

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

*Filmes de galactomanana-colágeno: caracterização físico-química
e uso na detecção de lectinas*

Sônia Duarte Figueiró

Fortaleza-Ce

2002

Filmes de galactomanana:colágeno: caracterização físico-química e uso na detecção de lectinas

Sônia Duarte Figueiró

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Co-orientador: Dr. Júlio Cesar Góes Ferreira

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Universidade Federal do Ceará
Fortaleza-CE**

CATALOGAÇÃO - BIBLIOTECA CENTRAL

No. de páginas - 109

Título - Filmes de galactomanana:colágeno: caracterização físico-química e uso na detecção de lectinas.

Departamento - Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador - Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Ano - 2002

Palavras Chaves - Lectina, galactomanana, colágeno, biossensor.

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Ciências, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Sônia Duarte Figueiró

Tese APROVADA em 04 / 03 / 2002.

Prof. Dr. Renato de Azevêdo Moreira
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dr. Julio César Góes Ferreira
Depto. de Eng. Mecânica e Produção
Universidade Federal do Ceará
Co-orientador

Profa. Dra. Leila Maria Beltrami
Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Antonio Sergio Bezerra Sombra
Depto. de Física
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Depto. de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

“Não é o conhecimento, mas o conhecimento do conhecimento o que nos compromete. Não é saber que a bomba mata, e sim o que queremos fazer com a bomba que determina se a usaremos ou não. Isso geralmente se ignora ou se finge desconhecer para evitar a responsabilidade que nos cabe em todos os nossos atos cotidianos, já que todos os nossos atos sem exceção, contribuem para formar o mundo em que existimos e que legitimamos precisamente por meio desse atos, num processo que configura nosso vir-a-ser. Cegos diante da transcendência de nossos atos, fingimos que o mundo tem um vir-a-ser independente de nós, justificando assim nossa irresponsabilidade e confundindo a imagem que buscamos projetar, o papel que representamos, com o ser que verdadeiramente construímos em nosso viver diário”.

Humberto Maturana

*A Deus,
porque viver já é um milagre suficiente.*

*Ao Júlio,
pelo amor*

*Aos que me antecederam na vida,
à Maria, grande amiga de outras dimensões.*

*Aos meus irmãos e em especial à Gisa e Elba, sempre presentes
em minha vida.*

*À Betânia e Eduardo por me fazerem ver
sentir, transformar e amar.*

*Aos bioamigos pela poesia
dos nossos encontros.*

*Às cobaias,
que “doam” parte de suas vidas,
para que a ciência progrida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, pela valiosa orientação, amizade, e estímulo, e em especial, por ensinar a fazer da ciência uma arte, da vida uma luta que incessantemente nos leva a um resultado feliz.

Ao Dr. Júlio César Góes Ferreira pela generosa co-orientação, que sabe fazer despertar nossos sentidos, para uma compreensão melhor do mundo e da natureza humana.

Ao Prof. Dr. Sérgio Sombra, pela grande colaboração, e disponibilidade do Laboratório de Ótica Linear e Ciências dos Materiais para os ensaios elétricos e piezelétricos.

Aos amigos que compõem o grupo de Lectinas e Glicoconjugados: Prof. Dra. Ana Cecília, Ana Cristina, André, Álvaro, Alexsandra, Célio, Clébia, Dani, Ed Carlos, Fábila, Jacira, Kelton, Lia, Marcus, Raquel, Renatinha, Renata Alves, Ricardo, Rogildo e Wagner, pela amizade, acolhimento e prazeroso convívio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Marisa, pela fé contagiante.

Aos amigos da Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao Departamento de Química Analítica e Físico-Química, pela oportunidade.

Ao Departamento de Engenharia Mecânica, em especial ao Prof. Dr. Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira, pela disponibilidade do Laboratório de Desenvolvimento de Materiais.

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, pelos ensaios espectroscópicos e termoanalíticos, e em especial a Teresa pelas medidas.

Ao Prof. Dr. Frederico José Beserra pela disponibilidade do Laboratório de Carnes para eventuais necessidades.

Ao Rômulo pela colaboração nos ensaios de viscosidade e Eduardo (Dudu) pela ajuda na edição dos gráficos.

Aos amigos, Lisiane, Kleber, Cristiane, Rose e José Luís pelos valiosos auxílios prestados.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pela concessão da bolsa de auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a CAPES pelos auxílios à pesquisa.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	<i>i</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>ii</i>
LISTA DE TABELAS	<i>viii</i>
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
I. INTRODUÇÃO	<i>1</i>
I.1. Interações por afinidade	<i>2</i>
I.2. Colágeno	<i>6</i>
I.3. Galactomananas	<i>14</i>
I.4. Lectinas	<i>21</i>
I.5. Biossensores	<i>29</i>
II. HIPÓTESE DE TRABALHO	<i>34</i>
II.1. Estratégias experimentais	<i>35</i>
III. PARTE EXPERIMENTAL	<i>36</i>
III.1. Materiais	<i>36</i>
III.1.1. Solventes e reagentes	<i>36</i>
III.1.2. Matéria prima	<i>36</i>

<i>III.1.2.1. Colágeno</i>	36
<i>III.1.2.2. Sementes</i>	36
<i>III.1.2.3. Hemácias</i>	37
<i>III.2. Métodos de Preparação</i>	37
<i>III.2.1. Colágeno solúvel</i>	37
<i>III. 2.2. Obtenção do polissacarídeo</i>	37
<i>III.2.2.1. Obtenção do endosperma das sementes de Adenanthera pavonina</i>	37
<i>III.2.2.2. Obtenção do polissacarídeo em solução</i>	38
<i>III. 2.3. Preparação dos filmes de galactomanana:colágeno (GalCol)</i>	38
<i>III.2.4. Reticulação dos filmes com glutaraldeído</i>	38
<i>III. 2.5. Preparação da farinha de sementes de Artocarpus incisa</i>	39
<i>III. 2. 6. Preparo de extrato bruto de Artocarpus incisa</i>	39
<i>III. 2. 7. Isolamento de lectina (frutalina), por cromatografia de afinidade</i>	39
<i>III. 3. Técnicas de Caracterização</i>	40
<i>III.3.1. Caracterização do colágeno solúvel por determinação de hidroxiprolina</i>	40
<i>III. 3.2. Embebição</i>	42
<i>III. 3.3. Estabilidade térmica</i>	42
<i>III. 3.4. Espectros de infravermelho.</i>	43
<i>III. 3.5. Ensaio de viscosidade.</i>	43
<i>III. 3.6. Microscopia eletrônica de varredura</i>	44

<i>III. 4. Técnicas de Aplicação</i>	44
<i>III. 4.1. Ensaio de interação da frutalina com filmes de GalCol</i>	44
<i>III. 4.2. Cromatografia de afinidade em filmes de GalCol como suporte.</i>	45
<i>III.4.2.1. Preparação das colunas</i>	45
<i>III. 4. 2. 2. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas de filmes de GalCol</i>	46
<i>III.4.3. Determinação de atividade hemaglutinante</i>	46
<i>III.4.4. Medidas elétricas e piezelétricas.</i>	47
<i>III. 4.5. Modelo piezelétrico</i>	47
<i>III.4.6. Medidas do fator de perda</i>	51
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
<i>IV. 1. Caracterização do colágeno</i>	52
<i>IV .2. Caracterização do polissacarídeo</i>	60
<i>IV.3. Caracterização das blendas de GalCol</i>	65
<i>IV.4. Caracterização dos filmes de GalCol</i>	76
<i>IV.5. Aplicações</i>	85
<i>IV.5.1. Cromatografia de afinidade de frutalina em colunas de filmes de GalCol</i>	85
<i>IV.6. Medidas piezelétricas</i>	92
V.CONCLUSÕES	98
VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ABREVIATURAS

<i>GA</i>	<i>Glutaraldeído</i>
<i>Gly</i>	<i>Glicina</i>
<i>Pro</i>	<i>Prolina</i>
<i>Hyp</i>	<i>Hidroxiprolina</i>
<i>Lys</i>	<i>Lisina</i>
<i>Hyl</i>	<i>Hidroxilisina</i>
<i>Asn</i>	<i>Asparagina</i>
<i>Gln</i>	<i>Glutamina</i>
<i>DSC</i>	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i>
<i>GalCol</i>	<i>Galactomanana:colágeno</i>
<i>Td</i>	<i>Temperatura de desnaturação</i>
<i>pI</i>	<i>Ponto isoelétrico</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Configurações de sistemas de membrana por afinidade.* 5
- Figura 2 - Arranjo da hélice tripla do Colágeno* 6
- Figura 3 - Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Seqüência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária em hélice e terciária em tripla-hélice e (c) estrutura quaternária* 9
- Figura 4 – Esquema da reticulação natural ao longo das fibras de colágeno* 10
- Figura 5 – Estrutura química da galactomanana* 15
- Figura 6 – Diferentes distribuições de D-galactose (G) na cadeia principal de manose (M).* 17
- Figura 7 – Reação de dextrana com epiclorigrina na formação do gel Sephadex* 20
- Figura 8- Estrutura quaternária da Con A complexada com pentassacarídeo* 24
- Figura 9 – Dispositivo de onda acústica de superfície* 31
- Figura 10 - (a) dipolos presentes num material piezoelétrico (b) Uma voltagem é gerada quando o material é sujeito a uma deformação compressiva* 32
- Figura 11 – Esquema de reação de derivado pirrol com p-DAB.* 40
- Figura 12 – Sistema de cromatografia de afinidade com filme de GalCol como suporte.* 45
- Figura 13 - Coordenadas retangulares assinaladas ao filme da amostra para medidas das constantes piezométrica e dielétrica.* 48
- Figura 14 – Esquema da hidrólise dos resíduos de Gln em meio alcalino.* 52
- Figura 15 – Comportamento para a embebição de colágeno nativo (pele bovina) em função do pH.* 53
- Figura 16 – Efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de* 54

- cisalhamento de colágeno solúvel a pH 3 e concentração de 10 mg/g.*
- Figura 17 - Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade de 55 colágeno solúvel a pH 3 na concentração de 10 mg/g.*
- Figura 18- Efeito da temperatura sobre a viscosidade de colágeno solúvel a 56 pH 3 e concentração 10 mg/g.*
- Figura 19 – Espectro no infravermelho de filme de colágeno formatado a 57 pH 3*
- Figura 20 – Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de colágeno 58 formatado a pH 3.*
- Figura 21- Micrografia de filme de colágeno solúvel conformado a pH 3. 59 Ampliação 2500x.*
- Figura 22 – Micrografia de filme de colágeno solúvel conformado a pH 3. 59 Ampliação 5000x.*
- Figura 23– Micrografia do endosperma de galactomanana de Adenantha 60 pavonina.*
- Figura 24 – Curva de estabilidade térmica por DSC para amostra de 61 farinha de Adenantha pavonina.*
- Figura 25 – Curva de estabilidade térmica por DSC de fração de 62 galactomanana solúvel em ácido acético em pH 3, liofilizada.*
- Figura 26 – Efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de 63 cisalhamento de solução de galactomanana 10mg/g em ácido acético pH 3.*
- Figura 27 – Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade de 63 solução de galactomanana 10 mg/g em ácido acético pH 3.*
- Figura 28- Espectro no infravermelho de filme de galactomanana solúvel 64 formatado em pH 3 .*
- Figura 29 – Curvas de escoamento de soluções de galactomanana 5 mg/g 65 em ácido acético pH 3, em função da temperatura.*
- Figura 30 – Curvas de escoamento de soluções de GalCol (9:1) em ácido 66 acético pH 3, em função da temperatura.*

- Figura 31 – Curvas de escoamento de soluções de GalCol (3:2) em ácido acético pH 3, em função da temperatura.* 66
- Figura 32 – Curva de índice de fluidez das soluções de Gal:Col (3:2, 9:1 e 1:0) em função da temperatura.* 67
- Figura 33 - Curva de Arrhenius para soluções de galactomanana e blendas de GalCol (3:2 e 9:1).* 68
- Figura 34– Micrografias de esponjas de GalCol (1:1), formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).* 69
- Figura 35 – Micrografias de esponjas de GalCol (3:2) formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).* 70
- Figura 36 – Micrografias de esponjas de GalCol (7:3) formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).* 71
- Figura 37 – Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (1:1) formatado a pH 3.* 72
- Figura 38 – Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (3:2) formatado a pH 3.* 72
- Figura 39 – Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (7:3) formatado a pH 3.* 73
- Figura 40 – Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (1:1) formatados a pH 3.* 74
- Figura 41 – Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (7:3) formatados a pH 3.* 74
- Figura 42 – Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (9:1) formatados a pH 3.* 75
- Figura 43 - Reticulação do colágeno com glutaraldeído* 76
- Figura 44 - (a) Formas monoméricas do glutaraldeído (b) Formação do polímero hemiacetal.(c) Formação dos polímeros α , β insaturados* 78
- Figura 45 - Formação da amina secundária via intermediário, base de* 79

Schiff.

Figura 46- Reticulação de proteína via derivados piridínicos de glutaraldeído 79

Figura 47 - Reticulação de proteínas via polímeros insaturados de glutaraldeído 79

Figura 48 - Polimerização do glutaraldeído na fibrila de colágeno. 80

Figura 49- Curvas de estabilidade térmica por DSC de filmes de colágeno reticulado com GA 0,01%, filmes de GalCol (1:1) sem reticulação e filmes de GalCol (1:1) reticulados com GA 0,05, 1 e 1,5%. 81

Figura 50 – Comportamento de embebição de filmes de GalCol (1:1,3:2,7:3 e 4:1) reticulados com GA (0,001, 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5%), em função do teor de galactomanana. 83

Figura 51 – Comportamento de embebição para filmes de GalCol (1:1, 3:2, 7:3, 4:1) em função da reticulação com GA (0,001, 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5%). 83

Figura 52- Cromatografia de afinidade em coluna de filme de GalCol (3:2) reticulado com GA 0,05%. Solução de frutalina 2,5 mg/mL. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 20 cm², volume 2 mL). 86

Figura 53 – Cromatografia de afinidade de extrato bruto de Artocarpus incisa em coluna de filmes de GalCol (3:2) reticulados com solução de GA 0,001; 0,1; 0,5 e 1%. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL). 88

Figura 54- Cromatografia de afinidade de extrato bruto de Artocarpus incisa em coluna de filmes de GalCol (7:3) reticulados com solução de GA 0,01; 0,1 e 0,5 %. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL). 88

- Figura 55 Cromatografia de afinidade de extrato bruto de Artocarpus incisa em coluna de filmes de galactomanana:colágeno (4:1) reticulados com solução de GA 0,001; 0,1 e 0,5%. . Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL). 89*
- Figura 56- Cromatografia de afinidade de extrato bruto de Artocarpus incisa em coluna de filmes de galactomanana:colágeno (3:2, 7:3 e 4:1) reticulados com solução de GA 0,1%. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2 mL). 89*
- Figura 57 – Micrografias de filme de GalCol (3:2) reticulado com GA 0,1%, e com adição de frutalina. Ampliada 5000x. 91*
- Figura 58 – Micrografias de filme de GalCol (3:2) reticulados com GA 0,1% e com adição de frutalina. Ampliada 5000x. 91*
- Figura 59- Constante dielétrica de filmes de GalCol (3:2) reticulados com GA 01%, com e sem dopagem com frutalina. 94*
- Figura 60- Constante dielétrica de filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1%, com e sem dopagem com frutalina. 94*
- Figura 61– Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de Galcol (3:2) reticulados com GA 0,1% embebidos em solução NaCl 0,15 mol/L. 95*
- Figura 62– Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de GalCol (3:2) reticulados com GA 0,1% dopados com frutalina. 95*
- Figura 63– Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1% embebidos em solução de NaCl 0,15 mol/L. 96*
- Figura 64 – Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) 96*

e diâmetro do disco (L), para filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1% dopados com frutalina.

Figura 65 – Variação da frequência de ressonância em função do diâmetro 97 do eletrodo para amostras de GalCol (3:2) e GalCol (3:2)d, para eletrodo com diâmetro de 1,8 cm.

Figura 66 – Curvas de admitância das amostras de GalCol (3:2) e GalCol 97 (3:2)d para eletrodo com diâmetro 1,8 cm.

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
<i>1 Exemplos de sistemas biológicos utilizados em separações por afinidade.</i>	<i>2</i>
<i>2 Composição e distribuição dos principais tipos de colágeno</i>	<i>7</i>
<i>3 Composição de aminoácidos das cadeias α de colágeno Tipo I</i>	<i>8</i>
<i>4 Energia de ativação para soluções de galactomanana contendo 68 diferentes proporções de colágeno.</i>	<i>68</i>
<i>5 Resultados qualitativos de atividade de hemaglutinação para 86 amostras do ensaio de interação de frutalina com filmes GalCol (3:2).</i>	<i>86</i>
<i>6 Embebição e rendimento de interação de lectina com filmes de GalCol</i>	<i>90</i>
<i>7 Valores experimentais de densidade (ρ), espessura do filme (e), permissividade dielétrica (ϵ), constante de frequência (fL) e constante piezométrica (d_{14})</i>	<i>93</i>
<i>8 Fator de perda (Q^{-1}) para cada amostra como função do diâmetro do disco (L)</i>	<i>94</i>

RESUMO

Este trabalho objetivou a caracterização físico-química de filmes de galactomanana:colágeno e sua aplicação como biossensor piezelétrico para detecção de lectinas. Os filmes foram obtidos a partir de soluções de galactomanana:colágeno em proporções variadas de massa (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1), formatadas em moldes de acrílico, secos em capela de fluxo laminar e reticulados com solução de glutaraldeído em concentrações que variaram de 0,001 a 1,5 %. O estudo da interação de lectina galactose específica com os filmes, foi realizado através de cromatografia de afinidade, em colunas contendo o filme na forma em espiral, através da qual foi passada a fase móvel. Os estudos de embebição de filmes de colágeno e galactomanana:colágeno nas variadas proporções, mostraram que a capacidade de embebição da matriz pode ser controlada pela concentração de galactomanana e pelo grau de reticulação com glutaraldeído, cuja concentração mais adequada foi de 0,1%. Entretanto em filmes com alto teor de galactomanana pode ocorrer lixiviação do polissacarídeo não ocluído pela malha de colágeno. A determinação de atividade hemaglutinante foi usada para avaliar a interação dos filmes com a lectina e o maior valor de rendimento de interação encontrado, definido como massa de lectina por área do filme, foi de $76,8 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ para filme de galactomanana:colágeno (3:2). A constante piezelétrica, d_{14} , a complacência elástica, S_{55} , e as constantes dielétricas, foram obtidas para filmes de galactomanana:colágeno (3:2) e (7:3) dopados ou não com lectina. A constante piezelétrica para filmes de galactomanana:colágeno (3:2) foi 0,08 pC/N. A adsorção da lectina no filme aumentou levemente a piezeletricidade para 0,088 pC/N e diminuiu a frequência de ressonância cuja variação foi de 5,7 MHz. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização desses filmes em dispositivos eletrônicos para detecção de lectinas em extratos brutos de plantas.

ABSTRACT

This work reports the application of galactomannan:collagen films as piezoelectric biosensor for detection of lectins. The films, casted in acrylic molds, from collagen solutions containing galactomannan in various proportions (1:1, 3:2, 7:3 and 4:1), were crosslinked with glutaraldehyde (0.001 to 1.5 %). The study of interactions of lectins with films was by affinity columns utilizing a film in a spiral in nylon spacer, where the mobile phase is forced to pass between them. The swelling studies of collagen films with galactomannan in that variable proportions, showed that the water swelling can be controlled by the galactomannan concentration and the glutaraldehyde crosslink treatment, which best concentration was 0,1%. However in films with high galactomannan concentration can occur lixiviation of the gum not occluded by the collagen net. Hemagglutination activity were determined to evaluate the binding of lectins on the films and the yield, calculated per membrane surface was expressed by mass of lectin $\mu\text{g}/\text{area}$ and was $76.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for galactomannan:collagen film (3:2). The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were obtained for the galactomannan:collagen (3:2 and 7:3 w/w) films, doped or not with lectin. Resonance measurement of the piezoelectric strain constant d_{14} of galactomannan:collagen film gives 0.080 pC/N . It was observed that adsorption onto the film slightly increased the piezoelectricity to 0.088 pC/N and decrease the film resonance frequency of $\Delta f = 5,7 \text{ MHz}$. These results open the possibility of using this films in electronic devices for galactose binding lectin detection from vegetal extracts.

I. INTRODUÇÃO

A alta afinidade biomolecular é uma característica essencial da vida. Interações moleculares específicas produzem mecanismos fundamentais para a seletividade em todos os aspectos das funções e estruturas biológicas. Enzimas catalisam reações específicas em rotas metabólicas. Porções de carboidratos das glicoproteínas da superfície celular, servem como rótulos biológicos marcando com diferentes oligossacarídeos proteínas que participam de diversos eventos biológicos. Neurotransmissores servem de pontes para sistemas informacionais biológicos, exercendo seus efeitos através da interação com estruturas especializadas da membrana celular. Anticorpos interagem especificamente com antígenos, no sistema imunológico.

O conhecimento das interações biomoleculares tem levado a um contínuo crescimento das técnicas de isolamento, reconhecimento de biomoléculas e monitoramento dos mecanismos biológicos dessas interações. Estas técnicas têm como princípio básico a afinidade biomolecular e seu desenvolvimento tem sido de grande importância nas áreas de biotecnologia e biomateriais.

As lectinas são glicoproteínas que possuem a habilidade de se ligarem reversivelmente a açúcares específicos e através desse mecanismo, têm sido isoladas de várias fontes vegetais por cromatografia de afinidade. Géis de galactomanana, estabilizados com epicloridrina, vem sendo utilizados para isolar lectinas galactose específicas em alternativa aos suportes convencionais. Neste trabalho descrevemos o estudo para o desenvolvimento de uma matriz de afinidade de galactomanana e colágeno na forma de filme, que devido as propriedades piezelétricas destes biopolímeros, poderá ser utilizado como transdutor piezelétrico na detecção de lectinas em biossensores.

1.1. INTERAÇÕES POR AFINIDADE

As reações de afinidade incluem um conjunto de interações não covalentes entre moléculas que se associam seletivamente com uma molécula complementar específica, freqüentemente referida como substrato ou ligante. A especificidade do ligante, por ser extremamente seletiva, torna capaz o isolamento e purificação de substâncias com base em sua atividade biológica ou função (Tabela 1) (WILCHEK e MIRON, 1999).

Tabela 1 – Exemplos de sistemas biológicos utilizados em separações por afinidade.

Analito	Ligante
Enzimas	Substrato análogo, inibidores, cofatores
Anticorpos	Antígenos, vírus, células
Lectinas	Polissacarídeos, glicoproteínas, receptores de superfície celular
Ácido nucleico	Seqüência de base complementar, proteínas ligantes
Hormônios	Receptores
Células	Proteínas de superfície celular, lectinas

Uma diversidade de sistemas tem sido usados em separações por afinidade. O mais popular é o sistemas de géis em colunas cromatográficas, como por exemplo, a Sepharose. Uma série de colunas empacotadas com géis são comercialmente disponíveis para isolamento e purificação de pequenas quantidades de compostos biológicos e para purificações em grande escala, onde são utilizadas colunas empacotadas com micropartículas monodispersas (HADE, 1999).

Na cromatografia de afinidade (PHILLIPS e DICKENS, 2000) a molécula a ser purificada, é de forma específica e reversível, adsorvida a uma substância imobilizada (ligante) ligado a um suporte insolúvel (matriz). O ligante, imobilizado em um veículo polimérico que recheia uma coluna, torna possível a captura de moléculas com afinidade específica, simplesmente fazendo-se passar a solução que a contém, através

dessa coluna, sob condições favoráveis. A molécula adsorvida dessa forma, pode ser eluída mudando-se as condições do meio, como pH, força iônica, solvente e temperatura. Desse modo o complexo formado entre o ligante e a molécula alvo, é dissociado e esta é eluída em uma forma pura.

O suporte de cromatografia de afinidade deve apresentar características importantes, como ser quimicamente inerte, o que faz com que não ocorram interações químicas com a fase biológica ativa. Deve possuir adequada porosidade, e grupos funcionais capazes de formarem ligações covalentes com o ligante. Um dos materiais mais usados com essas características e disponível comercialmente, é agarose. O ligante possuindo grupamentos amino não essenciais à ligação com a proteína, pode ser covalentemente ligado à agarose em duas etapas de reação: a reação inicial de ativação da matriz com brometo de cianogênio (CNBr) e a etapa seguinte quando o ligante é imobilizado na agarose ativada através de reação com uma amina (VOET 1990).

A estrutura física do polímero pode por impedimento estérico, dificultar interações efetivas entre o ligante e a proteína a ser isolada. Esses problemas podem ser reduzidos significativamente pelo uso de braços espaçadores inertes, os quais fornecem um distanciamento do ligante em relação ao suporte, com isso facilitando o acesso de macromoléculas a matriz.

Aspectos importantes relacionados à escolha do ligante envolvem sua afinidade de ligação específica com a substância de interesse a ser isolada, e a capacidade de liberar essa substância em sua forma ativa, após lavagem da coluna para remoção do material não ligado. A seleção do ligante nas separações de afinidade é influenciada assim por dois fatores. Primeiro, o ligante deve exibir afinidade de ligação específica e reversível com a substância a ser purificada; segundo, deve possuir grupos funcionais quimicamente modificáveis, que permitam sua ligação com a matriz sem destruir sua atividade (WILCHEK e MIRON, 1999).

Além de géis com ligantes imobilizados, novos sistemas de afinidade tem sido desenvolvidos, utilizando membranas e cuja tecnologia oferece inúmeros modelos e sistemas de aplicações. As membranas como suportes, tornaram-se populares principalmente pelo fácil manuseio e disponibilidade comercial. São construídas a

partir de uma variedade de materiais, desde a nitrocelulose a compósitos de sílica-plástico e vidro (ROPER e LIGHTFOOT, 1995).

Um dos principais atrativos desses materiais é o vasto sistema de poros que atravessa a matriz. Esses poros permitem um fluxo rápido e uma área ampla para imobilização do ligante. Nesta configuração, as membranas superam dois dos maiores problemas associados aos suportes convencionais, que são os efeitos de difusão e limitações de transferência de massa. Apresentando uma maior capacidade de difusão, permitem um menor tempo de processamento, sendo capazes de processar soluções não clarificadas, o que torna interessante a utilização desses sistemas, no isolamento seletivo de analitos contidos em grandes volumes por exemplo, de extratos brutos de plantas.

Tem sido usados sistemas de afinidade envolvendo membranas em diversas configurações (Figura 1). Nesses sistemas são empregadas uma ou mais membranas microporosas montadas em série, em forma de fibra oca, espirais, discos, considerando as mais variadas aplicações, em processos de clarificação, concentração, fracionamento e purificação de biomoléculas (ROPER e LIGHTFOOT 1995).

A cromatografia em membrana de afinidade reflete um avanço tecnológico em relação aos sistemas usuais de cromatografia líquida, tendo em vista permitir um fluxo rápido enquanto grandes volumes são rapidamente processados. A liberdade de acesso do analito aos poros da membrana, freqüentemente isenta a adição de um braço espaçador, simplificando a construção da matriz (PHILLIPS e DICKENS, 2000).

O processo de separação por cromatografia em membrana encontra freqüentes aplicações na recuperação de produtos biológicos de meios de cultura de células. LANGLOTZ e KRONER, (1992) compararam técnicas de cromatografia em membrana usando proteína A e o anticorpo específico para isolamento de anticorpos monoclonais de cultura de tecidos. Membranas de afinidade de celulose porosa, modificada com ácido tânico, tem sido empregadas para adsorção de proteínas do soro tais como albumina sérica bovina e γ -globulina, através de sistema de filtração (KUBOTA *et al.*, 1999).

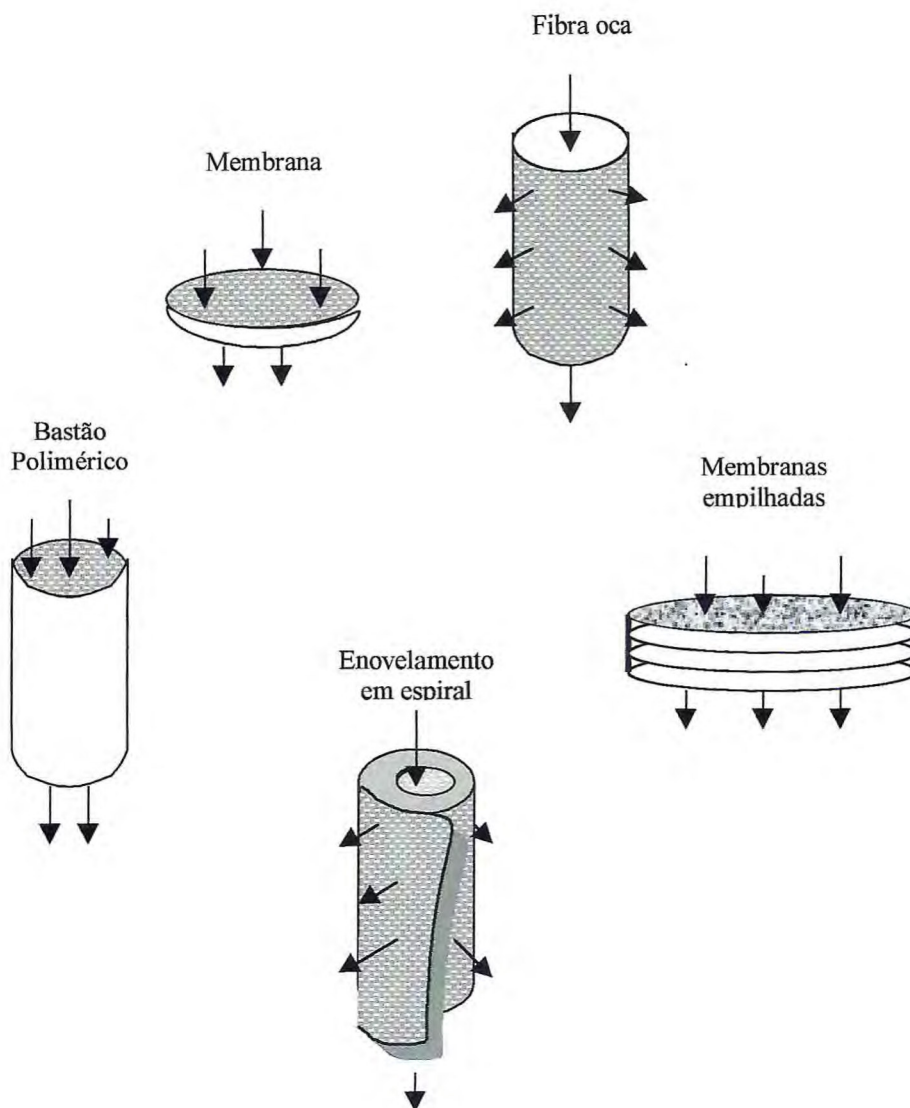


Figura 1 – Configurações de sistemas de membrana por afinidade.

Polímeros sintéticos, tais como nylon, polietileno, copolímeros de estireno-divinilbenzeno, estireno-divinilmetacrilato, tem sido empregados na obtenção de membranas como suporte. Um exemplo de aplicação refere-se a utilização de glicidilmetacrilato com fenilalanina ligada, para imobilização de γ -globulina (KIM *et al*, 1991).

Polímeros naturais, como heparina e colágeno, têm sido utilizados em aplicações de sistemas de afinidade na recuperação de biomoléculas (JOSIC *et al*, 1992).

1.2. COLÁGENO

O colágeno (BORNSTEIN, *et al.*, 1979), uma proteína fibrosa, é o principal constituinte do tecido conjuntivo dos mamíferos, tendo a função de manter a integridade estrutural do tecido e conferir resistência mecânica. Está amplamente distribuído, formando os tendões, pele e ossos. Entre as proteínas o colágeno é singular devido a sua composição em aminoácidos, pois é a única proteína de mamíferos contendo grandes quantidades de hidroxiprolina e sua alta concentração em glicina e prolina.

A unidade molecular básica do colágeno, chamada de tropocolágeno, consiste de três cadeias polipeptídicas, denominadas α , entrelaçadas, em sua maior parte, na conformação de uma longa hélice tripla, de 300nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro (Figura 2). Cada cadeia, com massa molar em torno de 100.000 g/mol, possui uma região central de hélice tripla com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e regiões N e C terminais não helicoidais, chamadas telopeptídeos.



Figura 2 - Arranjo da hélice tripla do Colágeno (VOET 1990).

Já foram identificadas 33 cadeias polipeptídicas de colágeno geneticamente distintas que formam arranjos específicos homo-triméricos e heterotriméricos levando a 19 tipos de estruturas colagênicas (CHAN *et al.*, 1997). A Tabela 2 mostra a composição e distribuição de alguns tipos de colágeno que variam com o comprimento da hélice e a natureza e tamanho das porções não helicoidais. O colágeno tipo I, o mais abundante, consiste em duas cadeias chamadas de $\alpha 1(I)$, e outra chamada de $\alpha 2(I)$.

Cada cadeia $\alpha 1(I)$ possui 1056 resíduos dos quais, 1014 formam uma região contínua de hélice tripla. As regiões dos telopeptídeos consistem de 16 resíduos N-terminais e 26 resíduos C-terminais. A cadeia $\alpha 2(I)$ também possui 1014 resíduos na região de hélice tripla, mas os telopeptídeos contém 9 resíduos N-terminais e 15 C-terminais, fazendo, portanto, 1038 resíduos no total (PIEZ, 1989).

Tabela 2 - Composição e distribuição dos principais tipos de colágeno (KUCCHARZ 1988)

Tipo	Composição da cadeia	Distribuição
I	$(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)_3$	Pele, tendão, ossos, córnea e dentina
II	$(\alpha 1(II))_3$	Cartilagem, humor vítreo e notocorda
III	$(\alpha 1(III))_3$	Vasos sangüíneos, trato gastrointestinal, parede uterina e gengiva (normalmente coexiste com o tipo I)
IV	$(\alpha 1(IV))_2 \alpha 2(IV)$	Membrana basal.
V	$\alpha 1(V) \alpha 2(V) (3(V) \text{ ou } (\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V) \text{ ou } (\alpha 1(V))_3)$	Ossos e membrana placentar
VI	$\alpha 1(VI) \alpha 2(VI) \alpha 3(VI)$	Músculos do coração
VII	$(\alpha(VII))_3$	Placenta, pele e córnea
VIII	$\alpha 1(VIII) \alpha 2(VIII)$ desconhece-se a organização da cadeia	Produzido pela células endoteliais
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Cartilagem
X	$(\alpha 1(X))_3$	Cartilagem hipertrófica
XI	$1\alpha 2\alpha 3\alpha 1$ ou $\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Humor vítreo e disco intervertebral
XII	$(\alpha 1(XII))_3$	Ligamento periodontal bovino e tendão de embriões de frango

O teor de aminoácidos das cadeias α de colágeno de pele bovina (Tipo I) está apresentado na Tabela 3. Esta composição em aminoácidos do colágeno é única em relação às outras proteínas, com teores em glicina, prolina e hidroxiprolina correspondendo a 33, 12 e 11% respectivamente. Possui também 0,7% de

hidroxilisina. Os aminoácidos polares constituem quase 40% da molécula, dos quais 11% são básicos e 9% ácidos; os outros 17% correspondem a aminoácidos hidroxilados (RAMACHANDRAN, 1967).

Tabela 3 - Composição de aminoácidos das cadeias α de colágeno Tipo I (FRIESS 1998).

Aminoácido	$\alpha 1(I)^a$	$\alpha 2(I)^a$
Alanina	124	111
Arginina	53	56
Asparagina	13	23
Ácido aspártico	33	24
Ácido glutâmico	52	46
Glutamina	27	24
Glicina	345	346
Histidina	3	8
Hidroxilisina	4	9
Hidroxiprolina	114	99
Isoleucina	9	18
Leucina	22	33
Lisina	34	21
Metionina	7	4
Fenilalanina	13	15
Prolina	127	108
Serina	37	35
Treonina	17	20
Tirosina	5	4
Valina	17	34

^a Número de resíduos por cadeia α .

A estrutura em hélice tripla é possível graças a sua seqüência primária peculiar, na qual o triplete (Gly-X-Y) se repete ao longo das cadeias polipeptídicas, onde X e Y podem ser prolina ou hidroxiprolina respectivamente, e o restante, cerca de dois terços, estão ocupados por outros aminoácidos que são essenciais para a organização do colágeno em fibras (Figura 3 -a).

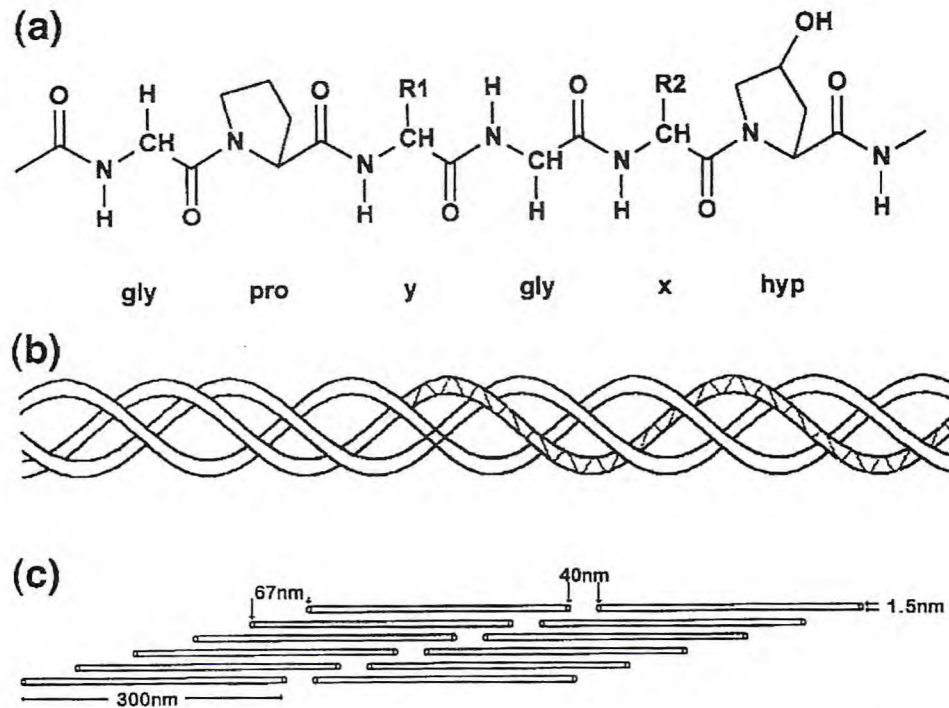


Figura 3 - Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária em hélice e terciária em hélice tripla (c) estrutura quaternária.

A ausência de cadeia lateral nos resíduos de glicina favorece o enovelamento das cadeias, com estes resíduos se localizando no interior da hélice, onde não há espaço para cadeias laterais. A distância entre cada resíduo de glicina é $8,7 \text{ \AA}$ (NIMNI, 1988). A separação entre resíduos individuais nas cadeias não permite a formação de ligações hidrogênio intra-cadeias, como é o caso das hélices α nas proteínas globulares, mas apenas ligações de hidrogênio inter-cadeias. As cadeias α do tropocolágeno formam ligações de hidrogênio entre si, através dos grupamentos $-\text{NH}$ dos resíduos de glicina e grupos carbonílicos de um resíduo de cadeia vizinha. Os grupos hidroxílicos de resíduos de hidroxiprolina e moléculas de água também participam destas ligações, o que contribui para a estabilidade da hélice tripla (BURJANADZE, 1982).

As cadeias laterais dos resíduos estão direcionadas para fora da hélice, onde elas podem interagir com cadeias laterais de outras moléculas de tropocolágeno, formando um determinado empacotamento macromolecular. Neste arranjo macromolecular, cada cinco moléculas de tropocolágeno se organizam lado a lado, deslocadas em $\frac{1}{4}$ de seu comprimento em relação à molécula adjacente, por forças

resultantes, principalmente, de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, no modelo conhecido como quarto alternado pentafibrilar (SMITH, 1968), para formar as microfibrilas, que se agregam formando as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos. Micrografias eletrônicas de fibrilas de colágeno coradas indicam que as moléculas de tropocolágeno estão separadas por falhas de 40 nm e que as fileiras adjacentes são deslocadas de 67 nm. Como o comprimento do tropocolágeno é 300 nm (Figura 3c), a periodicidade de 67 nm, chamado período D, corresponderá a 234 resíduos (VEIS, 1982).

Durante a maturação das fibras se estabelece no colágeno o processo de reticulação natural entre resíduos das cadeias laterais de lisinas e hidroxilisinas, presentes nos telopeptídeos. Estes são convertidos enzimaticamente em derivados aldeídicos, resultando em reticulações por reação com grupos amino, com formação de (RHC=NR') envolvendo diferentes cadeias da estrutura microfibrilar, o que confere estabilidade mecânica e biológica ao tecido. O progressivo decréscimo da solubilidade de tecidos colagenosos coincide com um gradual aumento da reticulação intermolecular (ROBINS e DUNCAN, 1983).

