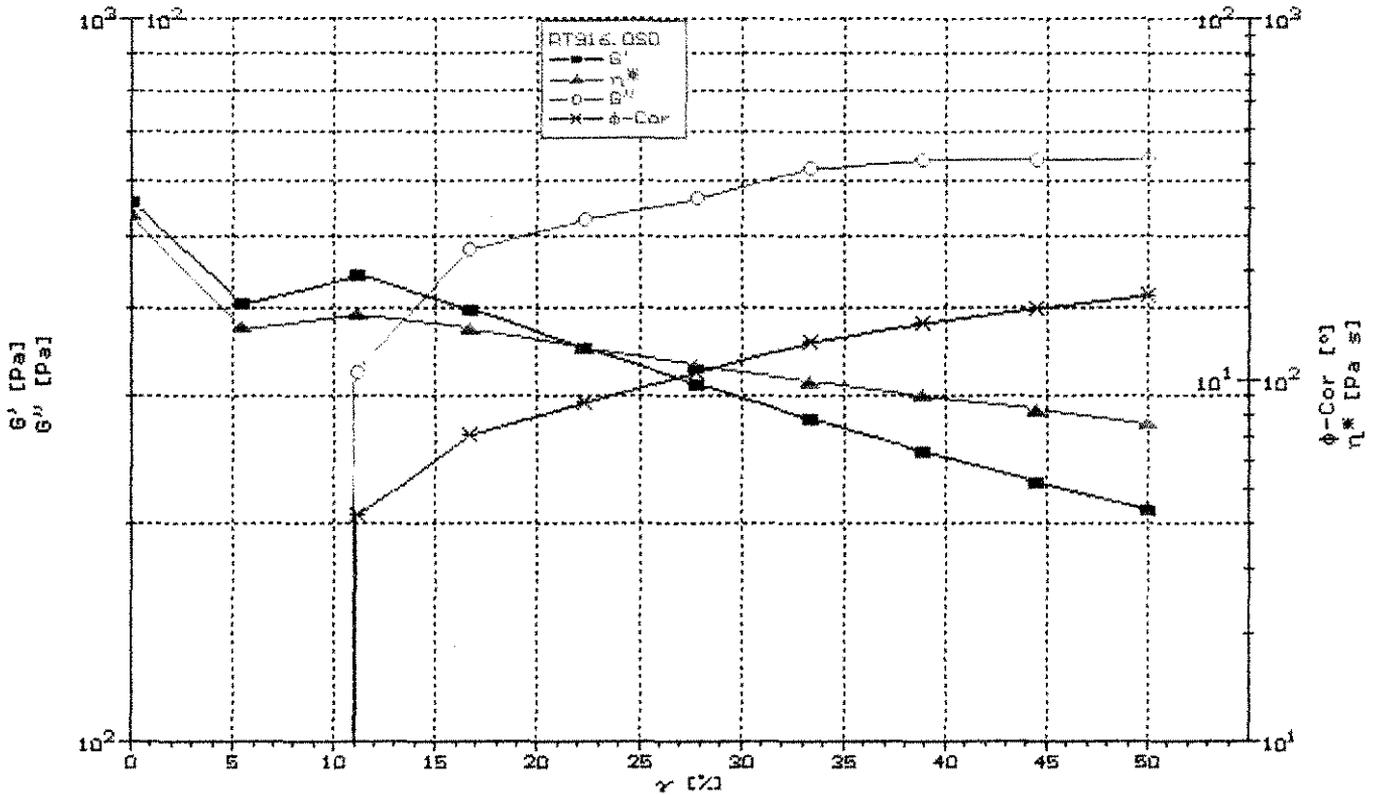
Na varredura de deformação os módulos elástico e viscoso são medidos como uma função da deformação a uma frequência constante. A intenção deste teste é avaliar o ponto onde a rigidez do material é inicialmente afetada por uma dada quantidade de deformação.

Se o módulo e a defasagem tornam-se constantes como função da deformação, então o material é classificado como viscoelástico linear e o teste pode ser considerado não destrutivo - permanece intacta a microestrutura da amostra, além do que o pressuposto da linearidade resulta na formulação de equações diferenciais lineares com coeficientes constantes, onde tais constantes são parâmetros materiais tais como a viscosidade e o módulo de rigidez, e esta restrição tem como resultado a teoria linear, que se aplica a estreitas variações de tensão e deformação (Rosolen, 1994), como na lei de Hooke, na qual a força necessária para deformar um objeto é diretamente proporcional à deformação. A informação do espectro viscoelástico é útil para prever o quanto o material é resistente à deformação. O espectro viscoelástico linear foi obtido a partir de uma frequência de 0,463 hertz e fixada uma deformação de 15% para todos os géis.

Após o estabelecimento da região viscoelástica linear e troca da amostra utilizada, procede-se nesta região a uma varredura de frequência, que também é um teste dinâmico no qual a resposta do material é medida em função da frequência a uma dada amplitude de deformação constante.

Nesta região as propriedades medidas são independentes da deformação, providenciando a varredura de frequência uma caracterização, do tipo impressão digital, para o material viscoelástico sob condições não destrutivas. As respostas de frequência foram medidas no extremo da região viscoelástica linear sob uma década de frequência (0 a 10 rad/s), utilizando-se placas paralelas com 30 mm de diâmetro (PQ30) com distância de 1,00 mm. Pode-se observar abaixo (Figura 23A) um reograma típico de uma varredura de deformação para um gel no pl.

PPTO 16 HORAS DIALISE/ENSAIO DOSAGEM 1.



Date: 11.08.95, 13:48 Operator: Sample:  
 Sensor system : Q30 System : CV20

Data sheet HAAKE OSC 2.0.5

Date: 11.08.95, 13:48 Operator:  
 Sample:  
 Sensor system : Q30 System : CV20  
 A-Factor : 23 M-Factor : 2.9 Gap [mm] : 1  
 File : B:\RT916.OSD

G' [Pa]	tan(φ) [-]	G'' [Pa]	Gamma [%]	Eta* [Pa s]	w [1/s]
5.54E+02	-1.11E+00	-6.14E+02	2.24E-02	2.84E+02	2.91E+00
4.02E+02	-6.96E-02	-2.80E+01	5.44E+00	1.39E+02	2.91E+00
4.38E+02	7.33E-02	3.21E+01	1.11E+01	1.51E+02	2.91E+00
3.93E+02	1.22E-01	4.78E+01	1.67E+01	1.36E+02	2.91E+00
3.48E+02	1.51E-01	5.26E+01	2.22E+01	1.21E+02	2.91E+00
3.09E+02	1.82E-01	5.63E+01	2.78E+01	1.08E+02	2.91E+00
2.77E+02	2.25E-01	6.22E+01	3.33E+01	9.74E+01	2.91E+00
2.50E+02	2.55E-01	6.37E+01	3.89E+01	8.87E+01	2.91E+00
2.28E+02	2.81E-01	6.39E+01	4.44E+01	8.12E+01	2.91E+00
2.08E+02	3.06E-01	6.35E+01	5.00E+01	7.47E+01	2.91E+00

Figura 23A. Reograma de uma varredura de deformação para um gel no pl.

## CAPÍTULO 4

### MODELAGEM MATEMÁTICA DA VISCOELASTICIDADE

A viscoelasticidade pode ser estudada em termos de modelos mecânicos (Schramm, 1994; Haake, 1992; Vairon, s.d; Tschoeg, 1989; Bueche, 1962), que são propostos como associação de mola(s) e amortecedor(s). Molas possuem independência com relação ao tempo e comportamento elástico e/ou armazenador. Amortecedores, possuem uma relação de dependência com o tempo e comportamento viscoso e/ou dissipativo. O modelo é suposto comportar-se qualitativamente e de modo similar ao material. Se o comportamento mecânico pode ser expresso em termos de força-deformação e tempo, os resultados guiam a uma equação reológica. Esta equação reológica é usada para explicar e prever o comportamento do material sob várias condições de carga. Alguns destes modelos clássicos lineares mais comuns são Kelvin-Voigt, Maxwell e Zener. São modelos que representam o comportamento macroscópico do material, acrescentando, de modo indireto, compreensão para a base molecular do fenômeno da viscoelasticidade. A coleta de dados para o ajuste deve ser realizada na região viscoelástica linear, onde o ensaio pode ser considerado não-destrutivo e a estrutura do gel fibroso não é afetada.

#### 4.1 MODELO DE KELVIN-VOIGT.

Neste modelo a mola tem um módulo de rigidez constante ( $G$ ) e o amortecedor uma viscosidade constante ( $\eta$ ). No modelo qualquer deformação ( $\gamma$ ) aplicada resulta em igual deformação no elemento mola ( $\gamma_e$ ) e no elemento amortecedor ( $\gamma_v$ ).

A tensão total necessária para a deformação do sistema é igual à somatória da tensão no elemento mola ( $\tau_e$ ) e a tensão no elemento amortecedor ( $\tau_v$ ). Ambos os elementos são forçados a uma taxa constante e, portanto, a força no amortecedor instantaneamente atinge um valor determinado e mantém-se constante, enquanto na mola inicia-se do zero subindo gradualmente e a superposição de efeitos resulta no comportamento descrito pelo modelo de Kelvin-Voigt (Figura 24).

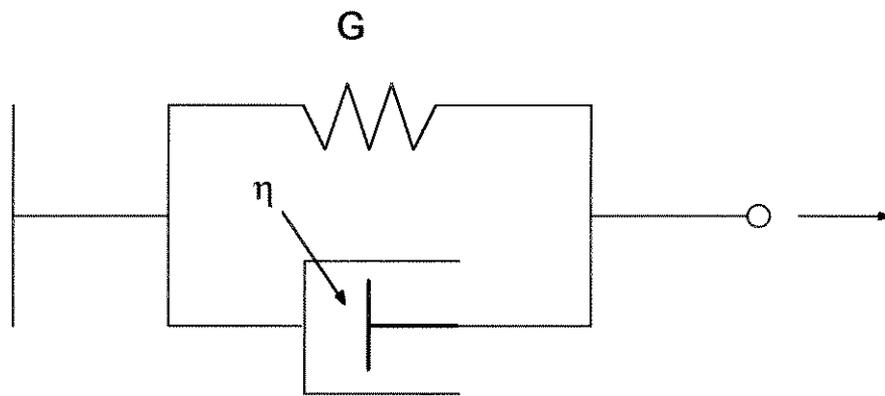


Figura 24. Esquema do modelo de Kelvin-Voigt, resultado da associação em paralelo de mola e amortecedor.

$$\gamma = \gamma_e = \gamma_v \quad (18)$$

$$\tau = \tau_e + \tau_v \quad (19)$$

substituindo (1) e (2) em (19), a equação do modelo é:

$$\tau = \mathbf{G} \cdot \gamma_e + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Modelo de Kelvin-Voigt}) \quad (20)$$

Aplicando uma deformação senoidal:  $\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$ , tem-se (21):

$$\tau = \mathbf{G} \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (21)$$

onde observa-se a componente em fase (elástica) e a fora de fase (viscosa) em relação à tensão.

Pode-se comparar os termos do modelo com os dados experimentais e fazer senso dos modelos mecânicos propostos. Para o modelo de Kelvin-Voigt a tensão resposta é expresso pela equação (21). Os termos anteriores podem ser correspondidos com a equação (15).

$$\tau = \mathbf{G}' \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + \mathbf{G}'' \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

Para o modelo de Kelvin-Voigt as magnitudes do módulo de armazenamento ( $\mathbf{G}'$ ) e módulo de perda ( $\mathbf{G}''$ ) são:

$$\mathbf{G}' = \mathbf{G} \quad \mathbf{G}'' = \eta \cdot \omega \quad (22)$$

onde observa-se que a resposta elástica é inteiramente verdadeira para a mola e a resposta viscosa igualmente verdadeira para o amortecedor. A substância pode ser descrita como um sólido viscoelástico, possuidor de memória. Se a viscosidade do modelo for elevada, o amortecimento da resposta para uma tensão imposta é elevado.

#### 4.2. MODELO DE MAXWELL.

O modelo corresponde a uma associação mecânica em série dos elementos mola e amortecedor (Figura 25).

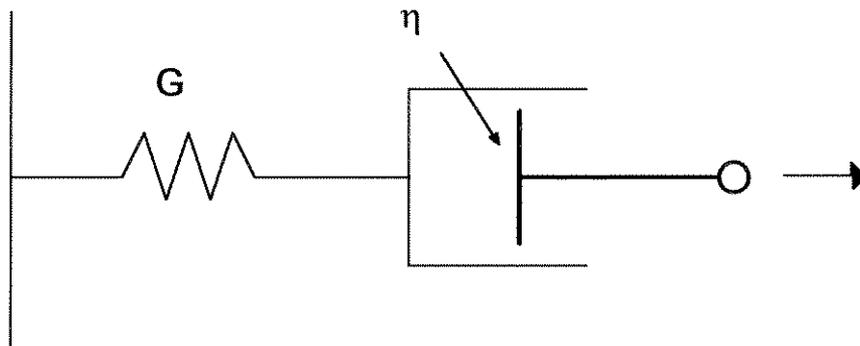


Figura 25. Esquema do modelo de Maxwell, resultado da associação em série da mola e amortecedor.

A mola possui um módulo de rigidez constante ( $G$ ) e o amortecedor uma viscosidade constante ( $\eta$ ). Por estar associado em série a tensão em cada elemento deve ser igual à tensão total imposta.

O total da deformação aplicada ao sistema é a somatória da deformação no elemento mola e no elemento amortecedor. Inicialmente toda tensão é utilizada para a deformação da mola. Sendo a mola alongada, o amortecedor vai-se carregando de tensão, até a alongação total da mola. Neste ponto todas as tensões acumuladas servirão para o escoamento no amortecedor.

$$\tau = \tau_e = \tau_v \quad (23)$$

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_v \quad (24)$$

Derivando a equação (24) em relação ao tempo, a taxa de deformação pode ser expressa como:

$$\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_e + \dot{\gamma}_v \quad (25)$$

Substituindo as equações (1) e (2) em (25):

$$\dot{\gamma} = \frac{\dot{\tau}}{\mathbf{G}} + \frac{\tau}{\eta} \quad (\text{Modelo de Maxwell}) \quad (26)$$

Quando uma deformação senoidal é aplicada:  $\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$

$$\frac{\dot{\tau}}{\mathbf{G}} + \frac{\tau}{\eta} = \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (27)$$

A solução desta equação diferencial em estado permanente é:

$$\tau = \left\{ \frac{\mathbf{G} \cdot (\lambda \cdot \omega)^2 \cdot \gamma_0}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \right\} \cdot \sin(\omega \cdot t) + \left\{ \frac{\mathbf{G} \cdot \lambda \cdot \omega \cdot \gamma_0}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \right\} \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (28)$$

O termo  $\lambda$  é o tempo de relaxação, definido como:  $\lambda = \frac{\eta}{\mathbf{G}} = \frac{1}{\omega \cdot \tan \delta}$

agora para o modelo de Maxwell, a tensão resposta deste modelo mecânico é dado pela equação (28) comparando os termos com a equação (15). As magnitudes dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) podem ser expressos por:

$$G' = \frac{\mathbf{G} \cdot (\lambda \cdot \omega)^2}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \quad G'' = \frac{\mathbf{G} \cdot \lambda \cdot \omega}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \quad (29)$$

As respostas elástica e viscosa dependem da magnitude das dimensões do termo  $(\lambda \cdot \omega)$ . A partir de uma varredura de frequência “frequency Sweep”, quando  $G'$  e  $G''$  são medidos, podem ser estabelecidos limites para análise:

$$a) (\lambda \cdot \omega)^2 \lll 1 \qquad G' = G \cdot (\lambda \cdot \omega)^2 \qquad G'' = \eta \cdot \omega$$

Característico de baixa frequência, a escala do módulo de armazenamento aumenta com o quadrado da frequência, enquanto o módulo de perda é proporcional a frequência.

$$b) (\lambda \cdot \omega)^2 \ggg 1 \qquad G' = G \qquad G'' = \frac{G^2}{(\eta \cdot \omega)}$$

O amortecedor em alta frequência não tem tempo suficiente para responder a uma deformação, estabelecido este regime, a componente elástica ( $G'$ ) domina, comportando-se a substância como uma mola. Quando o material se comporta para estes dois limites, ele pode ser dito um líquido viscoelástico, não possuindo posição singular de equilíbrio. Portanto, não possui memória de retorno a uma posição de “pré-stress”. Qualquer deformação aplicada é permanente e, quando a viscosidade do amortecedor for elevada, o modelo atuará como uma mola. Se, ao contrário, a módulo da mola for elevado, o modelo atuará como um amortecedor.

#### 4.3. MODELO DE ZENER

A associação mecânica neste modelo corresponde a uma associação série do elemento mola e do elemento amortecedor em paralelo com outro elemento mola (Figura 26). O sistema total sofre igualmente a deformação, enquanto a tensão total é a somatória em cada parte do sistema. A análise pode ser feita separadamente em dois subsistemas.

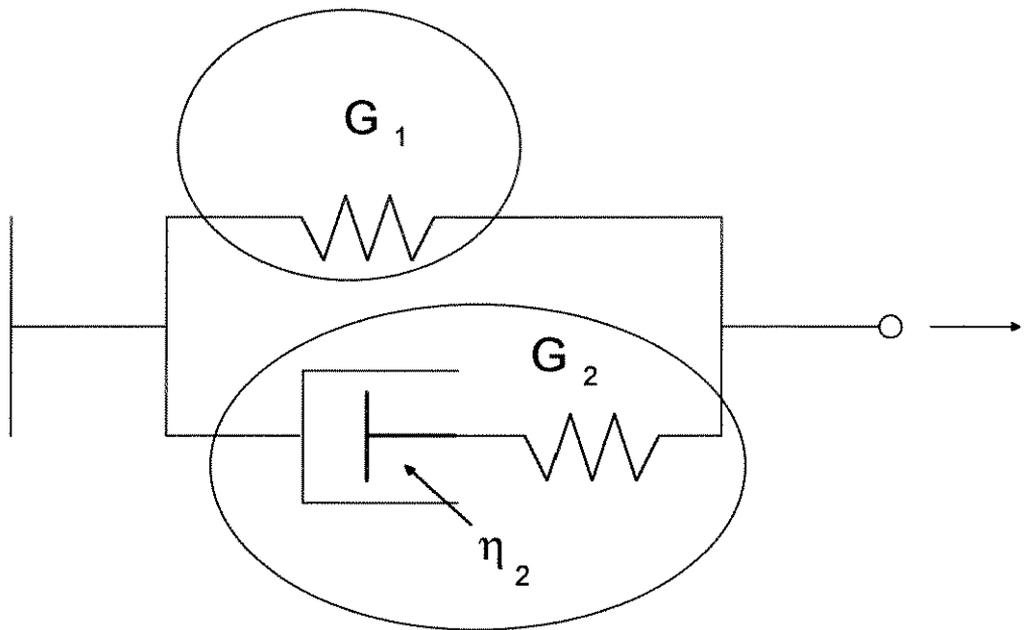


Figura 26. Esquema do modelo de Zener, resultado da associação em série mola e amortecedor com uma mola em paralelo.

$$\gamma = \gamma_1 = \gamma_2 \quad (30)$$

$$\tau = \tau_1 + \tau_2 \quad (31)$$

No subsistema 1, com um elemento mola presente:

$$\tau_1 = \mathbf{G}_1 \cdot \gamma_1 \quad (32)$$

No subsistema 2 temos em série o elemento mola e o elemento amortecedor:

$$\tau_2 = \tau_e = \tau_v \quad (33)$$

$$\gamma_2 = \gamma_e + \gamma_v \quad (34)$$

derivando a equação (34) em relação ao tempo:

$$\dot{\gamma}_2 = \dot{\gamma}_e + \dot{\gamma}_v \quad (35)$$

Substituindo as equações (1) e (2) em (35)

$$\dot{\gamma}_2 = \frac{\dot{\tau}_e}{G_2} + \frac{\tau_v}{\eta} \quad (36)$$

Aplicando uma deformação senoidal:  $\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$

$$\dot{\gamma}_2 = \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (37)$$

substituindo (37) em (36).

$$\gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) = \frac{\dot{\tau}_e}{G_2} + \frac{\tau_v}{\eta}$$

A solução desta equação diferencial é:

$$\tau_2 = \left\{ \frac{G_2 \cdot (\lambda \cdot \omega)^2 \cdot \gamma_0}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \right\} \cdot \sin(\omega \cdot t) + \left\{ \frac{G_2 \cdot \lambda \cdot \omega \cdot \gamma_0}{[1 + (\lambda \cdot \omega)^2]} \right\} \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

$$\lambda = \frac{\eta}{G_2} = \frac{1}{\omega \cdot \tan \delta}$$

que levada com a equação (32) à equação (31), dá a equação (38) que representa o modelo de Zener.

$$\tau = \left\{ \frac{G_2(\lambda\omega)^2 \gamma_0}{[1 + (\lambda\omega)^2]} + G_1 \gamma_0 \right\} \sin(\omega t) + \left\{ \frac{G_2 \lambda \omega \gamma_0}{[1 + (\lambda\omega)^2]} \right\} \cos(\omega t) \quad (38)$$

Comparando os com a equação (15), as magnitudes dos módulos de  $G'$  e  $G''$ , podem ser expressos por:

$$G' = \frac{(\lambda\omega)^2 (G_2 + G_1) + G_1}{[1 + (\lambda\omega)^2]} \quad G'' = \frac{G_2 \lambda \omega}{[1 + (\lambda\omega)^2]} \quad (39)$$

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados de viscoelasticidade foram obtidos após prévio estabelecimento de uma varredura de deformação a baixa frequência (0,486 Hertz) nos géis, visando o estabelecimento da faixa viscoelástica linear para cada gel. A partir da Figura 27 a Figura 31 são mostrados uma sequência de resultados dos ensaios reológicos (varredura de deformação (A) e frequência (B)) a partir de uma suspensão de fibras naturais reconstituídas e, posteriormente dialisada, que originaram pré-géis e géis ao longo da diálise.

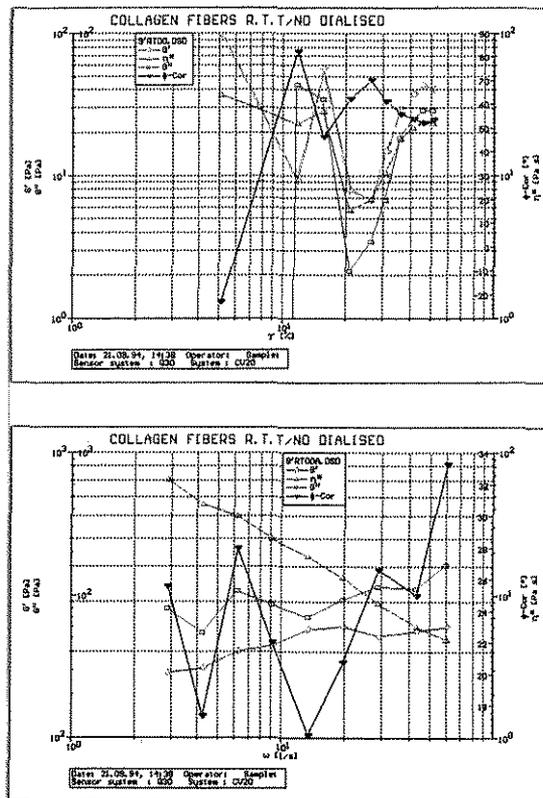


Figura 27. Reograma da suspensão fibrosa pH 2,5. (A) Varredura de deformação (B) Varredura de frequência.

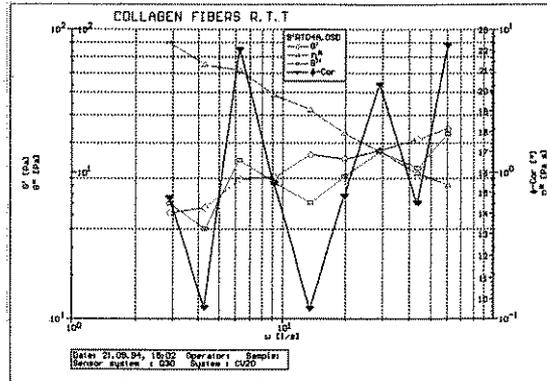
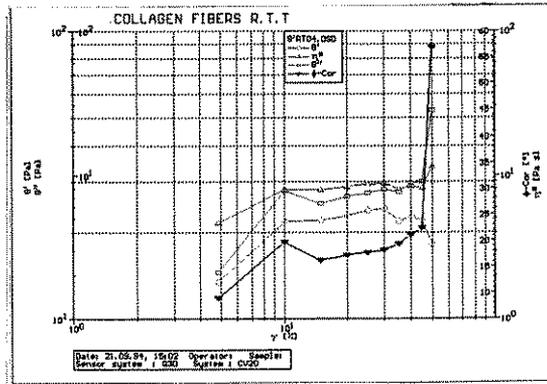


Figura 28. Reograma das fibrilas pH 3,50. (A) varredura de deformação (B) varredura de frequência.

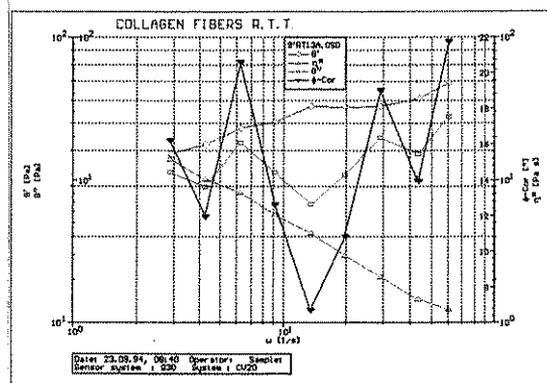
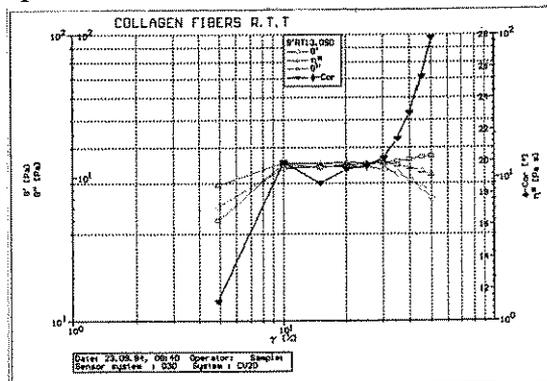


Figura 29. Reograma de estrutura no início da zona isoeletrica pH 4,5. (A) varredura de deformação (B) varredura de frequência.

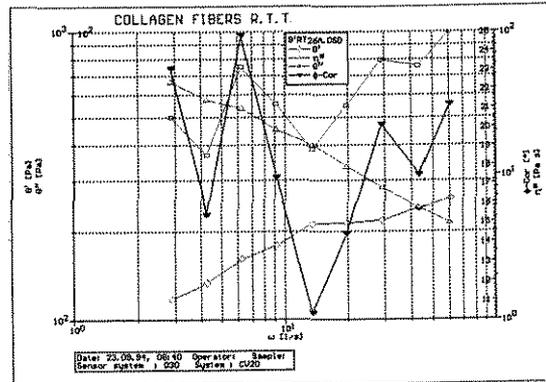
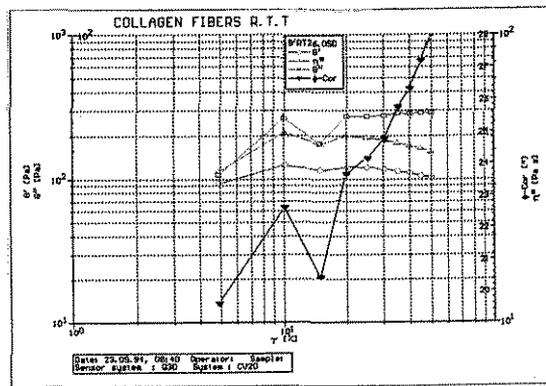


Figura 30. Reograma de estrutura em início de trama pH 4,8. (A) varredura de deformação (B) varredura de frequência.

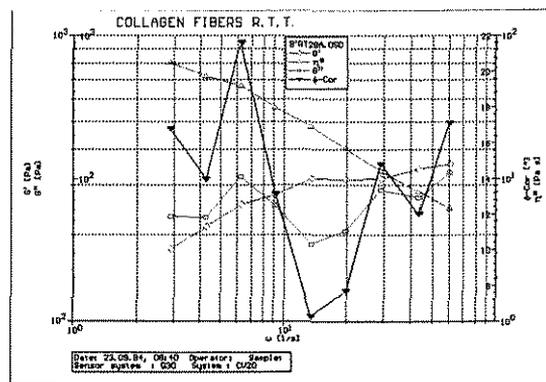
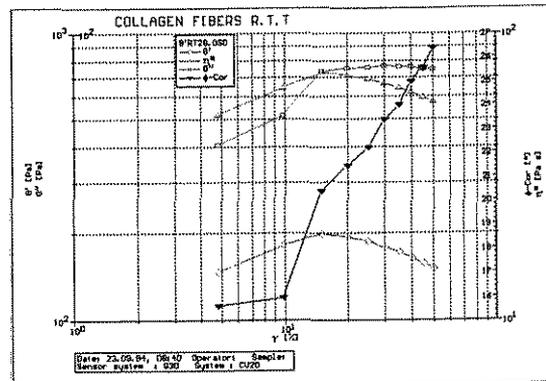


Figura 31. Reograma de estrutura em trama pH 5,0. (A) varredura de deformação (B) varredura de frequência.

A análise inicial dos reogramas de deformação possibilitou fixar uma deformação de 15% para os ensaios dos pré-géis e géis no limite superior da região viscoelástica linear a fim de observar o comportamento viscoelástico das estruturas fibrilares dos géis. A partir dos reogramas de frequência pode-se avaliar a faixa de comportamento viscoelástico linear (Figura 27A a Figura 31A). O comportamento viscoelástico dos géis foram diferenciados de amostra para amostra. Os resultados dos ensaios salientaram uma heterogeneidade na forma de um aumento de rigidez, um aumento de  $G'$  (Figura 27B a Figura 31B), à medida que a amostra foi submetida a uma variação de frequência, resultando num estreitamento para a faixa de frequência, na qual a viscoelasticidade linear pode ser avaliada, e conseqüentemente o platô para o máximo valor de  $G'$ . Uma avaliação a nível estrutural, por meio das micrografias e dados viscoelásticos, conduziram a conclusão que feixes de fibras mais compactos refletem estreitas faixas de deformação viscoelástica linear. As faixas foram ampliadas quando os feixes de fibras apresentaram-se menos compactados e entrelaçados.

Um comportamento de afinamento cisalhante foi observado sob a variação de frequência, pelo decaimento progressivo da viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) (Figura 27B a 31B). Este comportamento foi explicado a partir de uma progressiva orientação fibrilar na direção do escoamento, provocando uma diminuição da resistência friccional e deformação da camada de hidratação das fibras protéicas. O colágeno é pouco solúvel em água, indicando que as interações são fracas entre as fibras de colágeno e a água, as quais podem ser facilmente destruídas por perturbações externas (Maeda et al.,1993). O fenômeno é observado em proteínas hidratadas e dispersas com a ocorrência de ruptura de pontes de hidrogênio e outras ligações fracas, resultando em dissociação de agregados protéicos ou “net-works”. O tamanho aparente das partículas na direção do escoamento, de qualquer modo, foi reduzido. Este comportamento afinante diz respeito às interações proteína-proteína e, é mais marcante em altas concentrações protéicas quando as interações são numerosas, por exemplo no gel.

O escoamento de tal estrutura necessita de uma tensão inicial para que haja rompimento de algumas interações. No caso de proteínas observa-se geralmente uma correlação positiva entre absorção de água e o escoamento.

Estes fatos foram avaliados pelos módulos  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$ , como também por medidas de birrefringência antes e após os ensaios realizados, mostrando que, de fato, a alteração da camada de hidratação das microfibras é um forte indicativo das interações microfibrilares que ocorreram e pode sugerir que trabalhos em reologia que apontem “heterogeneidades” em estruturas protéicas, possam indicar fortemente a manifestação das interações hidrofóbicas, em variável intensidade, a depender do conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos na molécula, concentração protéica, geometria da molécula e condições de meio. Alguns casos podem ser citados como géis de ovalbumina (globular), colágeno (fibrilar) e outros géis protéicos com elevado conteúdo hidrofóbico que apresentaram este comportamento.

A dosagem de colágeno nos pré-géis e géis ao longo da diálise mostrou um comportamento diferenciado quanto à hidratação das fibras. A dispersão da concentração foi grande, e possibilitou uma análise para determinação do ponto isoelétrico (pI). Como se vê na Figura 32, onde os pontos representam, geralmente, a média de três medidas e a barra o desvio padrão. No ponto isoelétrico, em particular, as interações proteína-proteína são intensas, o que faz com que a densidade fibrilar aumente e reflita no maior teor que se possa dosar entre os géis. O pI é fortemente dependente da força iônica e foi deslocado em uma unidade de pH, situando-se no início em torno do pH 4,50 e posteriormente em torno do pH 5,45. Os géis anteriores a cada um dos pI(s) citados sofrem uma intensa hidratação (aumento da interação proteína -água) e desorganização da estrutura (“net work”).

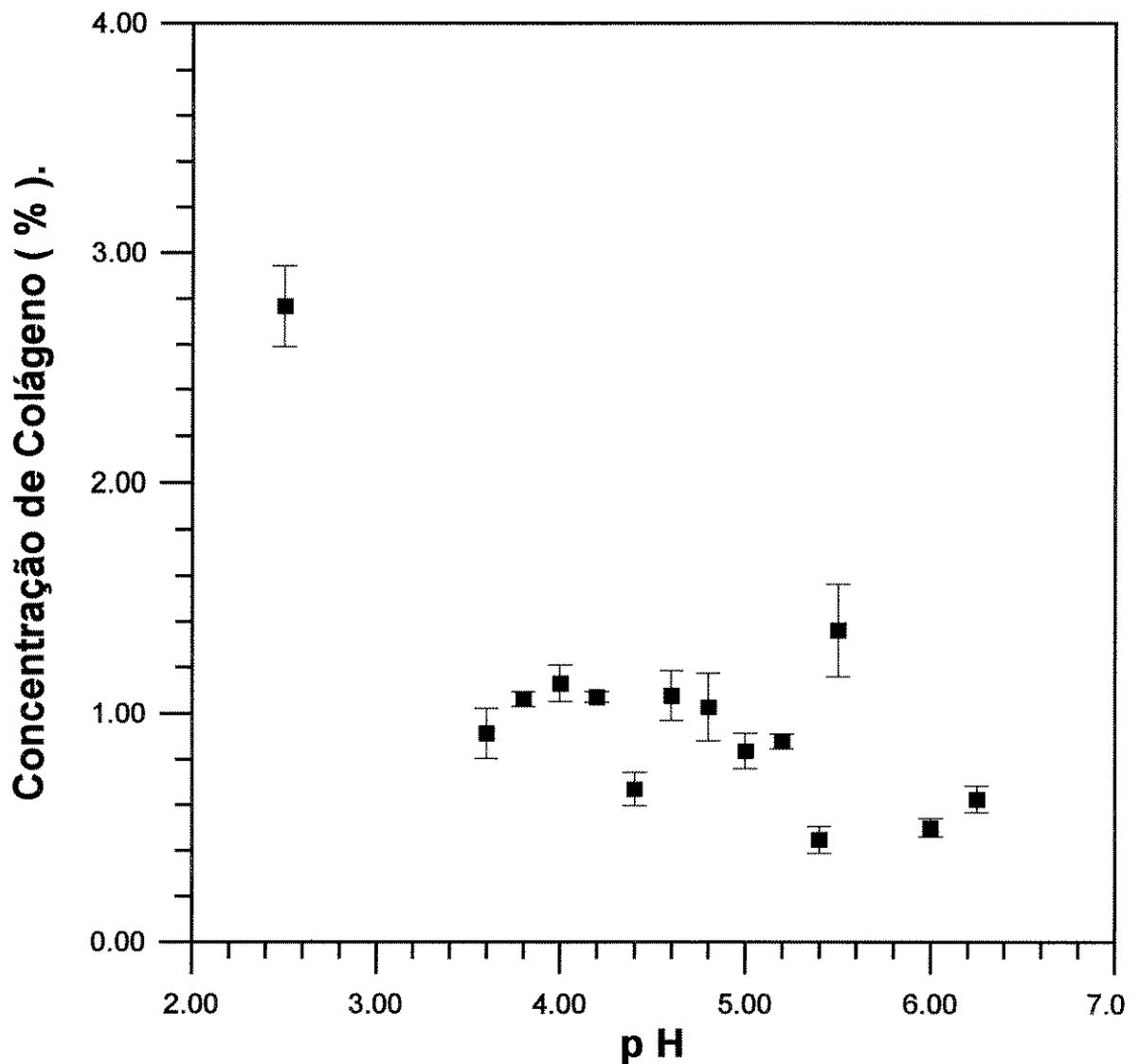


Figura 32. Dosagem de colágeno nos pré-géis e géis ao longo da diálise.

Pela análise dos dados viscoelásticos tornou-se necessário, para avaliação do comportamento das estruturas fibrilares dos géis, fixar uma frequência comum - 1 Hertz. Os diversos gráficos a seguir (Figura 33 a Figura 36), resumem o comportamento reológico de pré-géis e géis nativos (obtidos somente por variação de pH e força iônica), geralmente, a partir da média de três medidas com o respectivo desvio padrão.