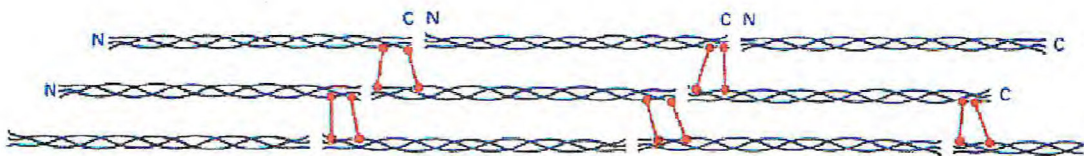


Figura 4 – Esquema da reticulação natural ao longo das fibras de colágeno.

A biossíntese do colágeno (RAMSHAW, *et al.*, 1995), desde a transcrição dos genes à secreção e agregação de monômeros de colágeno em fibrilas funcionais no tecido, é particularmente complexa. O colágeno fibrilar é sintetizado a partir de um precursor, o procolágeno, contendo domínios globulares que se estendem das extremidades N e C terminais, os propeptídeos.

O processo da biossíntese ocorre em duas etapas: uma intracelular com a formação do procolágeno e outra etapa extracelular onde ocorre a conversão proteolítica do procolágeno ao colágeno, cujas moléculas se arranjam em fibrilas e são posteriormente reticuladas.

Na fase inicial, as cadeias pro- α do procolágeno são sintetizadas nos ribossomos livres, com uma seqüência particular de aminoácidos através da tradução de informações codificadas pelo RNA mensageiro.

Peptídeos sinalizadores interagem com partículas reconhecedoras de sinais (PCR) produzindo complexos PCR-polipeptídeos capazes de se associarem com o retículo endoplasmático. Uma vez no retículo endoplasmático, peptidases sinalizadoras liberam cadeias de procolágeno, e resíduos específicos de lisinas e prolinas são hidroxilados, e algumas resíduos de lisinas modificadas por glicosilação.

Três hidroxilases estão envolvidas na reação de hidroxilação. A lisil hidroxilase, prolil 4-hidroxilase e prolil 3-hidroxilase catalizam a conversão de peptidil lisina a hidroxilisina e peptidil prolina a 4-hidroxiprolina e 3-hidroxiprolina. A presença de 3-hidroxiprolina não é muito frequente e ocorre somente na posição X do triplete (X-Y-Gly) que se repete ao longo da estrutura primária do colágeno, e somente quando hidroxiprolina ocorre na posição Y. As funções da 3-hidroxiprolina na estrutura do colágeno não são ainda bem conhecidas mas a presença de 4-hidroxiprolina é necessária para estabilização da hélice tripla. A presença de hidroxiprolina, hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada é quase exclusiva de estruturas colagênicas, com exceção de algumas proteínas que possuem domínios de hélice tripla em sua estrutura secundária. O grau de hidroxilação da prolina afeta a estabilidade da hélice tripla. Se a extensão da hidroxilação não for suficiente, a temperatura de desnaturação do colágeno (T_d), será mais baixa e o colágeno não terá estabilidade a temperatura fisiológica (NIMNI, 1988, ROBERT *et al*, 2001).

A glicosilação ocorre por ação de enzimas específicas, as glicosil transferases. Os açúcares são ligados a molécula de colágeno por ação seqüencial da galactosil e glicosil transferase as quais são enzimas de glicosilação específicas para resíduos de hidroxilisina no colágeno, antes da formação da hélice tripla.

Colágeno de vertebrados contém monossacarídeos como galactose e dissacarídeos, galactose-glucose, ligados covalentemente a resíduos de hidroxilisina no domínio de hélice tripla. A extensão da glicosilação varia entre os tipos de colágeno ou no mesmo tipo de colágeno em diferentes tecidos e em doenças causadas por mutações em genes de colágeno. As funções do carboidratos na estrutura colagênica é

desconhecida, e alguns autores tem sugerido participação na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno (BORNSTEIN, 1979).

Quando estas transformações enzimáticas ocorrem as três cadeias do procolágeno se associam a partir do C-terminal, e é iniciada a formação da hélice tripla, e formando domínios globulares específicos N e C terminais dos propeptídeos. A etapa de enovelamento cessa a reação de hidroxilação de resíduos de lisina, prolina e glicosilação de hidroxilisina por ação de enzimas específicas.

As moléculas de procolágeno modificadas, são transportadas através do complexo de Golgi e empacotadas em vacúolos secretores para a membrana celular, onde são liberadas por exocitose para o espaço extracelular. Tem sido observado nesses vacúolos, a presença de moléculas de procolágeno na forma de agregados, o que sugere não ocorrer a liberação de procolágeno monomérico. Numa etapa seguinte, os domínios dos propeptídeos da molécula de procolágeno, são clivados por proteases específicas, as procolágeno peptidases que aparentemente são produzidas pelas mesmas células que sintetizam o colágeno. As moléculas de tropocolágeno originadas se agregam para formarem as fibrilas de colágeno (RAMSHAW, *et al.*, 1995 e ROBERT, L, *et al.*, 2001).

A estrutura condensada de tripla hélice é resistente à ação das proteases, tais como pepsina, tripsina, quimotripsina etc., com exceção da collagenase e tratamento prolongado com pronase. A resistência da hélice tripla à degradação proteolítica tem sido extensivamente usada para examinar a sua estabilidade térmica (Td) (NIMNI, 1988).

Comumente o colágeno é obtido por processo de extração, tendo como matéria-prima tecido conjuntivo de animais jovens. Variando-se o pH e a concentração de sais do meio de extração é possível solubilizar o colágeno de matrizes ainda não reticuladas. As moléculas de colágeno formam soluções muito viscosas, estáveis em meio ácido, à baixa força iônica e à temperatura ambiente (MILLER *et al.*, 1982).

Com o aquecimento dessas soluções ocorrem grandes alterações nas propriedades físicas do colágeno devido à destruição da estrutura tridimensional da hélice tripla. Assim, o movimento térmico supera as forças que estabilizam a hélice, conduzindo a uma estrutura desordenada que corresponde a disposição das cadeias α

ao acaso. A transição estrutural ocorre a uma determinada temperatura de desnaturação, T_d , que pode ser alterada em função do solvente, pH ou pela presença de sais.

Quando é adicionado sal ao colágeno solúvel em meio ácido, ou quando se eleva o pH para faixas próximas ao ponto isoelétrico, pI, do tropocolágeno, a proteína precipita na forma de fibras, cuja morfologia é similar a das fibras formadas *in vivo*. O processo de formação de estruturas filamentosas pelo arranjo ordenado das moléculas de colágeno é chamado fibrilogênese (PIEZ *et al.*, 1982). A capacidade do colágeno de se reconstituir a partir de soluções ácidas diluídas e sua alta biocompatibilidade, levou a uma gama de aplicações principalmente de interesse biomédico: na engenharia de tecidos no reparo ou substituição de tecidos ou órgãos, vários produtos hemostáticos para fins cirúrgicos, revestimento de produtos biomédicos para aumentar a biocompatibilidade e a funcionalidade biológica do implante artificial (LEE *et al.*, 2001, GOISSIS, *et al.*, 1998, SUNG, *et al.*, 2000).

Têm sido desenvolvidos géis de colágeno pelo uso de colágeno aniônico, um polímero com resultante de carga negativa em pH neutro, que pode ser preparado por hidrólise seletiva de resíduos de asparagina e glutamina presentes na proteína. A expectativa é a obtenção de géis de colágeno injetáveis mais estáveis que não necessitam do tratamento com glutaraldeído (GOISSIS *et al.*, 1997).

Tem sido investigado o efeito da presença de alguns polissacarídeos com colágeno. Tem sido estudadas as propriedades físico-químicas de géis de colágeno com polímeros microbianos como ramsana (GOISSIS *et al.*, 1997), glicosaminoglicanas, e polissacarídeos sulfatados (KONG *et al.*, 1997), e de crustáceos como quitosana (TARAVEL e DOMARD, 1996).

I. 3. GALACTOMANANAS

Os polissacarídeos (CHAPLIN & KENNEDY, 1986) são polímeros de alto peso molecular e constituem um dos maiores grupos de compostos naturais. Possuem funções estruturais e são as principais fontes de energia dos organismos vivos. Podem ser modificados quimicamente, são estáveis, atóxicos, hidrofílicos e capazes de formarem géis biodegradáveis o que sugere, entre outras aplicações, seu uso em sistemas de liberação de drogas.

Sua estrutura química corresponde a polímeros de monossacarídeos ligados entre si, em cadeias lineares ou ramificadas, por ligações glicosídicas formadas através de reação de condensação de um grupo hidroxílico de um monossacarídeo, com o hemiacetal intramolecular de outro monossacarídeo, com eliminação de uma molécula de água.

A classificação dos polissacarídeos, tem como base seus principais componentes monossacarídicos, a seqüência e ligações entre eles, bem como a configuração α ou β das ligações glicosídicas, a estrutura do anel, furanose ou piranose, a configuração D ou L dos resíduos de monossacarídeos e outros substituintes presentes.

Suas propriedades físico-químicas, são influenciadas por certas características estruturais tipo conformação da cadeia e associações intermoleculares. Os polissacarídeos ordenados de forma regular, em geral são capazes de assumirem um número limitado de conformações devido às restrições estéricas, no grau de liberdade de rotação dos açúcares em torno das ligações glicosídicas entre as unidades.

As plantas possuem uma parede celular rígida que lhes dá forma e capacidade de resistir às diferenças de pressão osmótica entre os espaços inter e extracelulares. Nas plantas superiores a parede celular também tem um papel de sustentação, onde a celulose é o componente estrutural primário. Existem por outro lado os polissacarídeos de reserva que a planta sintetiza, como o amido, depositado no citoplasma das células vegetais, como grãos insolúveis compostos de amilose e amilopectina. As plantas superiores, da classe das angiospermas, se caracterizam pela presença de sementes, e

em seu cotilédone e endosperma. Em muitos casos eles constituem 40% ou mais do peso seco da semente (ASPINELL, 1982).

A estrutura molecular dos polissacarídeos tanto pode ser linear, formada de uma simples cadeia de unidades monossacarídicas, unidas por ligações glicosídicas, como o alginato, ou estruturas lineares com ramificações como a xantana e a galactomanana.

As galactomananas são polissacarídeos de reserva presentes em endospermas de sementes principalmente de Leguminosas. A sua função na planta também está relacionada com a retenção e regulação de água durante a germinação além de defesa contra predadores (SCHERBUKHIN *et al*, 1998).

São constituídas em geral, de cadeias lineares de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4), com substituições de galactose ligadas a unidades de D-manose da cadeia linear através de ligações glicosídicas α -(1-6) (DEA e MORRISON, 1975) (Figura 5).

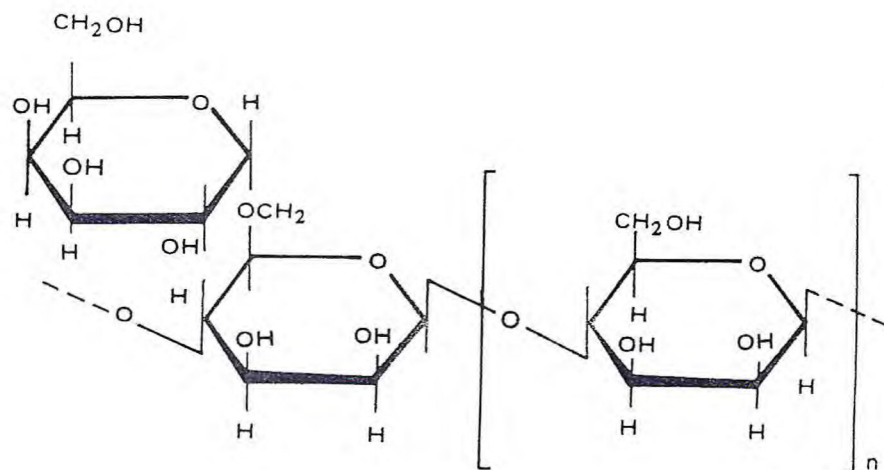


Figura 5 – Estrutura química das galactomananas

Embora pouco freqüentes, têm sido encontradas algumas exceções para essa estrutura clássica. Sementes de *Parkinsonia aculeata* indicam a ocorrência de ligações do tipo β -(1-4), β -(1-3), e β -(1-6) ao longo da cadeia principal (GURHA & SINGH 1988). Em galactomananas de certas espécies do gênero *Cassia* ou *Crotalaria*, são encontradas ligações do tipo β -(1-4) ao longo da cadeia principal contendo

ramificações, com ligações do tipo α (1-2) ou α (1-6), de resíduos de galactose (UNRAU *et al*, 1970).

A presença de outros açúcares, embora em pequenas proporções, tais como, xilose e arabinose, tem sido relatada em galactomananas isoladas de sementes de *Gleditsia triacanthos*. Análises do produto após reação de metilação, sugere a presença desses açúcares na extremidade de algumas cadeias laterais (MANZI, *et al*, 1984).

O teor e a distribuição das unidades de D-galactose depende da espécie de leguminosa que origina a galactomanana, e das técnicas de extração utilizadas em sua obtenção. Têm sido encontradas galactomananas com diferentes relações manose:galactose (M/G), variando de 1:1 a 5,7:1 com teor de galactose de 15 a 50%. Essa relação indica que o número de cadeias laterais é determinado pelo número de resíduos de galactose (SCHERBUKHIN, *et al*, 1999).

A crescente quantidade de galactomananas analisadas, tem mostrado certa dependência taxonômica entre as diferentes espécies com relação a proporção M/G. Entretanto galactomananas de sementes de diferentes fontes podem apresentar o mesmo teor de galactose, e diferente distribuição ao longo da cadeia de manose. Por exemplo, sementes de *Schizolobium parahybae* e *S. amazonicum* apresentam idêntica relação M/G, de 3:1 e mesma distribuição de galactose ao longo da cadeia de manose. No entanto, galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* mostraram mesma relação M/G, mas uma estrutura fina significativamente diferente das espécies *Schizolobium* (PETKOWICZ, *et al* 1998).

A distribuição de unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal, para as diferentes espécies, apesar das diferenças, tem seguido um certo padrão o que sugere a ocorrência de três estruturas como possíveis modelos para essa distribuição (Figura 6) (DEA e MORISSON 1975).

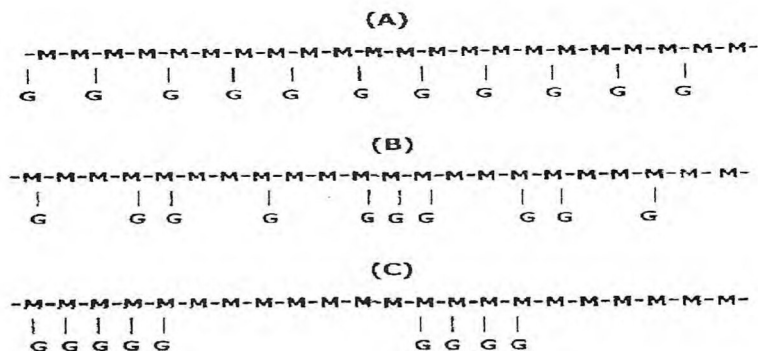


Figura 6 - Diferentes distribuições de D-galactose (G) na cadeia principal de manose (M).

As propriedades físico-químicas e conformacionais das galactomananas estão estritamente relacionadas com a relação M/G e a distribuição de galactose ao longo da cadeia principal. A solubilidade em água é afetada pelo grau de substituição de galactose na cadeia principal. A galactomanana de goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*) com razão M/G de 3,5 apresenta baixa solubilidade à temperatura ambiente quando comparada com a goma de Guar (*Cyamopsis tetragonalbus L*), cuja relação M/G é cerca de 1,8 (DEA e MORRISON 1975).

O teor de galactose no polissacarídeo, produz ainda um efeito pronunciado em suas propriedades reológicas. As galactomananas em água formam soluções altamente viscosas, e as propriedades do polímero em solução, são controladas pelas características moleculares tais como peso molecular e estrutura química (ANDRADE, *et al*, 1999).

Embora a estrutura química das galactomananas, de sementes de muitas espécies tenham sido estudadas, poucas fontes desse polissacarídeo são utilizadas comercialmente. Goma de guar e de alfarroba têm sido cultivadas com esse propósito (DEA e MORISSON, 1975).

Estudos da estrutura fina de galactomananas de diferentes fontes, tem sido conduzidos com os oligossacarídeos obtidos após hidrólise ácida ou hidrólise enzimática parcial do polímero. Uma combinação de técnicas tem sido usada na identificação desses oligossacarídeos, utilizando procedimentos enzimáticos e métodos

químicos tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono, espectrometria de massa, cromatografia líquida, entre outras (GANTER, 1999).

A presença de grupos funcionais livres nas galactomananas, como as hidroxilas, usualmente três em cada unidade de monossacarídeo na cadeia, possibilita sua modificação química que inclui alteração do grau de polimerização, eterificação, esterificação, oxidação e reticulação. Como agentes de reticulação têm sido usados epícloridrina, glutaraldeído, borax, entre outros (APPUKUNTTAN 1977, RUBINSTEIN e KABIR, 1995, KABIR 1999).

A modificação química introduz mudanças nas propriedades físicas e físico-químicas do polímero melhorando sua aplicabilidade especialmente na indústria de alimentos e cosmética. O controle das propriedades reológicas do polissacarídeo em meio aquoso confere produtos com propriedades desejáveis tais como estabilidade, textura e liberação controlada de atividade de produtos farmacêuticos. Estudos empregando goma de guar, reticulada com glutaraldeído, relacionam os efeitos desse tratamento na redução da embebição com a oclusão da droga pela goma, evitando assim sua liberação logo após administração oral (KABIR, 1998).

A reticulação de goma de guar com tri-metafosfato de sódio, sugere um produto com capacidade de embebição controlada, para uso em liberação de drogas com ação específica na região do cólon (KABIR, *et al* 2000). Efeito semelhante foi observado com o polissacarídeo modificado quimicamente pelo borax (RUBINSTEIN e KABIR, 1995).

As galactomananas são amplamente utilizadas como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes, encapsuladores, em uma variedade de aplicações industriais. O estudo de sua estabilidade em meio ácido é de considerável importância no processamento de alimentos, indústria de óleo e produtos dietéticos ricos em fibra. A goma de guar tem sido a fonte de galactomanana mais estudada com essa finalidade (WANG, *et al*, 2000). As galactomananas por não serem digeríveis, podem ainda ser usadas para aumentar o teor de fibras em alimentos (KABIR *et al.*, 1999).

polissacarídeos tipo xantana, pode produzir gel. O nível de distribuição de galactomanana desempenha importante função na formação do gel. Um crescente interesse comercial de aplicação da galactomanana está relacionado à sua capacidade de associação com outros polissacarídeos como a xantana, conferindo um produto com propriedades gelificantes, fato não observado para os polissacarídeos isoladamente. Xantana e galactomanana têm sido uma mistura amplamente utilizada na indústria devido ao efeito sinérgico que promovem (BRESOLIN *et al.*, 1999).

De um modo geral, têm surgido novas oportunidades de aplicação dos polissacarídeos, ampliadas pela possibilidade de sua modificação química ou enzimática. Uma alternativa interessante na preparação de polímeros modificados com atividade biológica é oferecida pela reação de sulfatação, onde alguns desses produtos semi-sintéticos simulam as propriedades anticoagulantes da heparina (SOUZA *et al.*, 1998, HUSSEIN, 1998). Novos polieletrólitos têm sido produzidos a partir de galactomanana extraídas de sementes de *Leucaema leucocephala*, modificada com derivados de piperidina, cujo produto apresenta maior solubilidade em solvente aquoso em comparação a galactomanana nativa, ampliando assim sua aplicação industrial (SIERAKOWSKI *et al.*, 2000).

O gel de galactomanana, a ser empregado como matriz para cromatografia de afinidade, pode ser obtido através de reticulação da goma com epicloridrina em meio alcalino (APPUKUNTAN, 1977). A reação liga covalentemente cadeias diferentes do polissacarídeo através da interação da epicloridrina com grupos hidroxilas dessa cadeias, produzindo ligações do tipo glicerol 1-3 éter (Figura 7). A reação confere um gel com maior insolubilidade, resistência mecânica e estabilidade.

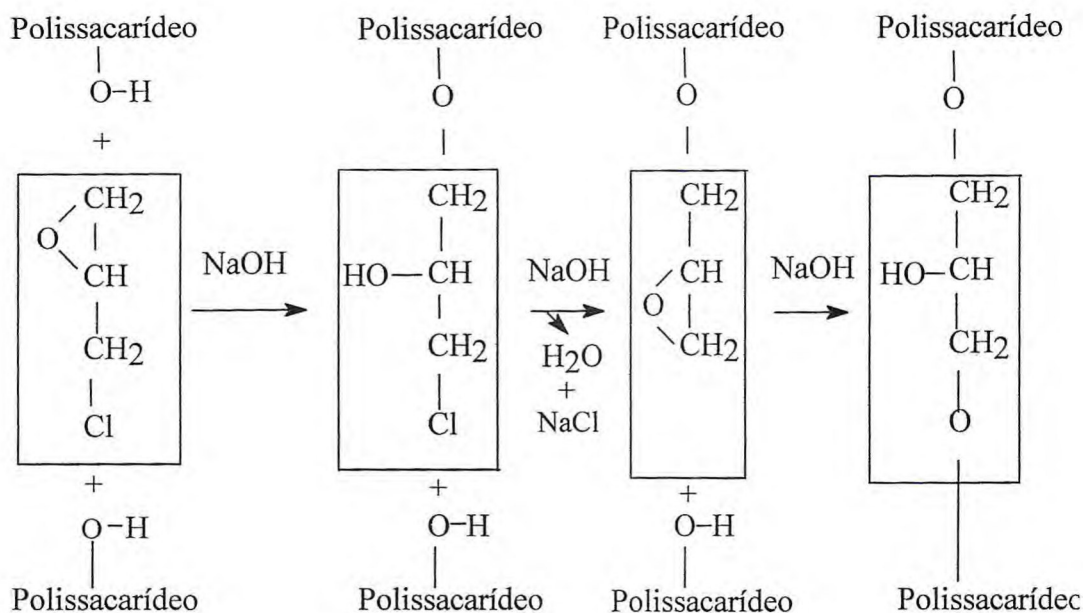


Figura 7 – Reação de dextrana com epicloridrina na formação do gel sephadex

A galactomanana de *Adenanthera pavonina* (Carolina) foi empregada como matriz de afinidade para isolamento de lectinas galactose-específicas de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Vaitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius*, *Abrus pulchellus*. Sua estrutura elucidada, é típica das galactomananas de leguminosas, uma cadeia linear de D-manose com ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), e ramificações de galactose ligadas a unidades de D-manose da cadeia principal por ligações glicosídicas α -(1-6). A proporção M/G para *Adenanthera pavonina* é de 1,8:1 (TAVARES, 1998, MOREIRA 1998). Outras galactomananas endospermicas mostram comportamento semelhante (ROSA, 2000, MATOS, 2000, BRAGA, 2001).

1.4. LECTINAS

As lectinas são proteínas ligantes de carboidratos, envolvidas em uma variedade de processos de reconhecimento celular. Exibem diversidade estrutural, habilidade de aglutinar células, e têm sido obtidas em alto grau de pureza por cromatografia de afinidade. Possuem aplicações nos diversos campos desde áreas de interesse clínico, na tipagem de células sanguíneas, como marcadores taxonômicos de microorganismos específicos, em sistemas de diagnóstico, a elucidação de estruturas de carboidratos e proteínas KENNEDY *et al*, (1995).

PEUMANS & VAN DAMME (1995), descrevem as lectinas como proteínas de origem não imune possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidrato e capazes de se ligarem a mono ou oligossacarídeos específicos. Com base em sua estrutura, essa classe de proteínas foi dividida em três tipos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas.

- Merolectinas são lectinas constituídas de um único domínio de ligação a carboidrato. Sendo de natureza monovalente são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.
- As hololectinas compreendem todas as lectinas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, o que as tornam capazes de aglutinar células.
- As quimerolectinas, são lectinas que além de possuírem um ou mais sítios de ligação a carboidrato, possuem um outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida.

As lectinas foram descobertas através de sua habilidade de aglutinar células vermelhas do sangue. Muitas delas sendo multivalentes, são capazes de interligar os açúcares presentes na superfície dessas células. Um grande número de lectinas foram isoladas e caracterizadas com relação à sua especificidade de ligação a carboidrato, estrutura molecular e propriedades bioquímicas.

As lectinas encontram-se distribuídas em uma grande variedade de organismos vivos nas diversas espécies vegetais, animais vertebrados e invertebrados, vírus, bactérias, protozoários e fungos (SHARON & LIS, 1989). A enorme ocorrência dessas proteínas nas mais variadas espécies, tecidos ou células, mostra a importância dessas

moléculas na natureza. As mais estudadas tem sido as lectinas de plantas superiores, principalmente as espécies pertencentes à divisão *Angiospermae* (Classes *Monocotyledoneae* e *Dicotyledoneae*) com grande evidência as gramíneas e as leguminosas, estas últimas com o maior número de lectinas isoladas (SHARON & LYS, 1990).

As lectinas de sementes de cereais como o trigo, arroz, milho e cevada, têm sido encontradas em espaços extracelulares, em vacúolos de células do embrião e endospermas. Nas sementes das leguminosas, as lectinas chegam a constituir até 10 % do teor de proteína total. Estão localizadas principalmente nos cotilédones quase exclusivamente nos órgãos de reserva. Outras plantas acumulam lectinas em outros tecidos vegetais como folhas, caules, frutos, cascas, flores, bulbos, rizomas e raízes (PUSZTAI *et al.*, 1991). Têm sido encontradas também em cactus e algas (PEUMANS *et al.*, 1994, BENEVIDES *et al.*, 1996, FREITAS *et al.*, 1997).

Originadas de plantas de diferentes espécies, as lectinas frequentemente diferem com respeito à estrutura molecular e especificidade. A comparação da sequência primária de lectinas de diversas origens, mostram extensiva homologia. Várias lectinas de leguminosas foram sequenciadas por métodos clássicos, o que tem tornado possível a comparação de aspectos evolucionários e quimotaxonômicos na compreensão das funções das lectinas, e alteração de genes durante a evolução das plantas (PUSZTAI, 1991).

A maioria das lectinas de leguminosas estudadas, contém íons metálicos tais como cálcio e manganês, como parte de sua estrutura nativa. A presença desses íons indica ser importante para atividade biológica dessas proteínas conferindo a essas lectinas, estabilidade estrutural, resistência a inativação pelo calor e resistência a degradação enzimática (SINGH, 1999).

Tem sido observada a presença de sítios hidrofóbicos em lectinas de leguminosas, os quais podem ocorrer dentro de uma única subunidade ou se estabelecer no interior do tetrâmero. Essa região tem sido chamada de cavidade hidrofóbica e no caso das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A), é composta de resíduos de valina, fenilalanina, leucina e isoleucina. A existência de tais cavidades hidrofóbicas na estrutura das lectinas deve produzir importantes

consequências biológicas tendo sido sugerido que as lectinas podem atuar não somente em virtude de sua habilidade em se ligar a carboidratos, mas também servindo como proteínas que se ligam a compostos hidrofóbicos biologicamente ativos (SHARON & LIS, 1990).

Associada à capacidade das lectinas de interagirem com carboidratos, está o fato dessas proteínas consistirem de subunidades formando dímeros e tetrâmeros. A análise estrutural e cristalográfica de raios X tem mostrado unidades monoméricas que se associam em uma variedade de formas (LORIS *et al.*, 1998).

As lectinas possuem em geral, de duas a quatro subunidades, idênticas ou não, com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa, contendo por subunidade, um sítio de ligação a carboidrato com mesma especificidade. As subunidades são compostas de uma a duas cadeias polipeptídicas, como exemplo nesse último caso, as lectinas de Leguminosas da tribo *Viceae* (Gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens*), que possuem cadeias leves denominadas α (5 a 7 kDa), e cadeias pesadas denominadas β (15 a 19 kDa) (SHARON e LIS, 1989).

Essas cadeias polipeptídicas, apresentam extensa homologia, notável entre as lectinas de mesma tribo ou sub-tribo. Lectinas de *Vicieae* tem mostrado 60% de homologia enquanto lectinas de *Diocleinae* chega a atingir 90% de homologia no mesmo gênero e mais de 80% em espécies de gêneros diferentes (FUJIMURA *et al.*, 1993).

A Con A foi a primeira lectina a ser sequenciada e sua estrutura tridimensional definida por difração de raios X (HARDMAN & AINSWORTH, 1972). A lectina é um tetrâmero constituído por subunidades de 25,5 kDa, cerca de 51% dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica estão dispostos em estruturas β que formam duas folhas pregueadas antiparalelas. As interações entre cada duas subunidades que formam o dímero e posteriormente o tetrâmero, são provenientes de ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (LORIS *et al.*, 1998) (Figura 8).



Figura 8- Estrutura quaternária da Con A complexada com pentassacarídeos (MOOTHOO e NAISMITH, 1998).

O sítio ligante de carboidrato na Con A, um por cada subunidade, está localizado em uma depressão na superfície da proteína e distante 10 a 14 ângstrons do íons Mn^{2+} . Os resíduos envolvidos na ligação são Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 (UDEDIBIE e CARLINI, 1998).

As subunidades podem ainda apresentar diferentes padrões de associação que dependem do pH do meio. A lectina da *Dioclea grandiflora* apresenta-se na forma de um tetrâmero entre pH 5 e 8 com peso molecular em torno de 100.000 Da. Acima de pH 8 ocorre a formação de agregados de peso molecular mais elevados enquanto em pH abaixo de 5 apresenta-se como um dímero (MOREIRA *et al.*, 1983). Já a lectina de *Dioclea guianensis*, a pH 7,5 apresenta-se com duas formas: 74,4% de sua estrutura como dímero, e 25,6 % como tetrâmero (VASCONCELOS *et al.*, 1991). No caso da Con A, a proteína torna-se um tetrâmero acima de pH 7 e um dímero abaixo de pH 5 (LORIS, *et al.*, 1998).

Todas as lectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, propriedade que lhe garante também a habilidade de aglutinar células. A especificidade das lectinas é em geral definida com base no teste de inibição da hemaglutinação de

eritrócitos com vários açúcares. A ligação de muitas lectinas pode ser efetivamente inibida com mais de um carboidrato (PUSZTAI, 1991).

Com base na reatividade da lectina com monossacarídeos que diferem na configuração do C3 e C4 no anel piranosídico, MÄKELÄ (1957) classificou as lectinas, de acordo com sua especificidade por açúcares simples: as específicas por L-fucose, D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, D-glucose/D-manose e outras pertencentes a um quarto grupo até então não identificado. Posteriormente foram incluídas: as específicas por N-acetil-glicosamina, e ácido siálico (PUSZTAI, 1991, MOREIRA *et al.*, 1991).

Tendo em vista a exata especificidade das lectinas, a maioria dessas proteínas tem sido purificadas com alto grau, por métodos de afinidade química.

As lectinas específicas por D-glucose/D-manose têm sido as mais estudadas, como por exemplo, a ConA, a primeira lectina isolada por cromatografia de afinidade. Outras tem sido isoladas, como é o caso da lectina de semente de *Dioclea grandiflora* ou do gênero *Lathyrus*, com certa homologia em relação a Con A (PUSZTAI, 1991).

Entre as lectinas específicas por N-acetil-D-galactosamina, distingue-se a da batata, *Solanum tuberosum*, a qual tem sido isolada usando cromatografia por afinidade com Sepharose-fetúina (SLIFKIN e DOYLE, 1990). Outras lectinas importantes dessa classe são as de germe de trigo (WGA) cuja maioria de suas preparações pode conter três ou quatro isolectinas. As lectinas específicas por D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, são amplamente distribuídas na natureza e a primeira observada por STILLMARK (1888) (*Ricinus communis*). A ricina é uma glicoproteína dimérica com peso molecular em torno de 63.000 g/mol. É composta de duas subunidades A e B unidas por ligações dissulfeto (PUSZTAI, 1991). Outro exemplo é a de feijão de soja, *Glycina max*, que são conhecidas por conter um número de isolectinas, cada uma com diferentes pontos isoelétricos. As lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que reconhecem carboidratos complexos de composição e estrutura apropriadas. Em algumas variedades de sementes de *Phaseolus vulgaris*, a molécula de lectina possui duas subunidades diferentes que tem sido isoladas em coluna de Sephadex: a subunidade E que aglutina eritrócitos, e a subunidade L que aglutina linfócitos (PUSZTAI, 1991).

Um pequeno grupo de lectinas possui afinidade pela L-fucose. Algumas delas são reagentes úteis para determinação de resíduos de fucose em estruturas de carboidratos complexos (SHARON & LIS, 1989). Algumas dessas lectinas, *Ulex europeus* I, são usadas como reagentes de grupo sanguíneo tipo O (SLIFKIN e DOYLE, 1990).

As funções das lectinas nas plantas, podem estar relacionadas ao transporte de açúcares ou reservas de proteínas, na proteção contra patógenos e insetos, participando do fenômeno de reconhecimento tanto intercelular quanto intracelular (PUSZTAI 1991, PEUMANS e VAN DAMME, 1993).

Em funções de reconhecimento celular, o sistema mais conhecido é o que governa a aderência do vírus *influenza* às células alvo. O vírus utiliza uma lectina para se ligar a célula hospedeira. O mesmo ocorre com várias espécies de bactérias, como exemplo a *Escherichia coli*, que adere as células epiteliais do trato urinário e gastrointestinal, através de lectinas produzidas em sua superfície (SHARON e LIS 1989).

As lectinas, especialmente de sementes das leguminosas, estão envolvidas no reconhecimento de bactérias com a finalidade de estabelecer a simbiose entre microorganismos fixadores de nitrogênio (SEQUEIRA, 1978).

As lectinas podem provocar crescimento e divisão dos linfócitos T e B, sendo que a maioria estimula somente linfócitos T. Esta atividade mitogênica foi descoberta por NOWELL (1960), com a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Uma importante propriedade das lectinas mitogênicas é sua habilidade em estimular uma grande porção de linfócitos com diferentes especificidades antigênicas (SHARON & LIS 1989).

A função de defesa das plantas contra o ataque de fungos e insetos, tem sido atribuída, principalmente as lectinas que se ligam a quitina, um polissacarídeo de N-acetil-glicosamina, que constitui um elemento estrutural importante da parede celular de muitos fungos patogênicos, do exoesqueleto, e do trato digestivo dos insetos e da cutícula de nematóides (PEUMANS & VAN DAMME, 1994; LERNER & RAIKHEL, 1992). As características da biologia destas lectinas é compatível com esta função e além disso, muitas dessas lectinas possuem uma alta toxidez “in vitro” a vários insetos e fungos. Existem evidências conclusivas de que as lectinas de *Urtica dioica* que se

ligam a quitina, apresentam definitivamente propriedades antifúngicas, assim pode ser considerada uma proteína de defesa contra instalação de colônias fúngicas na planta (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

A WGA tem sido estudada com respeito a sua função fisiológica. Há evidências de que, a WGA protege a planta do trigo contra agentes fitopatogênicos que contém quitina na parede celular, durante o processo de embebição da semente, germinação, e fase inicial de crescimento da plântula (MIRELMAN *et al.*, 1975).

Algumas lectinas apresentam toxicidade para células animais. Ricina e abrina causam danos, por serem resistentes a proteólise, podendo ligarem-se as células da mucosa intestinal e permanecer o tempo suficiente para interferir com a função digestiva (PUSZTAI 1991). Os ensaios de alimentação de animais com sementes artificiais contendo diferentes níveis de lectinas, apresentam toxicidade a algumas espécies de insetos (PUSZTAI & BARDOCK 1995).

A disponibilidade de um grande número de lectinas com diferentes especificidades por carboidratos, tem sugerido o uso dessas proteínas com grande potencial de aplicação na indústria, agricultura, medicina e bioquímica por sua capacidade em reconhecer glicoconjugados de receptores das superfícies celulares. Na agricultura, foi introduzida uma nova área de pesquisa, com ênfase nas lectinas de plantas com alta toxicidade e economicamente viável contra o ataque de insetos as plantações (PEUMANS e VAN DAMME 1993).

Algumas lectinas são usadas no fracionamento de células animais, incluindo linfócitos B, T, e podem demonstrar mudanças na arquitetura da superfície das células resultantes de infecção por vírus ou parasitas (SLIFKIN *et al.*, 1990).

Devido a capacidade de interação com carboidratos específicos, as lectinas são aplicadas em pesquisas envolvendo glicoproteínas e gliconjugados. Lectinas imobilizadas em Sepharose 4B, tem sido utilizadas como matrizes em colunas de cromatografia de afinidade, no isolamento de glicoproteínas do plasma, (ILLES *et al.*, 1990).

As lectinas são utilizadas em estudos histoquímicos e citoquímicos, como por exemplo, no estudo da composição das membranas celulares das vias intracelulares de glicosilação (SHARON e LIS, 1989). Muitos autores relatam a aplicação de lectinas na

identificação de células cancerígenas como é o caso da lectina da *Helix pomatia* que pode ser usada na identificação do câncer de mama (YUAN *et al.*, 1986).

Na microbiologia e parasitologia, as lectinas de *Triticum vulgare* (WGA) e de *Arachis hypogaea* (PNA), podem ser usadas para diferenciar populações de *Trypanosoma cruzi* localizados em diferentes regiões geográficas (SCHOTTELIUS *et al.*, 1990).

As lectinas tem sido usadas em sistemas de liberação de drogas (RUSSELL, 1999). Tem sido consideradas importantes reagentes usados na investigação da superfície de células receptoras em bactérias, protozoários e organismos superiores (KARAMANOS *et al.*, 1996). A interação de lectinas vegetais com microorganismos tem sido aplicada para caracterizar bactérias, fungos, e protozoários. A identificação e classificação taxonômica de muitos microorganismos em laboratório clínico tem sido realizada usando as lectinas. (SLIFKIN, 1983).

Uma das vantagens de aplicação de lectinas em microbiologia deve-se aos sítios receptores de superfície celulares, que podem ser parcialmente caracterizados por estudos de inibição de hapteno. Quando conjugada com um marcador histoquímico, tipo fluoresceína ou peroxidase, as lectinas podem ser usadas como provas histoquímicas para identificar e localizar resíduos de carboidratos específicos em microorganismos por microscopia eletrônica (SLIFKIN *et al.*, 1990).

Outras aplicações, envolvem a utilização de lectinas em biossensores (SOSNITZA, *et al.*, 1998). Tem sido desenvolvidos eletrodos com superfície modificada com filmes ultra finos em camadas, de enzimas como a glicose oxidase, utilizando a Con A para adsorção das monocamadas na formação do filme (KOBAYASHI, 2001). Outros autores estudam o mecanismos de reação de lectinas como a Con A e lectina de *Cratylia mollis*, através de técnicas eletroquímicas (SOUZA *et al.*, 2001).

1.5. BIOSSENSORES

A área de biossensores (SCHELLER, *et al*, 2001, COLLINGS e CARUSO, 1997) tem atraído considerável interesse nos últimos anos, tendo em vista a monitoração de substâncias bioativas ser fundamental em muitas aplicações tais como análise clínica, controle ambiental e processos industriais. Como qualquer outro sistema sensorial, pode ser dividido em três componentes principais: um detector que reconhece o sinal de interesse, um transdutor que converte o sinal em uma resposta útil, geralmente eletrônica, e um amplificador que amplifica, mostra e grava a resposta em formato adequado.

Os detectores podem ser classificados em dois grupos distintos: catalíticos e afinidade. Nos receptores catalíticos, enzimas são utilizadas como elemento de reconhecimento. As enzimas mais utilizadas do ponto de vista analítico são as oxidoredutases, as quais usam oxigênio ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para catalisar a oxidação de compostos, e as hidrolases, que catalisam a hidrólise. Por exemplo, a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glucose em ácido glicônico, que é a base do monitoramento da glucose em diabéticos (COLLINGS, 1997).

Ao contrário dos receptores catalíticos, os receptores de afinidade são mais específicos na natureza da ligação, mas não exibem atividade catalítica. Portanto, receptores de afinidade são mais apropriados para a detecção direta do componente do que para aplicações de monitoramento. Devido aos altos valores das constantes de reação, a ligação receptor-composto, favorece a detecção seletiva de pequenas quantidades de analitos.

Imunoreceptores (anticorpo/antígeno) (LUPPA, *et al*, 2001) são os tipos dominantes de receptores de afinidade. Estão também incluídos no grupo dos receptores uma série de proteínas não catalíticas de origem não imune, que abrange as membranas celulares e permite que a transdução do sinal através da membrana ocorra por uma mudança estrutural ou por uma associação com atividade enzimática. A função e os mecanismos de ligação dessas proteínas de membranas podem ser classificadas em dois grupos: aqueles que abrem um canal iônico através da membrana

e aqueles que envolvem a geração de mensageiro secundário. A acetilcolina é um exemplo do primeiro grupo de receptores de membranas. Talvez o exemplo mais importante do segundo grupo de membranas receptoras sejam as lectinas. A Con A por exemplo, tem sido utilizada em sistemas de biossensores (BARNES *et al*, 1992)

Um biossensor é um sistema analítico contendo um material no qual é imobilizado um composto biologicamente ativo, que está em contato com/ou integrado com o transdutor, que por sua vez, pode ser piezelétrico, acústico, ótico, calorimétrico ou eletroquímico. Um fator chave na construção de um biossensor é o desenvolvimento de técnicas de imobilização que prendam a biomolécula com eficiência sem prejudicar sua estabilidade. Uma rota usual é produzir um filme fino do material biologicamente ativo sobre ou próximo a superfície do transdutor que responda apenas na presença de um ou grupos de substâncias requeridas na detecção.

Entre as técnicas de transdução, os transdutores piezelétricos são de maior interesse para nosso trabalho. Os dois tipos de sistemas piezelétricos sensoriais mais usados são: microbalança de cristal de quartzo (QCM) e onda acústica de superfície (SAW).

O QCM consiste em um disco fino de quartzo com eletrodos de filme fino de metal em ambas as faces. Com aplicação de voltagem alternada nos eletrodos, a frequência de ressonância varia com a espessura do cristal. A frequência de ressonância é inversamente proporcional à espessura do cristal. Quando a superfície do cristal é sujeita a um aumento de massa, a variação da frequência é dada por (SAUEBREY, 1959)

$$\Delta f = C_Q f^2 \Delta m/A \quad (1)$$

onde C_Q é a sensibilidade, Δm é o aumento de massa, A é a área do cristal e f , a frequência de ressonância.

No sistema SAW (Onda Acústica de Superfície) a onda acústica se propaga na superfície de um substrato piezelétrico, como quartzo, niobato de lítio ou ZnO, sobre o qual são depositados os eletrodos metálicos, na forma de capacitores.

Um eletrodo transmite a onda acústica superficial e o segundo eletrodo recebe a energia acústica (Figura 9). A frequência da onda transmitida pode ser atenuada pela ligação de biomolécula sobre a superfície. A diferença das frequências de transmissão

e recepção depende da variação da massa na superfície, que pode ser expressa pela equação (WOHLTJEN, 1984):

$$\Delta f = C_s f^2 \Delta m/A \quad (2)$$

onde C_s é a sensibilidade do substrato, que é função das propriedades do material, Δm é o aumento de massa, A é a área do cristal e f é a frequência de ressonância.

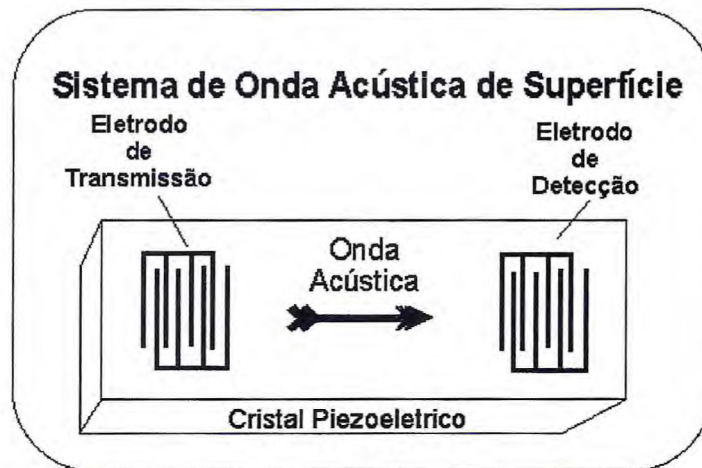


Figura 9 – Dispositivo de onda acústica de superfície

Uma importante vantagem do sistema SAW sobre o QCM é que ele opera à frequências maiores e, portanto, o raio $\Delta f/f$ pode ser aumentado.

- ***Piezeletricidade***

Piezeletricidade é a propriedade que alguns materiais têm de serem capazes de responder eletricamente a tensões mecânicas e mecanicamente a tensões elétricas (FUKADA, 1995). Este fenômeno é próprio de alguns materiais especialmente os cristais, e foi descoberto pelos irmãos Jaques e Pierre Curie no final do século XIX. O prefixo “piezo” provém do grego que significa pressionar. Os materiais piezelétricos podem ser encontrados em várias aplicações, como por exemplo, em transdutores de ultra-som, acelerômetros, transdutores de compressão, e medida de força, em osciladores ou ressonadores, em microfones, e em sistemas de controle e sensoriamento. O efeito da piezeletricidade é demonstrado na Figura 10.

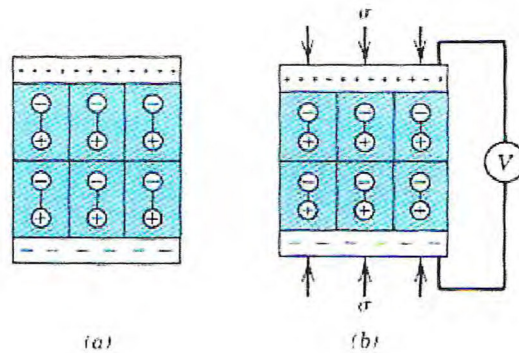


Figura 10- (a) dipolos presentes num material piezelétrico (b) Uma voltagem é gerada quando o material é sujeito a uma deformação compressiva (CALLISTER, 1997).

Esta propriedade é característica de materiais que têm estrutura cristalina com ausência de centro de inversão na simetria. Piezeletricidade é um acoplamento entre deformação mecânica e polarização elétrica de um material. Quando sujeito a deformação mecânica numa dada direção, um material piezelétrico transforma parte da energia absorvida em polarização. Esta polarização é resultante da rotação de dipolos permanentes e do deslocamento de carga da posição de equilíbrio para o momento polar induzido, sendo que a direção da polarização não é necessariamente na direção da deformação mecânica. O efeito piezelétrico direto é, por definição, a resposta elétrica ao estímulo mecânico e o efeito inverso é a deformação causada pela aplicação de tensões elétricas.

Apenas materiais com assimetria suficiente exibem efeito piezelétrico. A origem física do efeito repousa na presença de grupos assimétricos carregados no material. Quando o material sofre deformação, as cargas se movem uma em relação às outras produzindo uma variação no momento dipolo. Todos os materiais piezelétricos são anisotrópicos, o que implica dizer que o valor do coeficiente piezelétrico depende das direções relativas entre o tensor deformação e o vetor polarização. O número de coeficientes diferentes de zero e independente um do outro depende da simetria do cristal.

Alguns materiais biológicos podem exibir orientação não axial dos dipolos moleculares em suas estruturas e podem ser considerados como bioeletretos

(FUKADA, 1995). O estudo da piezeletricidade em vários tipos de sistemas biológicos mostrou a presença de polaridade natural na estrutura de várias partes de animais e plantas (PARK *et al*, 1992). Em muitas estruturas naturais, as moléculas polares como as que compõem as proteínas estão alinhadas em paralelo com uma direção preferencial dos eixos polares para formar a estrutura cristalina. Portanto, pode-se observar o efeito piezelétrico em determinada direção axial.

O efeito piezelétrico em biopolímeros foi documentado para queratina e para a seda em 1941 por MARTIN. A piezeletricidade de cisalhamento para polissacarídeos foi inicialmente investigada em detalhe para a celulose por BAZHENOV (1961). Estudos do efeito piezelétrico também foram realizados em derivados de celulose (SASAKI e FUKADA, 1976), quitina (ANDO e FUKADA, 1977) e amilose (NISHINARI e FUKADA, 1980).

As propriedades piezelétricas do colágeno têm sido investigada em alguns sistemas biológicos como o osso e tendão. A magnitude sensitiva do coeficiente piezelétrico depende da frequência, da direção da carga e da umidade relativa do material. Valores até 0,7 pC/N tem sido observado em ossos (NYE, 1960). MARINO *et al*, (1980), estudaram a relação entre o filme de colágeno piezelétrico e a aparência, por microscopia eletrônica em diversos graus de organização. Seu trabalho sugeriu que o efeito piezelétrico estava associado ao tropocolágeno.

FUKADA e YASUDA (1957), foram os primeiros a demonstrar que o osso seco exibia propriedade piezelétrica. Sabendo que a polarização elétrica do osso e do colágeno aumenta com o teor de umidade (MASCARENHAS, 1987), NETO e ZIMMERMAN (1975), estudaram o efeito da umidade relativa na piezeletricidade do osso e do colágeno concluindo que a água reduz a propriedade piezelétrica de ambos. A redução da piezeletricidade no osso ainda não foi esclarecida porém em filmes de colágeno foi atribuída as interações da água com seus resíduos polares que são responsáveis pela piezeletricidade dessa proteína (GÓES *et al*, 1999). A investigação dessas propriedades é de grande interesse no campo da biomedicina tendo em vista que ela pode ser útil na remodelagem de tecido ósseo (HASTINGS e MAHMUD, 1988).

II. HIPÓTESE DE TRABALHO

As Lectinas tem sido isoladas de tecidos de várias fontes, e purificadas em extratos salinos, tampões ou em meio aquoso por métodos clássicos associados a química de proteínas. Estão incluídos a precipitação com ácido ou por adição de sulfato de amônio (“salting out”) que elimina tanto proteínas contaminantes quanto possíveis inibidores de atividade hemaglutinante presentes no extrato. O extrato pré-purificado pode então ser submetido a processos cromatográficos, para obter a lectina em seu estado puro.

O teste qualitativo para lectinas em um extrato de sementes de plantas, é o ensaio de hemaglutinação. Uma suspensão de eritrócitos quando colocada em contato com o extrato, a aglutinação é um teste positivo para a presença de lectina. Além de células podem ser usados glicoconjugados, e polissacarídeos para detecção dessas proteínas.

Em geral, o isolamento e a purificação de lectinas nos dias de hoje, tem empregado a cromatografia por afinidade. O esquema de fracionamento a ser seguido depende da especificidade da lectina por açúcares, e são empregadas matrizes disponíveis comercialmente, como a Sephadex, uma polidextrana, e colunas de Sepharose ligadas a mono ou oligossacarídeos e glicoproteínas, como a fetuína. Gomas naturais como de galactomananas na forma de géis produzidos por reticulação com epícloridrina, tem sido empregadas para o isolamento de lectinas de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Vaitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus*.

A pergunta é, se haveria possibilidade de desenvolver uma matriz de afinidade de galactomanana na forma de filme. Entretanto, filmes de galctomananas puras são bastantes quebradiços e solubilizáveis. Para contornar este problema, foi sugerida a utilização de colágeno reticulado como estabilizante do filme, já que esta proteína é capaz de se reconstituir a partir de soluções diluídas na forma de filmes flexíveis e estáveis.

Combinando-se a afinidade da galactomanana com lectinas galactose específicas, e a propriedade piezométrica do colágeno e de polissacarídeos, podemos sugerir como hipótese de trabalho:

“ Filmes de galactomanana aditivados com colágeno poderiam ser usados como transdutores piezométricos na detecção de lectinas ligantes de galactose ? ”

II. 1. Estratégias experimentais

- Obter filmes de galactomanana:colágeno reticulados com glutaraldeído e realizar sua caracterização físico-química.
- Estudar a interação de lectinas ligantes de galactose em colunas de cromatografia de afinidade.
- Realizar as medidas piezométricas dos filmes na presença da lectina.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III. 1. MATERIAIS

III.1.1. - Solventes e reagentes

Foram utilizados solventes e reagentes de grau PA, descritos a seguir: H₃PO₄, Na₂B₄O₇.10H₂O, NaCl, Ca(OH)₂, NaOH, KOH, Na₂SO₄, KCl, CaSO₄, glutaraldeído (Merck), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), ácido acético, ácido bórico, ácido perclórico, acetato de sódio trihidratado, tartarato de sódio e potássio, n-propanol, tris(hidroximetil) aminometano (Tris), N-cloro-p-tolueno-sulfonamida (cloramina T), p-dimetil-amino-benzaldeído (p-DAB), glicina, 4-hidroxi prolina, D-galactose (Sigma).

III. 1. 2. Matéria prima

III.1.2.1. Colágeno

A matéria prima utilizada para obtenção de colágeno, foi a serosa bovina de aproximadamente 5 anos de idade. A serosa, desengordurada e conservada em sal, foi obtida de frigoríficos da região, onde é utilizada para produção de embutidos e mantida congelada por volta de -5 °C até antes de sua utilização. Após lavagens em água para remoção do sal foi tratada com NaOH 0,15 mol/L durante 1 h para remoção de substâncias não colagênicas. A seguir a serosa foi lavada com água até a neutralização do pH da solução de lavagem. O excesso de água da serosa, foi removido com auxílio de papel de filtro, e em seguida a mesma foi reduzida a pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento.

III. 1.2 .2. - Sementes

Sementes de *Adenanthera pavonina* (Carolina) foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza e após devidamente selecionadas foram armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 25°C para posterior utilização.

Sementes de *Artocarpus incisa* L (fruta pão de caroço), foram coletadas no município de Maranguape, Ceará. Os frutos foram colhidos maduros na safra que ocorre no período compreendido entre os meses de maio a junho. As sementes obtidas, após remoção dos tegumentos, foram desidratadas por tratamento com acetona, secas ao ar e estocadas em frascos lacrados para posterior preparo da farinha.

III. 1.2.3. Hemácias

Hemácias de coelho foram obtidas de animais mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

III. 2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

III. 2.1. Colágeno solúvel

O colágeno foi solubilizado, a partir de serosa bovina, após 72 h com tratamento em meio alcalino e alta força iônica (GOISSIS e MORIAK, 1990), seguido de uma série de lavagens para remoção de sais, e de homogeneização em solução de ácido acético 0,1% de forma que a concentração final de colágeno da solução estoque correspondeu a 10 mg/g. Esta solução foi dialisada contra ácido acético 0,1% para a completa remoção de sais. A diálise foi monitorada por medida da condutância da solução de ácido acético, até alcançar o equilíbrio. A concentração final da solução foi obtida através da determinação do teor de hidroxiprolina.

III. 2.2. Obtenção do polissacarídeo

III. 2.2.1. Obtenção do endosperma das sementes de *Adenanthera pavonina*

Sementes queiscentes foram submetidas à fervura em água por um período de 20 minutos e deixadas por 12h a 25°C. Uma vez intumescidas, as sementes foram separadas manualmente em película, tegumento, endosperma e embrião. O endosperma foi mantido congelado para posterior utilização.

III. 2.2.2. Obtenção do polissacarídeo em solução

Cada 100g de endosperma de *Adenanthera pavonina*, foi homogenizado em 500 mL de solução de ácido acético 0,1%, até obtenção de uma suspensão viscosa. O material foi a seguir centrifugado a 5.000 x g por 60 minutos a 10 °C. O teor de polissacarídeo na solução, foi obtido por determinação de massa seca de acordo com procedimento usual para determinação de umidade. A solução resultante foi diluída em solução de ácido acético 0,1% até a concentração final de 10 mg/g.

III. 2. 3. Preparação dos filmes de galactomanana:colágeno (GalCol)

Das soluções estoques, tanto do polissacarídeo como do colágeno na concentração de 10 mg/g, foram obtidas soluções na concentração de 5 mg/g após diluição em solução de ácido acético 0,1%.

A solução do polissacarídeo foi adicionada à solução de colágeno com homogeneização, de modo que se obteve misturas de GalCol nas proporções (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1).

Os filmes foram preparados a partir das soluções de GalCol, conformados em moldes de acrílico e secos em capela de fluxo laminar a 25 °C.

III.2.4. Reticulação dos filmes com glutaraldeído

Filmes de colágeno e de GalCol (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1), foram tratados com glutaraldeído de acordo com o seguinte procedimento: Cada filme (10 x 10cm) foi imerso em 200 mL de solução de glutaraldeído em concentrações variadas (0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1%) durante 24 horas à temperatura ambiente. A solução de glutaraldeído foi preparada por diluição em tampão fosfato 0,13 mol/L pH 7,4. Ao final dos tratamentos, cada peça foi imersa em 200 mL de solução glicina:borato 0,025 mol/L:0,05mol/L à pH 9,2 durante 10 minutos seguido por três lavagens em 200 mL de tampão fosfato em intervalos de 20 minutos, e lavagens em 200 mL de água durante

dois dias, em intervalos de 12 horas. Os filmes tratados foram secos em capela de fluxo laminar na temperatura de 25 °C.

III.2.5. Preparação da farinha de sementes de *Artocarpus incisa*

As sementes de *Artocarpus incisa*, preparadas como no ítem **III. 1.2.2**, foram trituradas em moinho e a farinha acondicionada em frascos lacrados, à temperatura ambiente.

III.2.6. Preparo de extrato bruto de *Artocarpus incisa*

O extrato bruto foi preparado suspendendo-se a farinha de *Artocarpus incisa* em solução de NaCl 0,15 mol/L na proporção 1:10 (p/v) e mantida em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi filtrada em tecido de nylon, centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 10 °C, e o sobrenadante obtido, dividido em porções de 20 mL e congelados para os ensaios de cromatografia de afinidade e ensaios elétricos.

III.2.7. Isolamento de lectina (frutalina), por cromatografia de afinidade

Géis de galactomanana obtida de sementes de *Adenanthera pavonina*, preparados por reação de reticulação com epícloridrina (APPUKUNTAN *et al*, 1997, TAVARES 1998, MOREIRA *et al*, 1998) foram usados como suporte para cromatografia de afinidade. Uma coluna de 15 cm de altura por 2 cm de diâmetro, foi empacotada com o gel de galactomanana reticulado e equilibrado em solução de NaCl 0,15 mol/L.

Extrato bruto de *Artocarpus incisa*, foi percolado através da coluna com um fluxo de 60 mL/h, usando um sistema de coletor de frações, acoplado a uma bomba peristáltica. O material não retido foi eluído com a solução de equilíbrio e a fração retida no suporte de cromatografia, foi eluída com tampão glicina-HCl 0,1 mol/L pH 2,6 preparada em solução de NaCl 0,15 mol/L. Essa fração denominada de frutalina,

(MOREIRA *et al*, 1998) foi dialisada contra água e seca por liofilização. A cromatografia foi monitorada por medida dos valores de absorvância das soluções eluídas a 280nm.

III.3. Técnicas de Caracterização

III.3.1. Caracterização do colágeno solúvel por determinação de hidroxiprolina

A concentração de solução estoque de colágeno usada neste trabalho foi determinada através do teor de hidroxiprolina (STAGEMANN e STALDER, 1994). Este aminoácido raro em proteínas está presente no colágeno em quantidades apreciáveis e, por isso, serve como indicador qualitativo e quantitativo de colágeno. O teor de colágeno é calculado pela multiplicação da concentração de hidroxiprolina pelo valor 7,4.

O método consiste, inicialmente, da oxidação da hidroxiprolina com cloramina T e posterior reação com o reagente de Ehrlich, p-dimetilaminobenzaldeído (p-DAB) em meio ácido, para formação de um cromóforo. A Figura 11 exibe o esquema da reação.

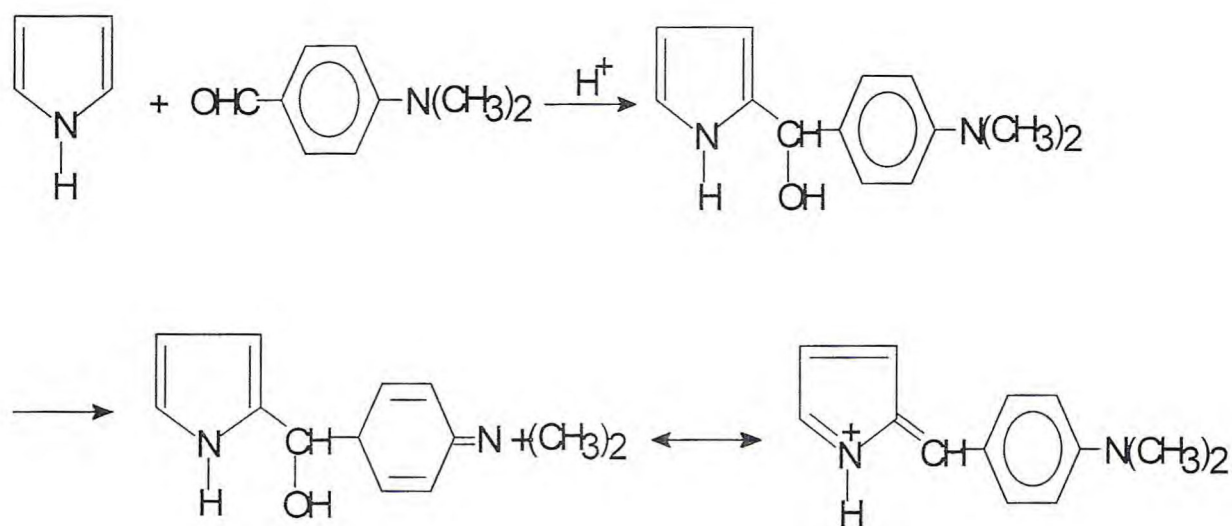


Figura 11 - Esquema de reação de derivado pirrol com p-DAB.

- **Procedimento:**

De cada amostra de colágeno, solúvel, foram removidas alíquotas que variaram de 0,5 a 1 mL, e introduzidas em tubos pirex providos de tampa. A cada tubo foi adicionado HCl 6N num volume relativo a quatro vezes o valor de cada alíquota, e colocados em uma mufla a 110 °C por 24 h. Em seguida cada solução hidrolisada foi introduzida em um balão de fundo redondo e evaporada a vácuo na temperatura de aproximadamente 60 °C até a secura. Após a evaporação, as amostras foram mantidas em dessecador contendo NaOH para completa neutralização de resíduo ácido, e cada amostra foi diluída em água, num volume adequado para análise de hidroxiprolina como descrito a seguir.

A cada 2 mL de amostra diluída, foi adicionado 1 mL de cloramina T preparada como segue: 0,35g de cloramina T foram dissolvidos em 2,5 mL de água, sendo adicionados 2,5 mL de n-propanol, e o volume completado para 25 mL com solução tampão pH 6,4. Esta solução tampão foi preparada da seguinte forma: a 50 g de ácido cítrico monohidratado dissolvidos em água, foram acrescentados 12 mL de ácido acético 96%, 120 g de acetato de sódio trihidratado, 34 g de NaOH previamente dissolvidos em água. O pH da solução foi ajustado para 6,4 e o volume completado para 1 L. Ao ser utilizada, a cada 125 mL desta solução foram acrescentados 25 mL de água e 37,5 mL de n-propanol.

As amostras foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 minutos, e a seguir foi adicionado com agitação vigorosa, 1 mL de solução de p-DAB, que foi preparada da seguinte forma: 3,75 g de p-DAB foram dissolvidos em 10 mL de n-propanol, sendo resfriado em banho de gelo, e a seguir adicionados lentamente 6,5 mL de ácido perclórico 60%, e o volume completado para 25 mL com n-propanol. As amostras foram deixadas por 15 minutos em um banho a 60 °C, e medidos os valores das absorvâncias das respectivas soluções a 550 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão obtida nas mesmas condições, a qual foi conduzida com soluções padrões de 0,05, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 µg/mL, obtidas a partir de uma solução estoque de hidroxiprolina de 1 µg /mL preparada por diluição em água num volume de 100 mL. Cada resultado foi expresso a partir do valor médio de duas determinações.

III. 3.2. Embebição

Foram utilizados filmes de 2,0 cm², de colágeno e GalCol (1:1, 3:2, 7:3,e 4:1), tratados com solução de glutaraldeído como no *ítem III. 2.4*. Cada filme, em frasco pirex previamente tarado, foi congelado e seco por liofilização até peso constante. A seguir cada filme foi imerso em 20 mL de solução de NaCl 0,15 mol/L por 24 horas, à temperatura ambiente. Após embebição o excesso de umidade dos filmes foi removida com auxílio de papel de filtro, e obtido o peso úmido. Cada resultado, obtido do valor médio de quatro determinações, foi expresso em massa de água por massa de amostra seca como mostra a equação:

$$E_{aq} = (A_u - A_s)/A_s \quad (3)$$

onde E_{aq} é a embebição em (g) de H₂O por (g) de filme seco, (A_s), massa do filme seco e A_u , é massa do filme úmido.

III. 3.3. Estabilidade térmica

Foi estudada através de medida da temperatura de desnaturação (T_d) por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), em filmes de colágeno e GalCol nas proporções (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1).

Esse procedimento mede o calor absorvido ou liberado, quando a temperatura é elevada em uma razão constante. Desde que a desnaturação do colágeno é um processo endotérmico, um pico negativo demonstrado no termograma, corresponde à temperatura de desnaturação do componente presente.

Os ensaios foram realizados em equipamento Shimadzu DSC-50. As amostras, filmes com peso em torno de 10 mg, foram colocadas em cadinhos de alumínio selados e aquecidas em atmosfera de N₂ com taxa de aquecimento de 5°C/min.

III. 3.4. Espectros de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um aparelho Shimadzu FTIR 8300, com filmes de colágeno, galactomanana e GalCol (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1) obtidos da mistura de soluções de colágeno e galactomanana em concentrações de 5 mg/g. Os filmes foram formatados em fôrmas de acrílico e secos em atmosfera de P₂O₅.

III. 3.5. Ensaios de viscosidade

Nesses ensaios foram utilizados volumes de 10 mL de soluções de colágeno, galactomanana e misturas de GalCol (1:1 e 9:1), na concentração de 3 mg/mL em solução de ácido acético 0,1%.

As medidas de viscosidade foram conduzidas em um viscosímetro Brookfield, modelo DV-III usando spindle SC4 -18, e monitoradas em função da temperatura, a um gradiente de cisalhamento constante de 0,3 s⁻¹. Todas as medidas foram realizadas como um torque variando entre 10 e 90%.

A tensão de cisalhamento e viscosidade em função do gradiente de cisalhamento de soluções de galactomanana e de misturas de GalCol obedece a lei segundo a equação:

$$\tau = K\gamma^n \quad (4)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento, γ é o gradiente de cisalhamento e n e K (mPas) os índices de fluidez e de consistência, respectivamente, obtidos da curva logarítmica da tensão de cisalhamento e gradiente de cisalhamento. Quando $n = 1$, o modelo é reduzido a um fluido newtoniano. Quando $n < 1$, a viscosidade decresce com o aumento do gradiente de cisalhamento e é referido como um fluido pseudoplástico. Quando $n > 1$, a viscosidade aumenta com o aumento do gradiente de cisalhamento e é referido como um fluido dilatante. Este é o modelo mais usado para viscosidade não newtoniana por ter sido representado adequadamente.

A dependência do parâmetro de consistência com a temperatura para soluções pode ser representado pela equação de Arrhenius:

$$K = K_0 \exp(E_a/RT) \quad (5)$$

Onde K_0 (mPas) é uma constante pre-exponencial, E_a (kJ/mol) a energia de ativação aparente e T a temperatura absoluta. Pode-se usar tanto E_a quanto K_0 como indicadores de mudanças no regime de fluxo para sistemas de polímero-solvente.

III. 3.6. Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias de filmes e esponjas (obtidas por liofilização das soluções congeladas em placas de acrílico) de galactomanana, colágeno e GalCol (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1), foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Phillips XL-30 a uma voltagem de aceleração de 5-10 kV. O procedimento de preparo das amostras incluiu cobertura com uma camada fina de carbono a fim de tornar o material condutor.

III. 4. TÉCNICAS DE APLICAÇÃO

III. 4.1. Ensaio de interação da frutalina com filmes de GalCol

Cada peça de 1 cm² de filmes de GalCol (3:2) reticulados com glutaraldeído 0,001% e previamente lavados com solução de NaCl 0,15 mol/L como descrito no item III.2.4, foi imersa durante 1h em 2 mL de solução de frutalina 0,5 mg/mL preparada em solução de NaCl 0,15 mol/L. Após esse tempo cada peça foi removida e lavada seis vezes em solução de NaCl 0,15 mol/L em intervalos de 20 minutos.

Cada peça assim tratada foi imersa em 1 mL de solução de galactose 0,2 mol/L durante 1,5 h, removida após esse tempo e seguida de tres lavagens com 1 mL da mesma solução estoque em intervalos de 30 minutos. Todas as soluções foram submetidas ao ensaio de atividade hemaglutinante. O mesmo ensaio foi realizado com

filmes de colágeno e filmes de GalCol (3:2) nesse último sem o tratamento com solução de frutalina.

Os rendimentos de interação da lectina com os filmes foram definidos como,

$$\eta = \text{massa de lectina } (\mu\text{g}) / \text{área do filme } (\text{cm}^2) \quad (6)$$

onde a massa de lectina foi obtida da relação experimental,

$$1\text{HU} = 1,95 \mu\text{g/mL}$$

onde, HU é unidade de hemaglutinação definido no item *III.4.3*.

III.4.2. Cromatografia de afinidade com filmes de GalCol como suporte

III.4.2.1. Preparação das colunas

As colunas foram montadas utilizando seringas de 5 mL e filmes de GalCol (3:2, 7:3 e 4:1) reticulados com glutaraldeído 0,1%, com dimensões 4,5 x 6,5 cm. Cada filme, previamente equilibrado em solução de NaCl 0,15 mol/L, foi enrolado em um bastão de vidro de 0,5 cm de diâmetro, utilizando uma tela fina de nylon como espaçador (Figura 12).

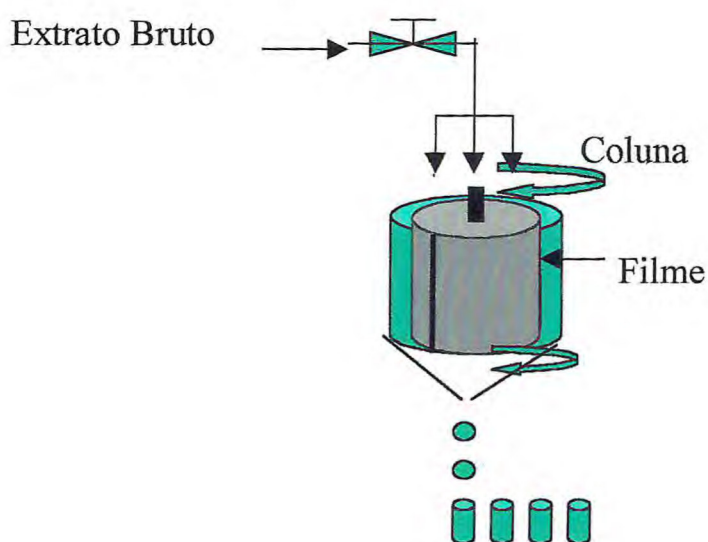


Figura 12 – Sistema de cromatografia de afinidade com filme de GalCol como suporte.

III.4.2.2. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas de filmes de GalCol

Extrato bruto de *Artocarpus incisa* (20 mL), preparado como no ítem III.2.6, foi centrifugado a 3.000 x g por 15 minutos, e deixado recircular por 3,5 h, através do suporte de afinidade em refluxo contínuo utilizando uma bomba peristáltica.

O material não retido na coluna (pico I), foi eluído com a solução de equilíbrio a temperatura ambiente por adições de 3 mL de solução de NaCl 0,15 mol/L a cada 5 minutos em contato com o suporte. A fração retida (pico II), foi eluída com 3 mL de solução de D-galactose 0,2M, preparada em solução de NaCl 0,15 mol/L, mantida em contato com o suporte por 1,5 h. Na eluição das frações seguintes do pico II, cada 3 mL de solução de D-galactose foi mantida por 15 minutos em contato com o suporte.

A fração retida (pico II) foi submetida ao ensaio de atividade hemaglutinante. A cromatografia foi monitorada por medida dos valores de absorbância das soluções eluídas a 280nm.

III.4.3. Determinação de atividade hemaglutinante

O teste qualitativo para lectinas em um extrato, é o ensaio de hemaglutinação, onde uma suspensão de eritrócitos quando colocada em contato com o extrato, a aglutinação é um teste positivo para a presença de lectina. Uma sensibilidade maior no teste de aglutinação, pode ser obtida por tratamento das hemácias com enzimas tais como, tripsina, papaina e neuraminidase (SHARON e LIS 1989).

A atividade (título de hemaglutinação) é expressa como o inverso da máxima diluição com agregação visível. A aglutinação deve ser afetada pelo tamanho molecular e números de sítios de ligação ao carboidrato, número e acessibilidade dos carboidratos das células, temperatura, fluidez da membrana, concentração e estágio metabólico das células (SHARON e LIS, 1989).

A atividade hemaglutinante das frações proteicas foi determinada segundo MOREIRA e PERRONE, 1977) descrito como a seguir:

A cada 50 μL de solução de proteínas em solução de NaCl 0,15 mol/L, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho a 2% diluída em NaCl 0,15 mol/L. A mistura foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos, deixada a seguir em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A aglutinação foi determinada visualmente.

Uma unidade de hemaglutinação (UH) é definida como a maior diluição que pode ser submetida uma amostra de proteínas, ainda capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2%.

III.4.4. Medidas elétricas e piezelétricas

A medida das funções dielétricas complexas foi realizada utilizando-se um analisador de impedância de materiais HP4291A em conjunto com um analisador de impedância HP4194, que juntos cobrem a região de 100 Hz a 1,8 GHz. Os eletrodos foram depositados por pintura da superfície circular da amostra com suspensão de pó de prata. O diâmetro dos discos variou de 1 a 4 cm.

Foram utilizados filmes de GalCol nas proporções (3:2 e 7:3) reticulados com glutaraldeído 0,1% como no ítem III. 2.4, dopados ou não com frutalina.

A dopagem de cada filme de GalCol de 6 x 8 cm, foi realizada por embebição em 30 mL de extrato bruto de *Artocarpus incisa* durante 12 h e a seguir lavados 5 vezes com 50 mL de solução de NaCl 0,15 mol/L em intervalos de 1 h. Os filmes foram lavados pelo mesmo procedimento com água, secos em capela de fluxo laminar e estocados em dessecados em atmosfera de P_2O_5 antes de serem utilizados. Os filmes não dopados foram tratados com solução de NaCl 0,15 mol/L por 12 h seguindo o mesmo procedimento acima.

III. 4.5. Modelo Piezelétrico (GÓES et al, 1999)

Para biopolímeros naturais a simetria de espaço observada é D_∞ . Neste caso $d_{25} = -d_{14}$ para o tensor piezelétrico. Piezeletricidade é observado quase universalmente

para as texturas orientadas de biopolímeros. Para esta simetria o tensor d_{ij} é determinado por,

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

O efeito da piezeletricidade de cisalhamento também é observado para filmes orientados de uma variedade de polímeros sintéticos com atividade óptica. Para o mesmo grupo de simetria o tensor dielétrico ϵ_{ij} é determinado por,

$$\begin{pmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{pmatrix}.$$

Para esta simetria o tensor de complacência elástico, s_{IJ} é determinado por,

$$\begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{12} & s_{11} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{13} & s_{13} & s_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & s_{55} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & s_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & s_{66} \end{pmatrix}.$$

Coordenadas retangulares são assinaladas ao filme da amostra. O eixo 1 é perpendicular ao plano da amostra, plano 2-3 (Figura 13).

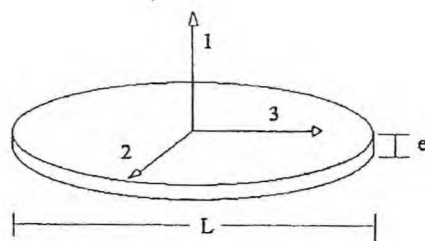


Figura 13 - Coordenadas retangulares assinaladas ao filme da amostra para medidas das constantes piezolétrica e dielétrica.

As equações eletromecânicas de acoplamento para nosso sistema são:

$$S_I = s_{IJ}^E T_J + d_{ij} E_j, \quad (7)$$

$$D_i = \varepsilon_{ij}^T E_j + d_{ij} T_j, \quad (8)$$

Onde S_I (S_1 a S_6) é a deformação e T_J (T_1 a T_6) é a tensão, E_j é o campo elétrico e D_i é o vetor de deslocamento, com as constantes s_{IJ}^E (complacência para campo elétrico constante), ε_{ij}^T (permissividade dielétrica para tensão constante) e o elemento de esforço piezoeletrico d_{ij} . Usando os tensores definidos nas equações 7 e 8, e levando em conta que o campo elétrico é aplicado na direção 1 ($E_2 = E_3 = 0$) temos

$$D_1 = \varepsilon_{11}^T E_1 + d_{14} T_4, \quad (9)$$

$$S_4 = s_{55}^E T_4 + d_{14} E_1, \quad (10)$$

Das equações (9) e (10) pode-se ver o acoplamento eletromecânica pelo tensor piezoeletrico d_{14} . Nesta geometria tem-se uma onda mecânica que se propaga no plano da amostra ($S_4 \leftrightarrow S_{23}$) acoplada com o campo elétrico ao longo do eixo 1. Temos para D_1

$$D_1 = \varepsilon_{11}^T \left(1 - \frac{d_{14}^2}{s_{55}^E \varepsilon_{11}^T} \right) E_1 + \frac{d_{14}}{s_{55}^E} S_4, \quad (11)$$

Pode-se definir agora k_{14} que é o fator de acoplamento piezoeletrico

$$k_{14}^2 = \frac{d_{14}^2}{s_{55}^E \varepsilon_{11}^T}, \quad (12)$$

Da definição de k_{14} , podemos definir as relações de complacência elástica e constante dielétrica medidas sob diferentes condições.

$$\frac{s_{55}^D}{s_{55}^E} = \frac{\varepsilon_{11}^s}{\varepsilon_{11}^T} = 1 - k_{14}^2. \quad (13)$$

O elemento tensor piezolétrico d_{14} , para piezeletricidade de cisalhamento, é dado pela equação 12,

$$d_{14} = k_{14} \sqrt{\varepsilon_{11}^T \varepsilon_{55}^E}, \quad (14)$$

Com equação 13

$$k_{14} = \sqrt{1 - \frac{\varepsilon_{11}^S}{\varepsilon_{11}^T}}, \quad (15)$$

Onde k_{14} é o fator de acoplamento piezolétrico, ε_{11}^T é a constante dielétrica obtida pela medida da capacitância a uma frequência abaixo da ressonância fundamental, ε_{11}^S é obtido por medida da capacitância a uma frequência acima do modo de ressonância. A constante dielétrica foi determinada na faixa de 1 MHz a 1 GHz, na geometria da Figura 13. Nos cálculos assume-se ε_{11}^T a 1 MHz (abaixo da frequência de ressonância piezolétrica) e ε_{11}^S a 1 GHz (acima da frequência de ressonância piezolétrica).

Das equações 9 e 10, temos para T_4 :

$$T_4 = \frac{1}{s_{55}^D} S_4 - \frac{d_{14}}{s_{55}^E \varepsilon_{11}^S} D_1, \quad (16)$$

Assumindo que $\partial D_1 / \partial x_4 = 0$ pode-se obter a equação de movimento,

$$\frac{\partial^2 u_4}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho s_{55}^D} \frac{\partial^2 u_4}{\partial x_4^2}, \quad (17)$$

Onde u_4 é o deslocamento no plano da amostra (plano perpendicular ao campo elétrico, Figura. 13), e ρ é a densidade.

A velocidade obtida é:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\rho s_{55}^D}} = \frac{\omega}{k}, \quad (18)$$

Onde ω é a frequência e k é o número de onda ($k = 2\pi/\lambda$).

A complacência elástica s_{55}^D que é determinada das frequências de ressonância sucessivas do modo de cisalhamento da equação 18, assumindo que as ressonâncias mais pronunciadas são aquelas onde o corpo pode acomodar meio comprimento de onda da onda elástica estacionária ($L = \lambda/2$). Neste caso s_{55}^D pode ser obtido da equação 19.

$$s_{55}^D = \frac{1}{4\rho(fL)^2}, \quad (19)$$

Onde fL é a constante de frequência que é o produto da frequência de ressonância e o diâmetro da amostra (controlando a dimensão da amostra, $L \gg e$, ver Figura 13) e ρ é a densidade da amostra. Das medidas experimentais de ε_{11}^T , ε_{11}^S , fL e ρ pode-se obter s_{55}^D (equação. 19), k_{14} (equação. 15) e d_{14} (equação. 14).