O comportamento viscoelástico mostra-se variável a partir da diálise da suspensão de fibras nativas - reconstituídas e randomizadas (pH 2,50). Ao iniciar-se a diálise da suspensão (Figura 37) e portanto a eliminação de ácido acético e cloreto de sódio que impregnam as fibras de colágeno (Figura 38 e 39), ocorreram simultaneamente disfibrilamento e hidratação (pH 2,50 a pH 3,50). Os cabos de fibras ao se desfazerem em fibrilas (Figura 40) levaram a capacidade estrutural de armazenamento e dissipação da amostra ao mínimo (Figura 33 e 34). Em seguida as fibrilas se auto-organizaram em duas estruturas intermediárias (pH 3,60 e pH 4,10) de comportamento reológico semelhantes, apesar que a segunda estrutura respondeu mais intensamente nos módulos de armazenamento e dissipação (Figura 33 e 34). As estruturas foram desfeitas e as fibrilas hidratadas. As fibrilas voltam a formar cabos visíveis em pH 4,50 (Figura 41) - no início da faixa isoelétrica do colágeno (pH 4,50 a pH 7,00) - se auto-organizando continuamente (Figura 42 e 43), com aumento da hidratação das fibras e da força de gel, numa trama bem definida (Figura 44) até que o pI (pH 5,45) seja atingido. A estrutura (Figura 45), no ponto isoelétrico, atingiu o maior valor no módulo elástico e o mínimo no módulo viscoso, pode -se observar com detalhe na Figura 46 a regularidade, a ordenação e compacidade dos feixes que se interligam como consequência das fortes interações microfibrilares. Os ensaios reológicos acima do ponto isoelétrico (pI) não puderam ser realizados, pois as amostras de géis apresentaram um comportamento de “fratura vítrea” sob compressão entre as placas. Este comportamento mostrou-se intensificado nos géis nativos acima do pI, obtidos por diálise exaustiva. Os géis desfaziavam-se e não preenchiam homogeneamente as placas. Medidas de concentração de colágeno (Figura 32) e micrografias (Figura 47 e Figura 48) mostraram, no entanto, géis com elevada hidratação e estruturas com feixes dilatados.

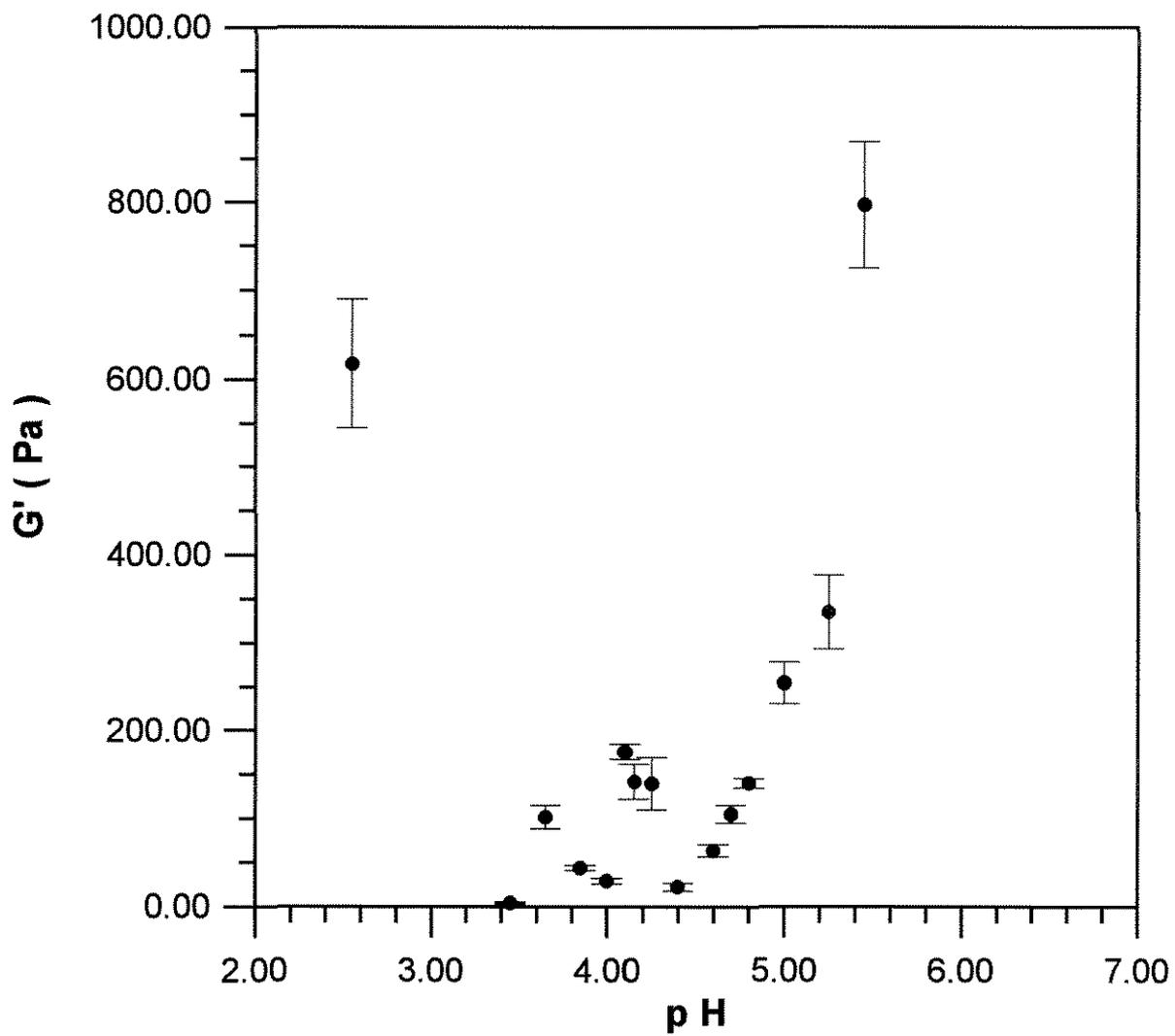


Figura 33. Variação do módulo elástico ( $G'$ ) com o pH dos géis obtidos ao longo da diálise.

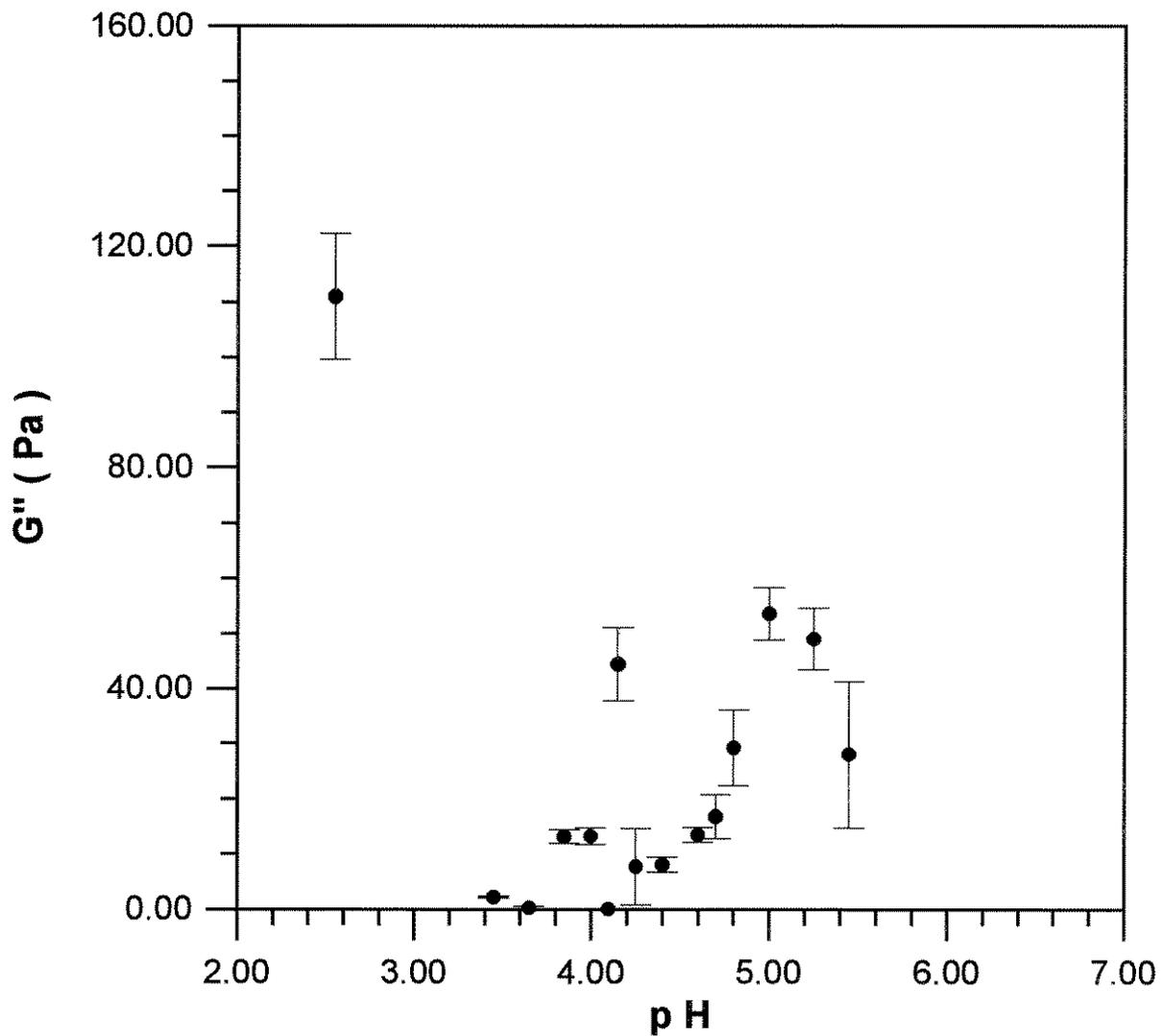


Figura 34. Variação do módulo viscoso ( $G''$ ) com o pH dos géis obtidos ao longo da diálise.

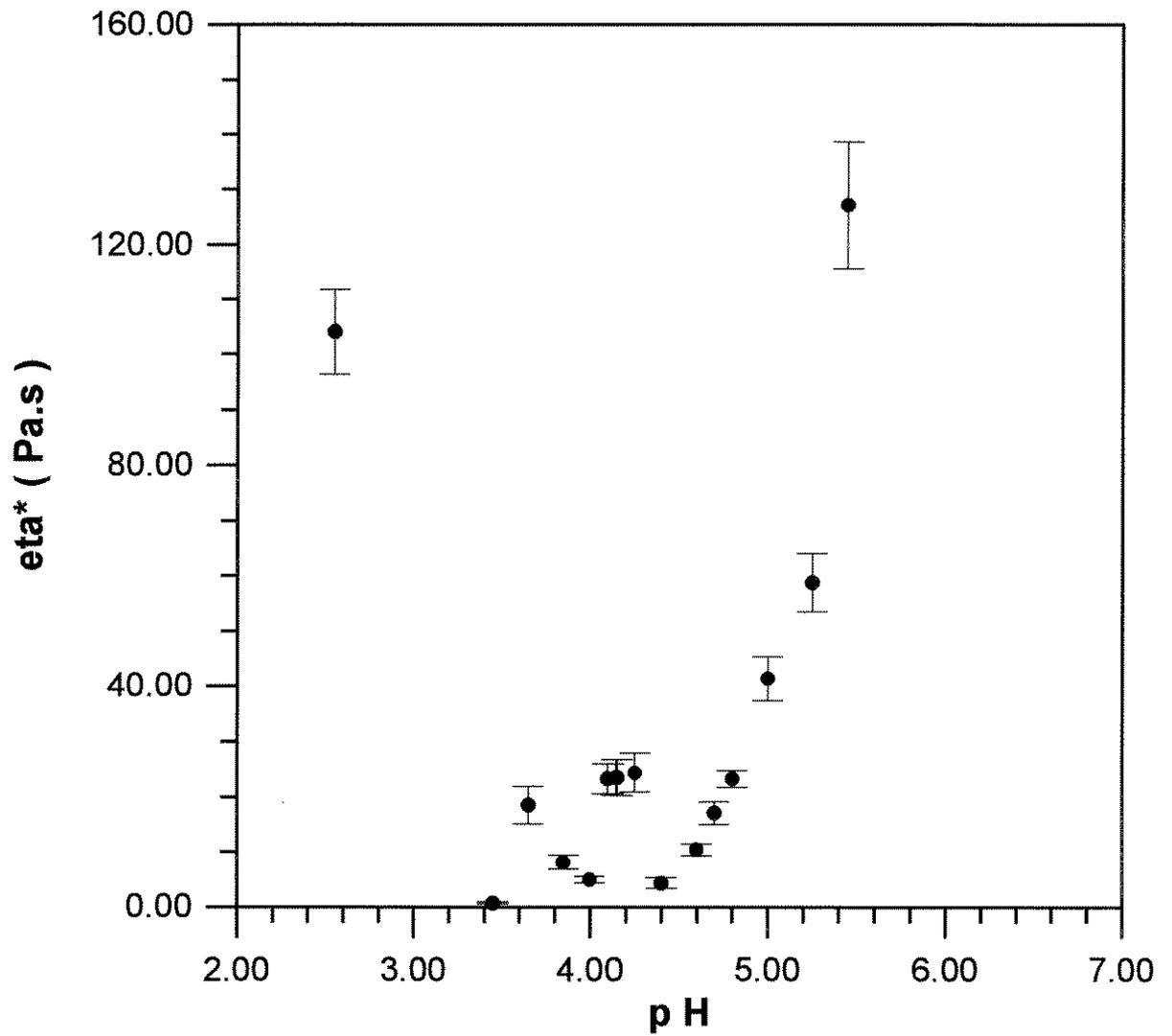


Figura 35. Viscosidade complexa (resistência ao cisalhamento dinâmico) dos géis de colágeno ao longo da diálise.

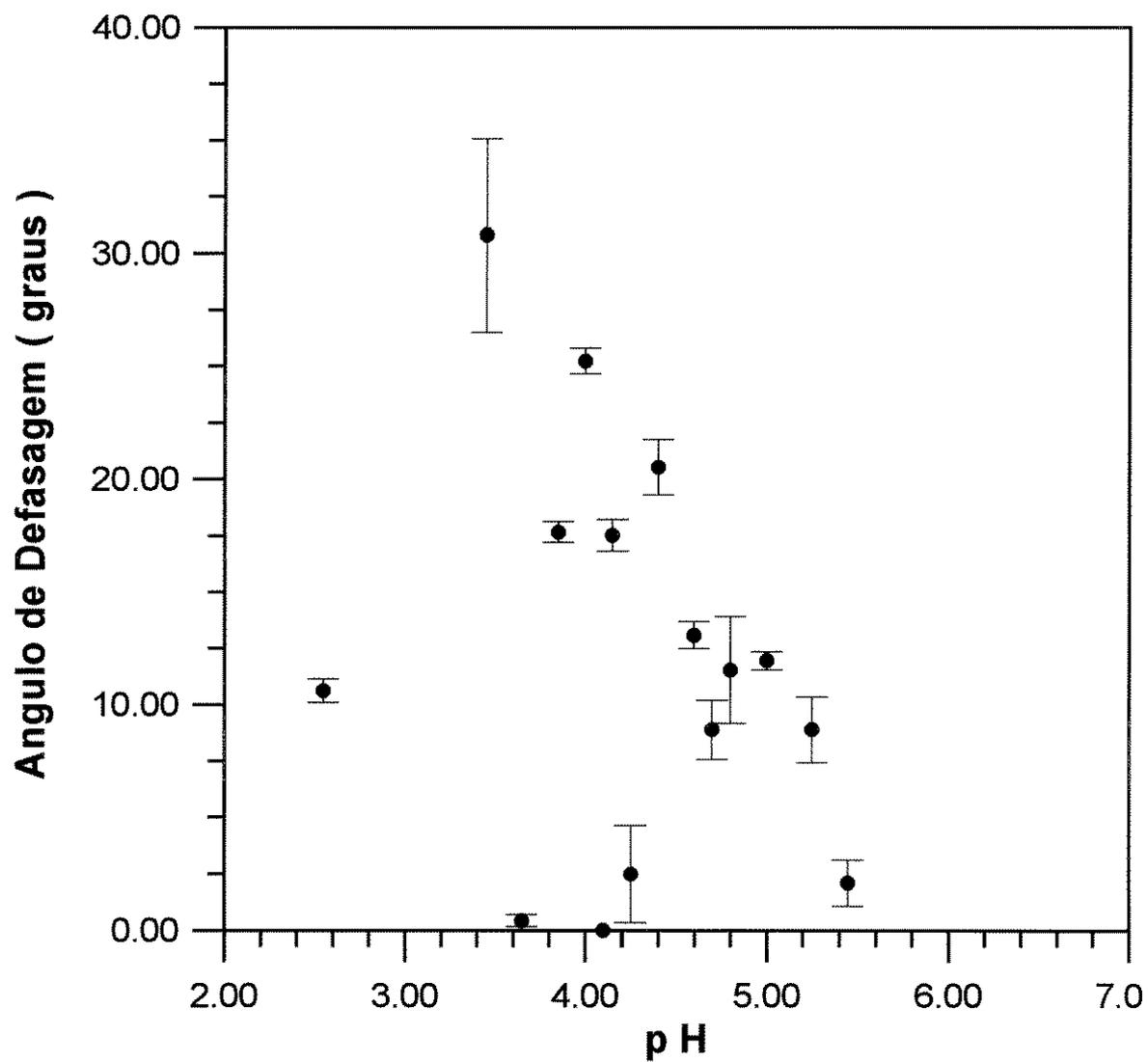


Figura 36. Ângulo de defasagem entre a deformação e a tensão nos géis de colágeno ao longo da diálise.



Figura 37. Suspensão fibrosa de colágeno após precipitação. (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); tempo de diálise 0 hora; concentração média em colágeno 2,85% em peso.

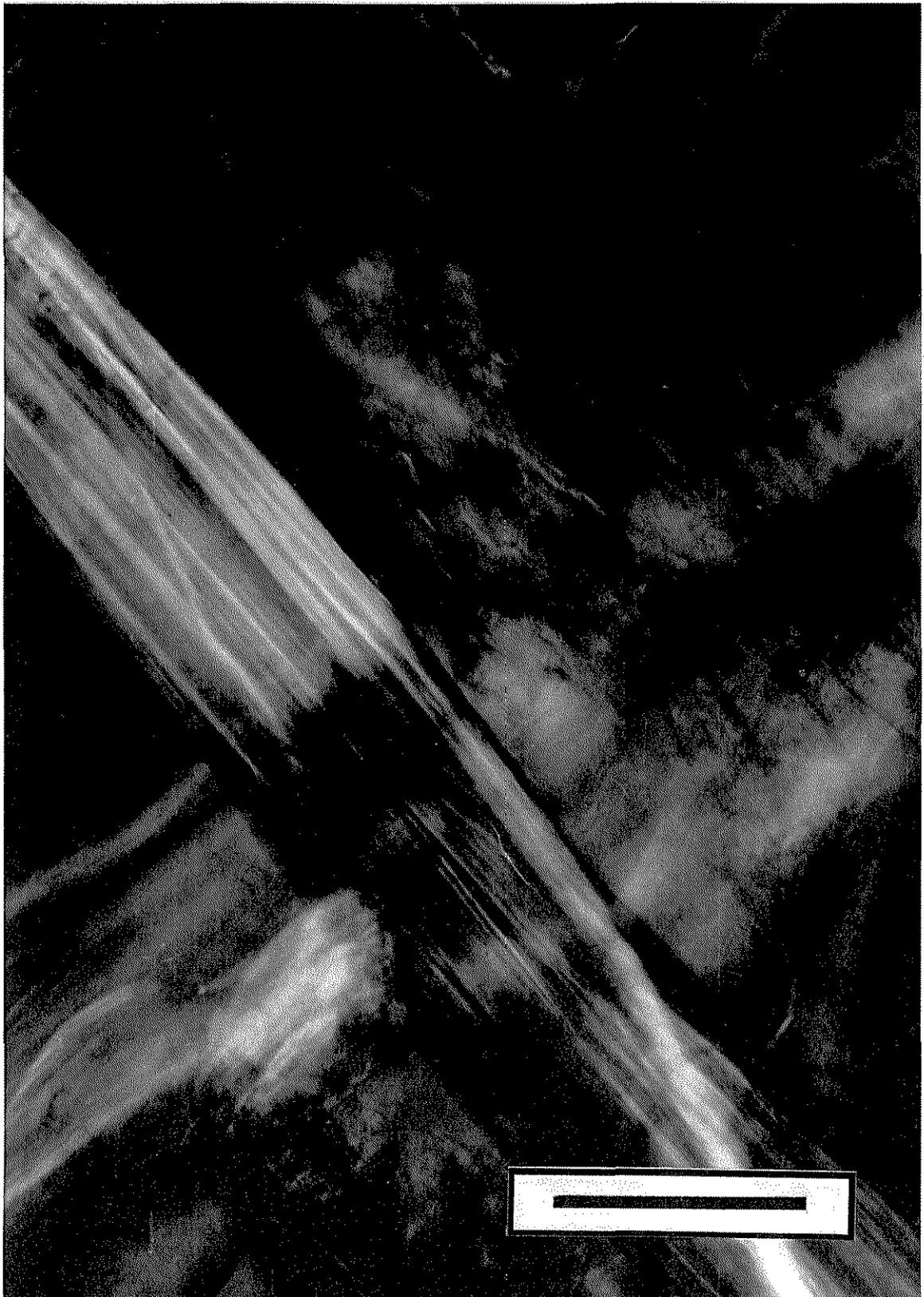


Figura 38. Detalhe de um feixe de fibras de colágeno. (Magnificação 340x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); tempo de diálise 0 hora; concentração média em colágeno 2,85% em peso



Figura 39. Detalhe ampliado do feixe de fibras de colágeno. (Magnificação 1350x. barra 25  $\mu\text{m}$ ); pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); tempo de diálise 0 hora; concentração média de colágeno 2,85% em peso.



Figura 40. Feixe de colágeno desfibrilando (fibrilas). (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 3,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-4}$  M (NaCl); tempo de diálise 4 horas; concentração média em colágeno 1,0% em peso.

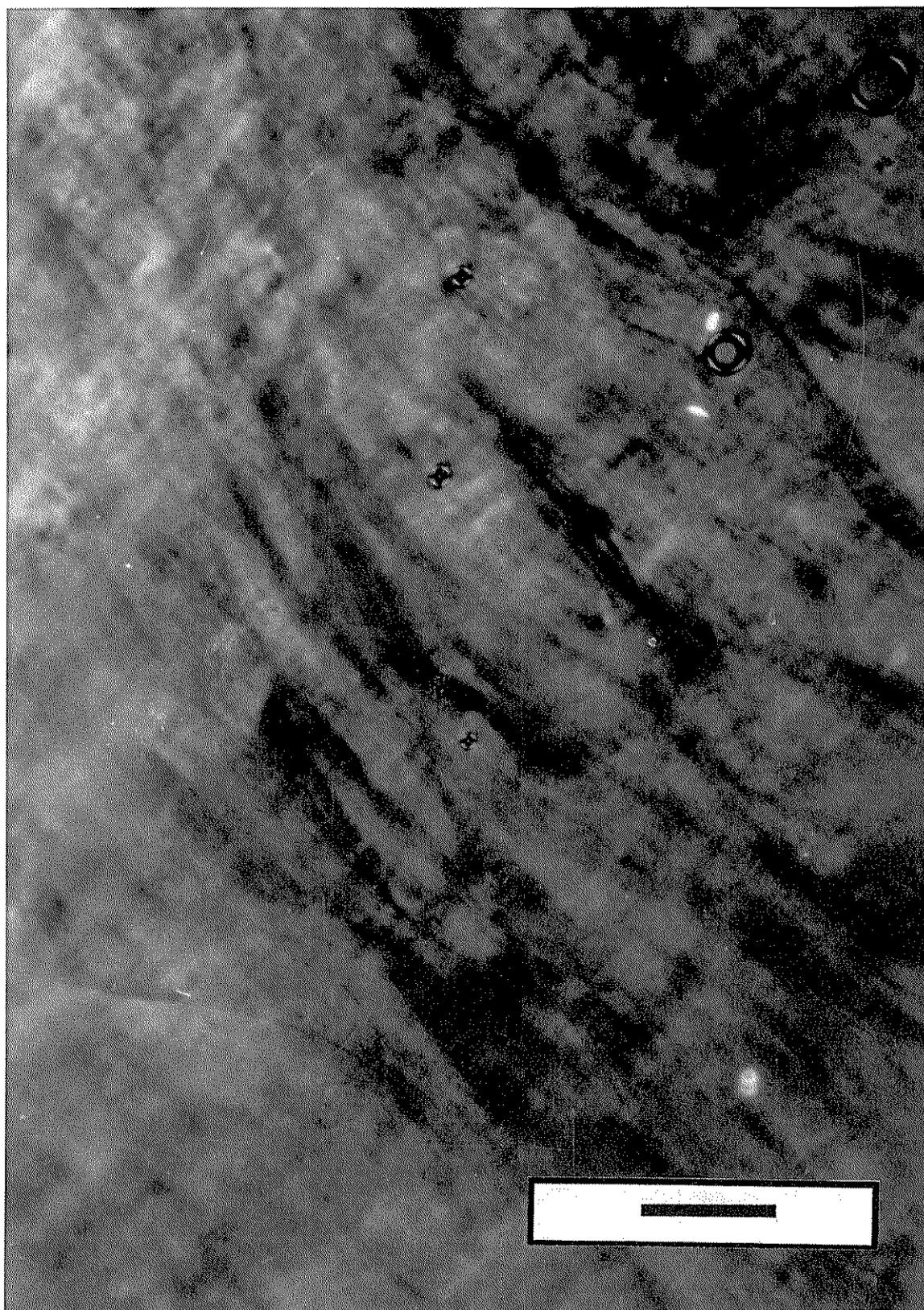
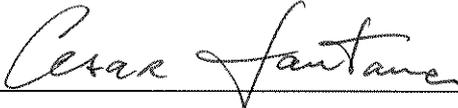


Figura 41. Fibrilas se reorganizando no início da zona isoeétrica do colágeno. (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 4,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-5}$  M; tempo de diálise 8 horas; concentração média em colágeno 1,25% em peso.

**Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo Eng<sup>o</sup> Eduardo José de Arruda e aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 1996.**



---

**Prof. Dr. César Costapinto Santana**

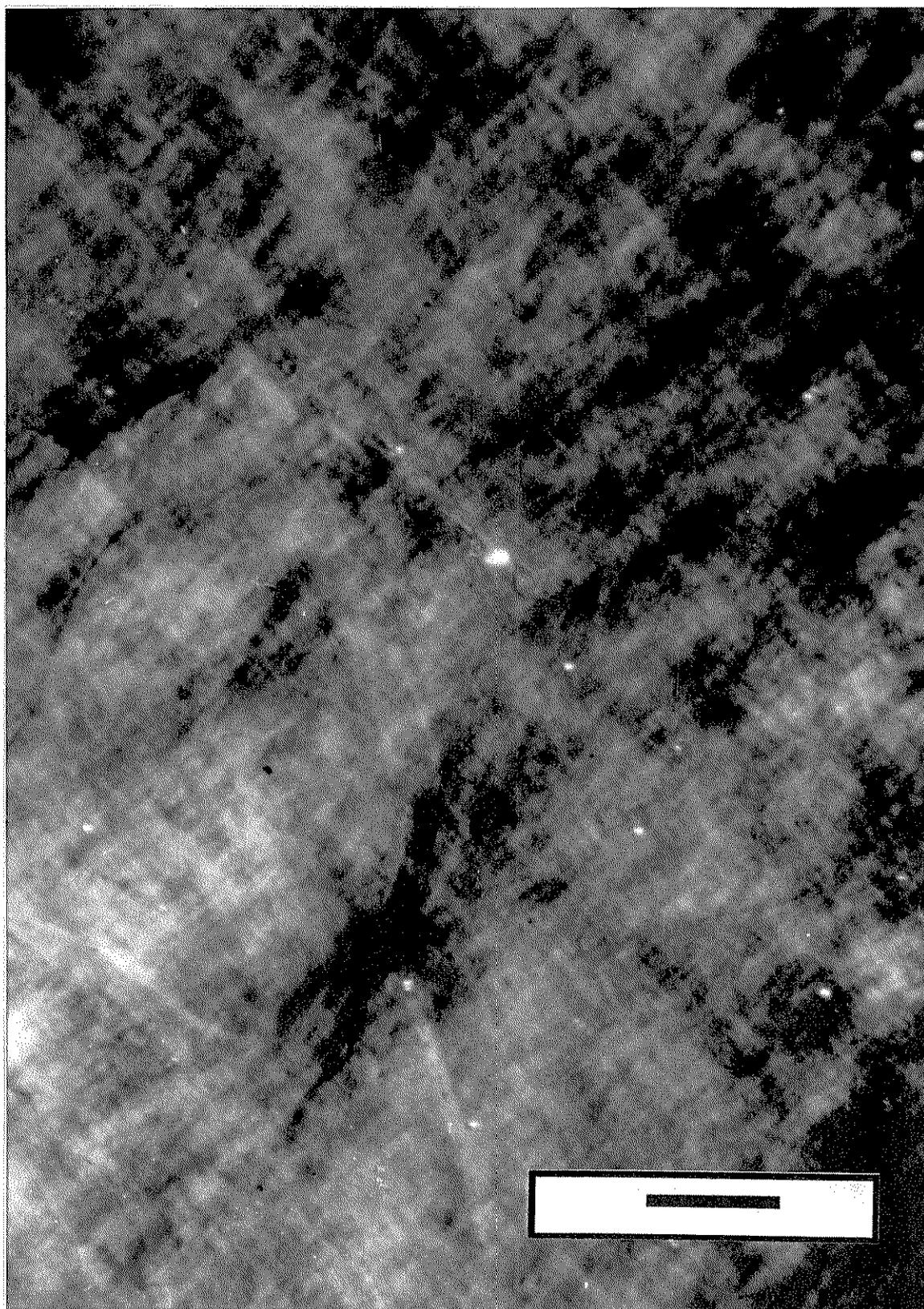


Figura 42. Fibrilas se entrelaçando e iniciando a formação da trama (gel). (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 4,80; força iônica  $85 \cdot 10^{-5}$  M (NaCl); tempo de diálise 12 horas; concentração média em colágeno 1,0% em peso.

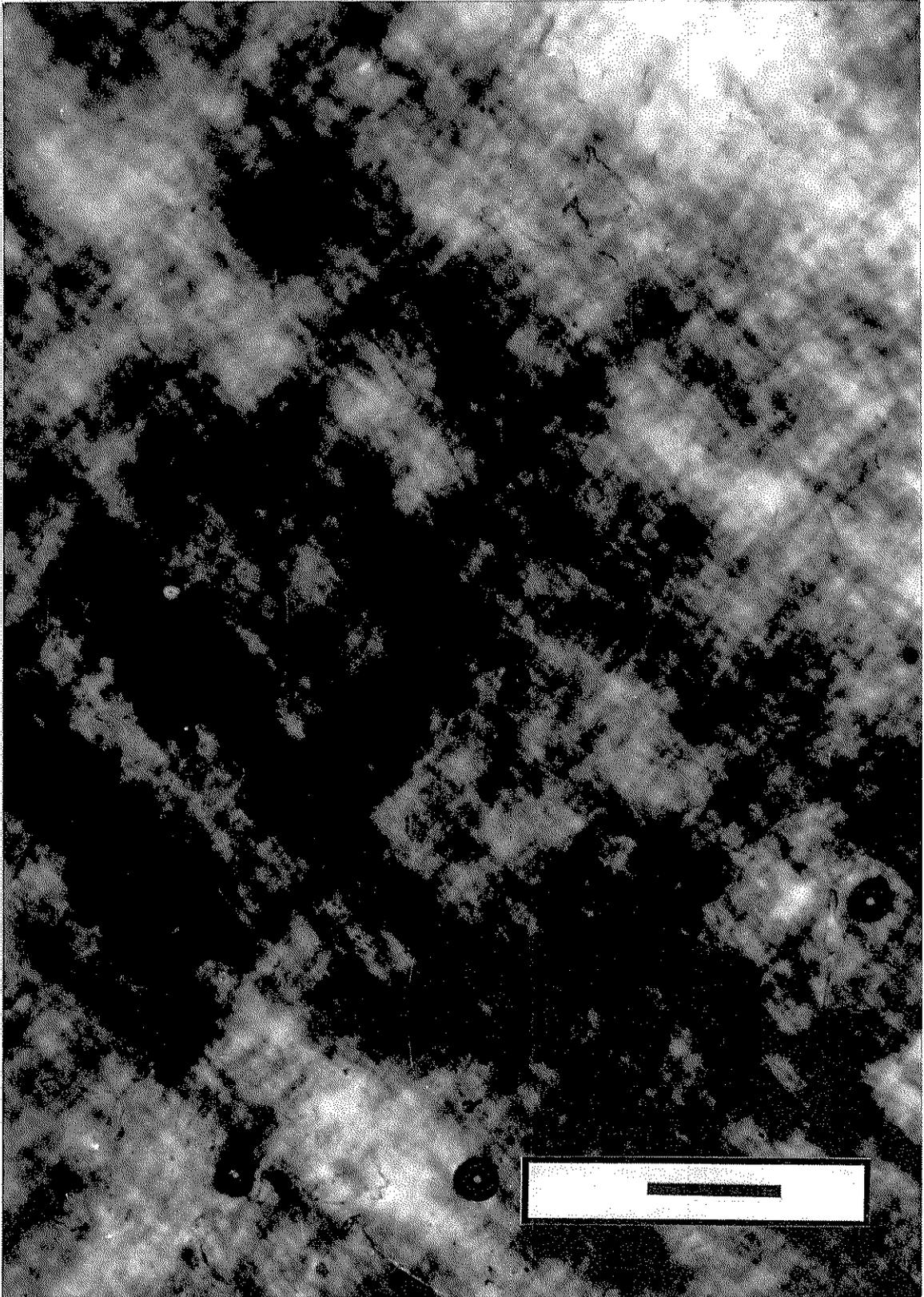


Figura 43. Os feixes começam a se definir, entrelaçam-se e inicia-se a formação de nós. (Magnificação 85x, barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 5,0; força iônica  $85 \cdot 10^{-6}$  M; tempo de diálise 14 horas; concentração média em colágeno 0,75% em peso.

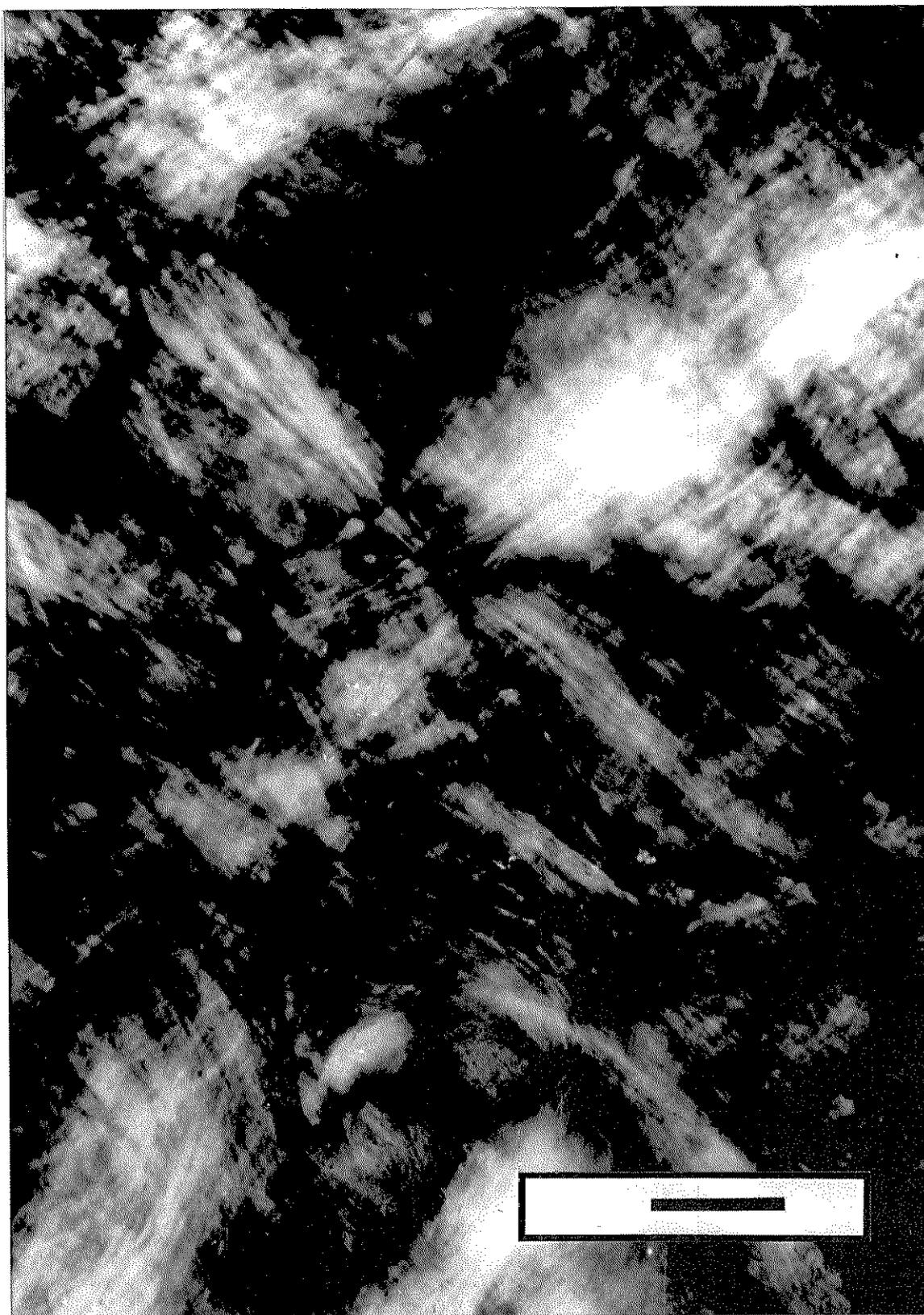


Figura 44. Trama fibrosa estruturada e nós aparentes. (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 5,25; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M (NaCl); tempo de diálise aprox. 15 horas; concentração média em colágeno 1,0% em peso.