III.4.6. Medidas do fator de perda

Consiste na dissipação de energia mecânica próximo a vizinhança da ressonância. O estudo desse efeito em cerâmicas foi investigado e alguns autores atribuíram à histerese dielétrica (IKEDA, 1958) entretanto a principal causa foi interpretada como fricção interna da cerâmica (IKEDA, 1996). O fator de perda Q^{-1} foi medido à partir da curva de ressonância da admitância elétrica por:

$$Q^{-1} = \frac{f_2 - f_1}{f_0}, \quad (20)$$

Onde Q^{-1} é o fator de perda, as frequências correspondentes a $|Y| = |Y_m|/0,707$ são indicadas por f_2 e f_1 , onde $|Y_m|$ é o valor de pico de ressonância e f_0 a frequência da ressonância.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Caracterização do colágeno

Comumente o colágeno é obtido por processo de extração tendo como matéria prima tecido conjuntivo de animais jovens. Variando-se o pH e a concentração de sais do meio de extração é possível solubilizar o colágeno de matrizes ainda não reticuladas (MILLER & RHODES, 1982). Entretanto, estes métodos têm baixo rendimento e, portanto, não são utilizados para uso comercial. Em outro método pode-se utilizar pepsina, uma enzima proteolítica, que embora não tenha atividade sobre a hélice tripla, por esta ser uma cadeia linear, age nas regiões dos telopeptídeos aumentando assim a solubilidade do tropocolágeno (TAYOT & TARDY, 1982). Uma terceira rota é a redução das ligações cruzadas, formadas por base de Schiff, através de um tratamento alcalino (CIOCA, 1983), que entretanto, provoca uma redução no pI do tropocolágeno, de 7, no colágeno nativo, para próximo de 5, devido a hidrólise de resíduos de asparagina e glutamina, a qual é função da temperatura e da duração do tratamento, Figura 14. Por outro lado, tem sido demonstrado que um aumento de grupos N-terminais, indicando a clivagem das ligações ésteres existentes na macromolécula, é provocado pelo tratamento alcalino do colágeno (VEIS, 1982).

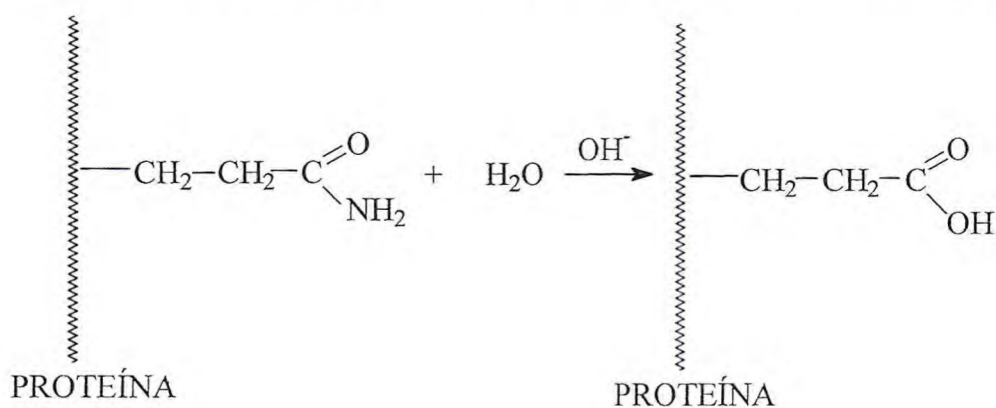


Figura 14 - Esquema da hidrólise dos resíduos de Gln em meio alcalino.

As moléculas de colágeno formam soluções muito viscosas, estáveis em meio ácido, pH 3,5, à baixa força iônica e à temperatura ambiente. Nestas condições, dizemos que o colágeno se encontra na forma solúvel, ou "swollen", para diferenciar

da forma chamada fibrilar, presente em meio neutro. A solubilidade e a hidratação da molécula são dependentes, do pH e da força iônica. O aumento da concentração de ions H^+ provoca uma maior solvatação do colágeno, devido a protonação dos grupos negativos fazendo com que o tropocolágeno se torne um polycation, sendo que a hidratação máxima ocorre a pH 2, como mostra a Figura 15. A solvatação da molécula é também função da força do ácido presente no meio. A pH 2 o ácido acético, por exemplo, produz 50% mais solvatação do que o HCl. O ânion do ácido fraco tem grande atração pelos grupos catiônicos e pelos prótons dos grupos carboxílicos da proteína promovendo a solvatação da molécula (ASGHAR *et al*, 1982).

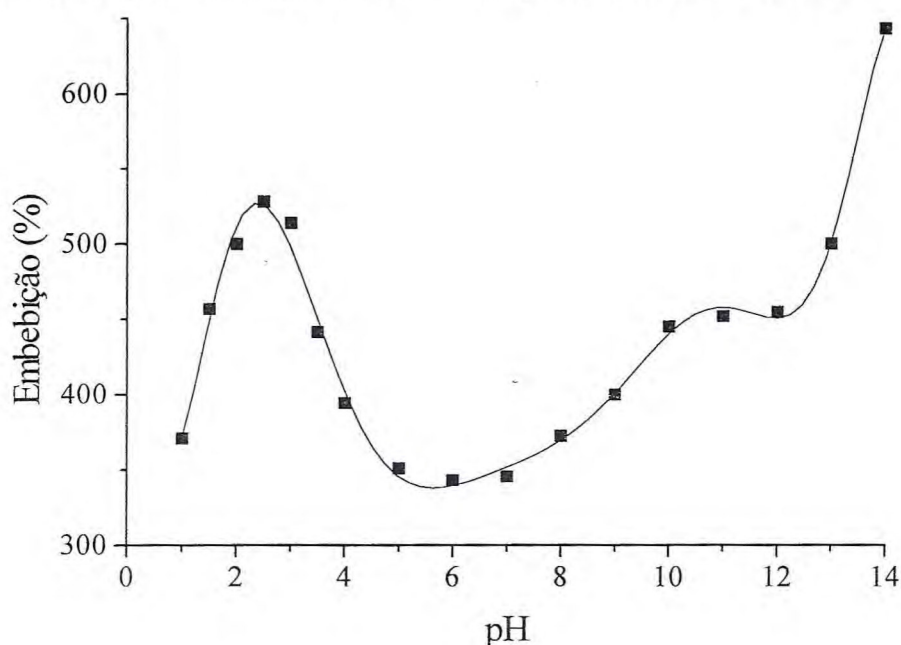


Figura 15 - Comportamento para a embebição de colágeno nativo (pele bovina) em função do pH.

A solubilização do tropocolágeno em meio ácido, neste trabalho, foi realizada pelo método alcalino, que, pela nossa experiência, resulta em dispersões muito viscosas com baixa incidência de agregados macromoleculares. Podemos admitir que, na concentração da solução estoque de colágeno solúvel, 10 mg/g a pH 3 em ácido acético, as moléculas de tropocolágeno estão dispersas e solvatam, praticamente, toda a água presente e estão randomicamente distribuídas na solução. Ensaio viscosimétrico são úteis para o monitoramento do processo de extração.

O efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de cisalhamento e a viscosidade de colágeno solúvel pode ser observado nas Figuras 16 e 17, respectivamente. As curvas mostram um comportamento pseudoplástico, com coeficiente de consistência $K = 1280 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ e índice de fluidez $n = 0,25$ obtidos por modelagem da lei de potência. Embora a viscosidade da solução seja alta em baixos gradientes de velocidade, $22195 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ em $0,03 \text{ s}^{-1}$, observa-se uma queda brusca da viscosidade com o aumento na velocidade.

Este resultado era esperado, visto que, sendo o colágeno uma molécula linear, um aumento do gradiente de velocidade tende a orientar as partículas paralelamente na direção do escoamento, levando a uma menor interação entre o soluto e camadas adjacentes de fluido e, por consequência, a uma diminuição da viscosidade e a tendência de se estabelecer patamares newtonianos em gradientes de cisalhamento maiores. Estes resultados sugerem que a solução deve ser constituída por macromoléculas lineares rígidas.

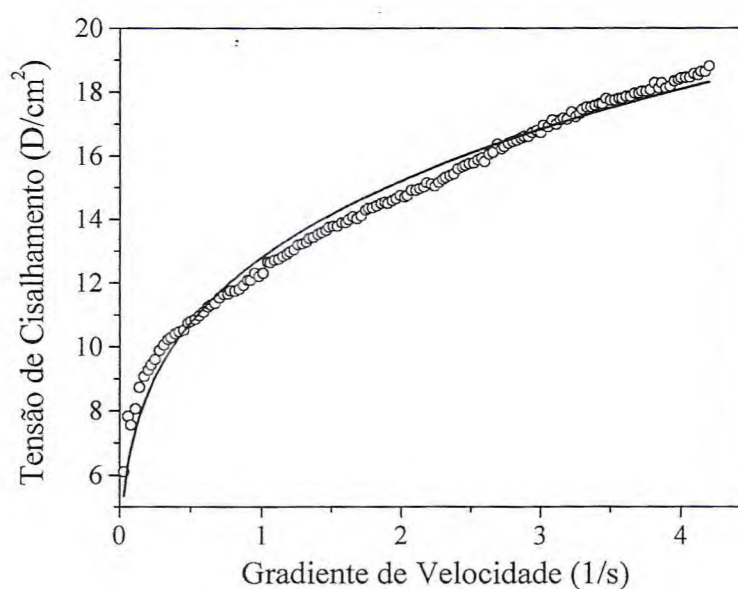


Figura 16- Efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de cisalhamento de colágeno solúvel a pH 3 e concentração de 10 mg/g.

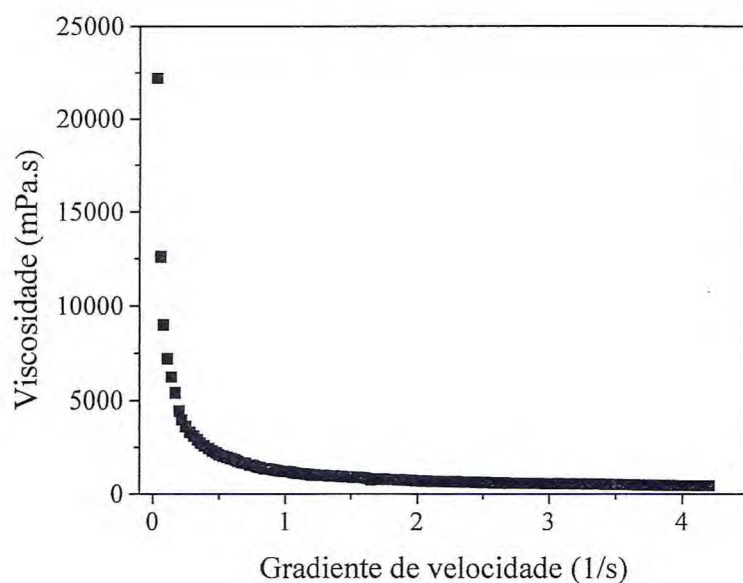


Figura 17 - Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade de colágeno solúvel a pH 3 na concentração de 10 mg/g.

A Figura 18 mostra o comportamento da viscosidade de colágeno solúvel a pH 3 em função da temperatura. A medida que a temperatura aumenta observou-se um decréscimo lento da viscosidade, no intervalo de 20 a 40 °C. Acima de 40 °C, a viscosidade cai abruptamente, seguindo um comportamento sigmoide, caracterizando a desnaturação da hélice tripla do colágeno. Pelo ponto de inflexão da curva, determinado pela derivada da curva sigmoide, obtém-se a temperatura de desnaturação do colágeno que foi de 48,7 °C. Este resultado demonstra que o colágeno solúvel obtido possui alta estabilidade térmica, sugerindo que a conformação em hélice tripla foi mantida no processo de extração.

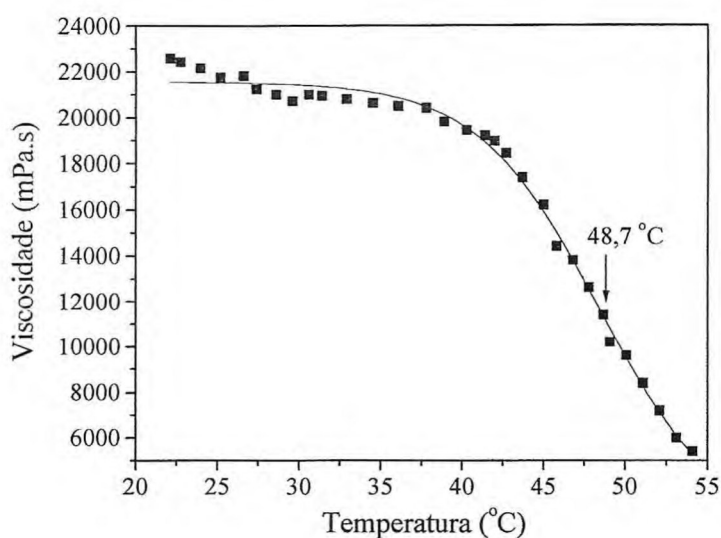


Figura 18- Efeito da temperatura sobre a viscosidade de colágeno solúvel a pH 3 e concentração 10 mg/g.

A dependência da viscosidade com a temperatura para soluções poliméricas pode ser descrita pela seguinte relação exponencial (XIONG & KIRAN 1995),

$$\eta = Ae^{E/RT} \quad (\text{Equação 15})$$

onde E é a energia de ativação para o escoamento viscoso e A é uma constante.

Considerando que as moléculas do solvente, numa solução polimérica, podem estar preenchendo sítios formados pela estrutura do polímero em solução, então a aplicação de uma tensão de cisalhamento sobre a solução provocará o deslocamento desses sítios, ou de moléculas de solvente de um sítio para outro, na direção que alivia a tensão. Se cada deslocamento for feito pela superação de uma barreira energética de altura E, podemos aplicar a Equação 15. A energia de ativação pode ser relacionada ao calor latente de vaporização do líquido, já que em ambos processos uma molécula deve ser removida de suas vizinhanças.

A energia de ativação da solução de colágeno, determinada a partir da inclinação do gráfico $\ln \eta \times 1/T$ na faixa de temperatura de 20 a 40 °C, (Figura 18) foi de 55,4 J/mol.

A integridade da hélice tripla do colágeno, também pode ser demonstrada por espectroscopia no infravermelho através de determinação da razão entre as

absorbâncias das bandas em 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} . Estas bandas correspondem às vibrações no plano do tipo amida III, devido ao estiramento C-N e à vibração N-H, e a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos respectivamente (GEORGE & VEIS, 1991). A banda em 1450 cm^{-1} serve como padrão interno já que se mostra invariável em relação à ocorrência da desnaturação da proteína, enquanto a banda amida III é muito sensível à presença de estrutura terciária do tropocolágeno. A integridade da hélice tripla fica demonstrada quando a razão é igual próxima a 1,0 em colágeno na forma “swollen”, isto é na forma ácida (GORDON *et al*, 1974).

A Figura 19 apresenta o espectro no infravermelho do colágeno, onde mostra bandas típicas para amida I, em 1656 cm^{-1} , devido ao estiramento da carbonila, e bandas de amida II, em 1552 cm^{-1} , devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento de C-N. As bandas referentes às vibrações no plano do tipo amida III, devido ao estiramento C-N e à vibração N-H, e a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos aparecem nas regiões de 1237 cm^{-1} e 1458 cm^{-1} respectivamente. A razão como demonstrada, $A_{1235}/A_{1450} = 1$ confirma a integridade estrutural do colágeno obtido.

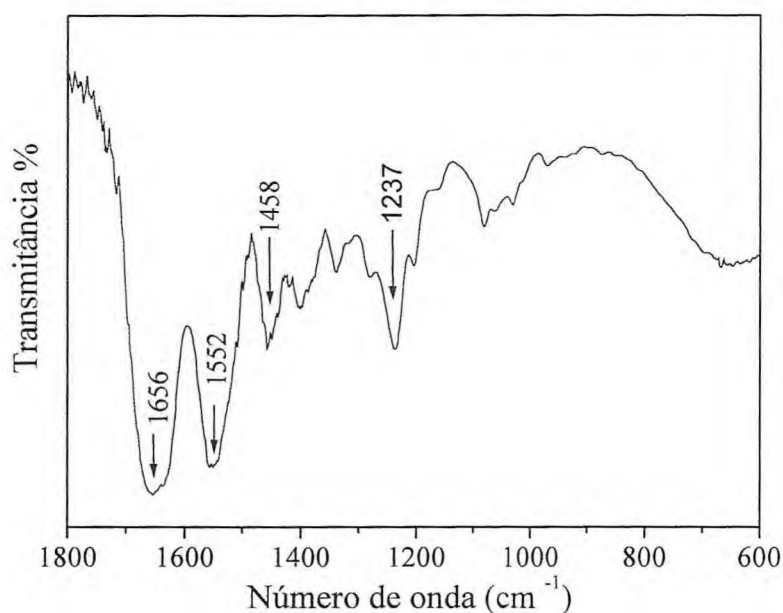


Figura 19 - Espectro no infravermelho de filme de colágeno formatado a pH 3.

Tanto colágeno solúvel em meio ácido como colágeno fibrilar neutro têm sido estudados por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) ,(PENKOVA *et al*, 1996) (FRIESS e LEE, 1996). Independentemente da taxa de aquecimento, o colágeno solubilizado desnatura nas temperaturas entre 10 e 20 °C mais baixas do que em amostras fibrilares ordenadas, como no tendão. Normalmente, um único pico endotérmico tem sido observado em ambas as formas.

A Figura 20 mostra o termograma por DSC de filme de colágeno solúvel formatado a pH 3 onde apresenta uma única transição térmica em 52,9 °C referente a temperatura de desnaturação da proteína.

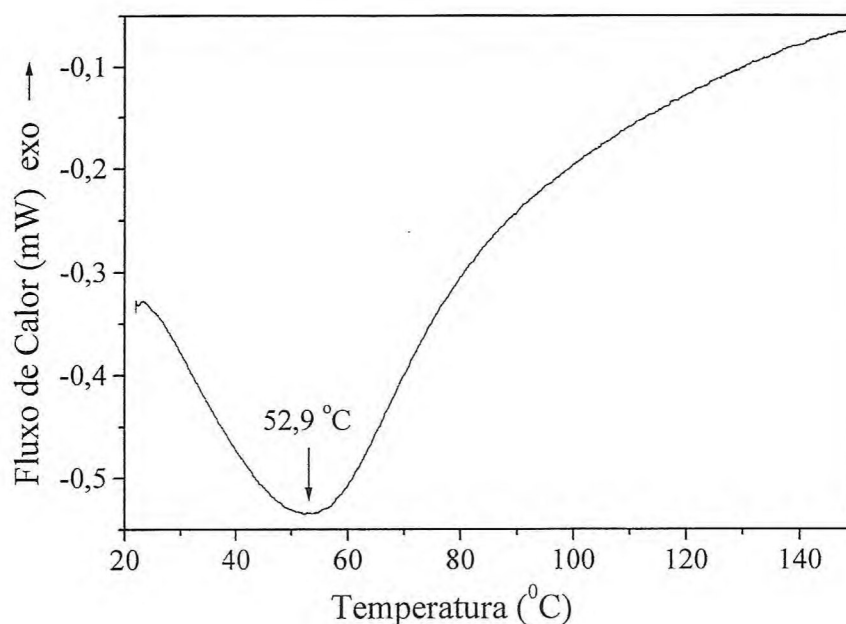


Figura 20 - Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de colágeno formatado a pH 3.

No sentido de esclarecer a estrutura superficial presente no filme de colágeno, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (Figura 21). Observa-se que em meio a uma superfície onde não se verifica qualquer indício de estruturas fibrilares, o que é esperado pois o colágeno solúvel não deve fibrilar nas condições dadas, ocorre a presença de agregados de fibras (Figura 22) que podem ter sido formados a partir de

microfibras de colágeno, que não tiveram suas ligações cruzadas inteiramente reduzidas pelo tratamento alcalino.

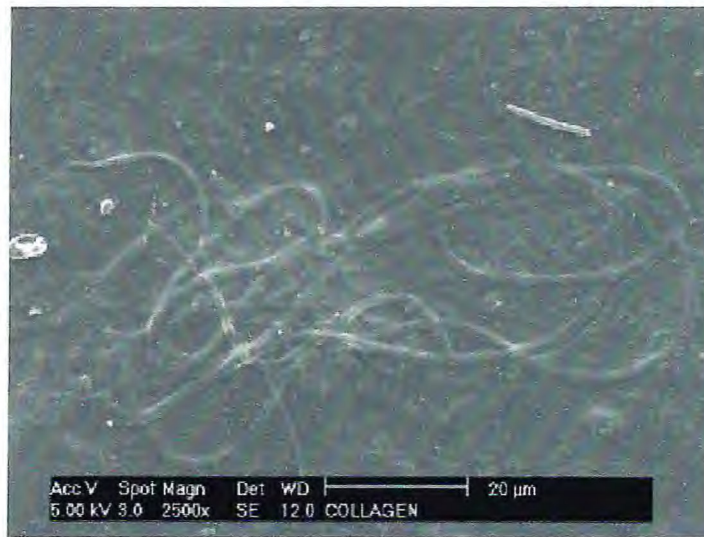


Figura 21- Micrografia de filme de colágeno solúvel conformado a pH 3. Ampliação 2500x.

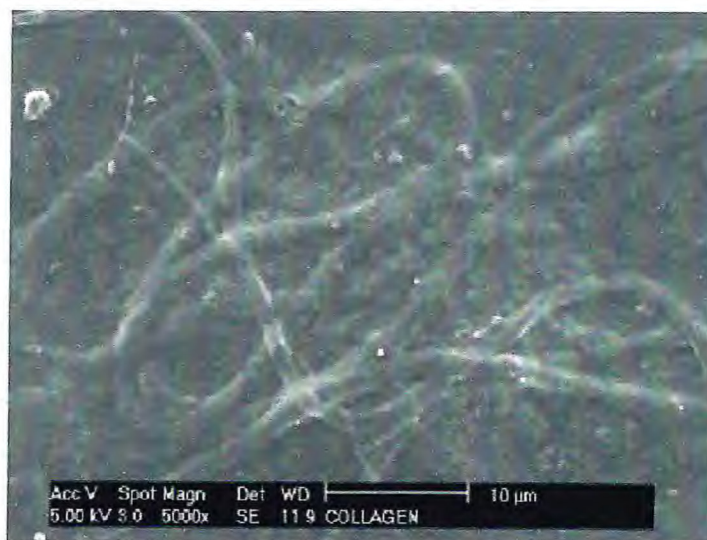


Figura 22 - Micrografia de filme de colágeno solúvel conformado a pH 3. Ampliação 5000x.

IV.2. Caracterização do polissacarídeo

Algumas sementes, principalmente de leguminosas, contém um endosperma gomoso, cuja principal função seria de absorver água em quantidade de até dez vezes superior ao seu peso aparentemente destinado a defesa das plantas jovens ao estresse hídrico. Estas gomas são constituídas principalmente por uma galactomanana com diferentes relações manose/galactose e substituições.

A microscopia eletrônica de varredura do endosperma de *Adenantha pavonina*, apresentada na Figura 23, revela uma estrutura porosa e grumosa de rede de fibras entrelaçadas sugerindo as funções do polissacarídeo, de proteção e armazenagem de água na semente.

A Figura 24 mostra a curva de estabilidade térmica por DSC de amostra de endosperma de *Adenantha pavonina*, apresentando uma transição larga e intensa em 76,9 °C e uma pequena transição em 126 °C sugerindo que a goma seja formada por diferentes componentes, tanto em termos de estrutura como de conformação, que se entrelaçam para formar uma matriz.

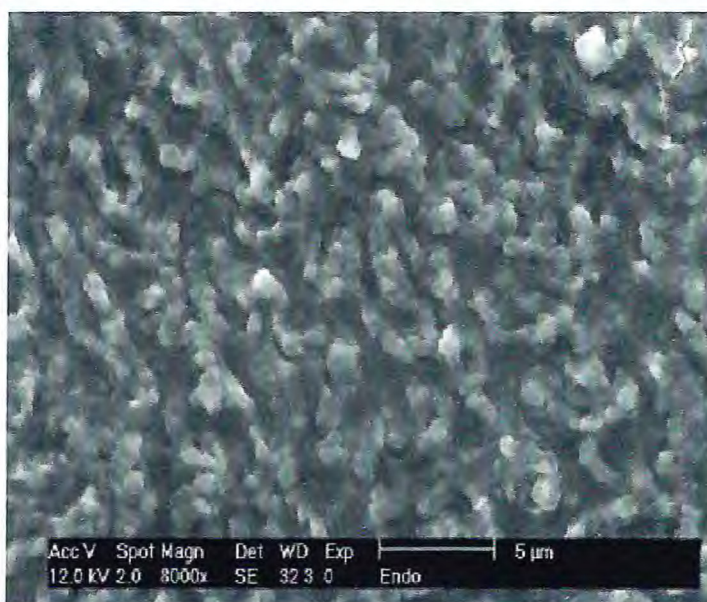


Figura 23– Micrografia do endosperma de galactomanana de *Adenantha pavonina*.

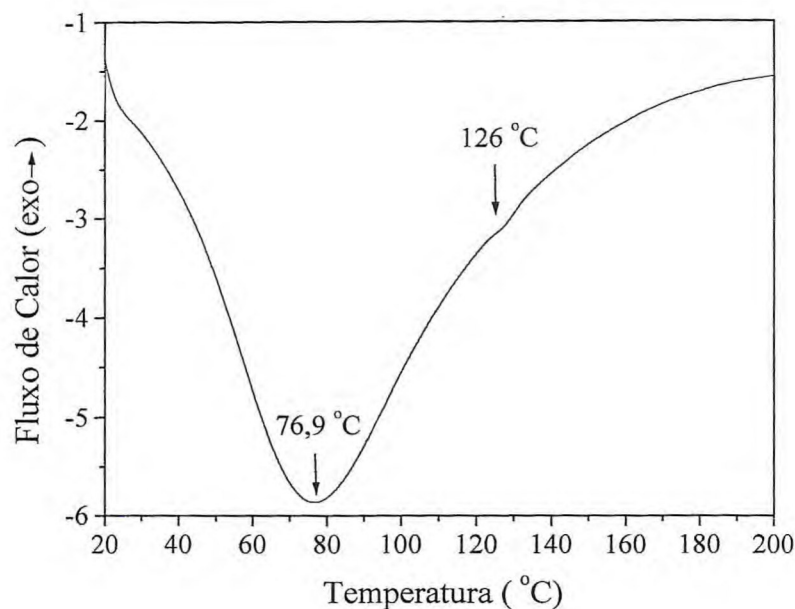


Figura 24- Curva de estabilidade térmica por DSC para amostra de endosperma de *Adenanthera pavonina*..

A obtenção das galactomananas utiliza o método usual o qual envolve remoção preliminar do tegumento, moagem da semente, e extração aquosa em temperaturas que variam de 4 a 25 °C, seguido de centrifugação e precipitação do sobrenadante com etanol a 75% (v/v) (DEA & MORRISON 1975). No processo juntamente com a galactomanana, pode haver coprecipitação de proteínas residuais, que podem ser eliminadas através de tratamento alcalino ou enzimático, complexação com cobre ou variação da força iônica. A galactomanana costuma reter pequenas quantidades de proteína (cerca de 1 a 2%) as quais devem estar ligadas covalentemente ou adsorvidas ao polímero (BRESOLIN *et al.*, 1999). Entretanto, no presente trabalho, era necessário obter a galactomanana em uma forma solúvel em meio ácido, nas mesmas condições das do colágeno solúvel. Portanto, a estratégia escolhida foi fazer uma homogenização direta da farinha da goma em ácido acético, seguida de centrifugação, como descrito no capítulo III.

A curva de estabilidade térmica por DSC para a fração de galactomanana solúvel em ácido acético em pH 3, liofilizada (Figura 25) mostra uma única transição

mais estreita em 45,8 °C, sugerindo que a galactomanana obtida nessas condições, é estruturalmente mais homogênea.

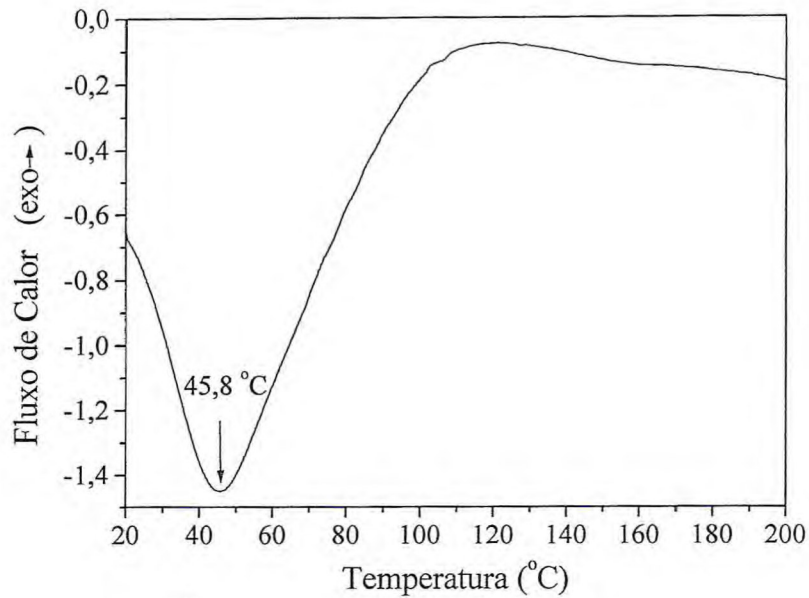


Figura 25 – Curva de estabilidade térmica por DSC de fração de galactomanana solúvel em ácido acético em pH 3, liofilizada.

As Figuras 26 e 27 mostram o efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de cisalhamento e viscosidade de soluções de galactomanana 10 mg/g em ácido acético pH 3, respectivamente. As curvas mostram um comportamento pseudoplástico com coeficiente de consistência $K = 10678 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ e índice de fluidez $n = 0,74$. Os resultados demonstram que as soluções de galactomanana estão mais próximas do comportamento newtoniano em relação a solução de colágeno, cujo índice de fluidez foi $n = 0,25$ e sugerem que as moléculas de galactomanana sejam mais flexíveis que as moléculas de colágeno. O alto valor do coeficiente de consistência obtido, sugere que as moléculas de galactomanana mantêm grande interação com moléculas do solvente.

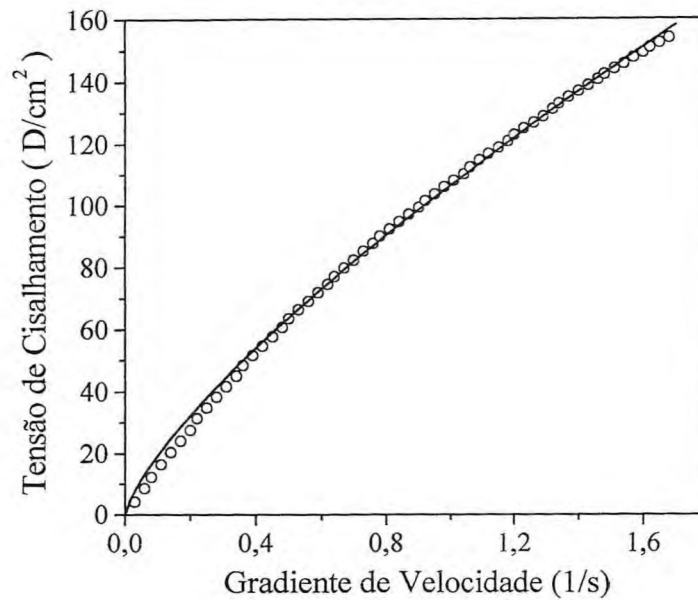


Figura 26 – Efeito do gradiente de velocidade sobre a tensão de cisalhamento de solução de galactomanana 10mg/g em ácido acético pH 3.

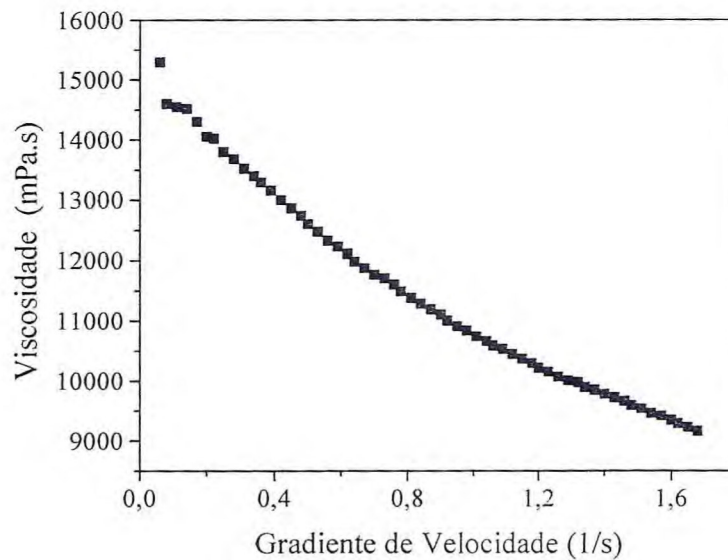


Figura 27 – Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade de solução de galactomanana 10 mg/g em ácido acético pH 3.

A Figura 28 apresenta o espectro no infravermelho de filmes de galactomanana solúvel em ácido acético pH 3. onde mostra bandas de absorção a 812 e 871 cm^{-1}

indicativo da presença de unidades de α -D- galactopiranosose e unidades β -D- manopiranosose, respectivamente. Tal configuração é encontrada na maioria das galactomananas estudadas (KAPOOR, 1972). Outras bandas, comuns em polissacarídeos, são observadas em 1150 cm^{-1} devido a deformação axial $\delta(\text{C-O})$ e vibração do anel piranosídico. A região do espectro de $1150 - 950\text{ cm}^{-1}$ é caracterizada por bandas de deformação $\delta(\text{C-OH})$. A banda em 970 cm^{-1} tem sido relacionada à deformação axial (C-OH) no C-4.

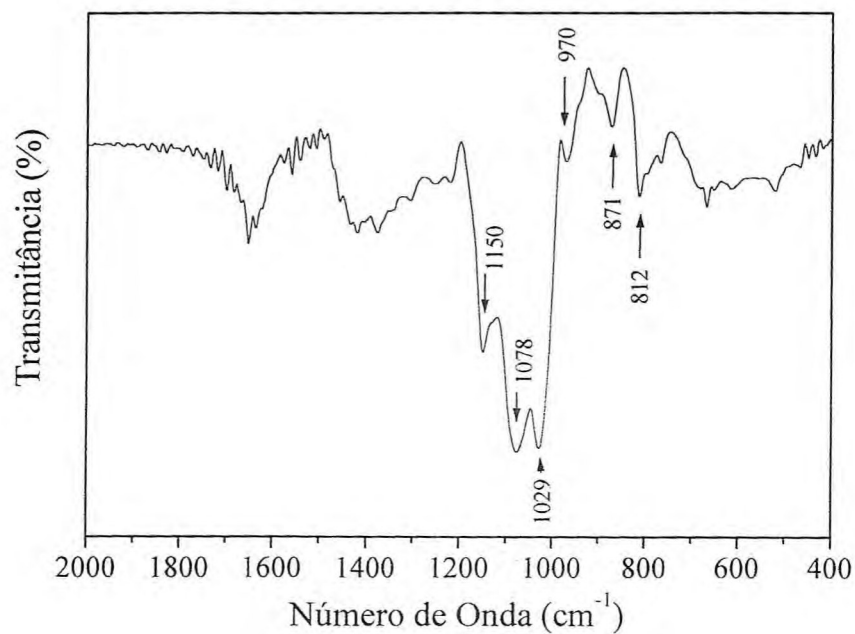


Figura 28- Espectro de infravermelho de filme de galactomanana solúvel formatado em pH 3 .

IV. 3 - Caracterização de blendas de GalCol em solução

As blendas foram preparadas por homogeneização das soluções estoques de galactomanana e colágeno, e centrifugadas. O processo de centrifugação não revelou qualquer separação de fases e nem ocorrência de precipitados em quantidade significativa.

As Figuras 29, 30 e 31 mostram as curvas de escoamento de soluções de galactomanana, soluções de GalCol (9:1) e (3:2) respectivamente, na concentração de 5 mg/g em função da temperatura. Os resultados mostram um comportamento pseudoplástico, podendo ser observada uma progressiva diminuição da viscosidade tanto para soluções de galactomanana como para blendas de GalCol.

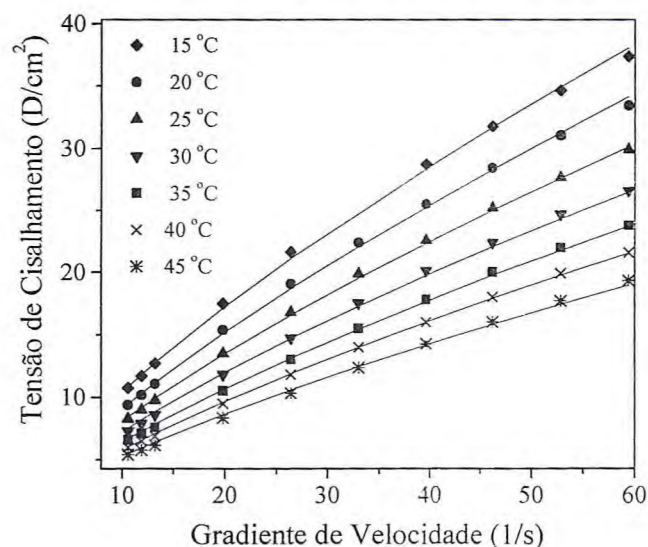


Figura 29– Curvas de escoamento de soluções de galactomanana 5 mg/g em ácido acético pH 3, em função da temperatura.

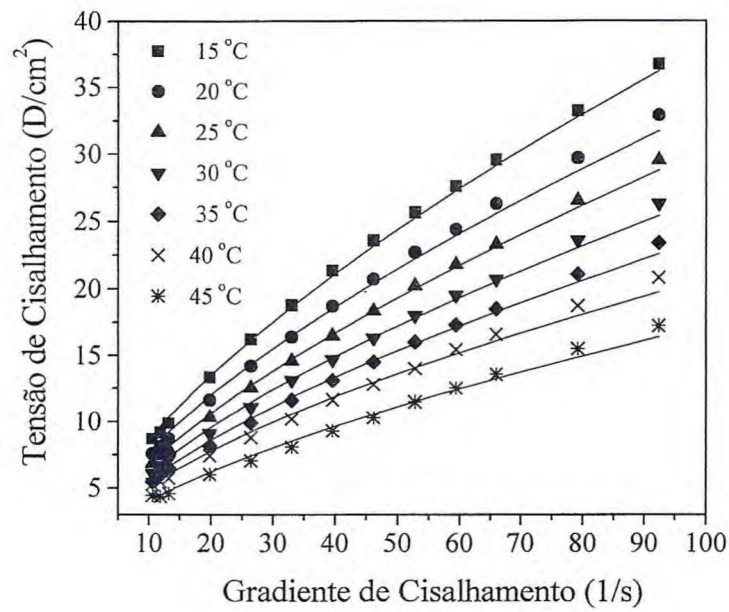


Figura 30 - Curvas de escoamento de soluções de GalCol (9:1) em ácido acético pH 3, em função da temperatura.

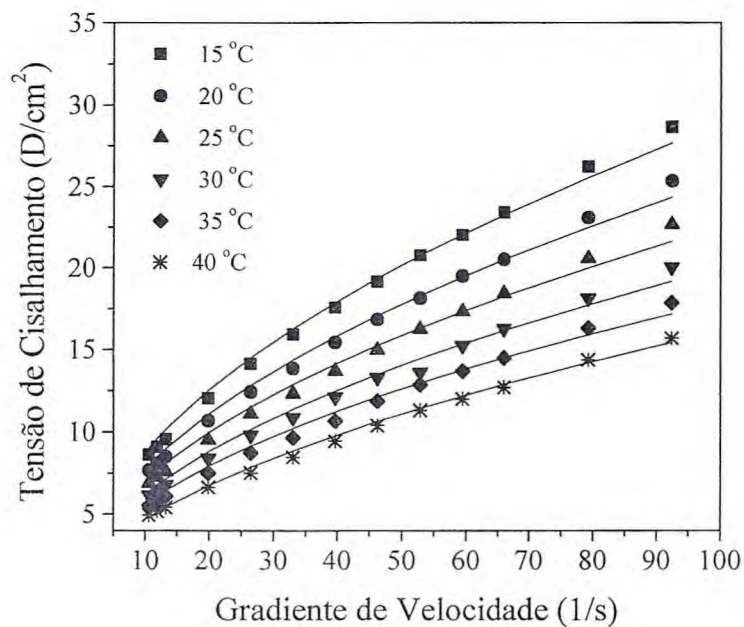


Figura 31 – Curvas de escoamento de soluções de GalCol (3:2) em ácido acético pH 3, em função da temperatura.

A Figura 32 apresenta o efeito da temperatura no comportamento do índice de fluidez para soluções de galactomanana e blendas GalCol (9:1 e 3:2). Os resultados

mostram que o índice de fluidez de soluções de galactomanana não varia significativamente com a temperatura, e que a presença de colágeno diminui o índice de fluidez das blendas. Apenas amostras de GalCol (3:2) mostram um aumento no índice de fluidez em temperaturas acima de 35 °C.