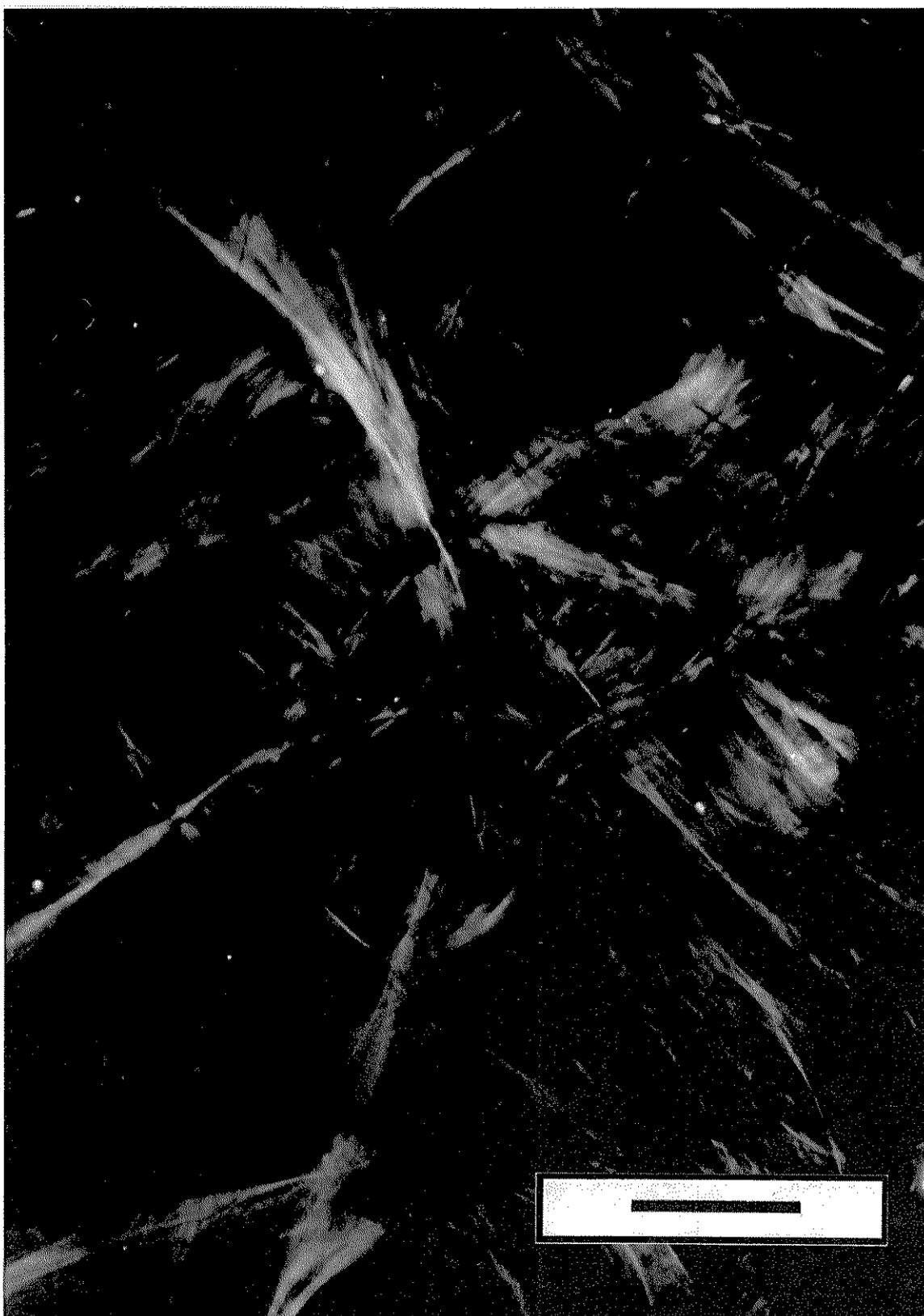


Figura 45. Estrutura tridimensional com feixes de fibras e nós definidos no ponto isoelétrico. (Magnificação 220x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M; tempo de diálise 16 horas; concentração média em colágeno 1,5% em peso.



Figura 46. Detalhe ampliado da estrutura fibrilar formada no ponto isoeletrico. (Magnificação 430x. barra 50 $\mu$ m); pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M (NaCl); tempo de diálise 16 horas; concentração média em colágeno 1,5% em peso.

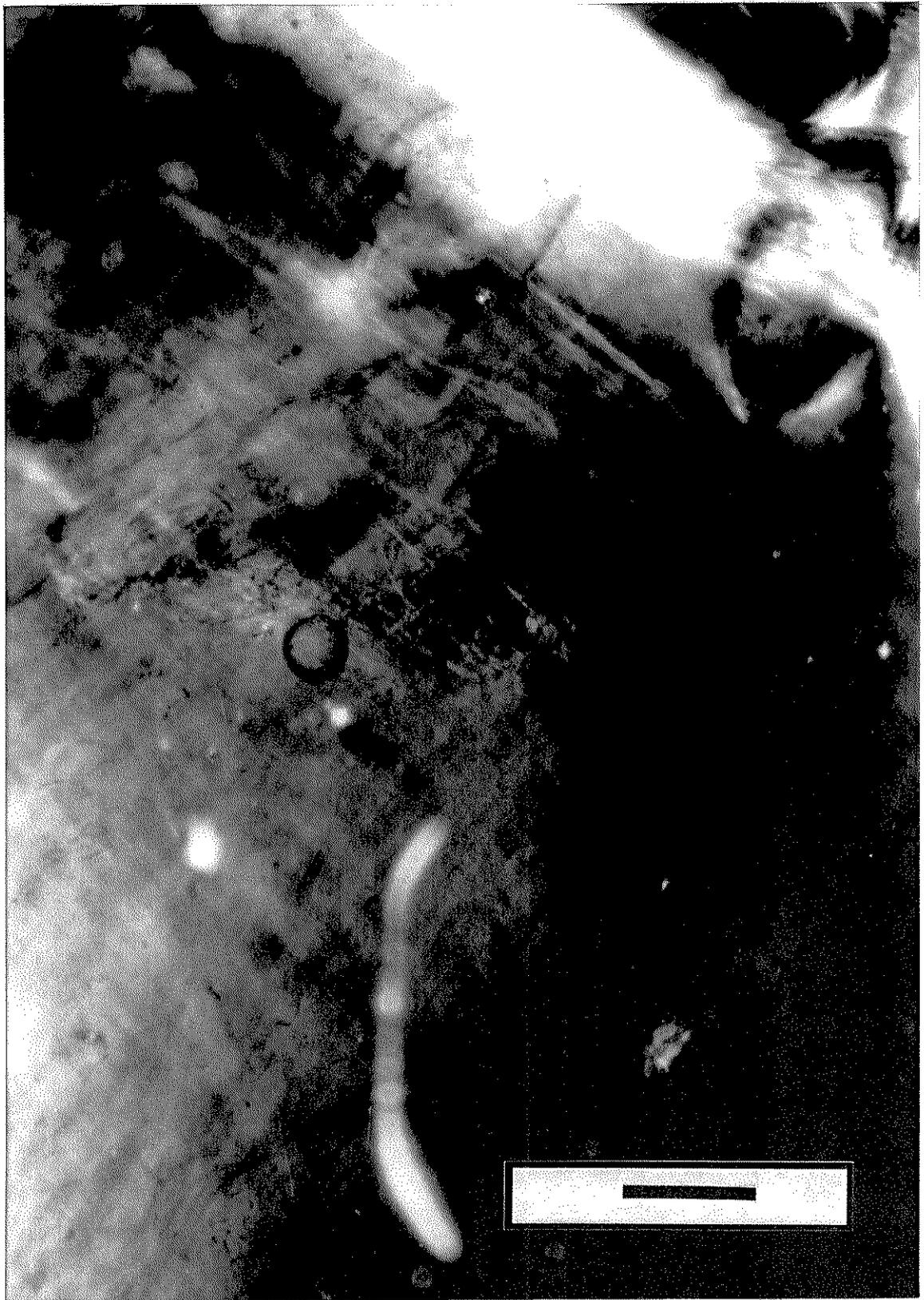


Figura 47. Estrutura fibrilar do gel após extensa diálise. (Magnificação 85x. barra 250  $\mu\text{m}$ ); pH 6,8; tempo de diálise 30 horas; concentração média em colágeno 0,5% em peso.



Figura 48. Detalhe de um nó fibrilar no gel extensamente dialisado. (Magnificação 2365x. barra 10  $\mu\text{m}$ ); pH 6,8; tempo de diálise 30 horas; concentração média em colágeno 0,5% em peso.

A influência do agente (glutaraldeído 0,25% v/v) que provocou a reticulação (“crosslinking”) e alterou as estruturas dos géis pode ser avaliada. O referencial para os géis foi o módulo de rigidez ( $G_2$ ) do modelo de Zener, tomado géis de baixa concentração (0,50%) de colágeno em peso (a fim de reduzir as interações intermoleculares) e frequência de 1 Hertz. A Figura 49 representa a constante  $G$  ( $G_2$ ) ajustadas a partir do modelo de Zener para ambas estruturas nativas e reticuladas.

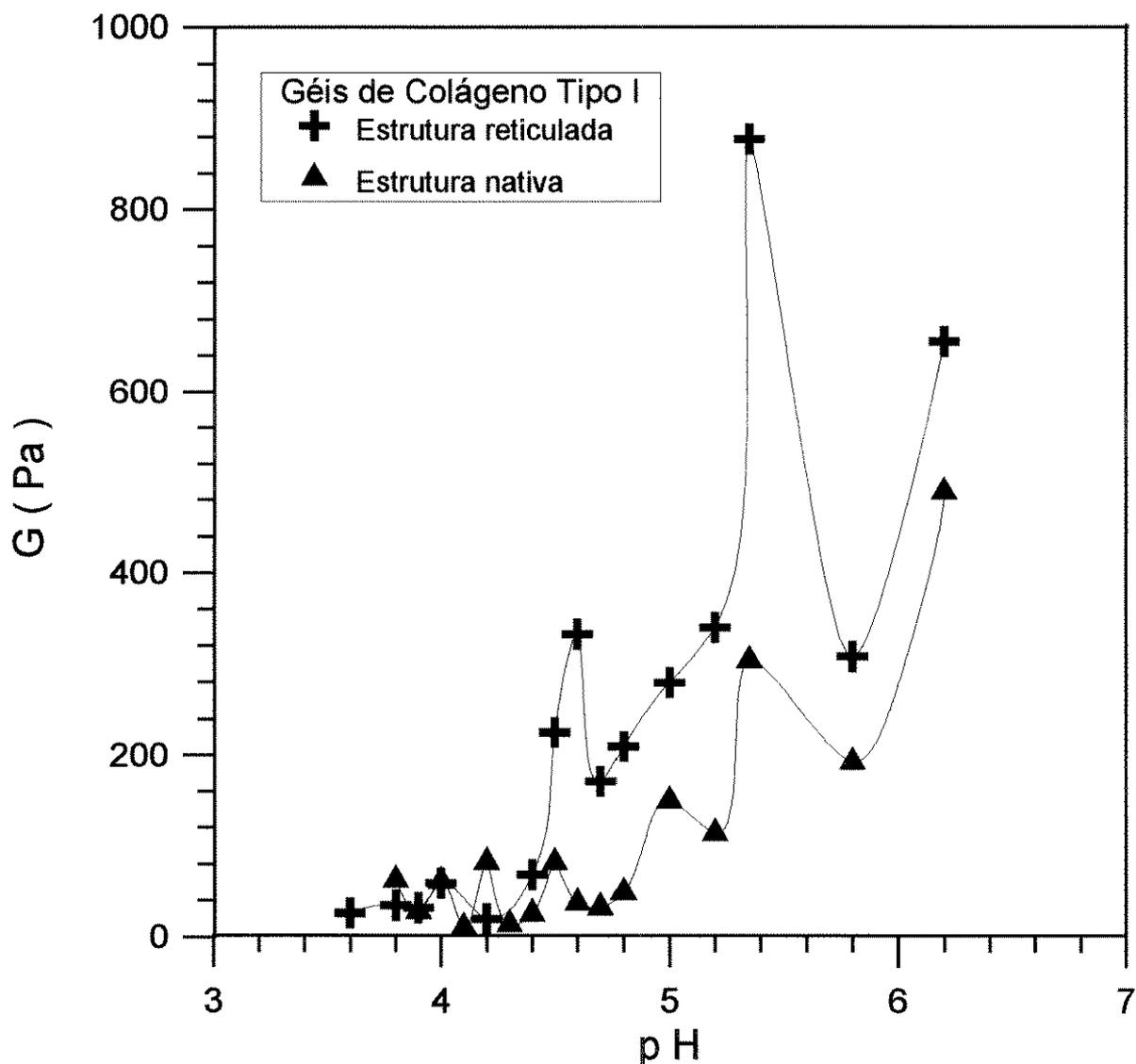


Figura 49. Constante do modelo de Zener ajustadas para os géis.

Os pontos amostrais tomados foram os mesmos em ambos os casos, quer seja estrutura nativa ou reticulada. Pode-se então avaliar as estruturas a partir das mesmas condições de ensaio reológico.

Na Figura 50 tem-se uma suspensão fibrosa reticulada (pH 2,5), nesta situação não houve alteração significativa nos módulos pela reticulação (“crosslinking”) da estrutura nativa.

Nas proximidades do pH 3,5 os feixes estavam totalmente desfibrilados e as fibrilas foram reticuladas. Um resultado que salientou foi que estas fibrilas foram agrupadas pelo agente reticulante, formando feixes. No entanto, apesar desta característica a estrutura formada não mostrou coesão, pois o módulo de rigidez do modelo não aumentou (Figura 49), pelo contrário diminuiu quando comparado ao da estrutura nativa (Figura 51 e 52).

Estruturas da zona isoeletrica (pH 4,5 a pH 7,0) mostraram comportamentos semelhantes, todos os módulos de rigidez das estruturas reticuladas foram superiores em valor aos módulos das estruturas nativas (Figura 49). Pode-se observar que a partir do início desta zona até pH 5,45 todas as estruturas conformadas pelo agente reticulante, mostraram afastamento fibrilar, ou seja, os feixes compostos de fibrilas foram dilatados os nós deformados em variável intensidade (Figura 53 a Figura 58). Este fato justifica o ajuste de maiores concentrações após a reticulação, como se o reticulante impedisse a interação intermolecular, se colocando como obstáculo físico, dispersando as fibrilas dentro do feixe. Observa-se também que os maiores módulos de rigidez em ambas as estruturas ocorreram nos pontos isoeletricos (pH 4,5 e pH 5,45). O que é justificado pelas intensas atrações proteína-proteína nestes pontos, aproximando as estruturas e facilitando a reticulação pelas moléculas do glutaraldeído. Esta reticulação é dependente dos grupos aminos e da polimerização do glutaraldeído.



Figura 50. Suspensão fibrosa precipitada e reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); tempo de diálise 0 hora.

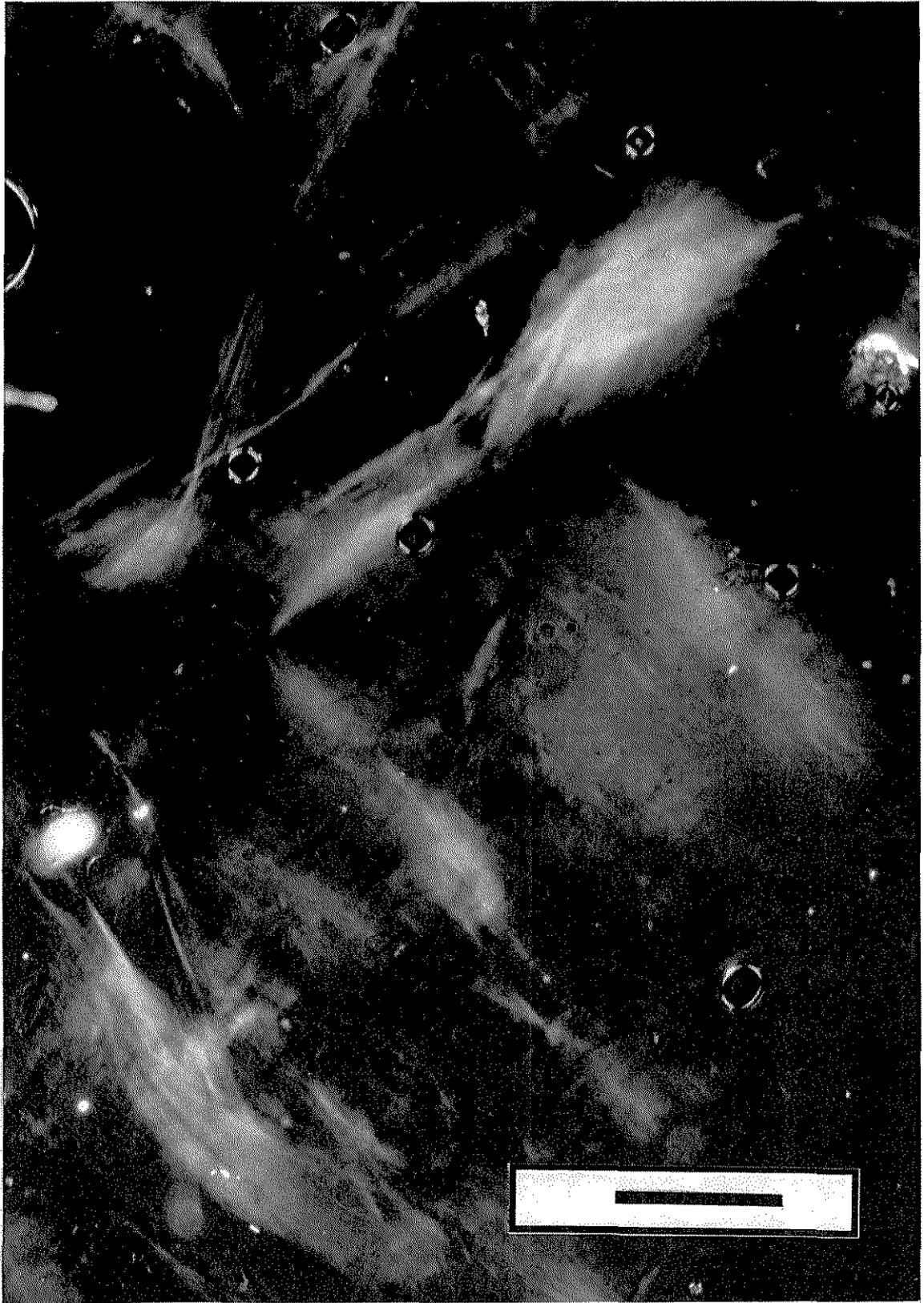


Figura 51. Fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v.(Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 3,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-4}$  M (NaCl); tempo de diálise 4 horas.

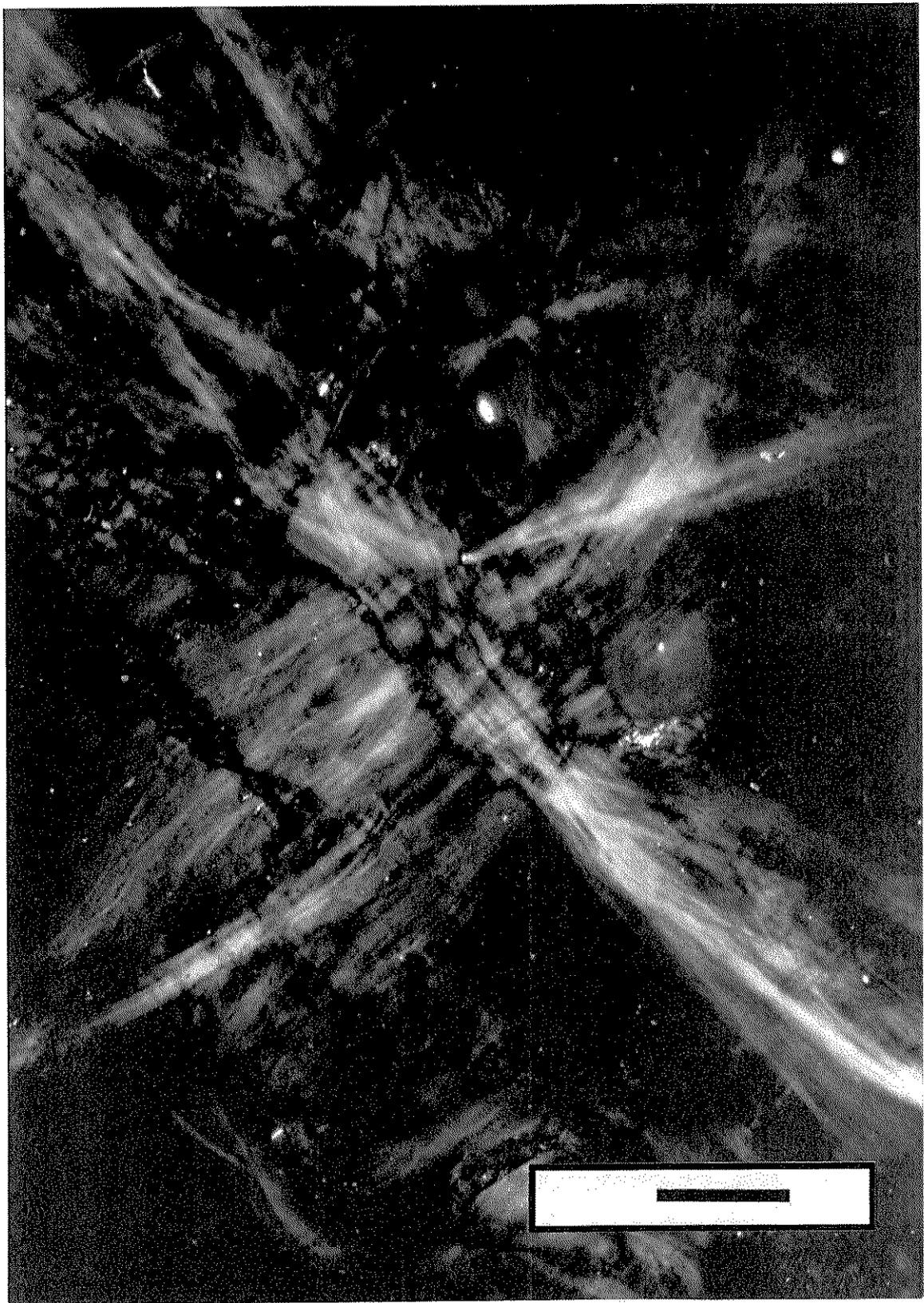


Figura 52. Detalhe ampliado das fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 850x. barra 25  $\mu\text{m}$ ); pH 3,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-4}$  M (NaCl); tempo de diálise 4 horas.

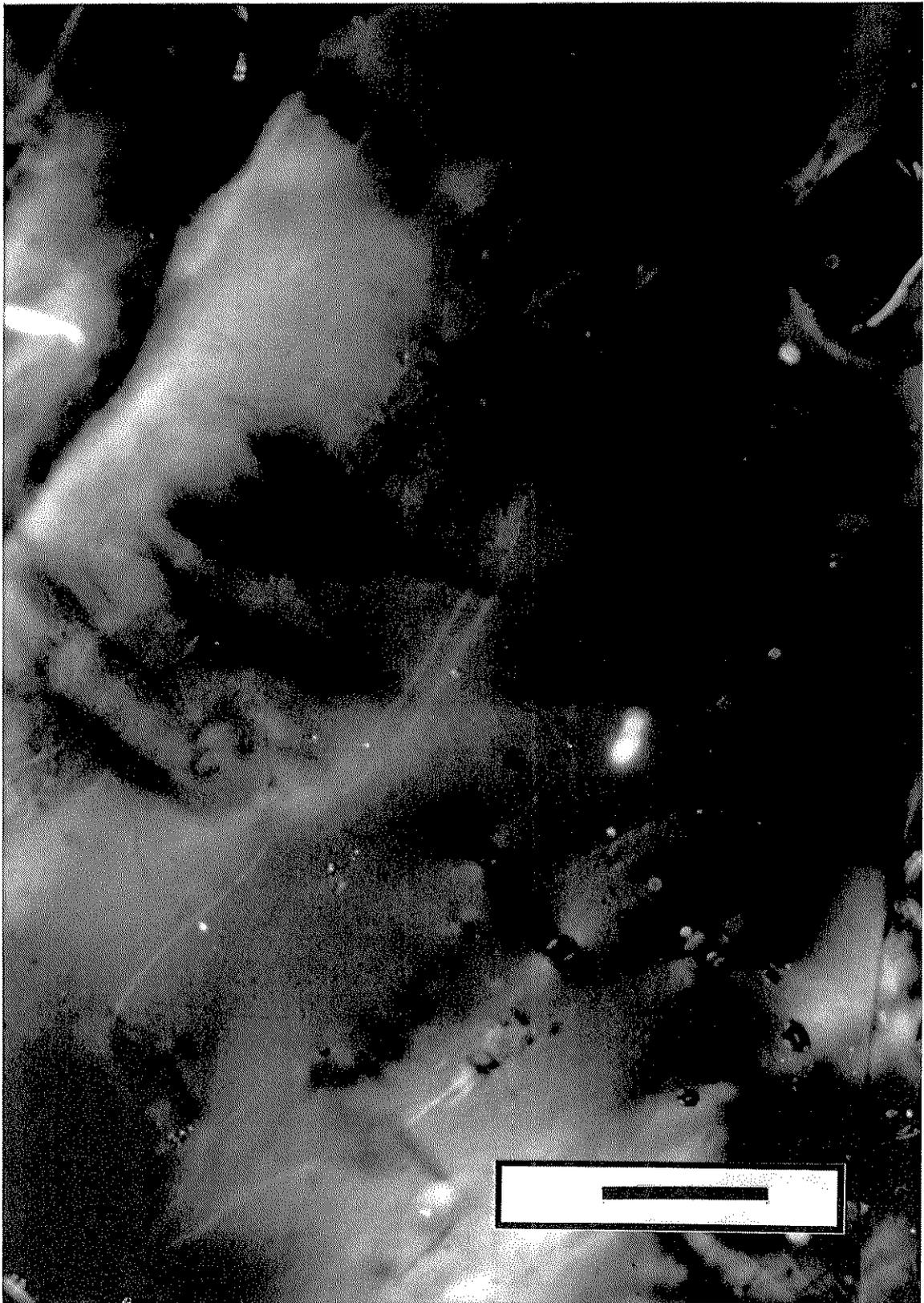


Figura 53. Fibrilas reticuladas (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v, no início da zona isoelétrica. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 4,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-5}$  M (NaCl); tempo de diálise 8 horas.

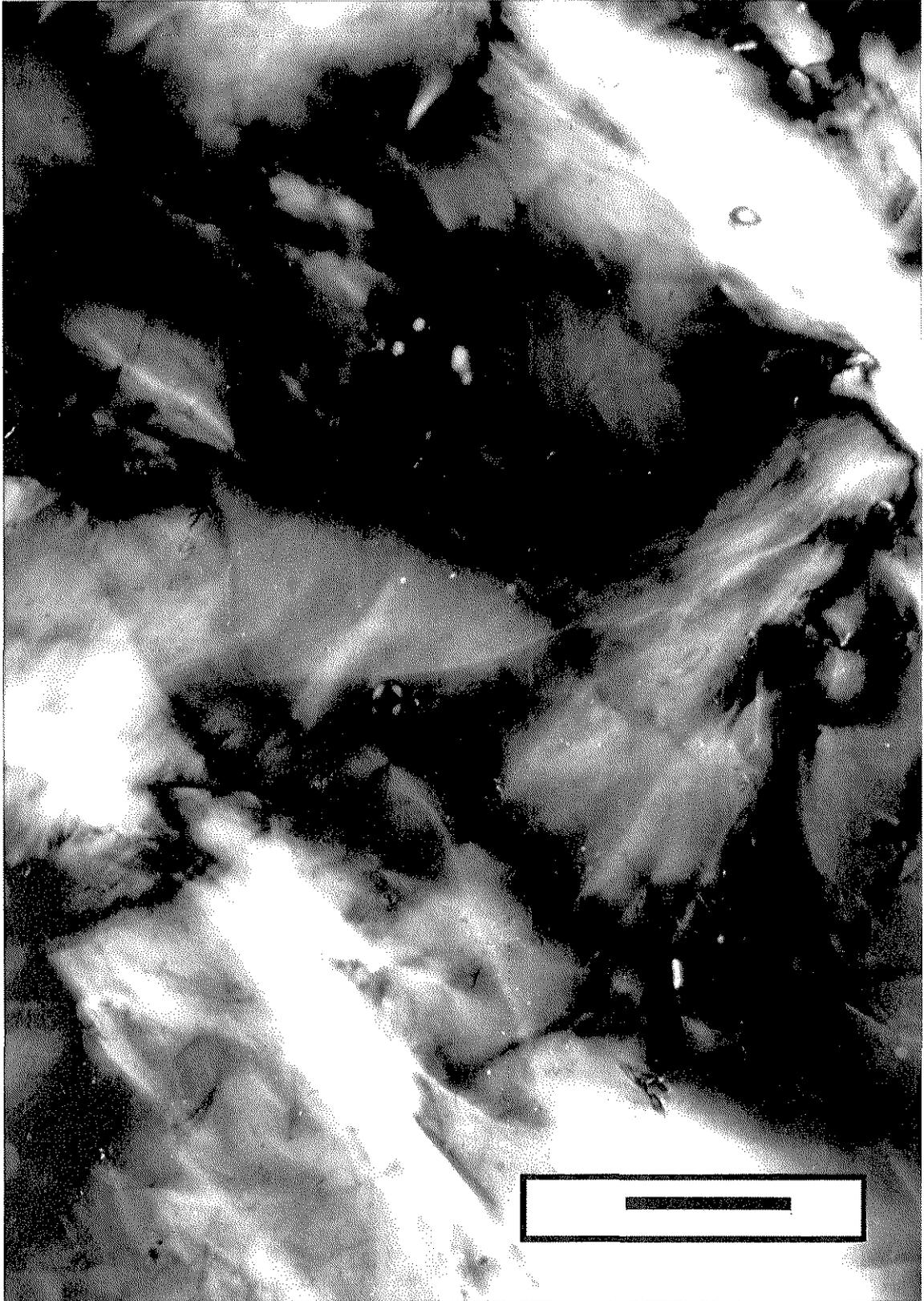


Figura 54. Trama fibrilar reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 4,80; força iônica  $85 \cdot 10^{-5}$  M (NaCl); tempo de diálise 12 horas.



Figura 55. Feixes entrelaçados e nós reticulados (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 5,0; força iônica  $85 \cdot 10^{-6}$  M (NaCl); tempo de diálise 14 horas.



Figura 56. Trama fibrosa com nós reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 5,25; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M (NaCl); tempo de diálise aprox. 15 horas.



Figura 57. Estrutura obtida no ponto isoelétrico e reticulada (“cross-linked”) com glutaraldeído 0,25% v/v. (Magnificação 215x. barra 125  $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M (NaCl), tempo de diálise 16 horas.



Figura 58. Detalhe ampliado do feixe e nó fibrilar no ponto isoeletrico reticulado ("cross-linked") com glutaraldeido 0,25% v/v. (Magnificação 850x. barra 25  $\mu\text{m}$ ); pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M (NaCl); tempo de diálise 16 horas.

## AJUSTE DOS DADOS PARA O MODELO DE ZENER.

A partir dos dados de viscoelasticidade obtidos dos reogramas para os géis nativos e reticuladas (“crosslinking”), pode-se ter informação para análise e predição dos termos do modelo. Em face as dificuldades oferecidas para obtenção das fibras colágenas e controle da concentração de colágeno nos géis. Foram utilizados ensaios, padronizados de modo diferente quanto à drenagem do precipitado, visando à obtenção de diversas concentrações de colágeno nos géis e determinar a sua influência na resposta do modelo ajustado, para um determinado valor de pH e força iônica; cita-se que valores de pH foram aproximados numa faixa de  $\text{pH} \pm 0,1$ . Foram obtidos os valores ( $G'$ ,  $G''$ ,  $\text{Tan } \delta$  e  $\omega$ ) para cada gel numa frequência fixa de 1 Hertz e deformação constante de 15%. Os dados foram substituídos e calculados pela expressão de Zener, pode-se resumir em gráficos (Figura 59 a Figura 70) as constantes de rigidez ( $G_2$  e  $G_1$ ) do modelo para géis “in natura” e “crosslinking” em função da frequência angular ( $\omega$ ).

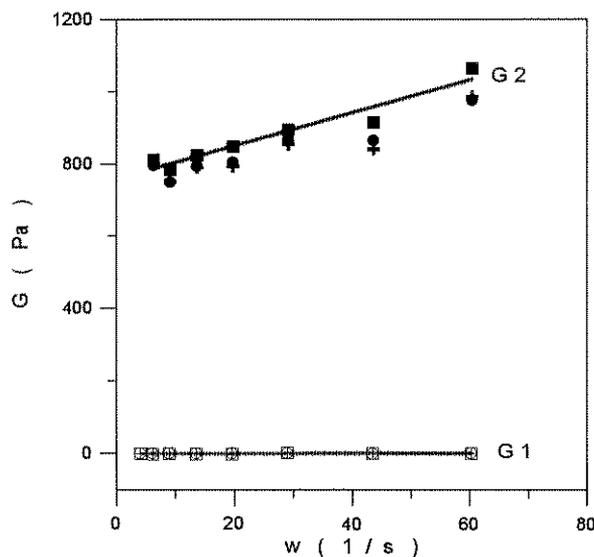


Figura 59. Suspensão precipitada; pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); 0 hora; conc. ●, +, ■ 2,5%.

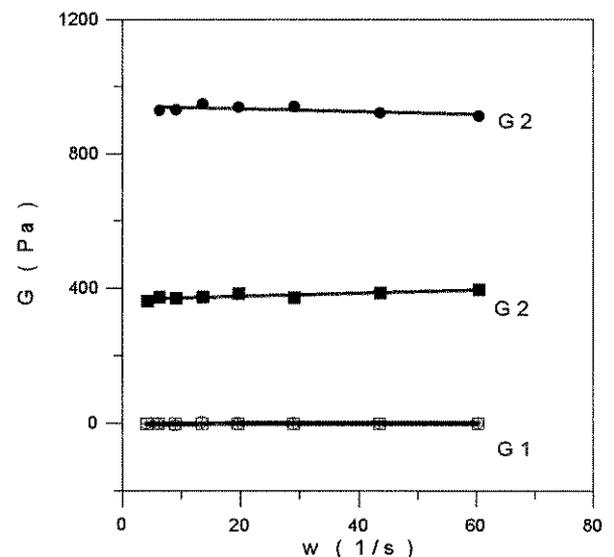


Figura 60. Suspensão reticulada; pH 2,50; força iônica  $85 \cdot 10^{-2}$  M (NaCl); 0 hora; conc. ● 2,5%, ■ 1,0%.

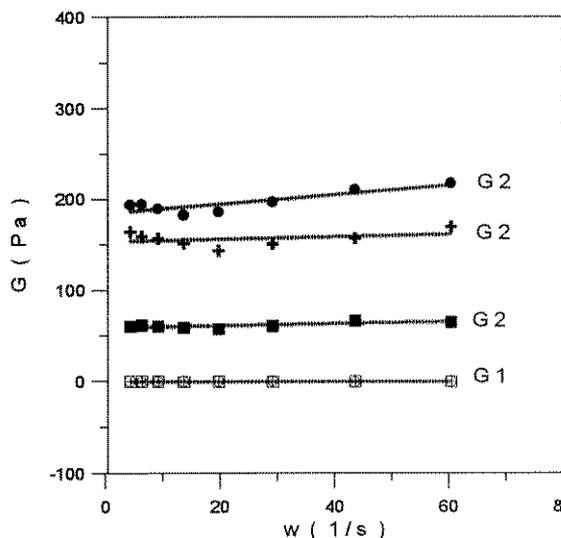


Figura 61. Fibrilas hidratadas, pH 4,0; força iônica  $85 \cdot 10^{-4}$  M; diálise 4 horas; conc. ● 1,2%, + 0,9% e ■ 0,7%.