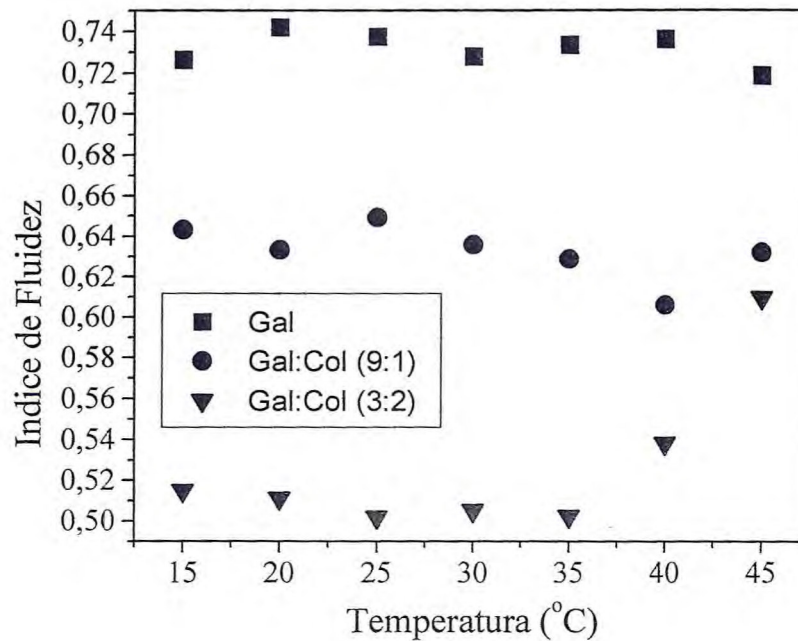


Figura 32 – Curva de Índice de fluidez das soluções de Gal:Col (3:2, 9:1 e 1:0) em função da temperatura.

As curvas de Arrhenius para todas as amostras (Figura 33) mostram duas regiões de escoamento com diferentes energias de ativação para amostras de GalCol (9:1 e 3:2). Esses resultados podem ser explicados pela desnaturação das moléculas de colágeno em temperaturas acima de 35 °C. As energias de ativação (E_a) das amostras determinadas na faixa de temperaturas entre 15 e 35 °C, são apresentadas na Tabela 4. As curvas de Arrhenius mostram que a adição de colágeno a soluções de galactomanana aumenta o coeficiente de consistência, K .

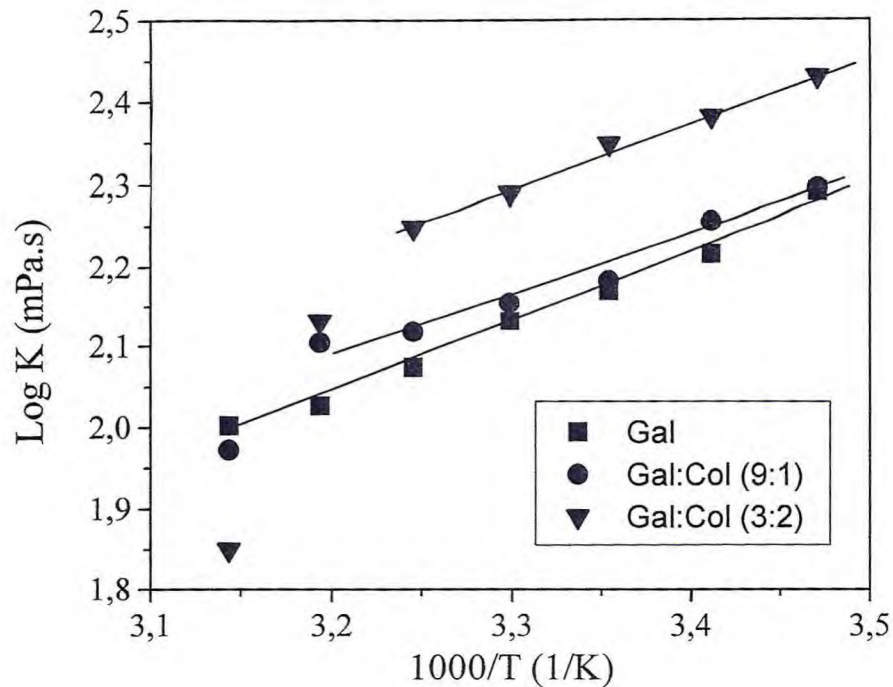


Figura 33 - Curva de Arrhenius para soluções de galactomanana e blendas de GalCol (3:2 e 9:1).

Tabela 4 – Energia de ativação para soluções de galactomanana contendo diferentes proporções de colágeno.

Amostra	Ea (kJ/mol)
GalCol (1:0)	16.89
GalCol (3:2)	17.13
GalCol (9:1)	13.55

Em temperaturas baixas (15 a 35 °C), os valores do índice de fluidez para soluções de galactomanana, e blendas GalCol (9:1 e 3:2) foram próximos a 0,7, 0,6 e 0,5 respectivamente, o que pode estar relacionado com a rigidez de moléculas de colágeno. O aumento no índice de fluidez de GalCol (3:2) com a temperatura, sugere que a desnaturação de moléculas de colágeno resulta em diminuição dessa rigidez.

O coeficiente de consistência foi sensível para mudanças da temperatura e concentração do colágeno, diminuindo com o aumento da temperatura e aumentando com o incremento de colágeno.

As Figuras 34, 35 e 36 mostram resultados de microcopias eletrônicas de varredura realizadas com esponjas de blendas de GalCol (1:1), (3:2) e (7:3). Observa-se que na medida em que se aumenta o teor de colágeno na esponja aparece uma estrutura fibrosa, sugerindo que a presença de colágeno concorre para o entrelaçamento macromolecular.

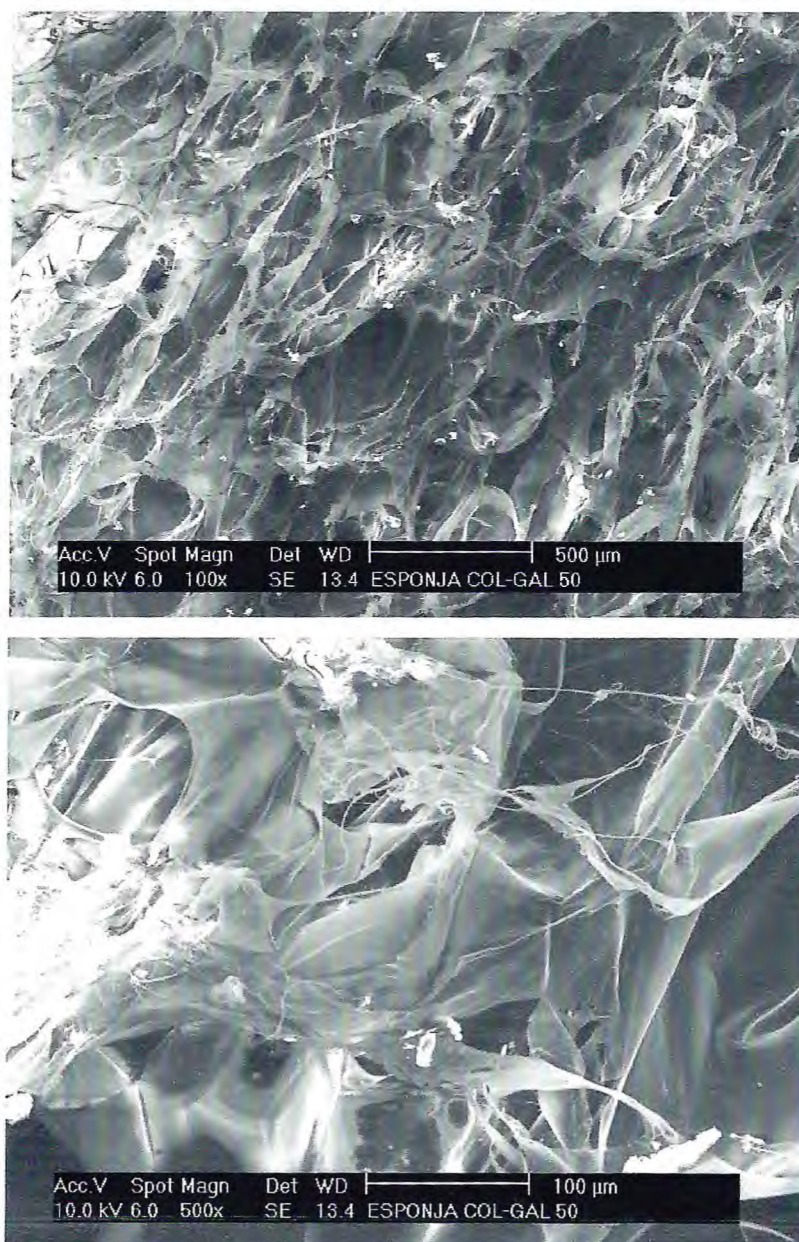


Figura 34 – Micrografias de esponjas de GalCol (1:1), formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).

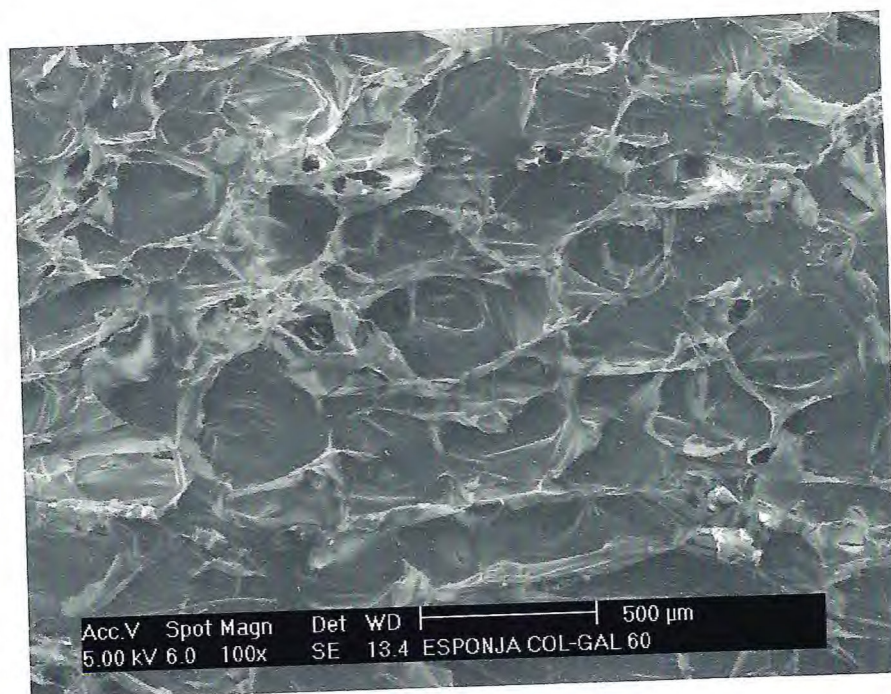


Figura 35- Micrografias de esponjas de GalCol (3:2) formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).

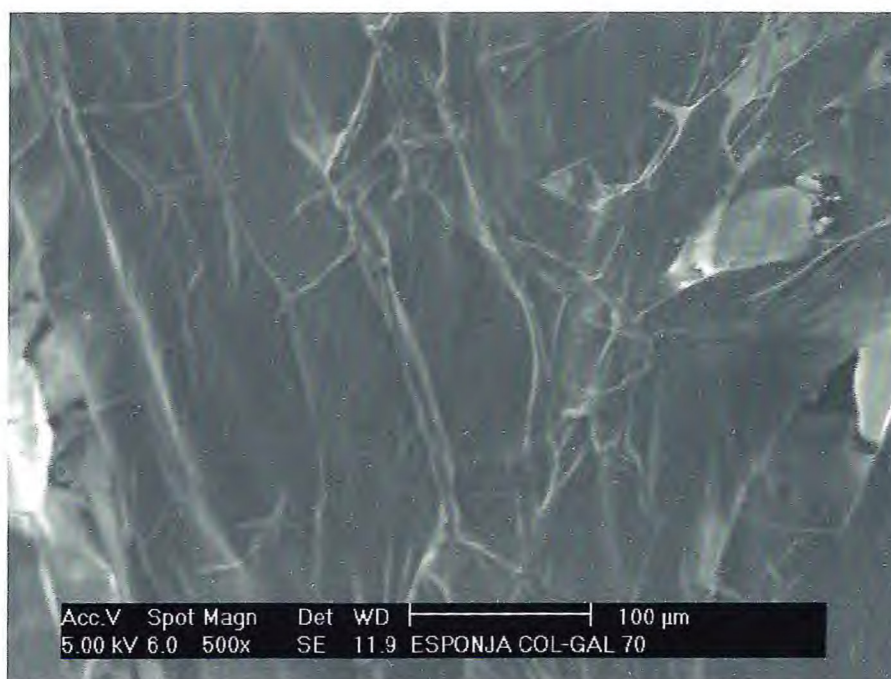
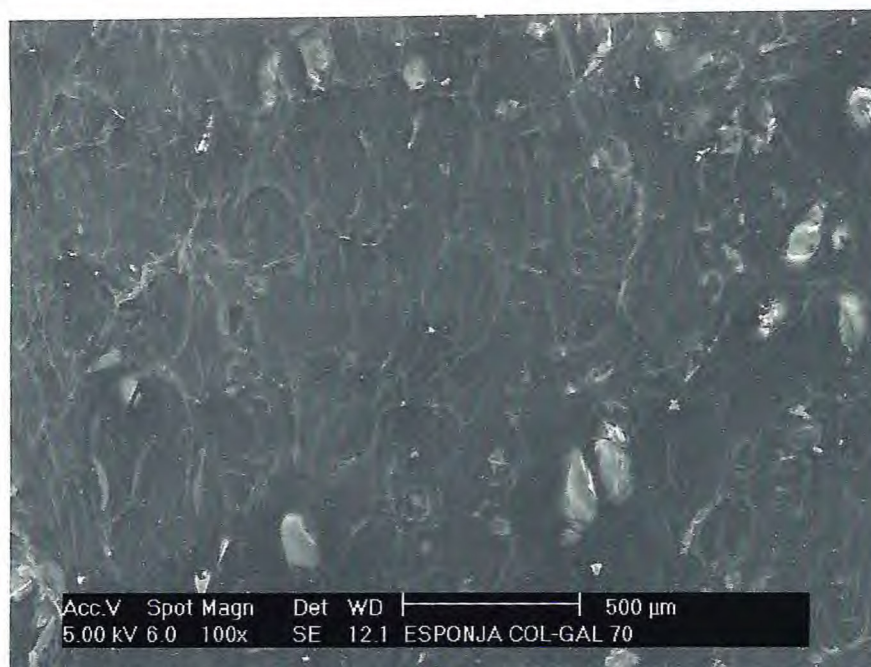


Figura 36 – Micrografias de esponjas de GalCol (7:3) formatadas a pH 3 e secas por liofilização (ampliadas 100 e 500x).

As Figuras 37, 38 e 39 mostram respectivamente as curvas de estabilidade térmica por DSC para filmes de GalCol (1:1), (3:2) e (7:3). Os termogramas se caracterizam pela presença de uma única transição térmica em 50,3, 62,0 e 59,9 °C para filmes de GalCol (1:1), (3:2) e (7:3), respectivamente. Os resultados sugerem que

a adição de galactomanana ao colágeno aumenta a estabilidade térmica da blenda. Entretanto uma variação pode ser observada para amostras de GalCol (7:3), cuja transição ocorreu em temperatura mais baixa, em relação a GalCol (3:2).

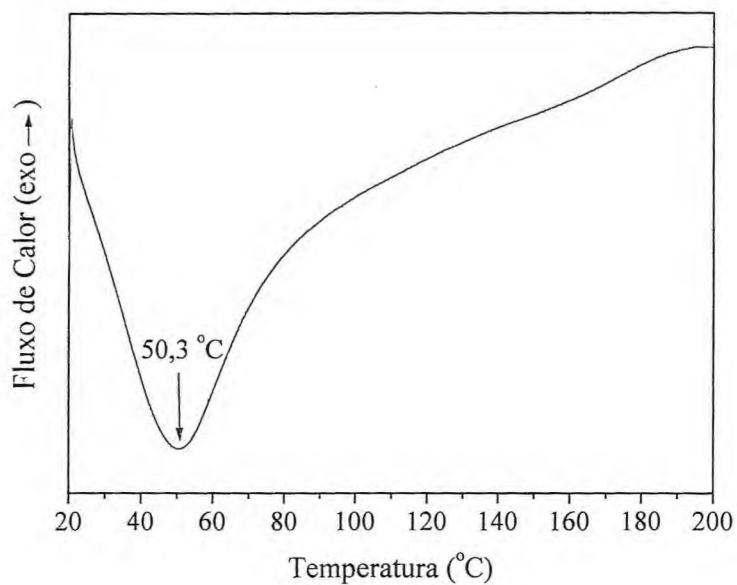


Figura 37 - Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (1:1) formatado a pH 3.

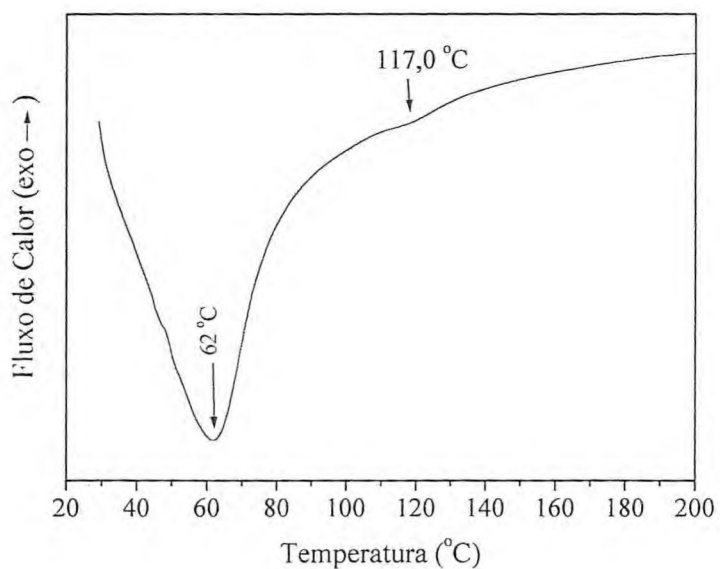


Figura 38 - Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (3:2) formatado a pH 3.

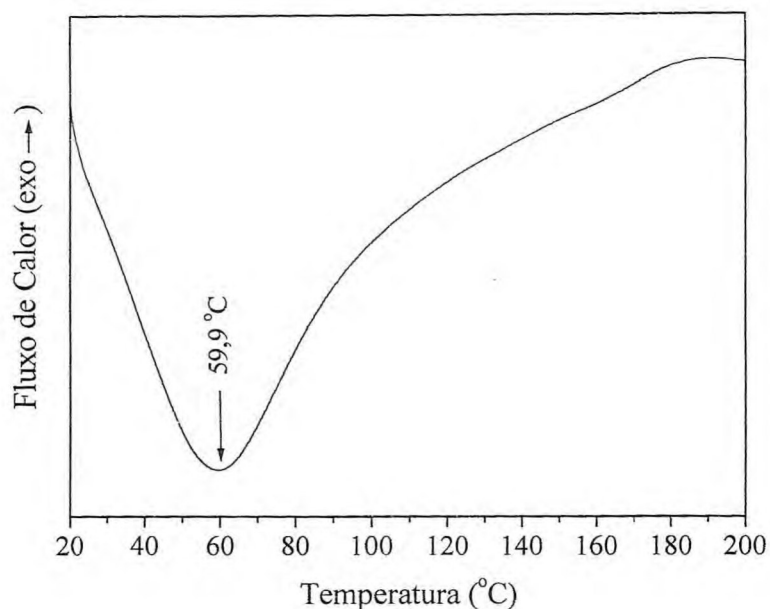


Figura 39 - Curva de estabilidade térmica por DSC de filme de GalCol (7:3) formatado a pH 3.

As Figuras 40, 41 e 42, mostram respectivamente, os espectros no infravermelho para filmes de GalCol (1:1), (7:3), e (9:1) formatados a pH 3. As bandas típicas de colágeno (amida I, II e III) aparecem nas mesmas regiões em todos os espectros e a medida que a presença de colágeno diminui na blenda, essas bandas diminuem de intensidade. As relações, A_{1235}/A_{1450} para as blendas de GalCol (1:1), (7:3) e (9:1), respectivamente foram 0,98, 0,98 e 1 demonstrando a manutenção de integridade estrutural do colágeno quando misturado a galactomanana. Nos espectros são conservadas as bandas de absorção típicas de galactomananas em torno de 812 e 871 cm^{-1} relativas a presença de unidade α -D-galactopirranose e unidades β -D-manopirranose respectivamente, e cujas intensidade aumentam com o aumento do teor de galactomanana na blenda.

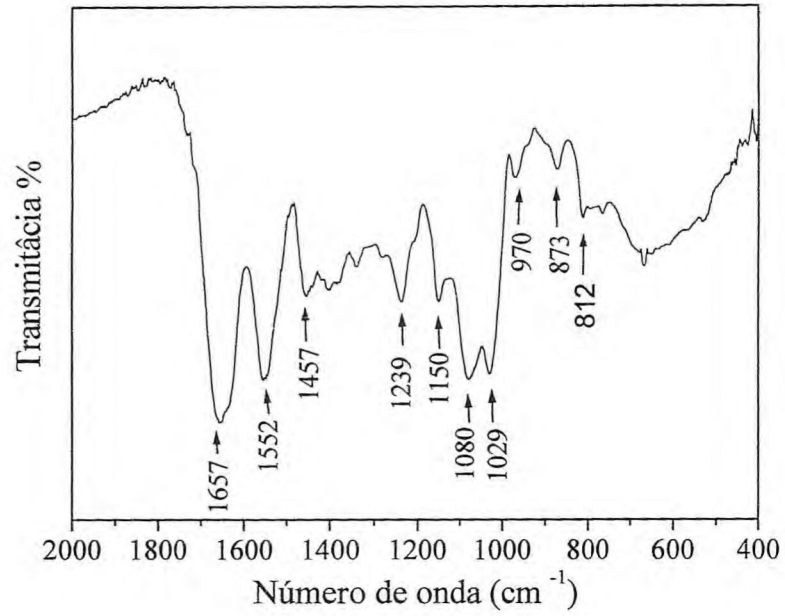


Figura 40 - Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (1:1) formatados a pH 3.

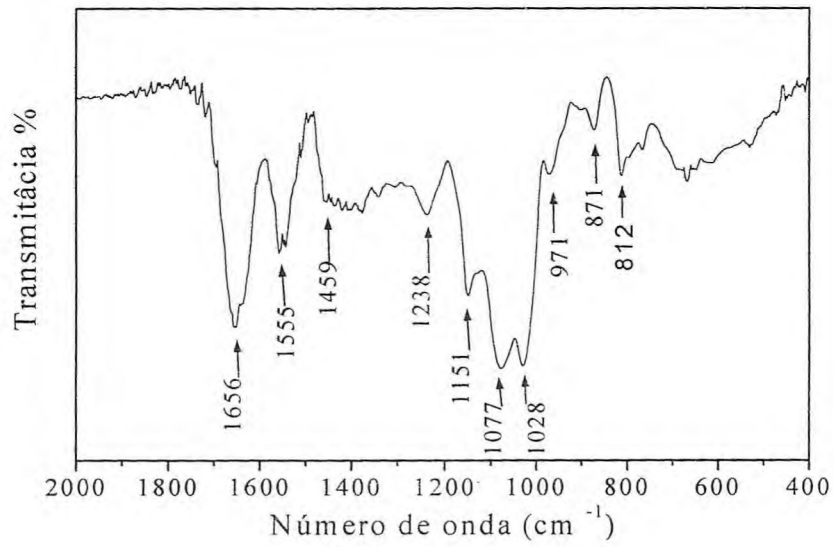


Figura 41 - Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (7:3) formatados a pH 3.

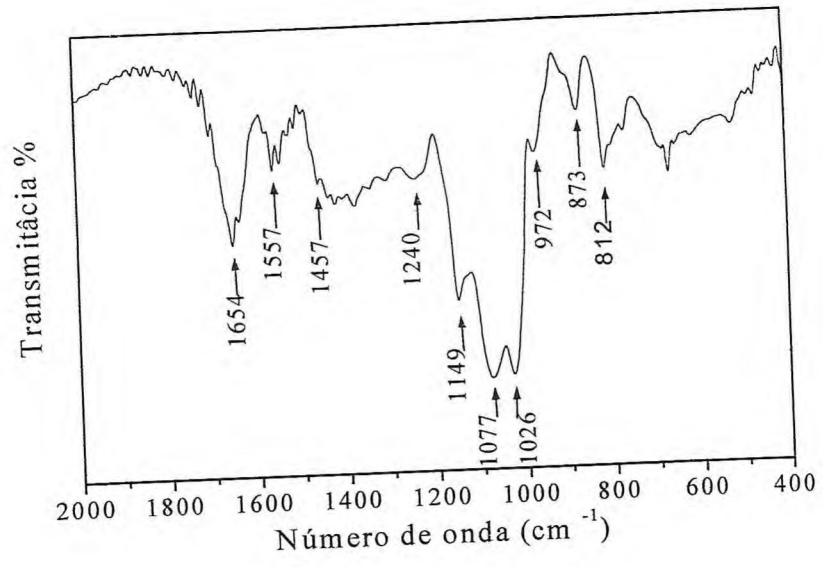


Figura 42 - Espectro no infravermelho de filmes de GalCol (9:1) formatados a pH 3.

IV. 4. Caracterização de filmes de GalCol reticulados com glutaraldeído

Para aumentar a estabilidade mecânica dos filmes e a capacidade de retenção do polissacarídeo, foi necessário pensar em uma estratégia de reticulação das macromoléculas. Optamos por fazer a reticulação das moléculas de colágeno com glutaraldeído, por ser a técnica mais usual na preparação de materiais à base de colágeno.

O glutaraldeído (1,5-pentanodial) é um reagente amplamente utilizado em bioquímica e na área biomédica. Sua natureza bifuncional resulta na capacidade de reticular proteínas e polissacarídeos, com aplicações que abrangem desde a fixação de células e tecidos em microscopia, à imobilização de enzimas em suportes sólidos, em cromatografia de afinidade, imunoquímica, como agentes de reticulação em biomateriais, e biossensores (WALT *et al*, 1994).

O glutaraldeído tem sido usado com grande eficiência como estabilizante de proteínas como o colágeno, em diversas aplicações tais como confecção de biopróteses e géis injetáveis de colágeno em liberação controlada de drogas (JAYAKRISHNAN, 1996). O glutaraldeído reage com o colágeno unindo covalentemente grupos ϵ -amino de Lys e Hyl de cadeias laterais adjacentes, com formação da base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$) (Figura 43). A reação, depende do tempo de exposição, temperatura, pH do meio, concentração e composição do reagente (CASAGRANDA *et al*, 1994).

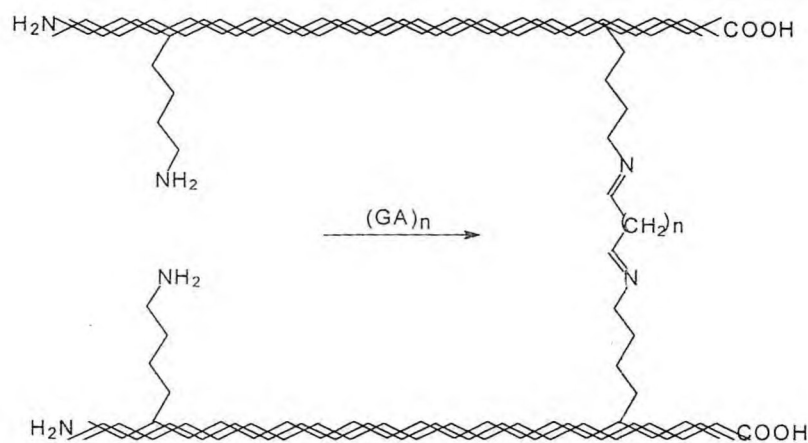


Figura 43 - Reticulação do colágeno com glutaraldeído

O glutaraldeído pode reagir também com outros grupos em proteínas como carboxílicos, e grupos hidroxílicos em polissacarídeos. Sua reatividade é maior para aminas primárias em relação a grupos hidroxílicos. Com proteínas como o colágeno, a reticulação com glutaraldeído é mais estável quando comparada com outros aldeídos tais como o formaldeído (JAYAKRISMAN *et al*, 1996).

A reticulação confere a matriz colagênica, maior resistência mecânica e estabilidade térmica, reduzindo sua antigenicidade e biodegradação (NIMNI 1988). Os efeitos da reação se refletem ainda em alterações das propriedades físico-químicas do colágeno, como mudança do pI, resultante do aumento de carga negativas na molécula, aumento de hidrofobicidade, além da citotoxicidade à concentrações acima de 10-25ppm (HUC *et al*, 1985).

A eficiência da reticulação com glutaraldeído pode ser limitada pela heterogeneidade química desse reagente em solução, e as variáveis que se estabelecem durante sua reação com a matriz de colágeno no caso de tecidos biológicos. Dependendo da aplicação do material tratado com glutaraldeído, essas limitações podem ter efeitos indesejáveis.

Soluções aquosas de glutaraldeído compreendem misturas complexas em equilíbrio, de glutaraldeído livre, mono e dihidratado, de hemiacetais cíclicos monomérico e polimérico, e vários polímeros α , β insaturados formados por condensação aldólica (Figura 44). A proporção desses constituintes em solução de glutaraldeído a 25%, à 25°C, é de aproximadamente 4% de glutaraldeído livre, 16% do monohidratado, 9% do dihidratado e 71% de hemiacetal cíclico. Outras reações embora insignificantes na composição total da solução, parecem ainda ocorrer entre hemiacetais cíclicos e polímeros insaturados para formar polímeros heterogêneos de glutaraldeído (WOODROFF, 1978).

A polimerização do glutaraldeído em solução aquosa é dependente da concentração, pH do meio e temperatura. Sua formação é maior, em soluções concentradas a 25 ou 50%, cujo fato pode ser observado, pela maior intensidade de absorvância da solução à 235nm . Por outro lado um aumento da temperatura ou diluição da solução desse reagente, desloca o equilíbrio para as formas monoméricas (RUIDJGROK *et al*, 1994).

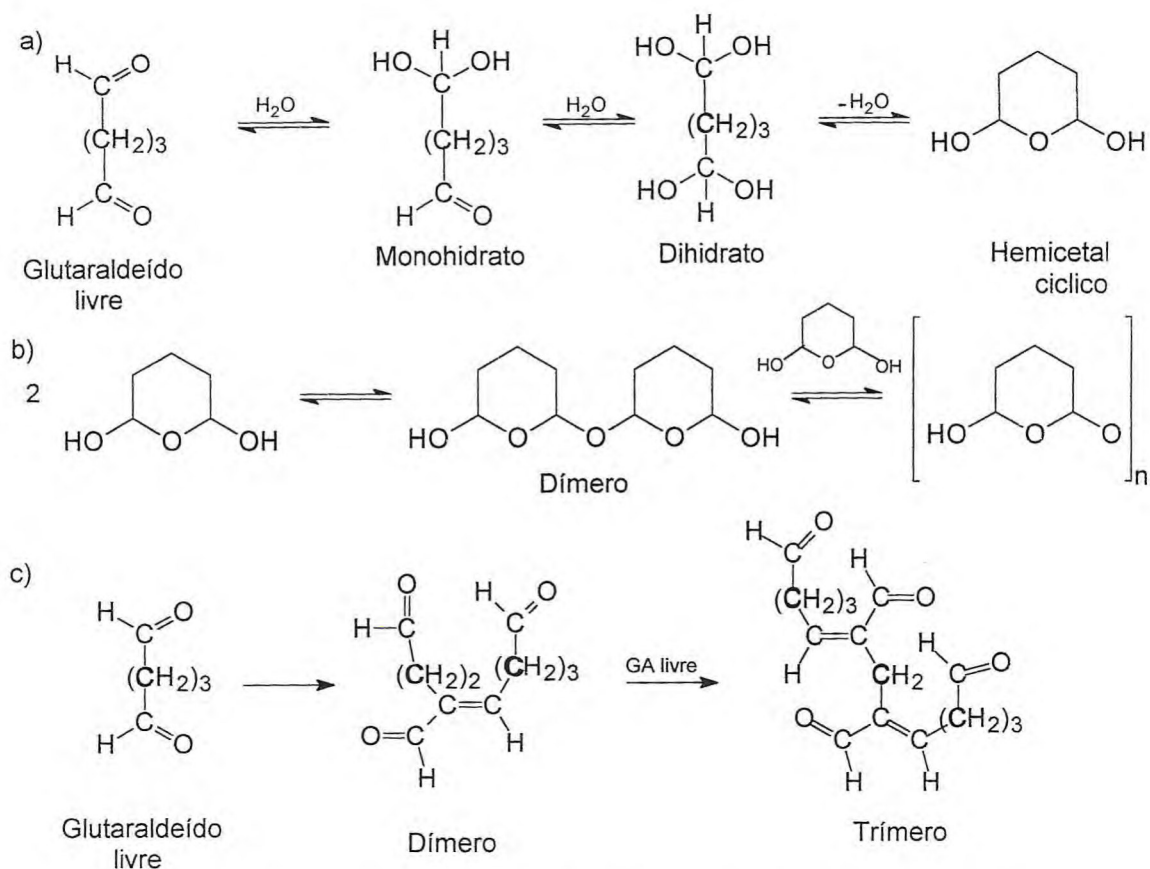


Figura 44 - (a) Formas monoméricas do glutaraldeído (b) Formação do polímero hemiacetal.(c) Formação dos polímeros α , β insaturados

Questões relativas a complexa reatividade do glutaraldeído em solução, tem gerado dificuldades na compreensão de sua reação com o colágeno, especialmente em aplicações como biomateriais, quando pouco se conhece a cerca do produto de reação formado durante a reticulação além das condições ótimas de reação (NIMNI, 1988).

Em se tratando da fixação de tecidos com glutaraldeído, existe controvérsia quanto ao mecanismo de reação que leva ao produto de reticulação estável. Várias propostas tem sido apresentadas, as quais envolvem produtos com estruturas químicas diferenciadas, consistindo no mínimo de três espécies diferentes: Uma delas corresponde a reação via base de Schiff levando a formação de uma amina secundária estável (Figura 45), outro mecanismo refere-se a formação de sais de piridina levado por reação do glutaraldeído com uma amina primária da estrutura protéica, seguido por reações de condensação aldólica (Figura 46). Ambos os produtos da reação acima seriam estáveis a pH e temperatura fisiológica e esse fato poderia explicar a excelente

durabilidade de tecidos estabilizados com glutaraldeído. Outra hipótese baseia-se na formação de uma amina secundária estável através de reação adicional entre aminas primárias e polímeros insaturados de glutaraldeído. (WOODROFF, 1978, NIMNI 1988) (Figura 47).

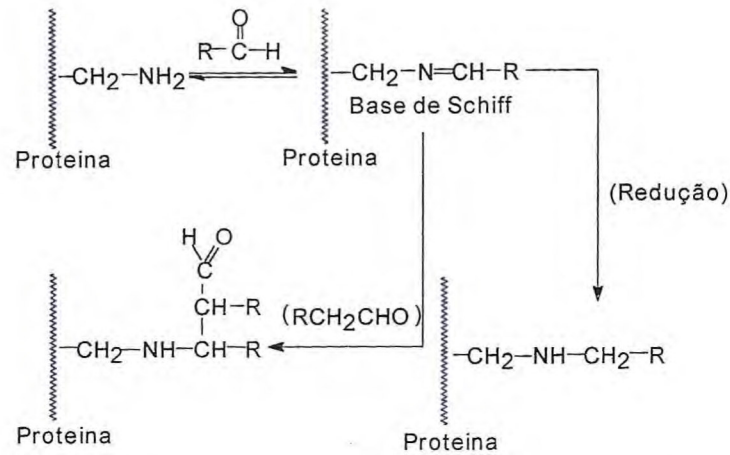


Figura 45 - Formação da amina secundária via intermediário, base de Schiff.

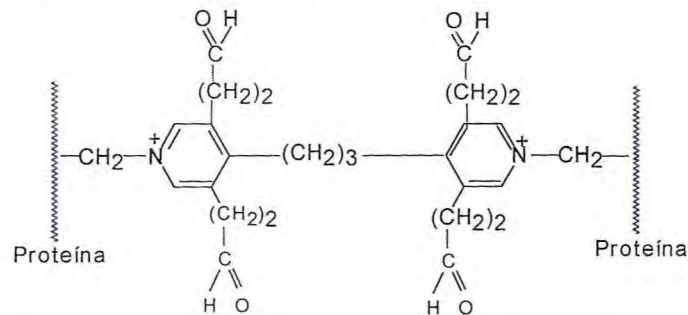


Figura 46 - Reticulação de proteína via derivados piridínicos de glutaraldeído.

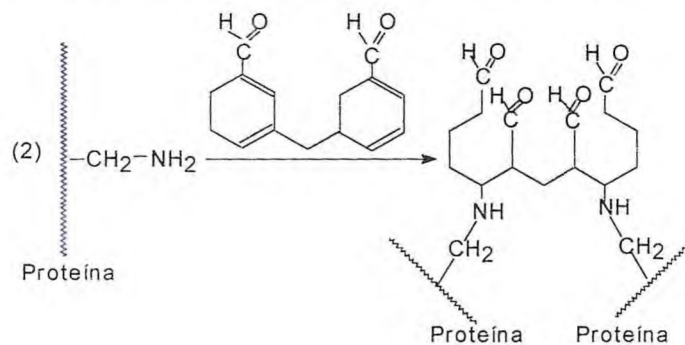


Figura 47 - Reticulação de proteínas via polímeros insaturados de glutaraldeído.

Outro aspecto da reticulação de tecidos, refere-se a acessibilidade desse reagente aos grupos reativos no interior da matriz, sendo esta formada por moléculas de colágeno densamente empacotadas, o que sugere a incerteza do grau de reatividade do glutaraldeído com a estrutura interna da matriz.

Em estudos utilizando matrizes colagênicas, foi observado que a fixação inicial do glutaraldeído no colágeno, ocorre na superfície das fibras (Figura 48), particularmente quando o reagente é usado em altas concentrações (NIMNI 1988). Esse processo é rápido e associado a polimerização de moléculas de glutaraldeído (CHEUNG *et al*, 1985), o que resulta em baixa penetração desse reagente na matriz interna colagênica, devido ao consumo de glutaraldeído monomérico, que se estabelece durante o processo de polimerização. Outra consequência é a liberação contínua de aldeído livre pela decomposição desses polímeros ao longo do tempo.

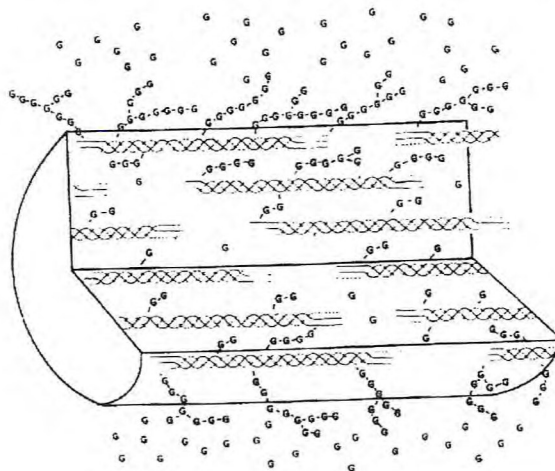


Figura 48 - Polimerização do glutaraldeído na fibrila de colágeno.

Foi também demonstrado que o glutaraldeído quando utilizado em baixas concentrações na fixação de tecidos, promove uma reação com grande dependência do tempo de tratamento. Estas observações enfatizam a importância do tempo de exposição e concentração do glutaraldeído na eficiência da reticulação (CHEUNG 1982).

A reticulação de matrizes, como tecidos biológicos, com soluções de glutaraldeído em baixas concentrações e temperaturas que variam entre 45°C e 60°C, pode melhorar a difusão desse reagente na matriz (CASAGRANDA 1994). Nessa

faixa de temperatura podem ocorrer mudanças na estrutura terciária da proteína, expondo sítios não alcançados à temperatura ambiente, além de favorecer a predominância de formas monoméricas de glutaraldeído. Esse fato deve levar a uma maior difusão do glutaraldeído na matriz de colágeno, embora não seja possível prever o efeito que a reação conduzida em temperaturas mais elevadas, possa produzir à estrutura do colágeno.

A Figura 49 mostra os termogramas de DSC de filmes de, colágeno tratado com glutaraldeído 0,01%, GalCol (1:1) tratados com glutaraldeído nas concentrações 0; 0,05; 1 e 1,5%. O filme de colágeno reticulado apresentou uma transição térmica referente a temperatura de desnaturação de 59,72 °C.