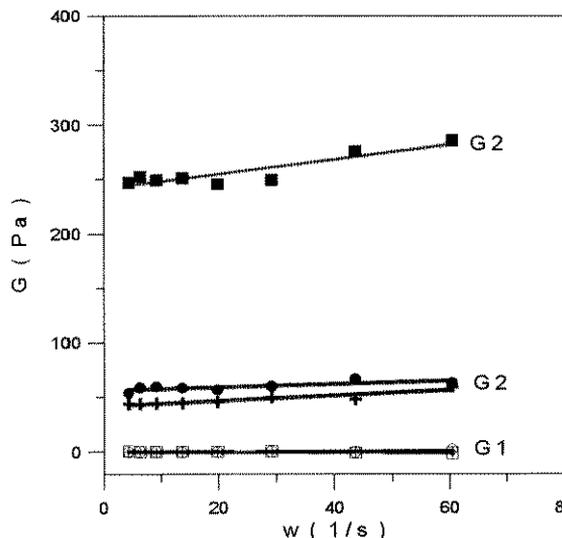


Figura 62. Fibrilas hidratadas, pH 4,0; reticuladas;  $85 \cdot 10^{-4}$  M; diálise 4 horas; conc. ■ 1,2%, ● 0,9% e + 0,7%.

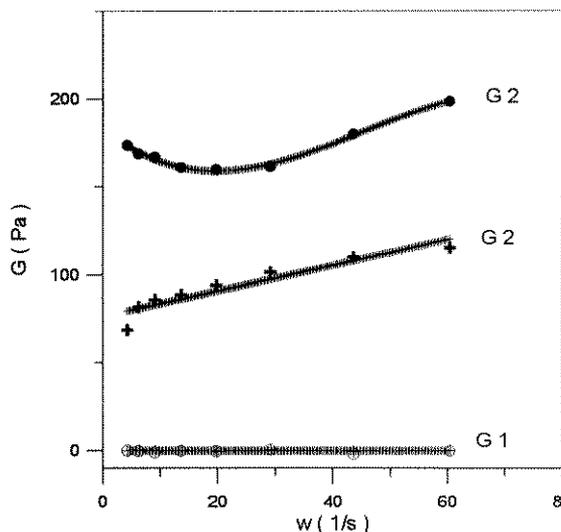


Figura 63. Fibrilas na zona isoelétrica, pH 4,5; força iônica  $85 \cdot 10^{-5}$  M; diálise 8 horas; conc. ● 0,8%, + 0,5%.

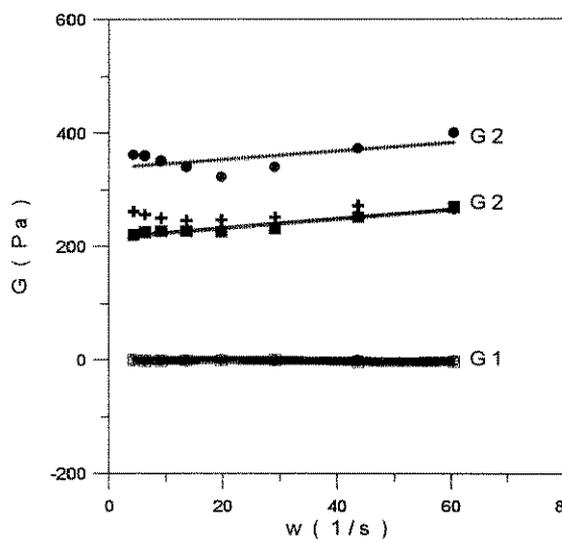


Figura 64. Fibrilas na zona isoelétrica, pH 4,5; reticuladas;  $85 \cdot 10^{-5}$  M; diálise 8 horas; conc. ● 1,0%, + 0,8% e ■ 0,5%.

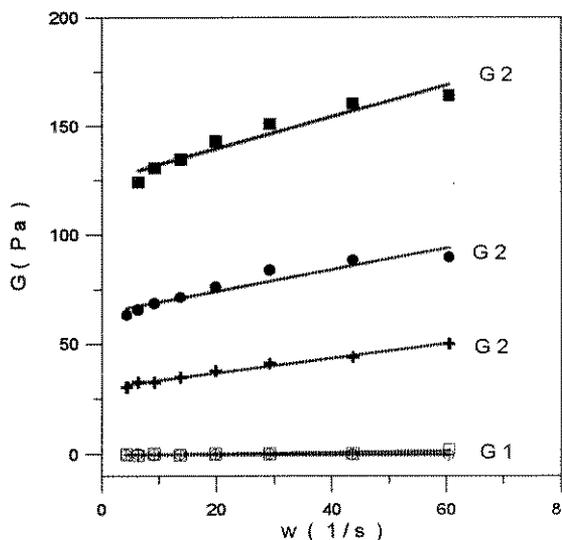


Figura 65. Tramas em formação; pH 4,8 ; força iônica  $85.10^{-5}$  M; diálise 12 horas; conc. ■ 1,0%, ● 0,8% e + 0,5%.

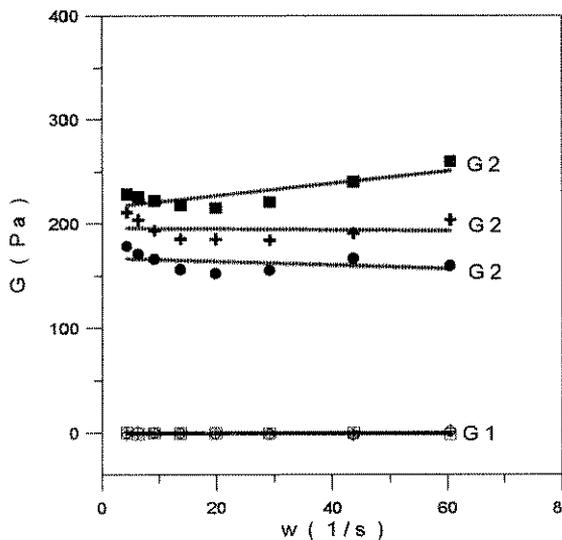


Figura 66. Tramas em formação, pH 4,8 ; reticuladas;  $85.10^{-5}$  M; diálise 12 horas; conc. ■ 1,0%, + 0,7% e ● 0,5%.

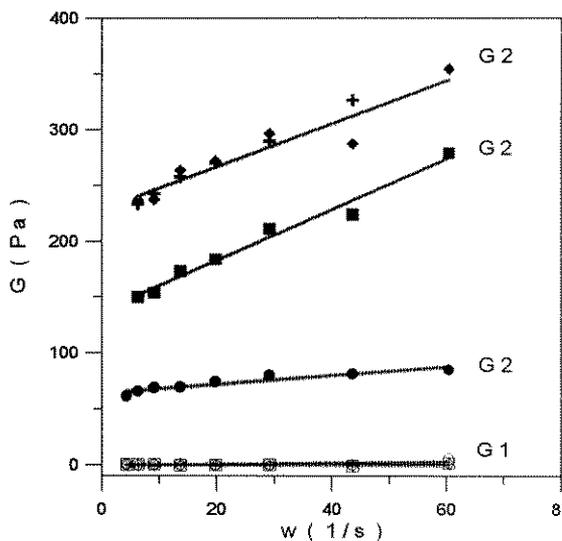


Figura 67. Tramas, feixes e nós; pH 5,0;  $85.10^{-6}$  M; diálise 14 horas; conc. +, ◆ 1,0%, ■ 0,7% e ● 0,5%.

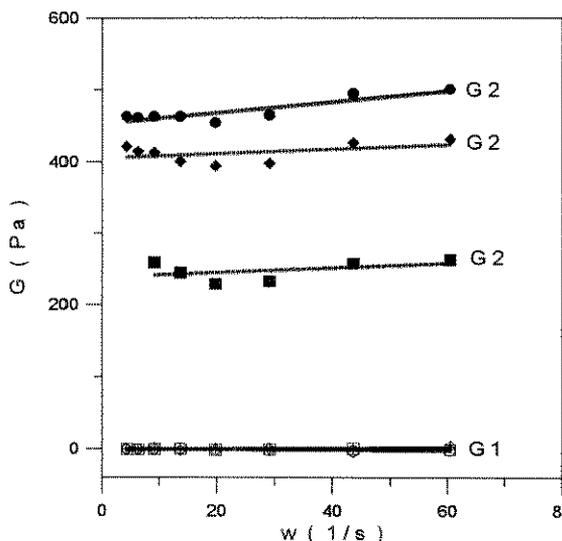


Figura 68. Tramas, feixes e nós reticuladas; pH 5,0;  $85.10^{-6}$  M; diálise 14 horas; conc. ● 1,2%, ◆ 1,0%, ■ 0,4%.

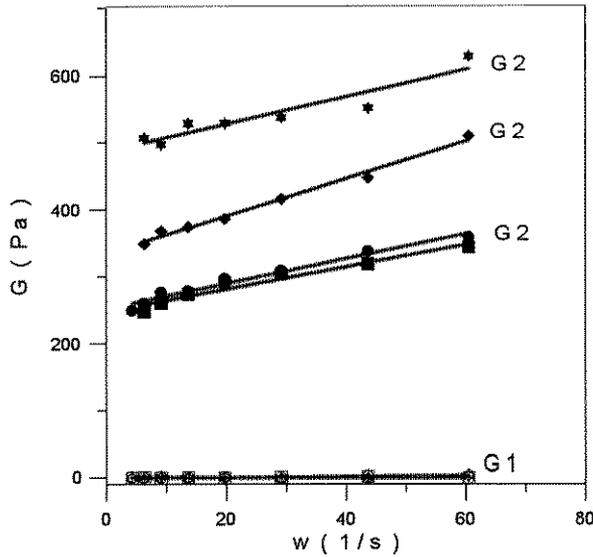


Figura 69. Estrutura no pI; pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M; diálise 16 horas; conc.  $\star$  1,2%,  $\blacklozenge$  1,0%,  $\bullet$ ,  $\oplus$ ,  $\blacksquare$  0,8%.

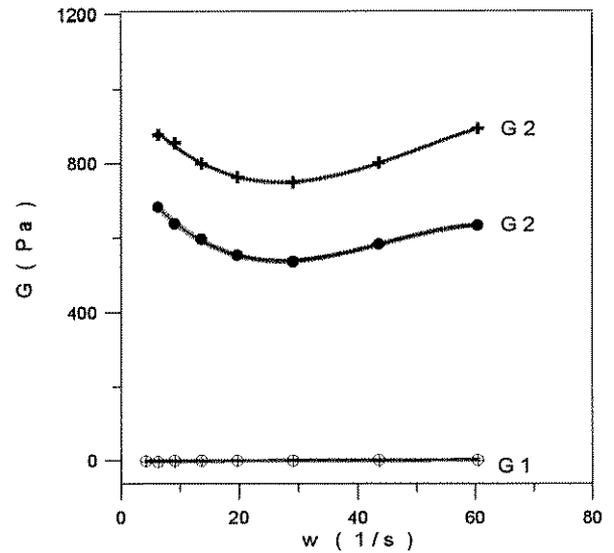


Figura 70. Estrutura no pI e reticulada; pH 5,45; força iônica  $85 \cdot 10^{-7}$  M; diálise 16 horas, conc.  $\bullet$  0,9% e  $\oplus$  0,8%.

Pode-se concluir, a partir dos ajustes gráficos realizados pelo modelo de Zener para os módulos elástico e viscoso, que as estruturas dos géis de colágeno “in natura”, a baixa concentrações (menor que 1% em peso de colágeno - mais precisamente, de um modo geral, em torno de 0,50% em peso), podem-ser ajustadas pelo modelo de Maxwell (Zener com  $G_1$  igual a zero), ficando expresso como:

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

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

para concentrações na faixa de 1% até 2,5% em peso de colágeno, o módulo de rigidez dos géis ( $G_2$ ) segue um comportamento linear ( $A\omega+B$ ), excetuando o pI (pH 4,50 (aparente) e pH 5,45), e os módulos elástico e viscoso podem ser expressos por:

$$G'(\omega) = \frac{[(A\omega + B) + G_1](\omega\lambda)^2 + G_1}{[1 + (\omega\lambda)^2]}$$

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

$$\lambda = \frac{1}{\omega \cdot \tan \delta}$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Nos géis reticulados (“cross-linked”) pode-se estabelecer que até 1,25% em peso de colágeno nos géis pode ser ajustado pelo modelo de Maxwell, em razão do glutaraldeído se interpor entre as fibras do feixe reduzindo as interações microfibrilares. Excetuando-se apenas os pontos isoelétricos (pH 4,5 (aparente) e pH 5,45) em razão das fortes interações fibrilares nestes pH(s), no qual o “crosslinking” não foi efetivo para realizar e manter a separação fibrilar e possibilitar o ajuste do modelo proposto. Houve indicações pelos módulos  $G'$  e  $G''$  que o modelo de Kelvin-Voigt possa ser tentado com algum sucesso.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- As fibras de colágeno possuem uma elevada capacidade de auto-agregação, iniciando-se pela formação de microfibrilas que se agregam em unidades cada vez maiores, as quais coalescem progressivamente para a formação de fibras com elevada cristalinidade e estas, sob condições variáveis - aumento de pH e diminuição da força iônica, conduzem à formação de estruturas com arquiteturas distintas.

- Ao longo da diálise, as estruturas nativas mostraram que, apesar de variar em magnitude nos módulos  $G'$  e  $G''$ , houve sempre maior elasticidade ( $G'$  é superior a  $G''$ ). O que sugere nos pré-géis e géis a presença de microfibrilas e/ou fibras, durante toda a diálise, em arranjos distintos.

- A hidratação fibrilar foi variável durante a diálise e possibilitou a avaliação do pI em pH 4,5 - deslocado pela força iônica - e pH 5,45. Antes da formação de cada uma destas estruturas - pontos isoelétricos, observou-se uma intensa hidratação e desorganização fibrilar.

- O enrijecimento das fibras pelo ensaio reológico (varredura de frequência), pode ser avaliado pela formação de platô no reograma e por birrefringência. A camada de hidratação das microfibrilas e a estrutura foram afetadas no ensaio, o que dificultou a modelagem dos géis nas frequências mais altas. Nos ensaios dos géis protéicos manifestaram-se “heterogeneidades”, como função do elevado conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos do colágeno.

- Em geral, pode-se afirmar que foi possível efetuar ajustes para modelos simples como o de Maxwell ou modelo modificado a partir do modelo de Zener para os géis estudados. Os maiores desvios ocorreram para o géis “crosslinking” nos pontos isoelétricos (pH 4,5 e pH 5,45). Nos pI(s) foram encontradas os maiores teores de colágeno, consequência das intensas interações microfibrilares. O reticulado tridimensional formado no pI acentuou a rigidez, o que impediu o deslizamento das fibras e dificultou o ajuste dos modelos propostos.

- A reticulação (“crosslinking”) não promoveu um aumento de ordenação nas estruturas originais dos géis nativos, mas desorganizou-as e, deste modo amenizou as interações hidrofóbicas. Os ajustes dos modelos mecânicos, mesmo a concentrações e frequências elevadas, puderam ser realizados.

A consequência da polimerização do glutaraldeído pode ser observado, por meio das micrografias, pelo distanciamento microfibrilar provocado nas estruturas dos géis, concordando com a previsão do comportamento biomecânico da fibra quanto ao seu diâmetro “in vivo”.

## RECOMENDAÇÕES

Estudar o efeito da temperatura sobre as estruturas dos géis.

Modelagem reológica no pI (testar Kelvin-Voigt)

Avaliar os estados organizacionais dos géis para confecção de lentes de contato, fabricação de córnea, tecidos com resistência unidirecional, tendões, etc (pH 4,5) peles e esponjas colagênicas (pH 5,0); como também pH(s) próximos aos pI (pH 5,45) para a base protéica utilizada para deposição mineral e constituição de ossos artificiais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cations salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, v.23, p.5912-5923, 1984.
- BLASS, A. *Processamento de polímeros*. 2º ed. Florianópolis. Ed. da UFSC, 1988. p.1-7.
- BOULIGAND, Y.; DENEFFLE, J. P.; LECHAIRE, J. P.; MAILLARD, M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures. *Biol. Cell*, v.54, nº 2, p.143-162, 1985.
- BRODSKY, B.; ELKENBERRY, E.F. Characterization of fibrous forms of collagen. *Methods in Enzymology*, v.82, p.127-174, 1982.
- BUECHE, F. *Physical properties of polymers*. New York, Interscience Publishers, 1962.
- BULL, H.B.; BREESE, K. Protein solubility and the lyotropic series of ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.202, nº 1, p.116-120, 1980.
- BURJANADZE, T.V. Thermodynamic substantiation of water-bridged collagen structure. *Biopolymers*, v.32, p.941-949, 1992.
- BUTZOW, J.J.; EICHHORN, G. Physical chemical studies on the age changes in rat-tail tendon collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, v.154, p.208-219, 1968.
- CAPALDI, M.J.; CHAPMAN, J.A. The C-terminal extrahelical peptide of type I collagen and its role in fibrillogenesis in vitro. *Biopolymers*, v.21, p.2291-2313, 1982.

- CARVALHO, H.F. Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *J. Theor. Biol.* , v.172, p.293-297, 1995.
- CARVALHO, H.F.; VIDAL, B.C. The unique fibrillar arrangement of the bullfrog pressure-bearing tendon as an indicative of great functional deformability. *Biol. Cell*, v.82, p.59-65, 1994.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. Amino acids, peptides, and proteins. in: *Food Chemistry*. (ed.) Fennema, O.R. 2° ed. New York, Marcel Dekker, Inc., 1985. p.245-369.
- CHEUNG, D.T.; NIMNI, M.E. Mechanism of crosslinking of proteins by gluteraldehyde I: reaction with model compounds. *Connect. Tissue Res.* , v.10, p. 187-199, 1982.
- DICKERSON, R.E.; GEIS, I. *The structure and action of proteins*. New York, Harper & Row, Publishers, 1969. p.40-43
- DOI, M. Basic principle in the viscoelasticity of polymeric liquids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, v.23, p.151-162, 1987.
- DOI, M. Rotational relaxation time of rigid rod-like macromolecule in concentrated solution. *Le Journal de Physique*, v.36, p.607-611, 1975.
- EILLET, R.; GULL, K. Gluteraldehyde - its purity and stability. *Histochemie*, v.3, p.162 - 167, 1972.
- ELIAS, H.G., *Macromolecules*. New York, Plenum Press, 1977. p.3-73
- ELIAS, H.G., *Mega molecules*. Berlin, Springer-Verlag, 1987. 171p.
- ENGLARDS, S.; SHEIFTER, S. Precipitation techniques. *Methods in Enzymology*, v.182, p.285-300, 1990.

- EVERETT, D.H. *Basic principles of colloid science*. Papers of Royal Society of Chemistry, London, 1988.
- FARFÁN, J. A. *Química de proteínas*. 2º ed. Campinas, Ed. da Unicamp, 1994.134p.
- FERRY, J.D. *Viscoelastic properties of polymers*. 3º ed. New York, John Wiley & Sons, 1980. 641p.
- FUKADA, E.; DATE, M. Viscoelastic properties of collagen solutions in dilute hydrochloric acid. *Biorheology*, v.1, p.101-109, 1963.
- GELMAN, R.A et al. Collagen fibril formation “in vitro”: the role of nonhelical terminal regions. *J. Biol. Chem.* , v.254, nº 22, p.11741-11745, 1979.
- GOES, J. C.; GOISSIS, G. Estudo viscosimétrico de suspensões fibrilares de colágeno na presença de ramsana. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Polímeros. Associação Brasileira de Polímeros. v.2, p.686-689, Rio de Janeiro, 1995.
- GOLOMB, G.; BARASHI, A.; WAGNER, D.; NAHCMIAS, O. In vitro and in vivo models for study of relationship between hydrophilicity and calcification of polymeric and collagenous biomaterials. *Clinical Materials*, v.13, nº 1-4, p.61-69, 1993.
- GRABAR, P.; MOREL, J. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, v.32, p. 630-643, 1950.
- GUSTAVSON, K.H. *The chemistry and reactivity of collagen*. New York, Academic Press, 1956. 323p.
- HAAG, J. *Introduction to elasticity*. Haake Information. Karlsruhe, Haake Messtechnik GmbH u Co.1990. 20p.

- HAAKE MESS-TECHNIK Gmbh u Co. *A general introduction to the theory of forced oscillation*. Karlsruhe, Haake Information Reporter V92-47E , 1992. 14p.
- HENRI, F.; NESTLER, M.; HVIDT, S.; FERRY, J.; VEIS, A.. Flexibility of collagen determined from dilute solution viscoelastic measurements. *Biopolymers*, v.22, p.1747-1758, 1983.
- HERMANSSON, A.M. Physico-chemical aspects of proteins structure formation. *J. Texture Stud.* , v.9, p.33-58, 1978.
- HOLLAND, D. Measuring and interpreting the rheological properties of cosmetics products. *Rheology* 91, p.108-112, junho/1991.
- JANMEY, P.A. et al. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *The Journal of Cell Biology*, v.113, n°1, p.155-160, 1991.
- KAMPHUIS, H.; JONGSCHAAP, J.J. The viscoelastic behaviour of heat-set ovalbumin gels explained in terms of transient-network model. *Journal of Rheology*, v.29, n°6, p.685-708, 1985.
- KOPPLE, K.D. *Peptides and aminoacids*. New York, W.A. Benjamin, Inc, 1966.137p.
- KUHN, K. Relationship between amino acid sequence and higher structures of collagen. *Connect. Tissue Res.*, v.10, p.5-10, 1982.
- LAZAREV, Y.A.; GRISHKOVSKY, B.A.; KHROMOYA, T.B.; LAZAREVA, E.V.; GRECHISHKO, V.S. Bound water in collagen-like triple-helical structure. *Biopolymers*, v.32, p.189-195, 1992.

- LIGHT, N.D.; BAILEY, A.J. Covalent cross-links in collagen. *Methods in Enzymology*, v.82, p.360-372, 1982.
- MAEDA, T.; TAKASAKI-OHSITA, M.; SATOH, K.; KIMURA, M. Dynamic light scattering study of monodisperse collagen in the less-dilute regime. Proceedings of SPIE - International Society for Optical Engineering, Society of Photo-Optical Instrumentation, v.1884-1993, 1993.
- MALAMUD, D.; DRYSDALE, J. Isoelectric points of protein: A table. *Analytical Biochemistry*, v.86, p.6-20, 1978.
- MANDELKERN, L. *An introduction to macromolecules*. 2° ed. New York Springer-Verlag, 1983.157p.
- McPHIE, P. Dialysis. *Methods in Enzymology*, v.22, p.23-32, 1971.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; VALDRIGHI, L. Anisotropy and isoelectrical point determinations on collagen bundles of rat periodontal fibers. *Histochemistry*, v.42, p.163-174, 1974.
- METZNER, A. B. Rheology of suspensions in polymeric liquids. *Journal of Rheology*, v.29, n°6, p.739-775, 1985.
- MEYER, L.H. *Food chemistry*. West Port, The Avi Publishing Company, Inc., 1975. p.115-129.
- MILLER, E.J.; RHODES, B.K. Preparation and characterization of different types of collagen. *Methods in Enzymology*, v.82, p.33-63, 1982.
- MORRISON, R.; BOYD, R. Química Orgânica. 12° ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p.1345-1361, 1985.
- NA, G.C.; PHILLIPS, L.J.; FREIRE, E.I. In vitro collagen fibril assembly: thermodynamic studies. *Biochemistry*, v.28, n° 18, p.7153-7160, 1989a.

- NA, G.C. Monomer and oligomer of type I collagen molecular properties and fibril assembly. *Biochemistry*, v.28, n° 18, p.7161-7167, 1989b.
- NELSON, C.D.; GLATZ, C.E. Primary particle in protein precipitation. *Biotech. Bioeng.*, v.27, p.1434-1444, 1985.
- NÉMETHY, G. Hydrophobic interactions. *Angewandte Chemie International Edition*. v.6, n° 3, p.195-280, 1967.
- NINMI, M.E.; CHEUNG, D.T.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. in: *Collagen*. (ed.) Ninmi, M.E.; Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1988. p.1-35. (Biotechnology, 3)
- NOMURA, S. et al. Interaction of water with native collagen. *Biopolymers*, v.16, p.231-246, 1977.
- OGSTON, A.E. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.89, p.181, 1960.
- PARRY, D.A.D. Collagen fibrils and elastic fiber in rat-tail tendon: an electron microscopic investigation. *Biopolymers*, v.17, p.843-855, 1978.
- PAYNE, K.J.; KING, T.A. Collagen fibrillogenesis in vitro: an investigation of the thermal memory effect and of the early events occurring during fibril assembly using dynamic light scattering. *Biopolymers*, v.25, p.1185-1207, 1986
- PETRUSKA, J.A.; HODGE, A.J. A subunit model for tropocollagen macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.51, p.871, 1964.
- PICCIRILLI, L.; GOISSIS, G. *Membranas do tipo colágeno: P(VDF-TrFe)*. Preparação e caracterização. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Polímeros. A.B.P, v.1, p.273-275, Rio de Janeiro, 1995.

- PIEZ, K.A. Structure and assembly of native collagen fibril. *Connect. Tissue Res.*, v. **10**, p.25-36, 1982.
- PIEZ, K.A.; MILLER, A. The structure of collagen fibrils. *Journal of Supramolecular Structure*, v. **2**, p.121-137, 1974.
- PIEZ, K.A.; TRUS, B.L. Microfibrillar structure and packing of collagen: hydrophobic interactions. *J. Mol. Biol.*, v. **110**, p.701-704, 1977.
- POHL, T. Concentration of protein and removal of solutes. *Methods in Enzymology*, v. **182**, p.73-75, 1990.
- REINER, M. The Deborah number. *Physics Today*, v. **17**, n° 1, p.62, 1964.
- RHODES, R.K.; MILLER, E.J. Physicochemical characterization and molecular organization of collagen A and B chains. *Biochemistry*, v. **17**, p.3442 - 3448, 1978.
- RICH, A.; CRICK, F.H.C. The Molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.*, v. **3**, p.483-506, 1961.
- RIGHETTI, P.G.; CARAVAGGIO, T. Isoelectric points and molecular weights of proteins: A Table. *Journal of Chromatography*, v. **127**, p.1-28, 1976.
- ROSENBLATT, J.; DEVEREUX, B.; WALLACE, D.G. Dynamic Rheological studies of hydrophobic interactions in injectable collagen. *Biomaterials J. Applied Polymer Science*, v. **50**, n°6, p.953-963, 1993.
- ROSOLEN, M.A. *Modelagem viscoelástica do fraturamento hidráulico*. Campinas, **1994**. 379p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.

- RUIJGROK, J.M.; WIJN, J.R.; BOON, M.E. Optimizing gluteraldehyde crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperature. *J. Materials Science: Materials in Medicine*, v.5, n° 2, p.80-87, 1994.
- SCHMIDT, R.H. Gelation and coagulation in functionality and protein structure. Washington D.C, *Am. Chem. Soc.*, p.131-147, 19
- SCHRAMM, G. *Practical approach to rheology and rheometry*. Karlsruhe Haake Mess-Technik Gmbh u Co, 1994. 290p.
- SCOPES, R. *Protein purification- principles and practice*. 2° ed. New York, C.R. Cantor Spring-Verlag, 1987. p.41-71.
- SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.; HUGHES, E.W. Proteoglycan collagen arrangement in developing rat tail tendon: an electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem. J.* , v.195, p.573-, 1981.
- SHIH, Y.C.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotech. Bioeng.*, v.40, p.1155-1164, 1992.
- SHINYASHIKI, N.; ASAKA, N.; MASHIMO, S.; YAGIHARA, S.; SASAKI, N. Microwave dielectric study on hydration of moist collagen. *Biopolymers*, v.29, p.1185-1191, 1990.
- SIMIONESCU, A.; SIMIONESCU, D.; DEAC, R. Lysine-enhanced gluteraldehyde crosslinking of collagenous biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.25, p.1495-1505, 1991.
- SMITH, J.W. Molecular pattern in nature collagen. *Nature* (London), v.219, p.157, 1968.

STENZEL, K.H.; MIYATA, T.; KOHNO, I.; SCHLEAR, S.D.; RUBIN, A.L.

Collagen surfaces. Applied Chemistry at Protein Interfaces. Advances in Chemistry Séries n° 145. Washington D.C, *Am. Chem. Soc.*, p.27-34, 1975.

STEWART, K. K. *Advance Protein Chem.*, v. 31, p.135, 1977.

STRYER, L. *Bioquímica*. 3° ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Kogan S/A.

1992. p.213-239

THAIN, J.F. *Principles of osmotic phenomena*. Monographs for teachers n° 13.

Royal Institute of Chemistry, Cambridge, 1967. 69p.

TORPS, S.; ARRIDGE, R.G.C., CRAIG, A.S. A comparison of size distribution

of collagen fibrils in connective tissues: as function of age and possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. London ser. B*, v.203, p.305, 1978.

TRELSTAD, R.L. Multistep assembly of type I collagen fibers. *Cell*, v.28, p.

197-198, 1982.

TSCHOEG, N.W. *The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior:*

an introduction. Berlin, Springer-Verlag, 1989. 751 p.

VAIRON, J.P. *Proprietes mecaniques des polymeres*. Universite P. et M. Curie,

D.E.A de Physico-Chimie Macromoleculaire Option Chemie, s.d. 97p.  
mimeografado.

VEIS, A. Collagen fibrillogenesis. *Connect. Tissue Res.* , v.10, p.11-24, 1982.

VEIS, A.; PAYNE, K. Collagen Fibrillogenesis. in: *Collagen*. (ed.) Ninmi, M.E.;

Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1988. p.113-139. (Biochemistry, 1)

- VIDAL, B.C. "Aorta elasticae and tendon collagen reactivity to 8-anilino-1-naphthalene sulphate (ANS) and Dansylchloride". *Cellular & Molecular Biology*, v.26, p.583-588, 1980
- VIDAL, B.C. Análise e quantificação básica para produtos colagênicos. *Aerosol & Cosméticos*, v.7, n° 45, p.11-14, 1986.
- VIDAL, B.C. Colágeno, uma proteína especial: medicina e biologia, in COBRAP 90, Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins, p.449-473, 1990.
- VIDAL, B.C. Crimp as part of helical structure. *C.R Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, v.318, p.173-178, 1995.
- VIDAL, B.C. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, v.318, p. 831-836, 1995.
- VIDAL, B.C. Molecular order and collagen bundles. Madrid. *Trab. Inst. Cajal*, v.75, p.19-27, 1984.
- VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F. Aggregation state and molecular order of tendon as function of age. *Matrix*, v.10, p.48-57, 1990.
- VILARTA, R.; VIDAL, B.C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, v.9, p.55-61, 1989.
- WALLACE, D.G. Early assembly pathways of type I collagen. *Biopolymers*, v.32, p.497-515, 1992.
- WALLACE, D.G. The relative contribution of electrostatic interactions to stabilization of collagen fibrils. *Biopolymers*, v.29, p.1015-1026, 1990.

- WALLACE, D.G. The role of extrahelical peptides in stabilization of collagen fibrils. *Biopolymers*, v.30, p.889-897, 1990.
- WALLACE, D.G.; RHEE, W.; REIHANIAN, H.; KSANDER, G.; LEE, R.; BRAUN, W.B.; WEISS, B.A.; PHARRISS, B.B. Injectable cross-linked collagen with improved flow properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.23, p.931-945, 1989
- WALLACE, D.G; CONDELL, R.A; DONOVAN, J.W; PAIVINEN, A.; RHEE, W.M. WADE, S. Multiple denaturational transitions in fibrillar collagen. *Biopolymers*, v.25, p.1875-1893, 1986.
- WOLD, F. *Macromoléculas: Estrutura e Função*. trad. Maria Lúcia Samara Mendes e José Reinaldo Magalhães. São Paulo, Edgard Blücher, 1975. p.15-25
- WOOD, G.C.; KEECH, M.K. The formation of fibrils from collagen solutions: the effect of experimental condition; kinetic and eletron-microscope studies. *Biochem. J.*, v.75, p.588-598, 1960.
- YAMAUCHI, M.; MECHANIC, G. *Cross-linking of collagen*. in: Collagen. (ed.) Ninmi, M.E.; Boca Raton, Florida, CRC, Inc., 1988. p.157-172. (Biochemistry, 1)
- YOSHIOKA, S.A.; OLIVEIRA, J.; SARTORI, L.; GOISSIS, G. *Estudo de reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído em função da concentração e temperatura*. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Polímeros. Associação Brasileira de Polímeros. Rio de Janeiro, v.1, p.265-268, 1995.

## APÊNDICE A

**TABELA A1**

Dados obtidos dos reogramas para géis “in natura” com 15% de deformação e frequência 1 Hertz ( 6,28 s<sup>-1</sup>)

<b>pH</b>	<b>G' (Pa)</b>	<b>G'' (Pa)</b>	<b><math>\eta^*</math> (Pa.s)</b>	<b><math>\delta(^{\circ})</math></b>
2,50	768	138	124	10,20
2,50	655	112	106	11,03
2,50	762	126	115	9,37
3,50	4,12	2,22	0,7	28,3
3,50	5,29	2,46	0,93	24,9
3,50	2,21	1,80	0,45	39,1
3,60	126	0	30	0
3,60	95,9	0	18	0
3,60	84,4	0	13,4	0,93
3,60	134	0	21	0
3,80	37,6	12,9	6,33	19
3,80	47,0	14,8	11,5	17,5
3,80	48,7	15	8,11	17,1
3,80	38,6	9,74	6,33	17
4,0	36,4	16,6	6,36	24,5
4,0	31	15	5,48	25,9
4,0	18,9	9,40	3,29	27,1
4,0	21,5	9,67	3,75	24,2
4,0	33,2	15	5,79	24,3
4,10	183	0	30	0
4,10	162	0	18	0
4,10	195	0	20	0
4,10	159	0	25	0
4,20	82,3	0,289	18	0,2
4,20	138	40,4	22,9	16,3
4,20	86,1	28,2	14,4	18,1
4,20	172	59,7	28,9	19,2
4,30	82,3	0,29	18	0,2
4,30	182	21,4	30	6,73
4,30	152	1,30	25	0,49
4,40	15,6	5,68	2,64	20,0
4,40	37,7	12,1	8	17,7
4,40	15,6	5,37	4,0	19

**TABELA A1**

Dados obtidos dos reogramas para géis “in natura” a 20°C, 15% de deformação e frequência 1 Hertz ( 6,28 s<sup>-1</sup>)

<b>pH</b>	<b>G' (Pa)</b>	<b>G'' (Pa)</b>	<b>η* (Pa.s)</b>	<b>δ(°)</b>
4,40	21,4	9,96	3,76	24,9
4,40	17,8	6,78	3,04	20,8
4,40	15,7	3,71	2,5	13,3
4,50	79	14,8	13	10,6
4,50	57,2	10,1	10	15
4,50	60,6	14,4	9,91	13,38
4,50	61,9	15,1	10	13,7
4,50	80,7	17,50	13,1	12,5
4,50	25,5	6,80	4,21	14,90
4,50	35,4	8,50	6	13,50
4,70	106	16,4	18	8,83
4,70	120	23,7	20	11,20
4,70	86	10	13	6,62
4,80	145	38,7	23	14,9
4,80	129	15,7	20,6	7
4,80	145	32,9	26	12,7
5,0	222	50	35	12,70
5,0	238	47,6	40	11,3
5,0	330	62,9	48,8	11,80
5,30	337	61,4	55	10,3
5,30	250	50,3	60	11,3
5,30	287	60,8	50	11,9
5,30	303	35,2	50	6,63
5,30	493	37,1	78,6	4,31
5,45	762	54,3	122	4,07
5,45	691	16,5	110	1,37
5,45	935	13,0	149	0,795

## APÊNDICE B

### TABELA B1

Dosagem do colágeno, a partir de soluções drenadas em 85% v/v da suspensão, nos géis “in natura” (% em peso de colágeno).

pH	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
*2,50	2,955	2,927	2,412	2,631
3,60	0,832	1,009	1,288	0,777
3,80	1,154	1,058	1,033	1,003
4,00	1,311	1,000	1,216	0,995
4,20	1,141	1,105	1,060	1,011
4,40	0,706	0,597	0,565	0,626
4,60	1,047	1,058	1,305	0,951
4,80	1,243	0,958	1,476	0,783
5,00	0,848	0,958	1,093	0,7825
5,20	0,857	0,868	1,003	0,845
5,30	0,619	0,416	0,375	0,372
5,45	1,730	1,037	1,314	1,105
6,00	0,551	0,383	0,504	0,555
6,25	0,763	0,673	0,554	0,503

\* suspensão de colágeno após precipitação e drenagem para sua padronização.

## APÊNDICE C

### TABELA C1

Tabela com peso, em gramas, dos animais com noventa dias utilizados no experimento.

258,20	284,10	297,70	323,50
269,00	285,10	298,00	327,00
269,40	285,40	299,00	336,10
271,40	286,10	304,30	336,20
271,40	286,10	306,00	349,30
275,10	292,00	308,40	397,60
276,70	295,70	309,00	
278,00	296,00	312,60	
279,00	296,50	317,00	
280,00	297,40	319,00	