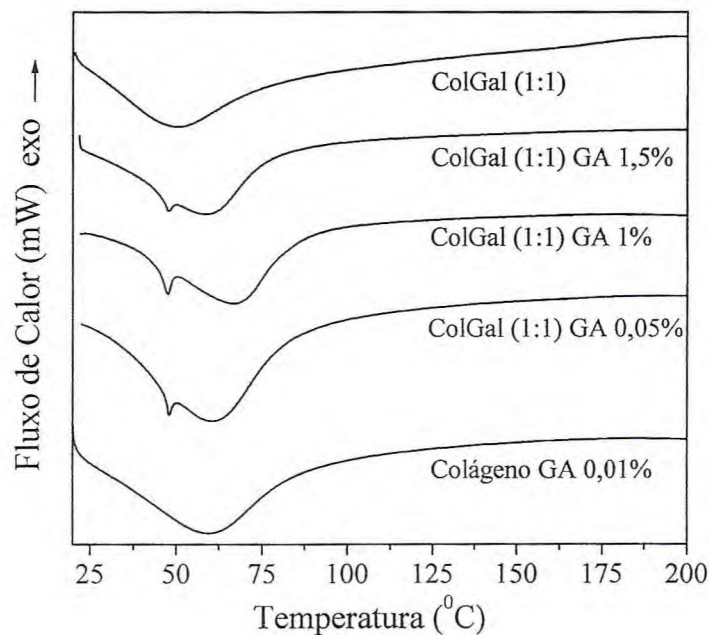


Figura 49 – Curvas de estabilidade térmica por DSC de filmes de colágeno reticulado com GA 0,01%, filmes de GalCol (1:1) sem reticulação e filmes de GalCol (1:1) reticulados com GA 0,05, 1 e 1,5%.

Nos filmes de GalCol, tratados com crescentes concentrações de glutaraldeído os termogramas mostraram duas transições térmicas, uma primeira próxima a 49 °C e outra entre 58 e 67 °C (60,1; 67,2 e 58,8 °C para concentrações de glutaraldeído 0,05, 1, e 1,5% respectivamente). O termograma para filmes de GalCol sem tratamento com glutaraldeído, apresentou uma única transição térmica em torno de em 51 °C.

A reação de reticulação com glutaraldeído, confere estabilidade à molécula de colágeno levando a um aumento da temperatura de desnaturação. Nos termogramas tanto de colágeno quanto de GalCol sem tratamento com glutaraldeído, pode ser observado uma única transição térmica em valores muito próximos de temperatura. A presença de duas transições, em filmes de GalCol reticulados com crescentes concentrações de glutaraldeído, sugere que a blenda de galactomanana e colágeno, resulta em duas estruturas com estabilidades térmicas diferentes. A primeira transição, em temperatura mais baixa, deve estar relacionada ao colágeno não reticulado com glutaraldeído, cujos valores de temperaturas situam-se próximos à transição observada para o colágeno sem reticulação. Esse fato pode estar relacionado as dificuldades de acesso do glutaraldeído às moléculas de colágeno nas regiões mais internas do filme, bloqueada pela presença da galactomanana.

A segunda transição deslocada para temperaturas mais altas, 60 e 67,2 °C para amostras tratadas com glutaraldeído 0,05 e 1%, respectivamente, sugerem a estabilização de moléculas de colágeno expostas na superfície do filme por ação do glutaraldeído em função da concentração.

A transição observada em temperatura mais baixa (58,8 °C) para filmes de GalCol tratados com glutaraldeído 1,5% sugere a ocorrência de reações de polimerização do glutaraldeído, que ocorre quando em altas concentrações, impermeabilizando a superfície da matriz, levando a baixa reticulação de moléculas de colágeno, nas regiões mais internas.

Outra propriedade capaz de avaliar a reação de reticulação é a capacidade de embebição da matriz, cujos valores devem ser inversamente proporcionais ao grau de reticulação. A reação de reticulação estabiliza as moléculas de colágeno formando uma malha onde o polissacarídeo poderia ser ocluído.

Os resultados de embebição dos filmes de GalCol, em função do teor de galactomanana e da concentração de glutaraldeído usado na reticulação, são apresentados nas Figuras 50 e 51, respectivamente. O grau de embebição para todas as amostras (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1), diminui em função do aumento da reticulação alcançando um estado de equilíbrio com glutaraldeído na concentração 0.1%. Esses resultados, são melhor observados, quando em função da concentração de

glutaraldeído, onde demonstram uma diferença significativa nos valores de embebição, com um aumento da concentração de galactomanana nos filmes, com valores que variaram de 6.42 to 11.69 g água/ g matéria seca, para proporções de GalCol de (1:0) e (4:1), quando reticulados com glutaraldeído 0,001%.

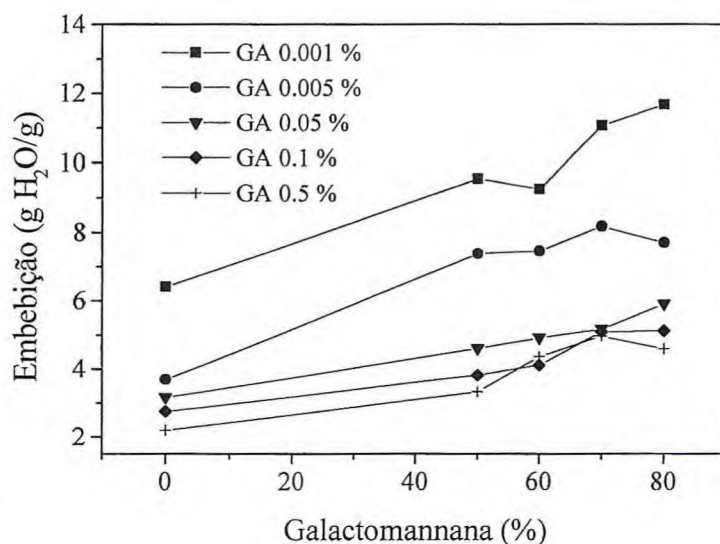


Figura 50 – Comportamento de embebição de filmes de GalCol (1:1, 3:2, 7:3 e 4:1) reticulados com GA (0,001, 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5%), em função do teor de galactomanana.

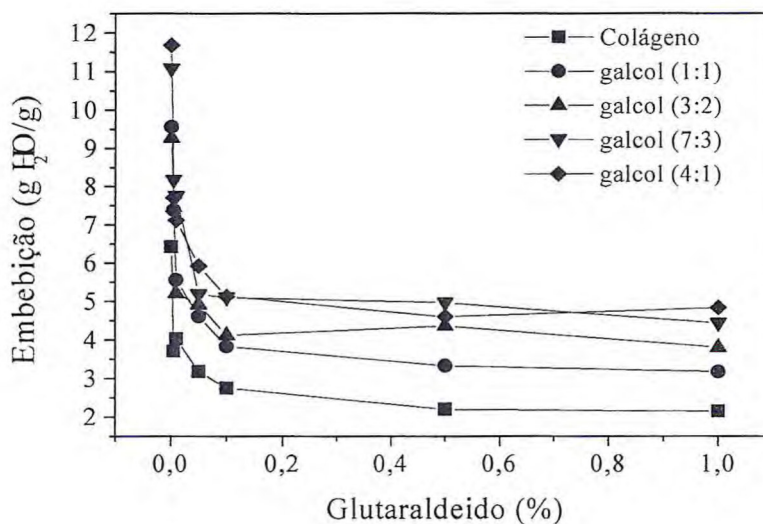


Figura 51 – Comportamento de embebição para filmes de GalCol (1:1, 3:2, 7:3, 4:1) em função da reticulação com GA (0,001, 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5%).

Estes resultados mostram que a absorção de água nos filmes, cresce com o aumento do teor de galactomanana no filme, e diminui com o incremento da reticulação com glutaraldeído. É importante ressaltar que altas concentrações do polissacarídeo nos filmes pode ocasionar lixiviação de quantidades não ocluídas nas malhas de colágeno.

IV. 5. Aplicações

IV. 5.1. Cromatografia de afinidade de frutalina em colunas de filmes GalCol

Com a finalidade de verificar a possível interação de lectina com filmes GalCol, foram realizados testes com filmes na proporção (3:2), reticulados com glutaraldeído 0,001%, e frutalina obtida por cromatografia de afinidade em coluna de *Adenantha pavonina*.

No ensaio, de um conjunto de 4 peças de filmes de 1 cm², cada peça foi imersa durante 1h em 2 mL de solução de frutalina 0,5 mg/mL preparada em solução de NaCl 0,15 mol/L. Após esse tempo cada peça foi removida e lavada exaustivamente em solução de NaCl 0,15 mol/L em intervalos de 20 minutos.

Cada peça assim tratada foi imersa em 1 mL de solução de galactose 0,2 mol/L durante 1,5 h, removida após esse tempo e seguida de lavagens com 2 mL da mesma solução estoque em intervalos de 30 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de atividade hemaglutinante, inclusive as soluções de lavagem com NaCl 0,15 mol/L. O mesmo ensaio, com igual número de amostras, foi realizado com filmes de colágeno e filmes de GalCol (3:2) reticulados com glutaraldeído 0,001%, nesse último sem o tratamento com solução de frutalina.

Os resultados de atividade hemaglutinante das amostras foram positivos para filmes na presença de frutalina, e negativos para os filmes preparados apenas com colágeno ou filmes preparados com GalCol sem adição de frutalina além das soluções de lavagem com NaCl (Tabela 5).

A partir desses resultados, foram estabelecidas as condições para um sistema de cromatografia de afinidade utilizando filmes de GalCol, com o intuito de avaliar melhor a capacidade de interação desse material com lectinas. Foram montadas colunas com filmes de GalCol reticulados com glutaraldeído 0,05%, e solução de frutalina 2,5 mg/mL (Figura 52). Após eluição da fração não retida com a solução de equilíbrio (pico I), a fração retida (pico II), foi eluída com solução de galactose e medida a atividade hemaglutinante.

Tabela 5 – Resultados qualitativos de atividade de hemaglutinação para amostras do ensaio de interação de frutalina com filmes GalCol (3:2).

Amostra (filmes)	Lavagem									
	NaCl (0,15mol/L)						Galactose (0,2mol/L)			
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
GalCol (3:2)/Frutalina	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
GalCol (3:2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colágeno/Frutalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = presença de atividade

- = ausência de atividade

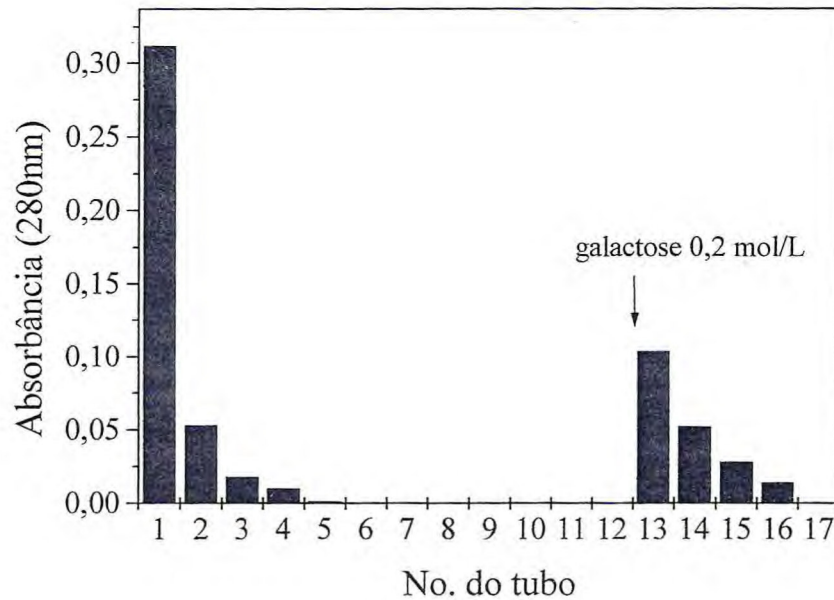


Figura 52 – Cromatografia de afinidade em coluna de filme de GalCol (3:2) reticulado com GA 0,05%. Solução de frutalina 2,5 mg/mL. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 20 cm², volume 2 mL).

Os resultados demonstraram que a matriz foi capaz de reter a frutalina, cujo rendimento de interação foi de $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A atividade hemaglutinante foi negativa para as últimas soluções de lavagem da coluna antes de eluir com galactose, demonstrando que toda lectina não ligada, foi removida previamente.

Com a finalidade de verificar quais condições experimentais resultariam em melhor interação das lectinas com os filmes, foram estudados filmes com diferentes proporções de massa (GalCol) e variados graus de reticulação com glutaraldeído.

Neste ensaio esperava-se obter uma matriz com a maior proporção possível do polissacarídeo, capaz de ser retido nas malhas do colágeno pela reticulação com glutaraldeído. A concentração do glutaraldeído não deve ser reduzida a ponto de permitir lixiviação da galactomanana, e nem alta o suficiente para impermeabilizar a matriz dificultando as interações com a lectina.

Foram montadas colunas com filmes de GalCol (3:2, 7:3 e 4:1) reticulados com glutaraldeído 0,01, 0,1 e 0,5%, utilizando extrato bruto de *Artocarpus incisa*.

Os resultados da cromatografia de afinidade são mostrados nas Figuras 53, 54 e 55, com filmes de GalCol (3:2), (7:3) e (4:1) respectivamente. Em colunas com filmes de GalCol (3:2), o grau de reticulação não pareceu influenciar o grau de interação com a lectina. No caso de filmes GalCol (7:3), pode ser observada uma maior interação com lectina em concentrações mais baixas de glutaraldeído (0,01 e 0,1%). Em filmes de GalCol (4:1) uma maior interação com lectina pareceu ocorrer a medida que a reticulação da matriz diminuiu.

A Figura 56 compara os resultados de cromatografia de afinidade para filmes de GalCol (3:2, 7:3 e 4:1) quando reticulados com glutaraldeído na concentração 0,1 %, com frutalina de extrato bruto de *Artocarpus incisa*. Os resultados sugerem que o teor de galactomanana nos filmes não parece afetar significativamente o nível de separação.

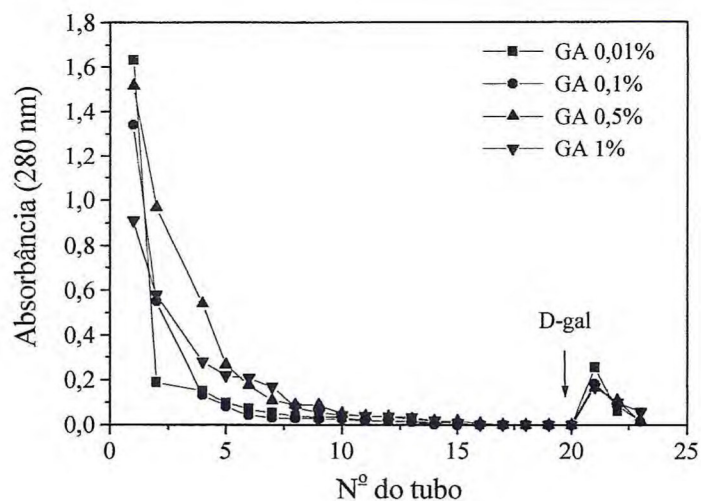


Figura 53 - Cromatografia de afinidade de extrato bruto de *Artorcarpus incisa* em coluna de filmes de GalCol (3:2) reticulados com solução de GA 0,001; 0,1; 0,5 e 1%. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL).

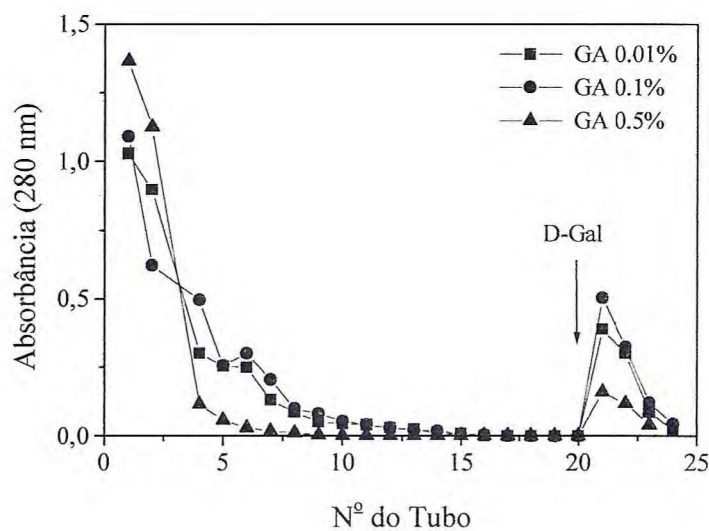


Figura 54 - Cromatografia de afinidade de extrato bruto de *Artorcarpus incisa* em coluna de filmes de GalCol (7:3) reticulados com solução de GA 0,01; 0,1 e 0,5 %. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL).

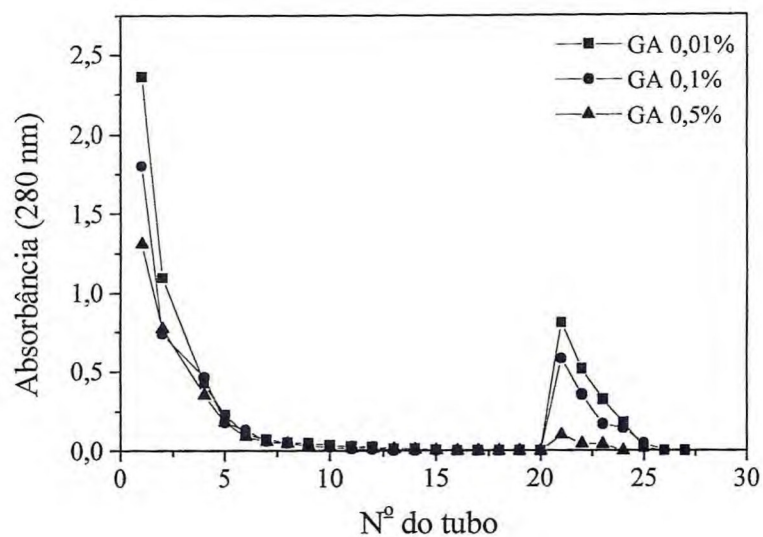


Figura 55 - Cromatografia de afinidade de extrato bruto de *Artorcarpus incisa* em coluna de filmes de galactomanana:colágeno (4:1) reticulados com solução de GA 0,001; 0,1 e 0,5%. . Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – área do filme 29,25 cm², volume 2,5mL).

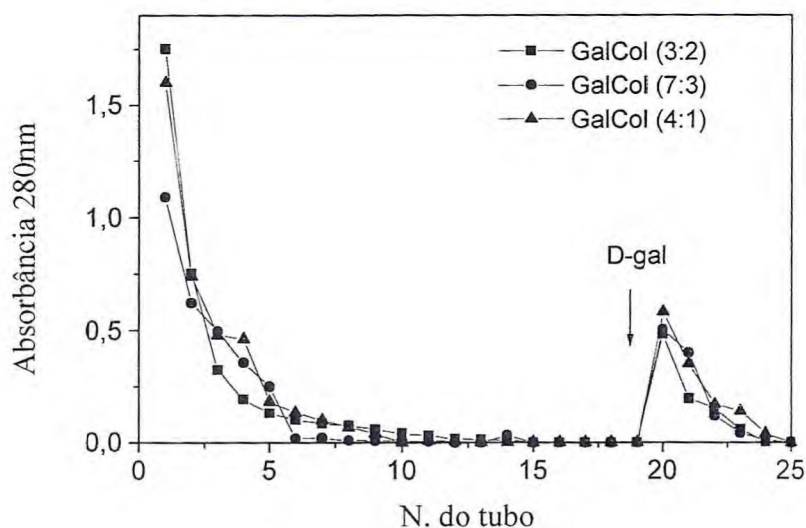


Figura 56 - Cromatografia de afinidade de extrato bruto de *Artorcarpus incisa* em coluna de filmes de galactomanana:colágeno (3:2, 7:3 e 4:1) reticulados com solução de GA 0,1%. Eluição do pico I com solução de NaCl 0,15 mol/L e do pico II com solução de D-galactose 0,2 mol/L. (Coluna – Área do filme 29,25 cm², volume 2 mL).

Quando verificados os rendimentos de interação da frutalina com filmes (Tabela 6), para os diferentes ensaios cromatográficos mostradas nas Figuras 54, 55 e 56, observa-se, uma diminuição no rendimento, com o aumento da reticulação dos filmes com glutaraldeído (0,01, 0,1 e 0,5%), de 34,13 a 8,53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de 22,5 a 8,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 68,36 a 2,10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para as proporções GalCol de (3:2), (7:3) e (4:1), respectivamente. O maior rendimento (76,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi verificado para filmes GalCol (3:2) reticulados com glutaraldeído 0,1%, embora com valor mais alto em relação a concentração 0,01%.

Tabela 6 – Embebição e rendimento de interação da frutalina com filmes de GalCol.

Amostra (GalCol)	Embebição ($\text{gH}_2\text{O}/\text{g mat. Seca}$)	η ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
(3:2) GA 0,01%	5,21	34,13
(3:2) GA 0,1%	4,12	76,8
(3:2) GA 0,5%	4,37	8,53
(3:2) GA 1%	3,80	6,39
(7:3) GA 0,01%	7,75	22,5
(7:3) GA 0,1%	5,10	21,3
(7:3) GA 0,5%	4,97	8,3
(7:3) GA 1% ^(a)	4,43	–
(4:1) GA 0,01%	7,12	68,36
(4:1) GA 0,1%	5,13	17,06
(4:1) GA 0,5%	4,60	2,10
(4:1) GA 1% ^(a)	4,83	–

(a) – amostra sem atividade hemaglutinante

Os resultados mostraram como esperado, que o aumento da reticulação da matriz, diminuindo a capacidade de embebição, deve produzir menor capacidade de interação com a lectina, independente do teor de galactomanana presente. Outro aspecto verificado, é que o grau de interação da lectina com os filmes de GalCol, é

mais corretamente avaliado por medida de atividade hemaglutinante, cujo comportamento não foi o mesmo refletido no perfil cromatográfico.

Realizada microscopia eletrônica de varredura de filmes de GalCol (3:2) reticulados com glutaraldeído 0,1%, com e sem adição de frutalina, Figuras 57 e 58 respectivamente, observa-se mudança na textura na superfície da membrana.

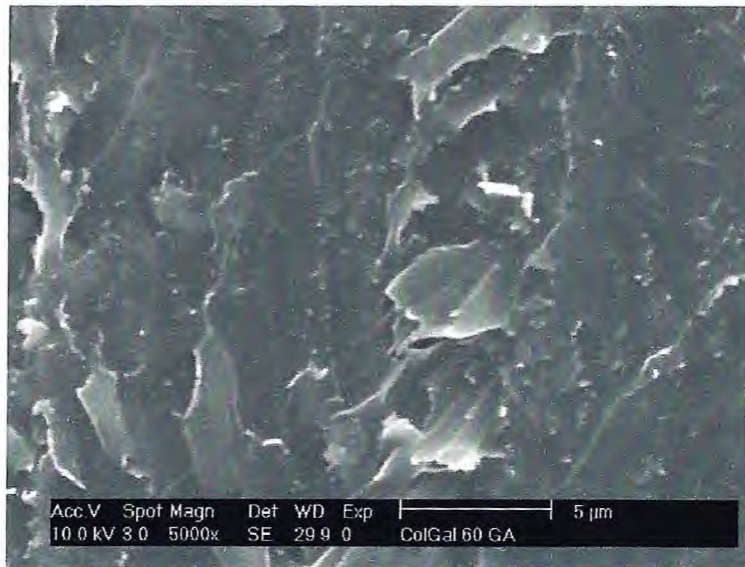


Figura 57 – Micrografias de filme de GalCol (3:2) reticulado com GA 0,1%. Ampliada 5000x.



Figura 58 – Micrografias de filme de GalCol (3:2) reticulado com GA 0,1%, e com adição de frutalina. Ampliada 5000x.

IV.5.2. Medidas Piezelétricas.

As medidas piezelétricas foram realizadas nas seguintes amostras: filmes de galactomanana:colágeno (3:2), dopado com frutalina (GalCol (3:2)d) e não dopada (GalCol (3:2)), e filmes de galactomanana:colágeno (7:3), dopado com frutalina (GalCol (7:3)d) e não dopado (GalCol (7:3)). As medidas foram feitas em amostras com geometria tipo disco como mostrado na Figura 13. Em todas as amostras o diâmetro do eletrodo L variou de 1 até 4 cm. As Figuras 61 a 66 mostram a dependência do módulo da admitância $|Y|$ com a frequência para diferentes diâmetros de eletrodo. Observa-se, em todos eletrodos, a ocorrência de ressonância eletromecânica associada à piezeletricidade da amostra. Pode-se também verificar a redução da frequência associada ao aumento do diâmetro do eletrodo (L), o que é esperado visto que a equação 19 está associada à característica principal de ressonância acústica.

As constantes de frequências, fL , associadas ao modo de piezeletricidade de cisalhamento do material, foram obtidas dos gráficos de admitância. Os valores médios obtidos para o produto fL encontram-se na Tabela 7, onde observa-se que os filmes GalCol (7:3) apresentaram valores próximos ao do colágeno (GÓES *et. al*, 2002), enquanto para os filmes GalCol (3:2) os valores são mais baixos, sendo o filme GalCol (3:2)d o que apresentou menor valor do produto.

A Tabela 7 também apresenta os valores das constantes dielétricas dos filmes, medidas em 1MHz e 1GHz, as quais foram obtidas das Figuras 59 e 60. Observa-se que, em ambos os casos, os filmes dopados com frutalina possuem constantes dielétricas menores que os não dopadas.

Das medidas experimentais de ϵ_{11}^T , ϵ_{11}^S , fL e ρ pode-se obter d_{14} utilizando-se as equações (14), (15) e (19). A Tabela 7 mostra os valores experimentais obtidos para estas constantes. Observa-se que para os filmes GalCol (3:2) e GalCol (3:2)d os valores da constante obtidos foram um pouco maiores do que os de filmes de colágeno. Estes resultados sugerem um possível aumento na orientação das macromoléculas na estrutura do filme, já que o efeito piezelétrico está relacionado com a anisotropia do material. Entretanto, nos filmes GalCol (7:3) e GalCol (7:3)d, observa-se uma redução nos valores das constantes, o que pode ser devido a maior

capacidade de embebição desses filmes, levando a possíveis perdas de massa de polissacarídeo por lixiviação.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores do fator de perda para todos os diâmetros, L , de todas as amostras. Em média os filmes GalCol (3:2) e GalCol (3:2)d apresentaram menores fatores de perda do que os filmes GalCol(7:3) e GalCol(7:3)d.

Um exame mais detalhado nas figuras de admitância, pode-se verificar que ocorre, em todos os diâmetros de eletrodo, um deslocamento da frequência de ressonância com a dopagem do filme com frutalina. A Figura 65 mostra o valor absoluto da variação da frequência de ressonância em função do diâmetro de eletrodo. O filme GalCol (3:2) apresenta Δf maior do que o filme GalCol (7:3) em quase todos os diâmetros, sendo que a maior variação de frequência (5,7MHz) foi observada no eletrodo com diâmetro igual à 1,8 cm. Esta variação de frequência pode ser melhor observada pela comparação das curvas de admitância, como apresentado na Figura 66.

Os altos valores para as constantes de frequência e piezelétricas, os baixos fatores de perda e os deslocamentos da frequência de ressonância devido a dopagem com frutalina, principalmente para o filme de GalCol (3:2), abrem a possibilidade de utilização deste filme em sistemas eletrônicos baseados em ondas acústicas, tais como sistemas de onda acústica de superfície, SAW.

Tabela 7 - Valores experimentais de densidade (ρ), espessura do filme (e), permissividade dielétrica (ϵ), constante de frequência (fL) e constante piezelétrica (d_{14})

Amostra	ρ (kg/m^3)	e (μm)	1MHz $\frac{\epsilon_{11}^T}{\epsilon_0}$	1GHz $\frac{\epsilon_{11}^S}{\epsilon_0}$	$f.L$ (kHz.m)	d_{14} (pC.N^{-1})
Colágeno*	1020,62	67,5	3,15	2,66	444,11	0,079
GalCol (3:2)	904,09	51,68	2,70	2,33	406,5	0,081
GalCol (3:2)d	916,63	43,56	2,56	2,20	324,5	0,099
GalCol (7:3)	1043,55	55,36	2,57	2,18	465,37	0,067
GalCol (7:3)d	977,73	59,20	2,11	1,85	460,29	0,057

*(GÓES *et al*, 2002)

Tabela 8 - Fator de perda (Q^{-1}) para cada amostra como função do diâmetro do disco (L)

Amostras	L (cm)											
	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,4	2,6	2,8	3,2	3,6	4,0
Galcol (3:2)	0,13	-	0,17	-	0,15	0,22	0,23	0,25	0,18	0,21	0,22	0,24
Galcol (3:2)d	0,16	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,18	0,21	0,16	0,17	0,20	0,19
Galcol (7:3)	-	0,16	0,15	0,20	0,20	0,17	0,22	0,28	0,25	0,22	0,21	0,46
Galcol (7:3)d	-	-	-	0,37	0,47	0,18	0,20	0,62	0,32	0,27	0,24	0,24

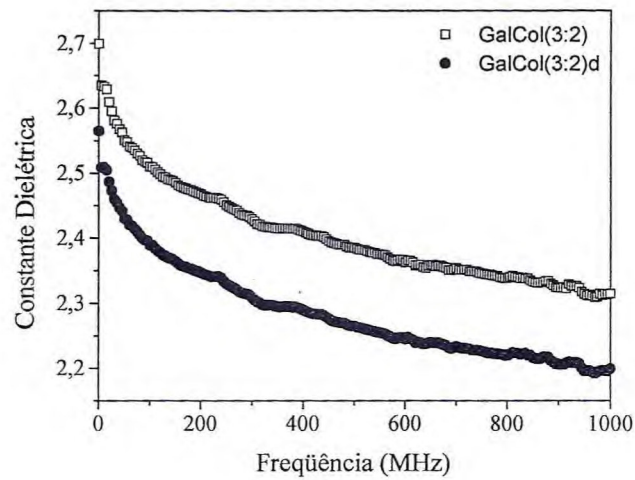


Figura 59 - Constante dielétrica de filmes de GalCol (3:2) reticulados com GA 0,1%, com e sem dopagem com frutalina.

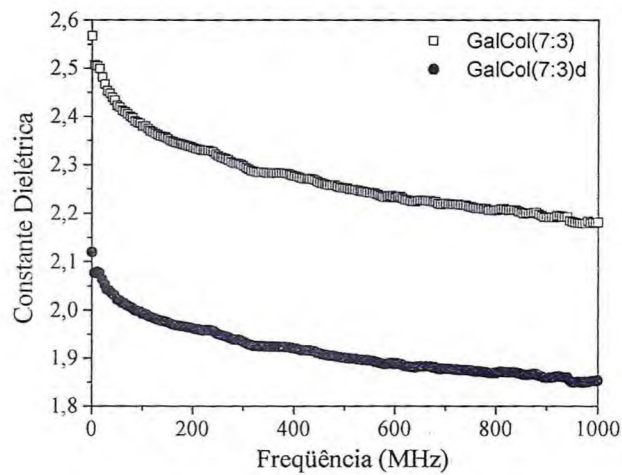


Figura 60 - Constante dielétrica de filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1%, com e sem dopagem com frutalina.

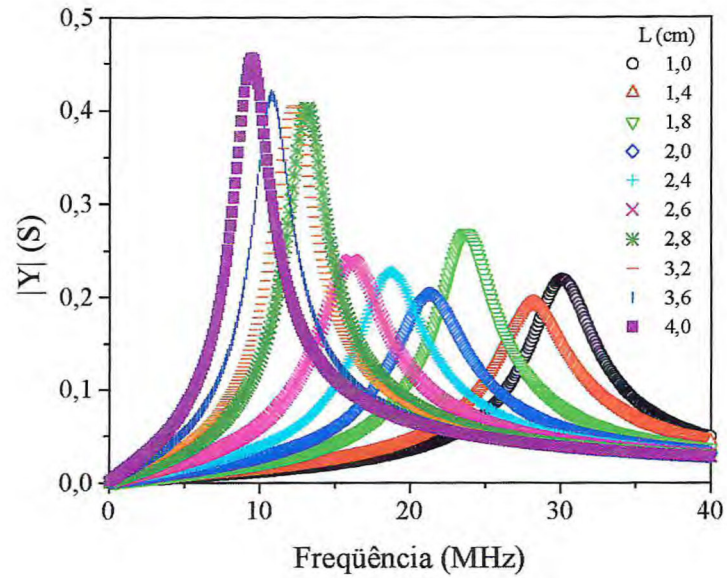


Figura 61 - Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de Galcol (3:2) reticulados com GA 0,1% embebidos em solução NaCl 0,15 mol/L.

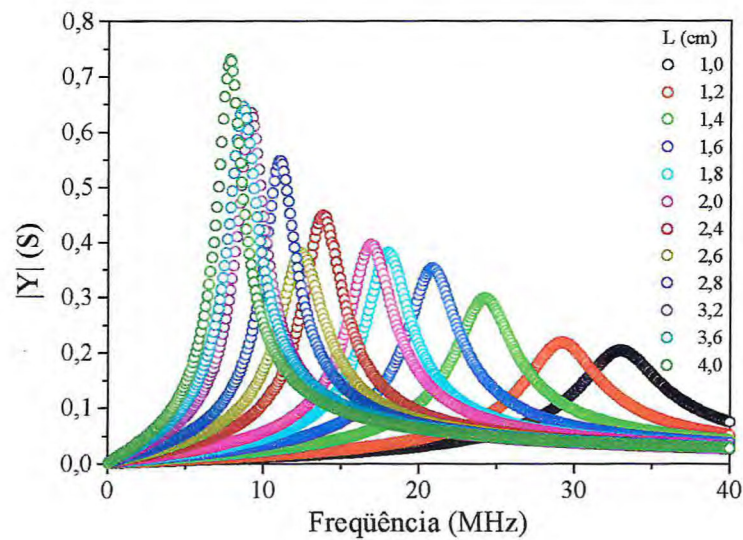


Figura 62 - Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de Galcol (3:2) reticulados com GA 0,1% dopados com frutalina.

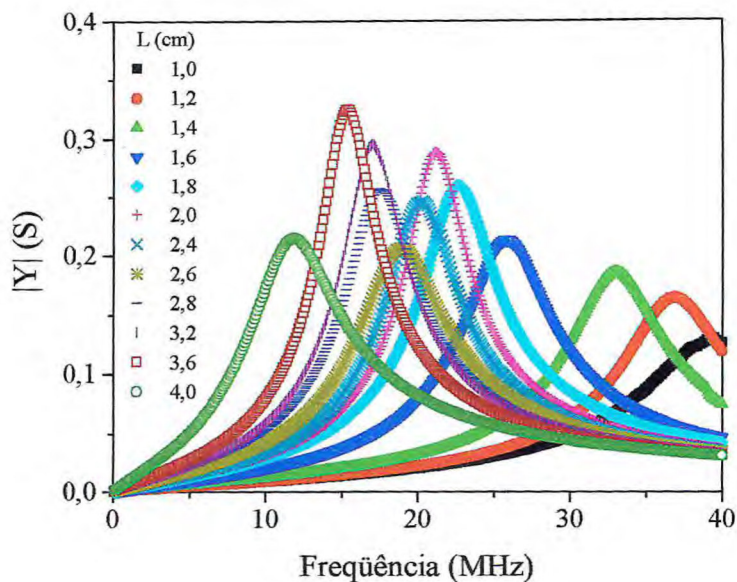


Figura 63 – Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1% embebidos em solução de NaCl 0,15 mol/L.

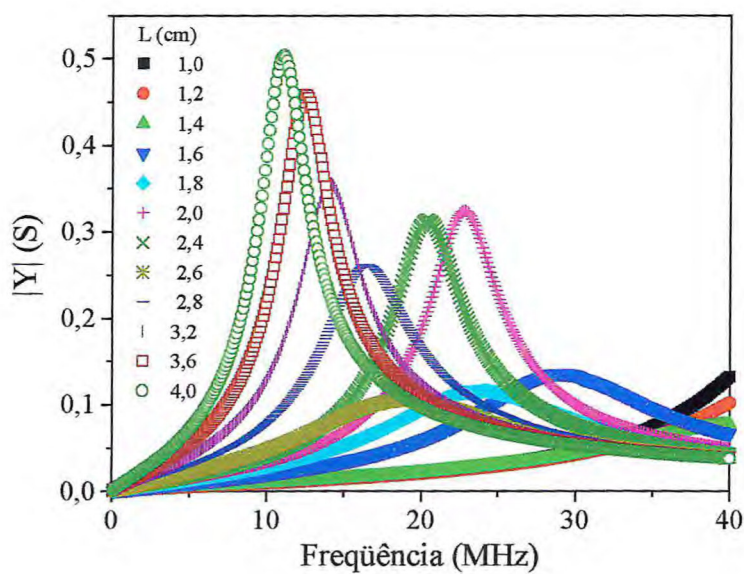


Figura 64 - Admitância elétrica $|Y|$ como função da frequência externa (F) e diâmetro do disco (L), para filmes de GalCol (7:3) reticulados com GA 0,1% dopados com frutalina.

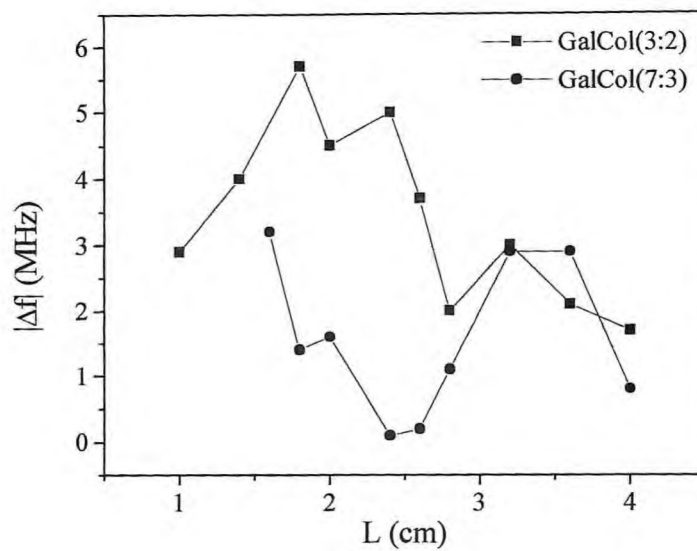


Figura 65 – Variação da frequência de ressonância em função do diâmetro do eletrodo para amostras de GalCol (3:2 e 7:3).

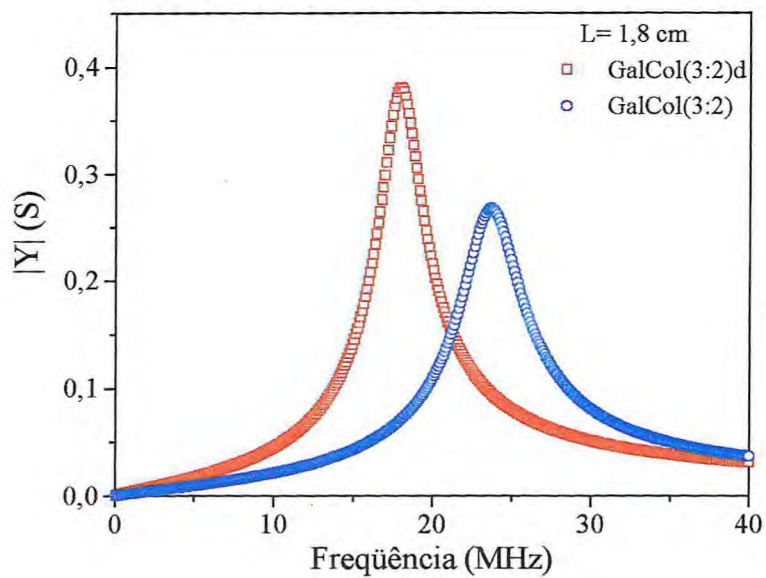


Figura 66 - Curvas de admitância das amostras GalCol (3:2) e GalCol (3:2)d, para eletrodo com diâmetro de 1,8 cm.

V. CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que:

- Filmes de galactomanana:colágeno quando reticulados com glutaraldeído, são estáveis e permitem interação com lectinas ligantes de galactose.
- Das proporções estudadas de galactomanana:colágeno, o filme de GalCol (3:2) reticulado com glutaraldeído 0,1% apresentou melhor desempenho tanto nos resultados de interação com a frutalina cujo rendimento foi de $76,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, como na capacidade de embebição da matriz.
- A constante piezelétrica, d_{14} , a complacência elástica, S_{55} , e as constantes dielétricas, foram obtidas para filmes de galactomanana:colágeno (3:2) e (7:3) dopados ou não com de lectina. A constante piezelétrica para filmes de galactomanana:colágeno (3:2) foi $0,08 \text{ pC/N}$. A adsorção da lectina no filme aumentou levemente a piezeletricidade para $0,088 \text{ pC/N}$ e diminuiu a frequência de ressonância cuja variação foi de $5,7 \text{ MHz}$. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização desses filmes em dispositivos eletrônicos para detecção de lectinas em extratos brutos de plantas.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDERRAHIM , R., FOUCAT, L., RENOUE, J.P., (2000). NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen., **Food Chemistry**, v. 69, p. 295-299.
- ANDO, Y., FUKADA, E., GLIMCHER, M.J., (1977). Piezoelectricity of chitin in lobster shell and apodeme., **Biorheology**, v. 14, p. 175.
- ANDRADE, C.T., AZERO, E.G., LUCIANO, L., GONÇALVES, M.P., (1999). Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum., **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 181-185.
- APPUKUTTAN, P.S., SUROLIA, A., BACHHAWAT, B.K., (1997). Isolation of two galactose binding protein from *Ricinus Communis* by affinity chromatography., **Indian. J. Biochem. Biophys.** v. 14, p. 382-84.
- ASGHAR, A., HENRICKSON, R.L., (1982). Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems., **Advances in Food Research**, v. 28, p. 231-271.
- ASPINALL, G. O., (1982). Isolation and fractionation of polysaccharides., **The Polysaccharides**, v. 1, Academic Press, New York, p. 19-26.
- BARNES, C.S., SILVA, D., JONES, C., LEWIS, T.J., (1992). Sensors Actuators, B, n.31, p. 159, citado por COLLINGS, A .F., CARUSO, F., (1997). Biosensors: recent advances., **Rep. Prog. Phys.**, v. 60, p. 1397-1445.
- * BAZHENOV, V.A., (1961). **Piezoelectric Properties of Wood**, Consultants Bureau, New York.
- BENEVIDES, LEITE, A .M., FREITAS, A. L. P., (1996). Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*., **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 117-122.
- * (BORNSTEIN. P., TRAUB. W., (1979). **The Proteins**., Academic Press, Inc, Neurath., v. 4, p. 411-512.) *
- BRAGA, R.C., (2001). Goma endospermica de *Caesalpinia pulcherrima* L: utilização como matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose-ligantes, **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- BRESOLIN, T.M.B., MILAS, M., RINAUDO, M., REICHER, F., GANTER, J.L.M.S., (1999). Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan., **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p.225-31.
- BURJANADZE, T. V., (1982). Stabilization of collagen structure. Dependence of collagen denaturation enthalpy on the imino acid content., **Biopolymers**, v. 21, p. 1587.
- CALLISTER, W.D., (1997). **Materials Science and Engineering an Introduction**, 4^a Ed, John Wiley & Sons, INC.
- CASAGRANDA, F., WERMEISTER, J.A .M., RAMSHAW, J.A., (1994). Evaluation of alternative glutaraldehyde stabilization strategies for collagenous biomaterials., **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 5, p. 332-337.
- CHAN, D., LAMANDÉ, S.R., McQUILLAN, D.J., BATEMAN, J.F., (1997). *In vitro* expression analysis of collagen biosynthesis and assembly., **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.36, p. 11-29.
- CHAPLIN, M.F., KENNEDY, J.F., (1986). **Carbohydrate Analysis: a practical approach**, IRL Press, England.
- CHEUNG, C.T., NATASHA, P., KO, E.C., NIMNI, M.E., (1985). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissue., **Connective Tissue Research**, v. 13, p. 109-115.
- CHEUNG, C.T., NIMNI, M.E., (1982). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen, **Connective Tissue Research**, v. 13, p. 210-216.
- CHRISPEELS, M.J., RAIKHEL, N.V., (1991). Lectins, lectins gens, and their role in plant defense., **The Plant Cell**, v. 3, p. 1-9.
- CHU, C.F.L., LU,A., LISZKOWSKI, M., SIPEHIA, R., (1999). Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers., **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p.479-485.
- CIOCA, G., (1983). Macromolecular biologically active collagen articles, U.S. **Patent** 4374121.
- COLLINGS, A .F., CARUSO, F., (1997). Biosensors: recent advances., **Rep. Prog. Phys.**, v. 60, p. 1397-1445.

- DEA I.C.M., MORRISON, A., (1975). Chemistry and interruptions of seed galactomannans., **Advance in Carbohydr. Chem. and Biochem.** v.31, p. 241-312.
- FREITAS, A .L.P., TEIXEIRA,, D.I, A., COSTA, F.F.F., FARIAS, W.R.L., LOBATO, A .S.C., SAMPAIO, A.H., BENEVIDES, N.M.B., (1997). A new survey of Brasillian marine algae for agglutinnins., **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 495-501.
- FRIESS, W., LEE, G., (1996). Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices., **Biomaterials.**, v. 17, p. 2289-2294.
- FRIESS, W.; (1998). Collagen-biomaterial for drug delivery., **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 45, p. 113–136.
- FUGIMURA, S. (1993). Primary structures os *Concanavalin A*-like lectins from seeds of two species of *Canavalia*., **Phytochemistry**, v.33, n.5, p.985-87.
- FUKADA, E., (1995). Piezoelectricity and Pyroelectricity of Biopolymers, em **Ferroelectric Polymers**, Chemical, Physics and Applications, Marcel Dekker, INC, New York, p.393-434.
- FUKADA, E., UEDA,H., RINALDI, R., (1976). Piezoelectric and related properties of hydrated collagen., **Biophys. Journal.**, v. 16, p. 911.
- FUKADA, E., YASUDA, I., (1957). On the piezoelectric effect of bone., **J. Phys. Soc. Jpn.** v. 12, p.1158.
- GANTER, J.L.M.S., REICHER, F., (1999). Water-soluble galactomannans from the seeds of *Mimosaceae spp.*, **Bioresource Technology**, v.68, p.55-62.
- GEORGE, A., VEIS, A., (1991)., FTIRS in H₂O demonstrate that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly *in vitro.*, **Biochemistry**, v. 30, p. 2372-77.
- GÓES, J.C., FIGUEIRÓ, S.D., PAIVA, J. A.C., VASCONCENLOS, I.F., SOMBRA, A .S.B., (2002). On the piezoelectricity of anionic collagen films., **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 63, p. 465-470.
- GÓES, J.C., FIGUEIRÓ, S.D., PAIVA, J.A .C., SOMBRA, A .S.B., (1999), Piezoelectric and dielectric properties of collagen films., **Physica. Stati. Solid**, v. 176, p.1077.

- GOISSIS, G., FIGUEIRÓ, S.D., (1998). Reticulação progressiva de pericárdio bovino com glutaraldeído para confecção de válvulas cardíacas biológicas., **Polímeros**, n.2, p. 46-54.
- GOISSIS, G., GÓES, J.C., (1997). Géis injetáveis de colágeno aniônico: ransana como biomateriais: Preparação e caracterização fisico-química., **Polímeros**, v.3, p. 32-39.
- GOISSIS, G., MORIAK, C. M., (1990). Extracting collagen from animal tissue. **BR Patente 9.000.972.**
- GORDON, P.L., YANNAS, I.V., BURUKE, J.F., LORD, R.C., (1974)., The far infrared spectrum of collagen., **Macromolecules**, v. 7, p. 954-956.
- GURHA, S.G., SINGH, L., (1998). Structural studies of D-galacto-D-mannan from the seeds of *Parkinsonia aculeata* Linn., **Carbohydrate Research**, v. 182, p. 144-149.
- HAGE, D.S., (1999). Affinity chromatography: a Review of Clinical Applications, **Clinical Chemistry**, v.45, n..5, p.593-615.
- HARDMAN. K.D., AINSWORTH, C.F., (1972). Structure of *Concanavalin A* at 2.4-Å resolution., **Biochemistry**, v. 11, p. 4910-4919.
- HASTINGS, G. W., MAHMUD, F. A., J. (1988). Electrical effects in bone., **Journal of Biomedical Engineering**, v.10, n. 6, p.515-521.
- HUC, A., (1985). Collagen biomaterials characteristics and applications., **Journal Am. Leather. Chem. Assoc**, v.80, p. 195.
- HUSSEIN, M.M.D., HELMY, W.A., SALEM, H.M., (1998). Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives., **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 479-84.
- IKEDA, T., (1958). **Journal Phy. Soc. Japan**, v. 13, p. 809., em **Ferroelectric Polymers**, Chemical, Physics and Applications, Marcel Dekker, INC, New York.
- IKEDA, T., (1996). **Fundamentals of Piezoelectricity**, Oxford Science Publishers.
- ILLES, T., FISCHER, J., (1990). Characterization of bone cells and bone tumors by lectins., **Lectin, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v.7, p.399.
- JAYAKRISHNAN, A., JAMEELA, S.R., (1996). Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices., **Biomaterials**, v. 17, p. 471-484.

- JOSIC, D., REUSCH, J., (1992). High performance membrane chromatography of serum and plasma membrane protein., **Journal of Chromatography**, v. 590, p. 59-76.
- KABIR I.G.A., YAGEN, B., PENHASI, A., RUBINSTEIN, A., (1998). Low swelling crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier., **Pharmaceutical Research**, v. 15 n.7, p.1019-1025.
- KABIR, I.G.A., PENHASI, A. B., RUBINSTEIN, A. A., (1999). Characterization of crosslinked guar by thermal analysis., **Carbohydrate Research**, v. 316, p. 6-13.
- KABIR, I.G.A., YAGEN, B., PENHASI, A. B., RUBINSTEIN, A. A., (2000). Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery I. Preparation and physicochemical characterization., **Journal of Controlled Release**, v. 63, n. 1, p. 121-127.
- KAPOR, V.P, (1972). A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*., **Phytochemistry**, v. 11, p. 1129-32.
- KARAMANOS Y., MOURICOUT, M., (1996). Bacterial lectins:from pathogenesis to detection reagents., **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 11, p.201-206.
- KENNEDY, J.F., PALVA, P.M.G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B., (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review., **Carbohydrate Polymer**, v.26, p.219-230.
- KIM, M., SAITO, K., FURUSAKI, T., SUGO, T., ISHIGAKI, I., (1991). Adsorption and elution of bovine γ -globulin using an affinity membrane containing hydrophobic amino acids as ligands, **Journal of Chromatography**, v. 586, p. 27-33.
- KOBAYASHI, Y., ANZAI, J. I., (2001). Preparation and optimization of bioenzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications., **Journal of Eletroanalytical Chemistry**, n. 507, p. 250-255.
- KONG, H.L., MAEDA, S., INAGAKI, H., SAITO, T., (1997). Long term culture of primary rat hepatocytes on heparin or lambda carrageenan containing collagen gels., **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 61, n. 6, p. 971-974.
- KUBOTA, N., TATSUMOTO, N., SANO, T., (1999). Recovery of serum proteins using cellulosic affinity membranes modified with tannic acid., **Carbohydrate Polymers**, v. 40, p.107-113.

- KUCHARZ, E.J (1988). **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**, Springer, Verlag, Berlim.
- LANGLOTZ, P., KRONER, K.H., (1992). Surface-modified membranes as a matrix for protein purification., **Journal of Chromatography**, v.591, p.107-113.
- LEE, H.C., SINGLA, A., LEE, Y., (2001). Biomedical applications of collagen., **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p.1-22.
- LERNER, D.R., RAIKHEL, N.V., (1992). The gene for stinging nettle lectin encodes both a lectin and a chitinase., **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 11085-091.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L., (1998). Legume lectin structure., **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p. 9-36.
- LUPPA, P.B., SOKOLL, L.J., CHAN, D. W., (2001). Immunosensors- principles and applications to clinical chemistry., **Clinica Chimica Acta**, v. 314, p. 1-26.
- MAKELA, D., (1957). Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds., **Annals of Medical and Experimental Biology**, v. 36, n. 11, p.1-156.
- MANZI, A . E., MAZZINI, M.N., CERESO, A .S., (1984). The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*, **Carbohydrate Research**, v.125, p.127-143.
- MARINO, A.A., SPADARO, J. A., FUKADA, E., KHAN, L.D., BECKER, R.O., (1980), Piezoelectricity in collagen films., **Calcif. Tissue Int.**, v. 31, p.257-259.
- MARTIN, A .J.P., (1941). Tribo-electricity in wool and hair., **Proc. Phys. Soc.**, v. 53, p.186.
- MASCARENHAS, S., (1987). Electrets in biomaterials and biopolymer, em **Topics in Applied Physics, Electrets**, v. 23. Springer, Berlim.
- MATOS, V.C., (2000).Goma endospérmica de *Delonix regia* e *Shizolobium paraybae*: uso em lectinas vegetais, **Tese de Doutorado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MILLER, E.M., RHODES, R.K., (1982). **Methods in Enzimology**, v. 82, p. 33-64.
- MIRELMAN, D., GALUN, E., SHARON, N., LOTAN, R., (1975). Inhibithion of fungal growth by wheat germ agglutinin., **Plant Physiology**, v. 66, p. 950-55.

- MOOTHOO, D.N., NAISMITH, J.H., (1998) *Concanavalin A* distorts the β -GlcNac-(1-2)-Man linkage of β -GlcNac-(1-2)- α -Man-(1-3)-[β -GlcNac-(1-2)- α -Man-(1-6)] upon binding., **Glycobiology**, v. 8, n.2, p.173-181.
- MOREIRA, R.A, BARROS, AC.H., STEWART, J.C., (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*(Mart), **Planta**, v. 58, p.63-69.
- MOREIRA, R.A., AINOZ, I.L., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S., (1991). Plant lectins, chemical and biology aspects., **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, supp. 2 p. 211-218.
- MOREIRA, R.A., PERRONE, J.C., (1977). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*., **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787.
- MOREIRA, R.A., BRANCO, C.C., MONTEIRO, A.C.O., TAVARES, R.O., BELTRAMINI, L.M., (1998). Isolation and partial characterizations of a lectin from *Artocarpus incisa* L seeds., **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-88.
- NETTO, T.G., ZIMMERMAN, R.L., (1975). Effect of water on piezoelectricity in bone and collagen., **Biophysical Journal**, v. 15, p. 573-576.
- NIMNI, M. E., (1988). Molecular Structure and functions of collagen., **Collagen: Biochemistry**, CRC Press, v. 1, p.1-77.
- NISHINARI, K., FUKADA, E., (1980). Viscoelastic, dielectric, and piezoelectric behaviour of solid amylose., **J. Polymer Sci. Polymer Phys.**, v. 18, p. 1609.
- NOWELL, P., (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of normal human leucocytes., **Cancer Research**., v. 20, p. 462-4.
- NYE, J.F., (1960). **Physical Properties of Crystals**, Oxford, University Press, London.
- PARK, J.B., LAKES, R.S., (1992). **Biomaterials an Introduction**, 2^a ed. Plenum Press, N. York.
- PENKOVA, R., GOSHEV, I., GORINSTEIN, S., NEDKOV, P., (1996). Stabilization of glycerol on collagen type I isolated from different species., **Food Chemistry**, v. 66, p. 483-87.
- PETKOWICZ, C.L.O, REICHER, F., MAZEAU, K., (1998). Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains., **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.25-39.

- PEUMANS W.J., VAN DAMME, E.J.M.M., (1994). The role of lectins in the plant defense against insects., **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, E. Van Driessche Eds. vol. 10.
- PEUMANS W.J., VAN DAMME, E.J.M.M.,(1993). .Plant lectins: storage proteins with a defensive role., **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 9, p.27-34.
- PEUMANS W.J., VAN DAMME, E.J.M.M.,(1995). Lectins as plant defense proteins., **Plant Physiology**. v. 109, p. 347-352.
- PHILLIPS, T.M., DICKEENS, B.F., (2000). **Affinity and Immunoaffinity Purification Techniques**, Eaton Publishing.
- PIEZ, K. A., (1989). **Collagen, Polymers: Biomaterials and Medical Applications**, WILLE, Inc., p.71-99.
- PIEZ, K.A., (1982). Structure and assembly of the native collagen fibril., **Connective Tissue Research**, v.10, p.25.
- PUSZTAI, A., BARDOCZ, S., (1995). **Lectins: Biomedical Perspective**, Taylor & Francis, Aberdeen, Scotland, p. 331.
- PUSZTAI, A., (1991). **Plants Lectins.**, Cambridge, Univ. Press., N.York.
- RAMACHANDRAN, G. N., (1967). **Treatise of Collagen**, London, Academic Press, v. 1.
- RAMSHAW, J.A .M., WERKMEITER, J.A., GLATTAUER, V., (1995). Collagen-based biomaterials., **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 335-382.
- ROBERT, L., LEGEAIS, A .M., ROBERT, A .M., RENARD, G., (2001). Corneal collagens., **Pathol. Biol.**, v. 49, p. 353-63.
- ROBINS, S. P., DUNCAN, A., (1983). Cross-linking of collagen., **Biochemical Journal**, v. 215, p. 175.
- ROPER, D.K., LIGHTFOOT, E.N., (1995). Separation of biomolecules using adsorptive membranes., **Journal of Chromatography A**, v.702, p.3-26.
- ROSA, I.G, (2000). Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L. Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose., **Tese de Doutorado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- RUBINSTEIN, A., KABIR, G.I., (1995). Synthesis and swelling-dependent enzymatic degradation of borax-modified guar gum for colon delivery purposes, *S.T.P. Pharma Science*, v. 5, n.1, p. 41-46.
- RUIDGROK, J.M., WIJN, J.R., BOON, M.E., (1994). Optimization glutaraldehyde crosslinking of collagen:effects of time, temperature and concentration as measured by shirinkage temperature., **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, p. 80-87.
- RUSSELL, J., G., VEITCH, H., ARTHUR, L., (1999). Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells., **International Journal of Pharmaceutics**, v. 190, p. 165-174.
- SAUERBREY, G.Z., (1959), Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung. **Zeitschrift Fur Physik**. v. 155, p.206-222.
- SAZAKI, E., FUKADA, E., (1976). Deformation of the crystal lattice by water adsorption and piezoelectricity of cellulose triacetate., **J. Polymer Sci. Polymer Phys.**, v. 14, p. 565.
- SCHELLER, F.W., WOLLENBERGER, U., WARSINKE, A., LISDAT, F., (2001). Research and development in biosensors., **Analytical Biotechnology**, v. 12, p. 35-40.
- SCHERBUKHIN, V.D., ANULOV, O.V., (1999). Legume seed galactomannans., **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 35, n. 3, p.229-244.
- SCHOTTELIUS, J., (1990). **Lectins. Biology Biochemistry, Clinical Biochemistry**, Sigma Chemical Company, St. Louis.
- SEQUEIRA, L., (1978). Lectins and their role in host-pathogen specificity., **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 453-81.
- SHARON, N., LIS, H., (1989). Lectins as cell recognition molecules., **Science**, v. 246, p. 227-234.
- SHARON, N., LIS, H., (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins., **The Faseb. J.**, v.4, p. 3198-3208.
- SIERAKOWSKI, M.R., MILAS, M., DESBRIERES, J., RINAUDO, M., (2000). Specific modifications of galactomannans., **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p.51-57.
- SINGH R.S., TIWARY, A.K., KENNEDY, J.F., (1999). Lectins: sources, activities and applications., **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 145-178.

- SLIFKIN, M., (1983). Rapid biochemical tests for the identification of groups A,B,C,F and G *streptococci* from throat cultures., **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 29-32.
- SLIFKIN, M., DOYLE, R. J., (1990). Lectins and their application to clinical microbiology., **Clinical Microbiology Review**, p. 197-218.
- SMITH, J. W., (1968). Molecular pattern in native collagen., **Nature**, v. 219, p. 157.
- SOSNITZA, P., FAROOQUI, M., SALEEMUDDIN, M., ULBER, R., SCHEPER, T., (1998). Application of reversible immobilization techniques for biosensors., **Analytica Chimica Acta**, v. 368, p. 197-203.
- SOUZA, S.R., CORREIA, M.T.S., PESSOA, M.M.A., KENNEDY, J.F., LIMA, J.L., COELHO, L.C.B.B., (2001). A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (*Camaratu bean*) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface., **Carbohydrate Polymer**, v. 46, p. 191-193.
- SPADARO, A.C.C., FONSECA, M.J.V., (1993). Cromatografia por afinidade, in: COLLINS, C.N., BRAGA, G.L., BONATO, P.S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, Editora UNICAMP.
- STAGEMANN, H., STALDER, K., ROMERO, J.S., PONS, M., COQUE, M.C., RAMOS, G.R., (1994). Determination of pyrrole derivatives with 4-dimethylaminobenzaldehyde in a micellar medium., **Analytical Letters**, v. 27, n. 8, p. 1557-1567.
- STILLMARK, (1988). Uber Rizin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und Einizen Anderen Euphorbiaceen., **Tese de Doutorado**, Universidade de Dopard, Dopard (Tartu), citado por Liener.
- TARAVEL, M.N., DOMARD, A., (1996). Collagen and its interactions with chitosan III. Some biological and mechanical properties., **Biomaterials**, v.17, p. 451-455.
- TAVARES, R.O, (1998) Galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- TAYOT, J.L., TARDY, M., (1982). Nouvelles preparations of collagene placentaire, leur procede extraction et leurs applications., **Eur. Patent**. 02114035.
- UDEDIBIE, A .B.I., CARLINI, C.R., (1998). Questions and answers to edility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds – a review., **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, p. 95-106.

- URAU, A .M., CHOY, Y.M., (1970). Identification of linkages of a galactomannan isolated from seeds of *Caesalpinia pulcherrima.*, **Carbohydrate Research**, v. 14, p. 151-158.
- VASCONCELOS, I.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., Oliveira, J.T.A., (1991). Purification and partial characterizations of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis.*, **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 137-154.
- VEIS, A., (1982). Collagen fibrillogenesis., **Connective Tissue Research**, v. 10, p. 11-24.
- VOET, D., VOET, J.G., (1990). **Biochemistry**, John Willey & Sons Inc, New York.
- WALT, D.R., AGAYN, V. I., (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde., **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 425-430.
- WANG, Q., ELLIS, P.R., MURPHY, R.S.B., (2000). The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions., **Food Hydrocolloids**, v.14, p.129-134.
- WILCHEK, M., MIRON, T., (1999).Thirty years of affinity chromatography, **Reactive & Functional Polymers**, v.41, p.263-268.
- WOHLTJEN, H., (1984). Sens. Actuators, n. 5, p.307, citado por COLLINGS, A.F., CARUSO, F., (1997). Biosensors: recent advances., **Rep. Prog. Phys.**, v. 60, p. 1397-1445.
- WOODROFF, A., (1978). Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves., **J. Bioeng.**, v. 2, p. 10-19.
- XIONG, Y., KIRAN, E., (1995). Miscibility, density, and viscosity of poly(dimethylsiloxane) in supercritical CO₂., **Polymer**, v. 36, n. 25, p. 4735-4740.
- YUAN, M., ITZKOWITZ, S.M, BOLAND, C. T., (1986). Comparison of T. antigen expression in normal premalignant and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry., **Cancer Res.**, v.46, p.4841-47.

ANEXOS



ELSEVIER

Journal of Physics and Chemistry of Solids 63 (2002) 465–470

JOURNAL OF
PHYSICS AND CHEMISTRY
OF SOLIDS

www.elsevier.com/locate/jpcs

On the piezoelectricity of anionic collagen films

J.C. Góes^{a,b}, S.D. Figueiró^c, J.A.C. de Paiva^a, I.F. de Vasconcelos^a, A.S.B. Sombra^{a,*}^a*Laboratório de Óptica não Linear e Ciência dos Materiais (LONLCM), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil*^b*Departamento de Engenharia Mecânica—Centro de Tecnologia, UFC-Fortaleza, Ceará, Brazil*^c*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências-UFC-Fortaleza, Ceará, Brazil*

Received 30 April 2001; accepted 30 May 2001

Abstract

In this paper, we report results of a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for the anionic and native collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to the alkaline treatment present lower thermal stability than those made from native collagen. However, the treated samples present a higher piezoelectricity compared with the native collagen. The frequency constant fL and the piezoelectric strain element d_{14} , obtained for the alkaline-treated sample (72 h), present the highest values for the samples under study (444.1 kHz m and 0.079 pC/N, respectively). We believe that the alkaline treatment led to an increase of the organization of the microscopic fiber structure of the sample, which could result in an increase of the piezoelectricity. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Some biological materials and biopolymers are found to exhibit the polar uniaxial orientation of molecular dipoles in their structure and can be considered as bioelectret. Such materials show pyroelectricity and piezoelectricity. Biocompatible polymeric materials are now used extensively after proper polarization treatment for biomedical applications such as antithrombogenic surfaces and artificial membranes [1]. Pyro- and piezoelectric studies in various types of biological systems show the presence of natural polarity in the structure of various parts of animals and plants. In many natural structures, polar molecules such as proteins are aligned in parallel with a preferred direction of the polar axis to form crystalline structures. Therefore, such structures can be regarded as natural electrets. Because of this intrinsic polarization, pyroelectricity and piezoelectricity in the axial direction can be observed [2,3].

Collagen, the most abundant protein of the animal kingdom, has a long history as a biomaterial. We can find it in prostheses

of heart valves, in artificial skins, in contact lenses and in injectable gels for soft tissue augmentation [4–6]. Collagen molecules (molecular weight 300,000) are rod-like triple helices, which are 300 nm in length and 1.5 nm in diameter. Collagen fibers possess a high degree of axial alignment of collagen molecules and are characterized by a regular stagger of approximately 1/4 of a rod length between each molecule and its axially aligned neighbor [7,8].

The piezoelectric properties of collagen have been investigated in complex biological systems such as bone and tendon. The major difference between them is the structural organization level over the tissue. For different tissues, one has different organization of the protein. However, the chemical composition is similar. The piezoelectric properties of bone are of interest in view of their role in bone remodeling [9]. The magnitude of the piezoelectric sensitivity coefficients of bone depends on frequency, on direction of load, and on relative humidity. Values up to 0.7 pC/N have been observed in bone [10]. Marino et al. [11] examined the relation between collagen's film piezoelectricity and its electron microscopic appearance, in films with different degree of organization, and suggested that the piezoelectric effect originates at the level of tropocollagen.

* Corresponding author. Fax: +55-8-5287-4138.

E-mail address: sombra@ufc.br (A.S.B. Sombra).

In this work, we studied the thermal, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery.

2. Experimental methods

The anionic collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine sera after different periods (24, 72 and 168 h) of treatment under alkaline conditions in the presence of salts, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5 [12]. The native collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine sera after treatment with acetic acid under low pH, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5. All samples were dialyzed against acetic acid solution, at pH 3.5, and brought to a final concentration of 1%, determined by hydroxyproline [13].

The membranes, cast in acrylic molds from a collagen solution, were equilibrated in phosphate buffer, 0.13 mol/l, pH 7.4 for 24 h, followed by extensive water washes and dried in laminar flow of air. The membranes were prepared from collagen with 0, 24, 72 and 168 h under alkaline treatment (samples S0, S1, S2 and S3, respectively).

The thermal stability of the collagen was determined by measures of its denaturation temperature, using a Shimadzu DSC-50 equipment, membrane samples were sealed in aluminum cells and heated at a rate of 5°C/min with N₂ atmosphere.

The complex dielectric function measurements were obtained from a HP 4291A material impedance analyzer in conjunction with a HP 4194 impedance analyzer, which jointly covered the region of 100 Hz–1.8 GHz. In Fig. 2 one has the sample geometry we used for the dielectric and piezoelectric measurements. Rectangular coordinates are assigned to the samples as shown in Fig. 2. The 2–3 plane is the sample plane, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample. The flat faces of the samples are painted with a silver electrode. The thickness and the diameter of each sample are found in Table 1. For each the sample, we took around 100 measurements of the thickness, using a digital paquimeter, and calculated the average value (see Table 1). For all the studied samples, the diameter 'L' varied between 1.5 and 3.2 cm, and

the average thickness 'e' was 85, 51, 67 and 54 μm for samples S0, S1, S2 and S3, respectively.

3. Piezoelectric measurements

The coupled electromechanical equations for our system are:

$$S_j = s_{ij}^E T_j + d_{ij} E_j \quad (1)$$

$$D_i = \epsilon_{ij}^T + d_{ij} T_j \quad (2)$$

S_j (S_1, \dots, S_6) is the strain and T_j (T_1, \dots, T_6) is the stress, E_j is the electric field and D_i is the displacement vector. With constants s_{ij}^E (compliance for constant electric field), ϵ_{ij}^T (dielectric permittivity for constant stress) and the piezoelectric strain element d_{ij} . Similarly, the coefficients relating the displacement vector (D_i) to the strain vector (S_j) are called the piezoelectric stress elements e_{ij} . Piezoelectricity may exist for certain symmetries of crystalline structures. In general anisotropic crystals have the piezoelectric effect and their piezoelectric constants can be represented by the matrix: d_{ij} [14,15]:

$$\begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix}$$

d_{ij} are called the piezoelectric strain constants. Some of them are null, according to the symmetry of the material [14,15]. In the case of natural biopolymers, which show only shear piezoelectricity, the symmetry observed is D_∞ ($\infty 2$). In this case, $d_{25} = -d_{14}$. In the case of bone, the piezoelectricity appears only when the shearing force acts on the oriented collagen fibers so that they slip past one another [2,3]. Shear piezoelectricity is observed almost universally for the oriented textures of biopolymers [2]. For this symmetry, the tensor d_{ij} is given by [2,3,14,15]:

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

In this notation, i, j take values 1, 2, and 3. When indices i

Table 1

Alkaline treatment time (AT), denaturation endotherm (DE), density (ρ), thickness (e), dielectric permittivity (ϵ), frequency constant (fL) and piezoelectricity (d_{14}) of samples S0, S1, S2 and S3

Sample	Alkaline treatment AT (h)	Denaturation endotherm DE (°C)	ρ (kg/m ³)	e (μm)	1 MHz $\epsilon_{11}^T/\epsilon_0$	1GHz $\epsilon_{11}^S/\epsilon_0$	fL (kHz m)	d_{14} (10 ⁻¹² C)
S0	0	78.33	998.47	85.45	2.56	2.23	437.69	0.066
S1	24	71.05	936.10	51.66	2.49	2.18	386.12	0.074
S2	72	57.38	1020.62	67.5	3.15	2.66	444.11	0.079
S3	168	58.35	986.2	54.1	2.21	1.88	404.85	0.072

and j are interchangeable, (ij) is abbreviated to I or J , so that: $11 \rightarrow 1, 22 \rightarrow 2, 33 \rightarrow 3, 23 \rightarrow 4, 31 \rightarrow 5, 12 \rightarrow 6$.

Shear piezoelectricity is also observed for the oriented films of a variety of synthetic polymers with optical activity. For the same symmetry group, the dielectric tensor ϵ_{ij} is given by:

$$\begin{pmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{11} \end{pmatrix}$$

For this symmetry, the elastic compliance tensor s_{IJ} is given by [14,15]:

$$\begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{12} & s_{11} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{13} & s_{13} & s_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & s_{55} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & s_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & s_{66} \end{pmatrix}$$

Rectangular coordinates are assigned to the film sample. The 1 axis is perpendicular to the plane of the sample, plane 2–3 (Fig. 2).

Using the tensors defined in Eqs. (1) and (2), and taking into account that the electric field is applied in direction 1 ($E_2 = E_3 = 0$), one has:

$$D_1 = \epsilon_{11}^T E_1 + d_{14} T_4 \tag{3}$$

$$S_4 = s_{55}^E T_4 + d_{14} E_1 \tag{4}$$

From Eqs. (3) and (4) one can see the electro-mechanical coupling through the d_{14} piezoelectric tensor element. In this geometry, one has a mechanical wave propagating in the plane of the sample ($S_4 \leftrightarrow S_{23}$) coupled with the electric field in the '1' axis.

After an easy manipulation one has for the D_1 vector:

$$D_1 = \epsilon_{11}^T \left(1 - \frac{d_{14}^2}{s_{55}^E \epsilon_{11}^T} \right) E_1 + \frac{d_{14}}{s_{55}^E} S_4 \tag{5}$$

One can now define k_{14} , which is the piezoelectric coupling factor:

$$k_{14}^2 = \frac{d_{14}^2}{s_{55}^E \epsilon_{11}^T} \tag{6}$$

From the definition of k_{14} , one can define the relations of elastic compliance and electric permittivity measured under different conditions:

$$\frac{s_{55}^D}{s_{55}^E} = \frac{\epsilon_{11}^S}{\epsilon_{11}^T} = 1 - k_{14}^2 \tag{7}$$

The piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectric

is given by Eq. (6) [14,15]:

$$d_{14} = k_{14} \sqrt{\epsilon_{11}^T s_{55}^E} \tag{8}$$

with Eq. (7):

$$k_{14} = \sqrt{1 - \frac{\epsilon_{11}^S}{\epsilon_{11}^T}} \tag{9}$$

where k_{14} is the piezoelectric coupling factor, ϵ_{11}^T is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance, ϵ_{11}^S is obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode. The measurement of the dielectric permittivity was done in the range of 1 MHz–1 GHz in the geometry of Fig. 2. The obtained values for 1 MHz, and 1 GHz can be found in Table 1. In our calculations, we assume ϵ_{11}^T at 1 MHz (below the piezoelectric resonance frequency) and ϵ_{11}^S at 1 GHz (above resonance).

From Eqs. (3) and (4), one has for T_4 :

$$T_4 = \frac{1}{s_{55}^D} S_4 - \frac{d_{14}}{s_{55}^E \epsilon_{11}^S} D_1 \tag{10}$$

Assuming that $\partial D_1 / \partial x_4 = 0$ we can obtain the equation of motion:

$$\frac{\partial^2 u_4}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho s_{55}^D} \frac{\partial^2 u_4}{\partial x_4^2} \tag{11}$$

where u_4 is the displacement on the plane of the sample (plane perpendicular to electric field, see Fig. 2), and ρ is the density.

The obtained velocity is:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\rho s_{55}^D}} = \frac{\omega}{k} \tag{12}$$

where ω is the frequency and k is the wavenumber ($k = 2\pi/\lambda$).

The elastic compliance s_{55}^D , which is determined from the successive resonance frequencies of the shear mode can be calculated from Eq. (12), assuming that the most pronounced resonances are those where the body can accommodate one half wavelength of the standing elastic wave ($L = \lambda/2$). In this case, one can obtain s_{55}^D from Eq. (12):

$$s_{55}^D = \frac{1}{4\rho(fL)^2} \tag{13}$$

where fL is the frequency constant which is the product of the resonance frequency and the diameter of the sample (controlling dimension of the sample, $L \gg e$, see Fig. 2) and ρ is the sample density. From the experimental measurement of ϵ_{11}^T , ϵ_{11}^S , fL and ρ one can obtain s_{55}^D (Eq. (13)), k_{14} (Eq. (9)) and d_{14} (Eq. (8)). Table 1 shows the experimental values of these constants under study.

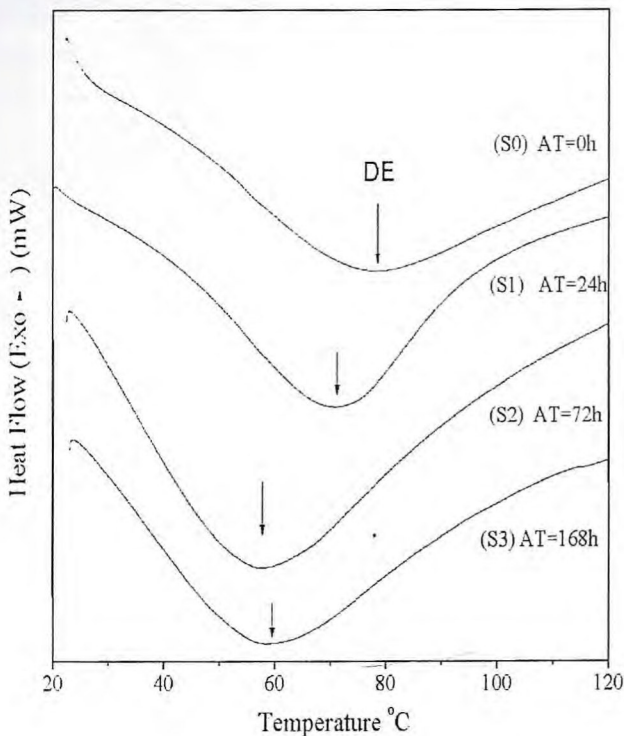


Fig. 1. DSC curves of the samples S0, S1, S2 and S3.

4. Results and discussion

Fig. 1 shows the DSC curves of collagen films. The main feature in the DSC curves of collagen are the denaturation endotherm, at 78.33, 71.05, 57.38 and 58.35°C for samples S0, S1, S2 and S3, respectively (see Table 1). These results show that films made from anionic collagen have lower thermal stability than those made from native collagen. We can explain these results by the fact that alkaline treatment of the protein may cleave the esterlike bonds present in tropocollagen [16,17]. Otherwise, it is known that the alkaline treatment hydrolyzes the carboxamide residues of asparagine and glutamine [18]. This hydrolysis results in a net negative charge of collagen molecules at neutral pH. The thermodynamics and kinetics of the collagen precipitation have been extensively studied [19,20]. Temperature, pH and ionic strength all exert profound effects on fibril precipitation. Primarily electrostatic and hydrophobic interactions between amino acid side chains of neighboring collagen triple helices stabilize the fibers. Attractive interactions result from pairing of oppositely charged amino acids and repulsive interactions result from pairing of like charged amino acids. The changes in net charge and number of ionized groups as pH varies would be expected to exert a significant effect on forces between molecules in fibers and, hence, on fiber physical properties.

Fig. 3 shows the frequency dependence of the absolute value $|Y|$ of the admittance of sample S0. The measurement was done with the sample in disk type geometry as shown in

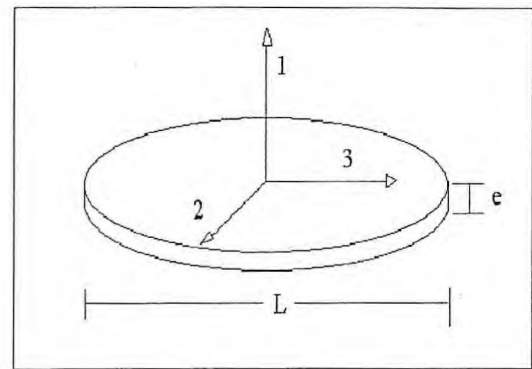


Fig. 2. A rectangular coordinate assigned to the sample for the measurement of piezoelectric and dielectric constants.

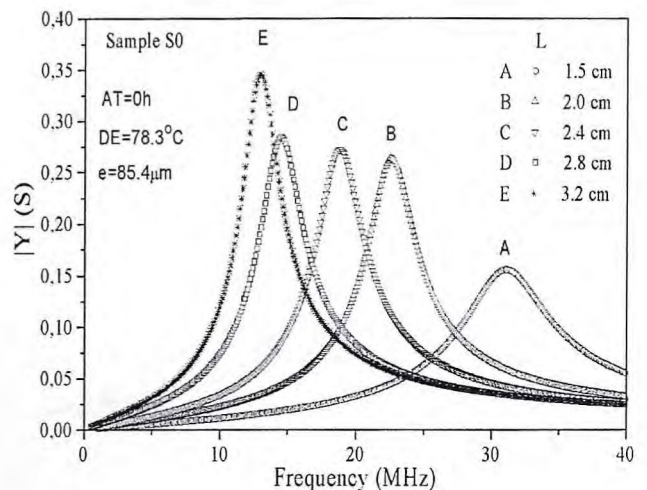


Fig. 3. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S0.

Fig. 2. It is quite clear that the electro-mechanical resonance is associated to the piezoelectricity of the sample. From Fig. 3 one can confirm the reduction of the resonance frequency associated to the increase of the electrode diameter (L). This is an expected result in view of Eq. (13) associated to the main characteristic of the acoustic resonator. We also did measurements in piezoelectric ceramic PZT to obtain the resonances for this material, to use as a calibration of our measurements.

Fig. 3 shows five measurements for five different diameters of the disk, which is indicated in the figure. From Fig. 3, the frequency constant, fL associated to the shear piezoelectric mode of this sample was obtained. The average value obtained for the shear mode was $fL \sim (437.69 \text{ kHz m})$, which is a value about two orders of magnitude higher compared with PZT [14,15]. Figs. 4–6 show the admittance of samples S1, S2 and S3. We also did the measurement of the dielectric permittivity ϵ_{11}^T at 1 MHz (which is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the

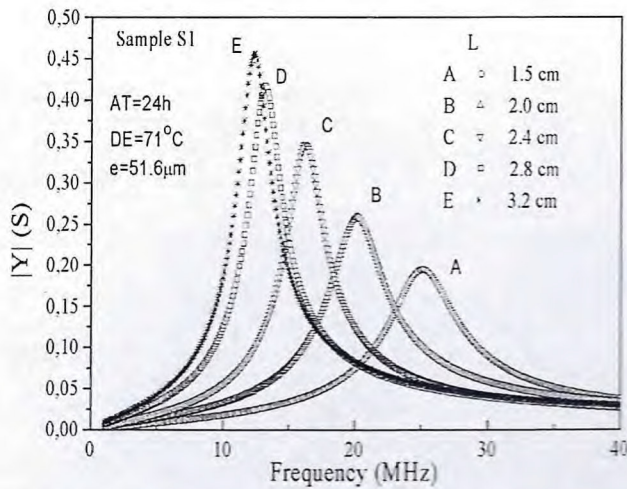


Fig. 4. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S1.

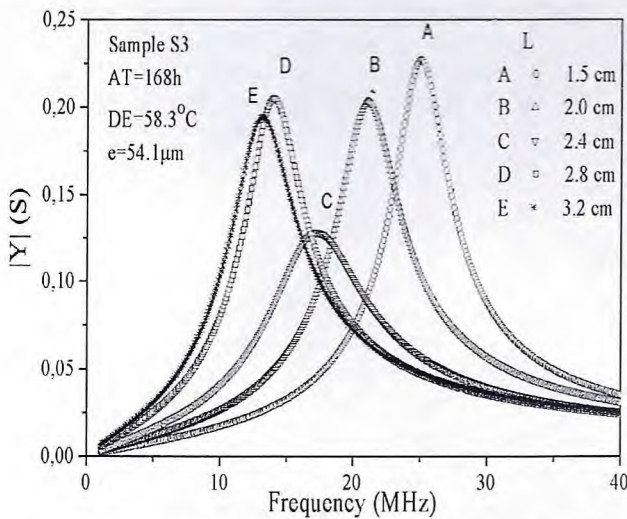


Fig. 5. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S2.

fundamental resonance) and ϵ_{11}^S at 1 GHz (which is the dielectric permittivity obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode). With the experimental measurements of ϵ_{11} , fL and ρ and using Eqs. (8), (9) and (13) one can obtain the piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectricity (see Table 1). The piezoelectric strain tensor element d_{14} obtained for the natural collagen was around 0.066 pC/N, which is in good agreement compared with values reported in the literature obtained with other techniques [2,3,11,16]. In Ref. [11] collagen films was prepared by evaporation and electrodeposition from solution. It was observed the electrodeposited films were more organized presenting higher piezoelectric coefficients than the evaporated films, with values around 0.076 pC/N. In Figs. 4–6 one has the reson-

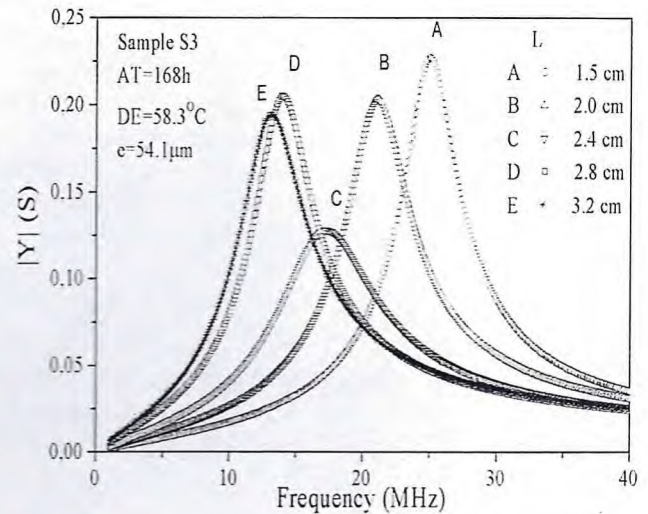


Fig. 6. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S3.

ances associated to samples S1, S2 and S3. For sample S2, a slight increase of the value of the piezoelectricity (0.079 pC/N) was observed. The increase of the piezoelectricity for the S2 sample was not well understood up to this point in this study. From Table 1, one can see that sample S2 presents the highest density, dielectric permittivity and frequency constant fL . We believe that the alkaline treatment, of the native collagen results in lower thermal stability than those made from native collagen, which was observed with the decrease of the denaturation endotherm (see Table 1). However, the treatment led to an increase of the organization of the microscopic fiber structure of the sample, which could explain the increase of the piezoelectricity.

5. Conclusions

In this paper we did a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for the anionic and native collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to the alkaline treatment presents, exhibited lower thermal stability than those made from native collagen. However, the treated samples present a higher piezoelectricity compared with the native collagen. The frequency constant fL and the piezoelectric tensor element d_{14} obtained for the heat-treated sample (72 h) present the highest values for the samples under study (444.1 kHz m and 0.079 pC/N, respectively). We believe that the alkaline treatment led to an increase of the organization of the microscopic structure of the sample, which could result in an

increase of the piezoelectricity. This high value for the frequency constant and piezoelectricity opens the possibility of using this film in electronic devices based on acoustic waves (such as surface acoustic wave devices, SAW) which operate in the MHz frequency range using piezoelectric substrates. We are studying in our laboratory a SAW filter prepared over the surface of a collagen film to be used as a pressure sensor in biological applications.

Acknowledgements

This work was partly sponsored by FINEP, CNPq, CAPES (Brazilian agencies). The authors also acknowledge P.L. Sombra for help with the drawing of the experimental setup.

References

- [1] S. Mascarenhas, Topics in Applied Physics, Vol. 23, Electrets, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- [2] E. Fukada, Piezoelectricity and pyroelectricity of piopolymers, Ferroelectric Polymers, Marcel Dekker Inc, New York, 1995, pp. 393–439.
- [3] E. Fukada, I. Yasuda, J. Phys. Soc. Japan 12 (1957) 1158.
- [4] M.E. Nimni, Collagen: Biotechnology, CRC, Boca Raton, FL, 1988.
- [5] G. Reinish, Nature 253 (1975) 626.
- [6] J.C. Anderson, C. Eriksson, Nature 218 (1968) 167.
- [7] J.A. Chapman, Electron Microsc. Rev. 3 (1990) 143–182.
- [8] K.E. Kadler, Biochem. J. 316 (1996) 1–11.
- [9] G.W. Hastnigs, F.A. Mahmud, J. Biomed. Eng. 10 (1988) 515–521.
- [10] J.B. Park, R.S. Lakes, Biomaterials: an Introduction, Plenum Press, New York, 1992.
- [11] A.A. Marino, et al., Calcif. Tissue Int. 31 (1980) 257–259.
- [12] G. Goissis, C.M. Moriak, BR 9.000.972, 2 March 1990.
- [13] J.S. Romero, M. Pons, M.C. Coque, G.R. Ramos, Analytical Letters 27 (8) (1994) 1557–1567.
- [14] T. Ikeda, Fundamentals of Piezoelectricity, Oxford Sci, Oxford, 1996.
- [15] J.F. Nye, Physical Properties of Crystals, Oxford University Press, London, 1960.
- [16] T.G. Netto, R.L. Ziemmerman, Biophys. J. 15 (1975) 573–576.
- [17] G.N. Ramachandran, Treatise on Collagen, Academic Press, London, 1967.
- [18] A. Veis, The Macromolecular Chemistry of Gelatin, Academic Press, New York, 1964.
- [19] A. Cooper, Biochem. J. 118 (1970) 353.
- [20] D.G. Wallace, Biopolymers 29 (1990) 1015–1026.



Caracterização Físico-Química de Filmes de Colágeno-Galactomanana

Sônia D. Figueiró¹, Renato A. Moreira¹ Júlio C. Góes²

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

²Laboratório de Desenvolvimento de Materiais, Departamento de Engenharia Mecânica, UFC.

Abstract

This work reports the effects of galactomanan on the physicochemical properties of collagen membranes, for biomedical, food industry and cosmetic applications. The membranes, casted in acrylic molds, from collagen solutions containing galactomanan in various proportions, were equilibrated in phosphate buffer, pH 7.4. Results obtained from thermal analysis (DSC) of collagen showed that the interaction between collagen and galactomanan occurs with increase in the thermal stability of collagen structure. The swelling studies showed that the presence of galactomanan increase the swelling in collagen membranes. Hemagglutination activity were done to study the binding of lectins on the membranes.

PALAVRAS-CHAVE

Biopolímeros, polímeros naturais, lectinas, galactomanana, colágeno.

INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína que, por sua capacidade de se reconstituir a partir de soluções ácidas diluídas, é amplamente utilizado na indústria de alimentos, de materiais biomédicos e em cosméticos. O colágeno é uma molécula linear constituída de três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, em sua maior parte, na conformação de uma hélice tripla de 300 nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro. Cada cadeia com peso molecular em torno de 100.000 mol/g, possui uma região central de hélice tripla com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e regiões N e C terminais não helicoidais [1]. O colágeno pode ser obtido na forma de géis, fios e membranas. Para melhorar o desempenho desses materiais, tem sido proposto a adição de polissacarídeos [2]. No presente trabalho foi nosso interesse estudar os efeitos da adição de galactomanana sobre as propriedades físico-químicas de membranas de colágeno. Galactomananas são polissacarídeos de plantas constituídos de cadeias lineares de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -1-4, com ramificações de galactose unidas a unidades D-manose da cadeia linear, por ligações α -1-6-glicosídicas [3]. A proporção de galactose/manose de galactomanana de *Adenantha pavonina* foi determinada como sendo 1,8:1 [4]. Assim, após reticulação com epícloridrina estas gomas podem ser usadas como matrizes de afinidade para isolamento de lectinas galactose-específicas.

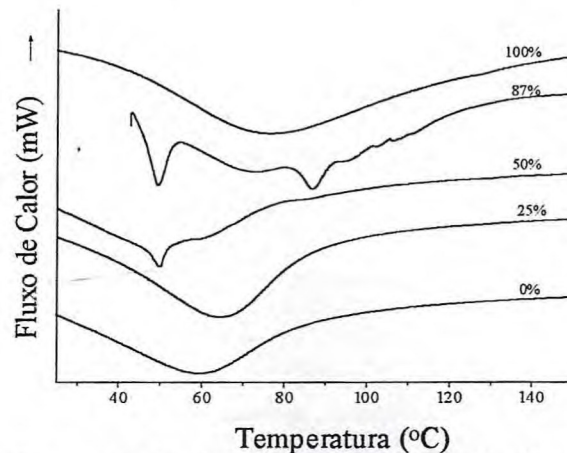
MATERIAIS E MÉTODOS

O colágeno foi solubilizado em solução de ácido acético 1% a partir de serosa bovina, após 72h de tratamento em meio alcalino [5]. A galactomanana isolada de goma endospermica de carolina [4] foi solubilizada em solução de ácido acético 1% e misturada à solução de colágeno pH 3,5, nas concentrações, 0, 25, 50 e 87%. As membranas foram formatadas em moldes de acrílico, a pH 7,4, e reticuladas com solução de glutaraldeído 0,05%, antes de serem secas em temperatura de 25°C. Os ensaios de embebição foram realizados emergindo as membranas, cortadas na forma de um retângulo de 1 cm de lado, em solução de NaCl 0,15M, e os resultados expressos como grama de H₂O por grama de membrana seca. A estabilidade térmica dos filmes foram determinadas em um equipamento Shimadzu DSC-50, em cadinhos de alumínio com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂. Para o estudo da interação lectina-galactomanana, peças das membranas colágeno/galactomanana (1cm²) foram imersas em solução de frutalina 1 mg/mL por 2h e a seguir lavadas exaustivamente com NaCl 0,15M. As membranas foram imersas em solução de galactose 0,2M por 30 minutos e o sobrenadante submetido a análise de atividade hemaglutinante como descrito na literatura [6], tendo sido utilizados eritrócitos de sangue de coelho. A atividade (Título de hemaglutinação) é expressa como o inverso da máxima diluição com agregação visível.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os ensaios de embebição das membranas de colágeno – galactomanana, com concentrações de 0, 25, 50 e 87% de galactomanana, mostraram uma absorção de água de 2,08, 2,66, 3,93 e 5,50 gH₂O/g, respectivamente. Estes resultados mostram que a absorção de água cresce com o aumento do teor de galactomanana na membrana. Entretanto, foi observado que em membranas com altas concentrações do polissacarídeo pode ocorrer lixiviação da goma que não ficou retida na malha de colágeno.

A Figura abaixo mostra os gráficos de estabilidade térmica, (DSC), de membranas de colágeno, colágeno-galactomanana e da goma de carolina. A membrana de colágeno (0%) apresenta uma transição em 59,22 °C, devido a desnaturação da proteína, enquanto a membrana com 25% de galactomanana apresenta uma transição em 64,33 °C, sugerindo uma maior estabilidade da hélice tripla do colágeno. Membranas com 50 e 87% de galactomanana apresentam múltiplas transições, o que sugere a formação de complexos colágeno - galactomanana com diferentes graus de estabilidade térmica. A goma de carolina (100%) apresenta uma transição em 76,90 °C.



A interação de lectina com a galactomanana pode ser avaliada pela medida da atividade hemaglutinante, já que essa proteína possui um ou mais sítios de ligação a carboidratos, e desse modo é capaz de aglutinar células. Os resultados demonstram um aumento do grau de aglutinação com o incremento de galactomanana na membrana, sugerindo que a goma ocluída entre as fibras de colágeno mantém livres grande parte dos sítios de ligação com a lectina que ocorre pela presença de resíduos de galactose livres no polissacarídeo.

CONCLUSÃO

Os ensaios de análise térmica mostram que o colágeno e galactomanana interagem para formar estruturas complexas, as quais podem aumentar a estabilidade das membranas, embora reduza sua homogeneidade. A maior capacidade de absorção de água nas membranas com galactomanana pode ser de interesse tanto para indústria de alimento como na cosmética.

REFERÊNCIAS:

- [1] M. E. Nimni, Collagen: Biotechnology, Vol. 3, CRC, 1988.
- [2] Taravel, M.N., Domard, A., Biomaterials, 16, p. 865-871, (1995)
- [3] Chabdrasekaran, R., Radha, A., Carbohydrate Polymers 32, p. 201-208, (1997).
- [4] Tavares, R. O., Galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. aplicada para isolamento de lectinas galactose específicas. Dissertação de Mestrado, UFC, (1988).
- [5] Goissis, G., Moriak, C. M., BR 9.000.972, 2 de março de 1990
- [6] Moreira, R.A., Perrone, J.C., Plant. Physiol., v.59, p. 783-787, (1977).

AGRADECIMENTO:

Os autores agradecem a FUNCAP pelo apoio financeiro e a Keline Lisboa Cavalcante e Ricardo Tavares pelo fornecimento das amostras de frutalina e galactomanana.

EFFECT OF GLUTARALDEHYDE IN GALACTOMANNAN-COLLAGEN FILMS

Sônia D. Figueiró¹, Renato A. Moreira¹ Júlio C. Góes²

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC. Campus do Pici, Bloco 907, Cx. Postal 6020, CEP: 60451-970, Fortaleza-CE.

²Laboratório de Desenvolvimento de Materiais, Departamento de Engenharia Mecânica, UFC.

Introduction

Biodegradable plant polysaccharides, such as pectin, dextrans and galactomannans are biopolymers generally considered to be biocompatible and environment friendly materials. They are widely used as thickening agents in food and drug products, and also used for the extended release of drugs after oral administration and could be used for the specific delivery of drugs into the human colon if properly modified (e.g., by crosslinking to form hydrogels) to reduce their water solubility[1]. Its major use is in the food industry either in its native or modified form. In other reports guar gum was crosslinked with glutaraldehyde (GA) to reduce its swelling properties[2]. These reduction in swelling was required to prevent entrapped drug leakage right after its oral ingestion.

Galactomannans are plant polysaccharides displaying a mannan backbone with randomly substituted (1→6) linked α -D-galactosyl units. The galactose:mannose (G/M) ratio varies from 0,3 in locust bean gum to 0,9 in fenugreek and intermediate values for other members in this family[3]. In contrast to mannan, these polysaccharides are water soluble and form highly viscous solutions. The viscosity appears to be dependent on a number of factors such as molecular weight, degree of substitution, temperature and pH [4]. The availability of a spectrum of plant seed polysaccharides thus provides an excellent opportunity for the development of fine tuned food products by utilizing these galactomannans. X-rays investigations to date indicate that any of these galactomannans can form a 2- fold helix of pitch 10,3 Å similar to that of mannan itself [3]. Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermal analysis (DSC) of some polysaccharides including galactomannan, have been reported and found to be promising and sensitive techniques for characterizing structural modifications of these natural polymers [5].

Collagen, the most abundant protein of the animal kingdom, has a long history as biomaterial. We can find it in prostheses of heart valves, in artificial skins, in contact lenses and in drug delivery systems [6]. Collagen molecules (molecular weight 300.000) are rod-like triple helices, which are 300nm in length and 1.5nm in diameter. Collagen fibers possess a high degree of axial alignment of collagen molecules and are characterized by a regular stagger of approximately $\frac{1}{4}$ of a rod length between each molecule and its axially aligned neighbour [7,8].

The goals of the present study were to check how crosslinking affects the physicochemical properties of galactomannan:collagen films which may be used for biomedical applications and in food industry.

Methods

The collagen was prepared by solubilization from bovine serosa after 72h of treatment under alkaline conditions in presence of salts, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5[9]. The samples were dialysed against acetic acid solution, and brought to a final concentration of 0.1%, determined by hydroxiprolin[10].

Galactomannan was obtained by its solubilization from seed endosperms of *Adenanthera pavonina* after homogenization in acetic acid solution at pH 3,5. The dry matter was determined by lyophilization.

The galactomannan:collagen films were prepared with 0, 50, 60, 70 and 80% of galactomannan (w/w) mixed in collagen solution at pH 3,5 and casted in acrylic molds with phosphate buffer 0,13mol/L, at pH 7,4. Subsequently they were extensively washes in 0,15M NaCl and dried in laminar flow of air. In fixation with GA, films pieces of 2cm² were immersed in 0,001% GA solution for 24h at ambient temperature. After fixation, the pieces were treated in glycine solution (0,025M glycine:0,05M borate, pH 9.2,) for 10 min, and used for swelling, infrared, and thermal stability assays.

The IR spectra were obtained from a NICOLET Model 5SXC-FTIR starting from galactomannan films, and galactomannan:collagen-films, casted at pH 3.5.

The thermal stability of the collagen, galactomannan and galactomannan:collagen films, were determined by DSC, using an equipment Shimadzu DSC-50: Samples were sealed in aluminum cell and heated up with rate of 5 °C/min with N₂ atmosphere.

Pieces (1.5 x 0.5 cm) of galactomannan:collagen films, fixed with 0,001% GA, were immersed in 0,15M NaCl solution for 24h. After swelling the films were weighed. The pieces were washed in water and keeping under atmosphere of P₂O₅ to constant weight. The results were expressed as the ratio between water weight and film dry weight.

Results

Crosslinking of collagen sample with GA involves the reaction of the free amine groups of lysine or hydroxylysine amino acids residues of the polypeptide chains with the GA aldehyde groups. The reaction that will take place is the formation of a Schiff base, thereafter a large variety of subsequent reactions may be involved in the crosslinking material [1-1]. The degree of crosslinking of the samples was related to the denaturation temperature of the DSC samples.

In Figure 1A, the IR spectra shows the typical bands for collagen were observed in 1652 and 1550 cm⁻¹ (amide I, C=O and amide II, NH), and the relationship of the absorbance for the bands in 1235 and 1450 cm⁻¹ always was larger than the unit, both in the collagen spectra and in the galactomannan:collagen spectra (See Figure 1B).

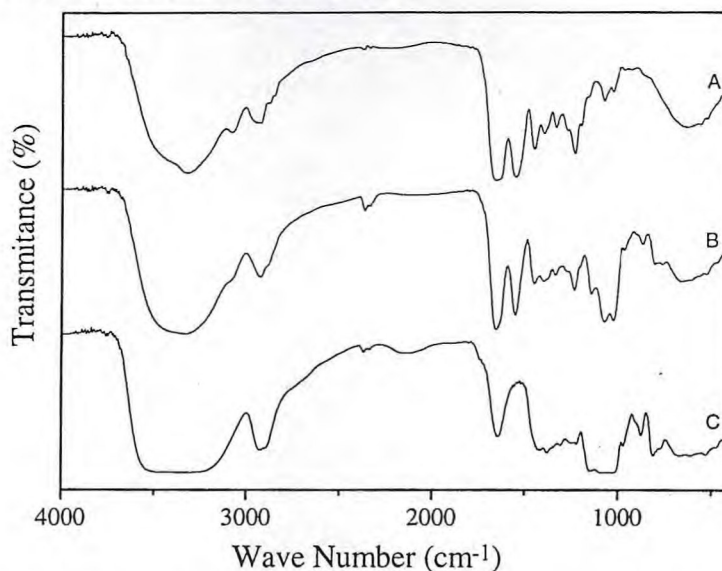


Fig. 1. Infrared spectra of (A) Collagen film, (B) Galactomannan:collagen film (1:1), (C) Galactomannan Film.

The Figure 2A shows the DSC thermogram of collagen film crosslinked with GA 0,01%, which the denaturation temperature was 59,72 °C. In all collagen-galactomannan films, treated with crescent concentrations of GA (0.05, 1 and 1.5%), shown in the Figure 2B, C and D, respectively, the thermograms showed two transitions, the first always near 49 °C and the other between 58 and 66 °C. In the Figure 2E, DSC thermogram of galactomannan:collagen-film without treatment with GA, present one transition in 51 °C.

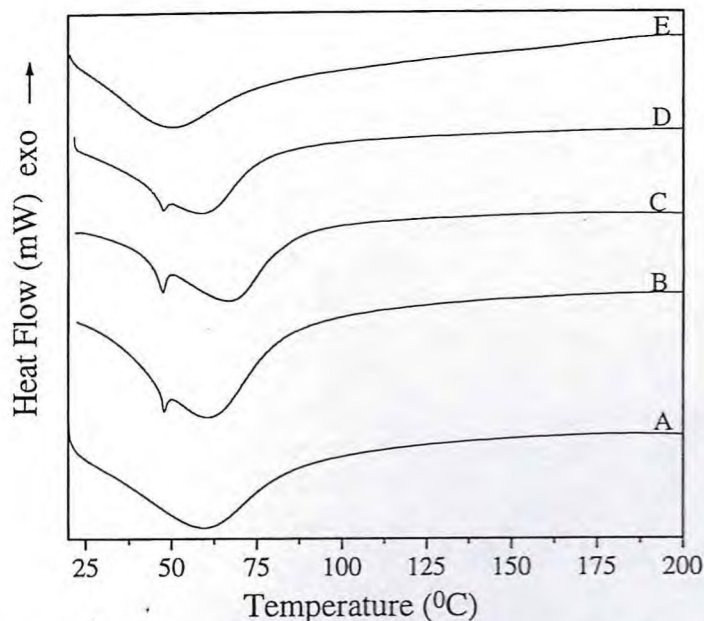


Fig. 2. DSC thermograms of (A) collagen film treated with GA 0.01%, (B), (C), (D) and (E) Galactomannan:collagen films (GA 0.05, 1, 1.5, 0 %, respectively).

The rate of swelling of GA treated samples are present in Figure 3. The degree of swelling of crosslinked samples decrease from 7.71 to 2.04 gH₂O/g film as a function of crosslinking level of GA from 0.001 to 2.0%.

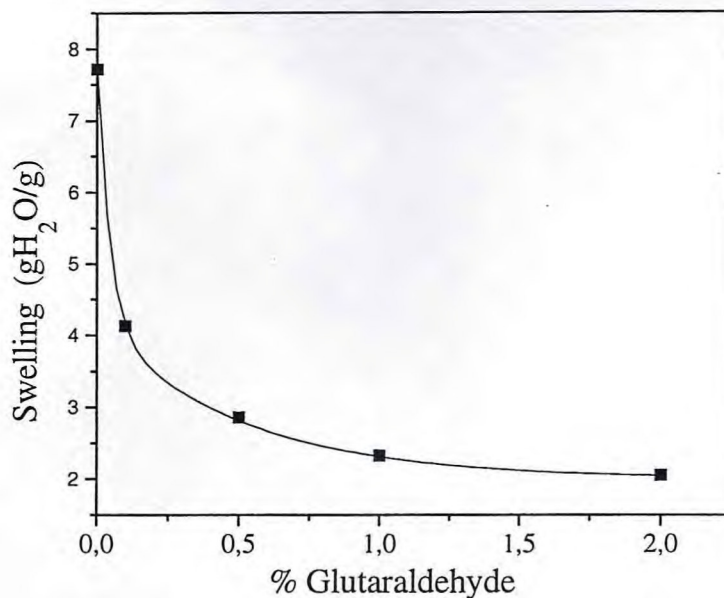


Fig. 3. The swelling curve of galactomannan:collagen films grafted with GA in function of concentration.

Conclusions

The IR results suggest that the triple helix structure of collagen was not affected with the presence of galactomannan. Results obtained from thermal analysis (DSC) of films suggest that the interaction between collagen and galactomannan occurs and produce some structure which have its thermal stability around 49 °C, while the GA treatment crosslink the collagen molecules, resulting transition in greater temperature. The swelling studies showed that the GA treatment decrease the swelling in galactomannan:collagen films.

References

1. Rubinstein, A., Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 12, 101-149, (1995).
2. Gliko-Kabir, I., Yagen, B., Penhasi, A, et al., Pharm. Res. 15, 1019-1025, (1998).
3. Chandrasekaran, R., Radha, A., Carbohydrate polymers, 32, 201-208, (1997).
4. Meyer, H., Anderson, M., Karl, C., et al., Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives, ed. R.L. Whistler, Academic press, New York, p. 181-226 (1993).
5. Gliko-Kabir, I., Penhasi, A, Rubinstein, A. et al., Carbohydrate Research, 316, 6-13, (1999)
6. Nimni M. E., Collagen: Biotechnology, Vol. 3, CRC, 1988.
7. Kadler, K. E., Homes, D. F., and Chapman, J. A.. Collagen fibril formation. Biochem. J.. 316, 1-11, (1996).
8. J. A. Chapman, Electron Microsc. Rev, Vol. 3, p. 143-182, 1990.
9. Goissis, G., Moriak, C. M., BR 9.000.972, 2 de março de 1990
10. Romero, J. S., Pons, M., Coque, M. C. e Ramos, G. R., Analytical Letters, v. 27, 8, 1557-1567, (1994).
11. Oldedamink, L.H.H., Dijkstra, M.J.A., Luyn Van, J. A., Journal of Materials Science, 460-472, (1995).

Piezoelectricity of native and anionic collagen

J. C. GÓES, S. D. FIGUEIRÓ

Departamento de Química Analítica e Físico-Química-UFC, Caixa Postal 12200, CEP 60.021-970, Fortaleza-CE-Brasil

E-mail: jcgoes@roadnet.com.br

J. A. C. DE PAIVA, I. F. DE VASCONCELOS, A. S. B. SOMBRA

Laboratório de Óptica não Linear e Ciência dos Materiais (LONLCM), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

E-mail: sombra@ufc.br

Some biological materials and biopolymers are found to exhibit the polar uniaxial orientation of molecular dipoles in their structure and can be considered as bioelectret. Such materials show pyroelectricity and piezoelectricity. Biocompatible polymeric materials are now used extensively after proper polarization treatment for biomedical applications such as antithrombogenic surfaces and artificial membranes [1]. Pyro and piezoelectric studies in various types of biological systems showed the presence of natural polarity in the structure of various parts of animals and plants. In many natural structures the polar molecules such as proteins are aligned in parallel with a preferred direction of the polar axis to form the crystalline structure. Therefore, such structures can be regarded as natural electrets. Because of this intrinsic polarization, pyroelectricity and piezoelectricity in the axial direction can be observed [2].

Collagen, the most abundant protein of the animal kingdom, has a long history as biomaterial. We can find it in prostheses of heart valves, in artificial skins, in contact lenses and in injectable gels for soft tissue augmentation [3]. Collagen molecules (molecular weight 300 000) are rod-like triple helix, which are 300 nm in length and 1.5 nm in diameter. Collagen fibers possess a high degree of axial alignment of collagen molecules and are characterized by a regular stagger of approximately 1/4 of a rod length between each molecule and its axially aligned neighbor [4, 5].

The piezoelectric properties of collagen have been investigated in complex biological systems such as bone and tendon. The piezoelectric properties of bone are of interest in view of their role in bone remodeling [6]. The magnitude of the piezoelectric sensitivity coefficients of bone depends on frequency, on direction of load, and on relative humidity. Values up to 0.7 pC/N have been observed in bone [7]. Marino *et al.* [8] examined the relation between collagen's film piezoelectricity and its electron microscopic appearance, in films with different degree of organization, and suggest that the piezoelectric effect originates either at the level of tropocollagen.

In this work we did a study of the thermal, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of

cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery.

The anionic collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine serosa after a period of 72 h of treatment under alkaline conditions in presence of salts, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5 [9]. The native collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine serosa after treatment with acid acetic under low pH, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5. All samples were dialyzed against acetic acid solution, at pH 3.5, and brought to a final concentration of 1%, determined by hydroxyproline [10].

The membranes, cast in acrylic molds from a collagen solution, were equilibrated in phosphate buffer, 0.13 mol/l, pH 7.4 by 24 h, followed by extensive water washes and dried in laminar flow of air. The membranes were prepared from collagen with 0 and 72 h under alkaline treatment (samples S0 and S1 respectively).

The thermal stability of the collagen was determined by measures of its denaturation temperature, using an equipment Shimadzu DSC-50, membranes samples were sealed in aluminum cell and heated up with rate of 5 °C/min with N₂ atmosphere.

The complex dielectric function measurements were obtained from a HP 4291A Material Impedance Analyzer in conjunction with a HP 4194 Impedance Analyzer, which jointly cover the region of 100 Hz to 1.8 GHz.

Piezoelectricity may exist for certain symmetries of crystalline structures. In general anisotropic crystals have the piezoelectric effect and the matrix can represent their piezoelectric constants:

$$\begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix}$$

Where d_{ij} are called as the piezoelectric strain constants. Some of them are null, according to the symmetry of the material [11]. In the case of natural biopolymers the symmetry observed is D_{∞} , which show only shear piezoelectricity. In this case $d_{25} = -d_{14}$. In the case of bone, the piezoelectricity appears only when the shearing force acts on the orientated collagen fibers

so that they slip past one another [2]. Shear piezoelectricity is observed almost universally for the oriented textures of biopolymers [2]. For this symmetry the tensor is given by:

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Shear piezoelectricity is also observed for the oriented films of a variety of synthetic polymers with optical activity. Rectangular coordinates are assigned to the film sample. The 3 axis is taken in the direction of orientation, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample (Fig. 2). The piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectric is given by [11]:

$$d_{14} = k_{14} \sqrt{\epsilon_{11}^T s_{55}^E} \quad (1)$$

With

$$\epsilon_{11}^S = (1 - k_{14}^2) \epsilon_{11}^T \quad (2)$$

Where k_{14} is the shear piezoelectric coupling factor, ϵ_{11}^T is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance, ϵ_{11}^S is obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode and s_{55}^E is the elastic compliance which is determined from the successive resonance frequencies of the shear mode f :

$$\frac{1}{s_{55}^E (1 - k_{14}^2)} = 4\rho(f \cdot L)^2 \quad (3)$$

Where $f \cdot L$ is the frequency constant which is the product of the resonance frequency and the diameter of the sample and ρ is the sample density. From the experimental measurement of ϵ_{11}^T , ϵ_{11}^S , $f \cdot L$ and ρ one can obtain s_{55}^E (Equation 3), k_{14} (Equation 2) and d_{14} (Equation 1). In Table I one has the experimental values of these constants under study.

Fig. 1 shows the DSC curves of collagen films. The main feature in the DSC curves of collagen are the denaturation endotherm, at 78.33 and 57.38 °C for samples S0 and S1 respectively (see Table I). These results show that films made from anionic collagen have lower thermal stability than those made from native collagen. We can explain these results by the fact that

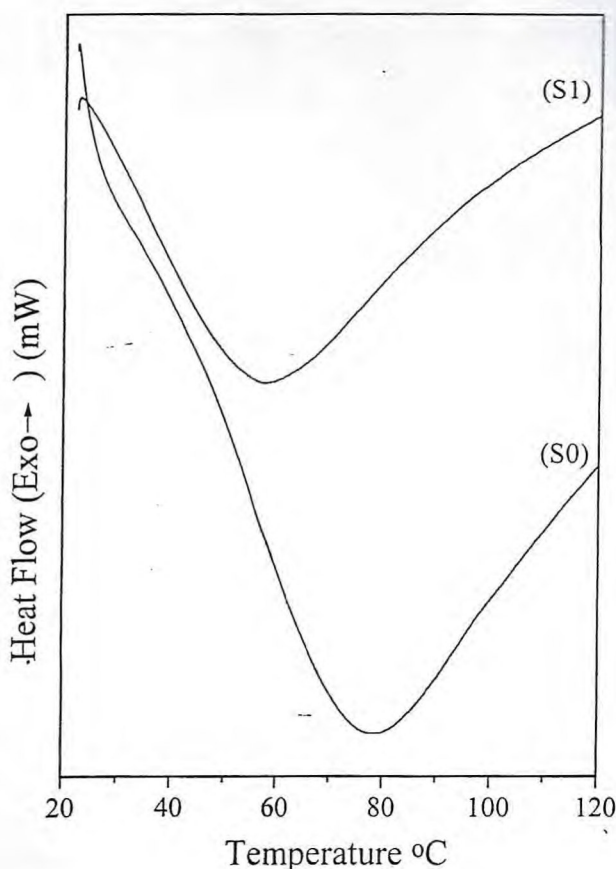


Figure 1 DSC curves of the samples S0 and S1 (native and anionic collagen).

alkaline treatment of the protein may cleave the esterlike bonds present in tropocollagen [12, 13]. Otherwise, it is known that the alkaline treatment hydrolyzes the carboxamide residues of asparagine and glutamine [14]. This hydrolysis results in a net negative charge of collagen molecules at neutral pH. The thermodynamics and kinetics of the collagen precipitation have been extensively studied [15, 16]. Temperature, pH and ionic strength all exert profound effects on fibril precipitation. Primarily electrostatic and hydrophobic interactions between amino acid side chains neighboring collagen triple helices stabilize the fibers. Attractive interactions result from pairing of oppositely charged amino acids and repulsive interactions result of like charged amino acids. The changes in net charge and number of ionized groups as pH varies would be expected to exert a significant effect on forces between molecules in fibers and hence on fiber physical properties.

In Fig. 2 one has the sample geometry we used for the dielectric and piezoelectric measurements. Rectangular

TABLE I Denaturation endotherm, density (ρ), thickness (c), dielectric permittivity (ϵ), frequency constant ($f \cdot L$) and piezoelectricity (d_{14}) of samples S0 and S1

	Denaturation endotherm (°C)	ρ (kg/m ³)	c (μ m)	$\epsilon_{11}^T/\epsilon_0$	$\epsilon_{11}^S/\epsilon_0$	$f \cdot L$ (kHz · m)	d_{14} (10^{-12} C N ⁻¹)
S0	78.33	998.47	85.45	2.56	2.23	437.69	0.066
S1	57.38	1020.62	67.5	3.15	2.66	444.11	0.079

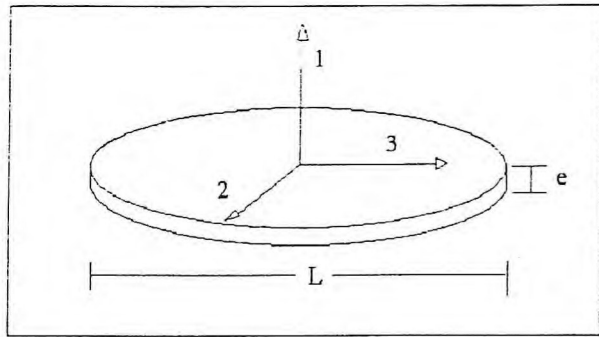


Figure 2 A rectangular coordinate assigned to the sample for the measurement of piezoelectric and dielectric constant.

coordinates are assigned to the samples as shown in Fig. 2. The 3 axis is taken in the direction of the sample plane, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample. The flat faces of the samples are painted with a silver electrode. The thickness and the diameter of each sample are found in Table I. For all the studied samples the diameter 'L' was varied between 1.5 and 3.2 cm, and the thickness 'e' was 85 and 67 μm for samples S0 and S1 respectively. In Fig. 3 one has the frequency dependence of the absolute value $|Y|$ of the admittance of sample S0. The measurement was done with the sample in disk type geometry as shown in Fig. 2. In this figure, one has five measurements for five different diameters of the disk, which is indicated in the figure. From Fig. 3, the frequency constant, $f \cdot L$ associated to the shear piezoelectric mode of this sample was obtained. The average value obtained for the shear mode was $f \cdot L \sim 437.69 \text{ kHz} \cdot \text{m}$, which is a value of about two orders of magnitude higher compared with

PZT [11]. In Fig. 4 one has the admittance of sample S1. We also did the measurement of the dielectric permittivity ϵ_{11}^T at 1 MHz (which is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance) and ϵ_{11}^S at 1 GHz (which is the dielectric permittivity obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode). With the experimental measurements of ϵ_{11} , $f \cdot L$ and ρ and using Equations 1, 2 and 3 one can obtain the piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectricity (see Table I). The piezoelectric strain tensor element d_{14} obtained for the native collagen was around 0.066 pC/N, which is in good agreement compared with values reported in the literature obtained with other techniques [2, 8, 12]. In Ref. [8] collagen films were prepared by evaporation and electrodeposition from solution. It was observed the electrodeposited films were more organized presenting higher piezoelectric coefficients than the evaporated films, with values around 0.076 pC/N. In Fig. 4 one has the resonance's associated to samples S1. For sample S1 a slight increase of the value of the piezoelectricity (0.079 pC/N) was observed. The increase of the piezoelectricity for the S1 sample was not well understood up to this point in this study. From Table I one can see that sample S1 presents a higher density, dielectric permittivity and the frequency constant $f \cdot L$ compared with the native collagen. We believe that the alkaline treatment, of the native collagen, results in lower thermal stability of these samples compared with those made from native collagen. Which was observed with the decrease of the denaturation endotherm (see Table I). However the treatment led to an increase of the organization of the microscopic fiber structure of the sample,

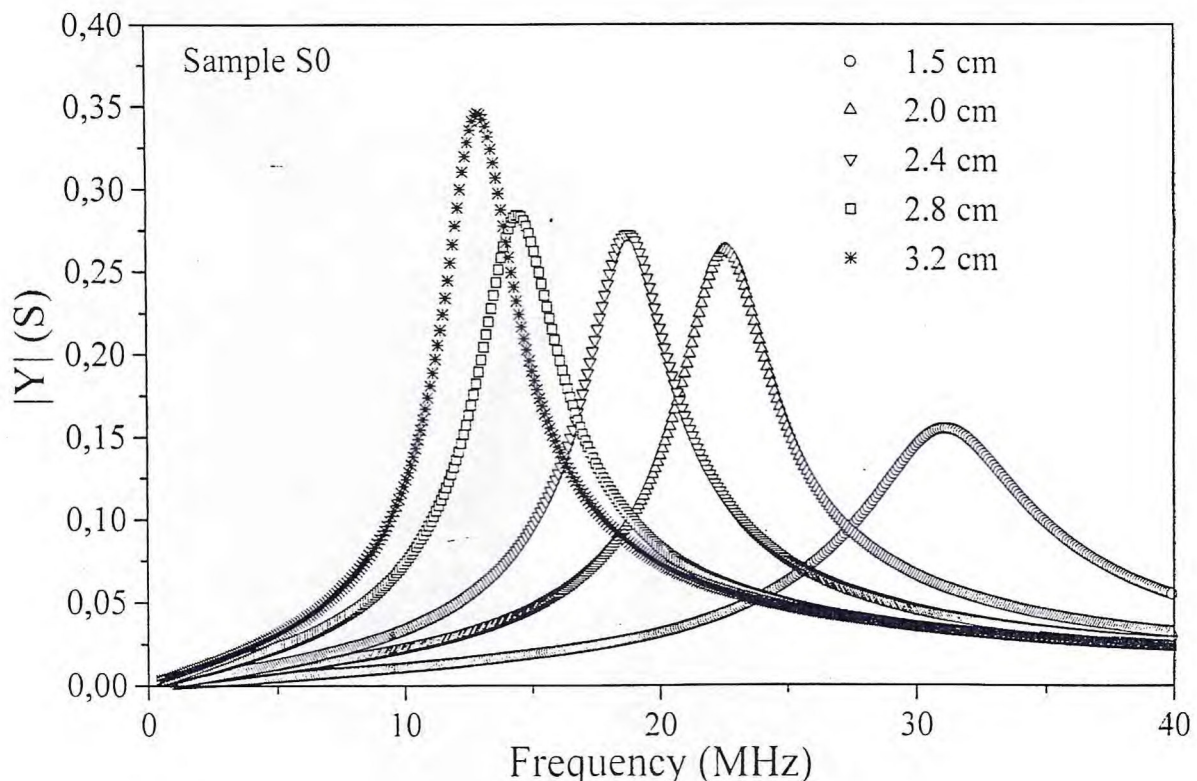


Figure 3 Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S0 (native collagen).

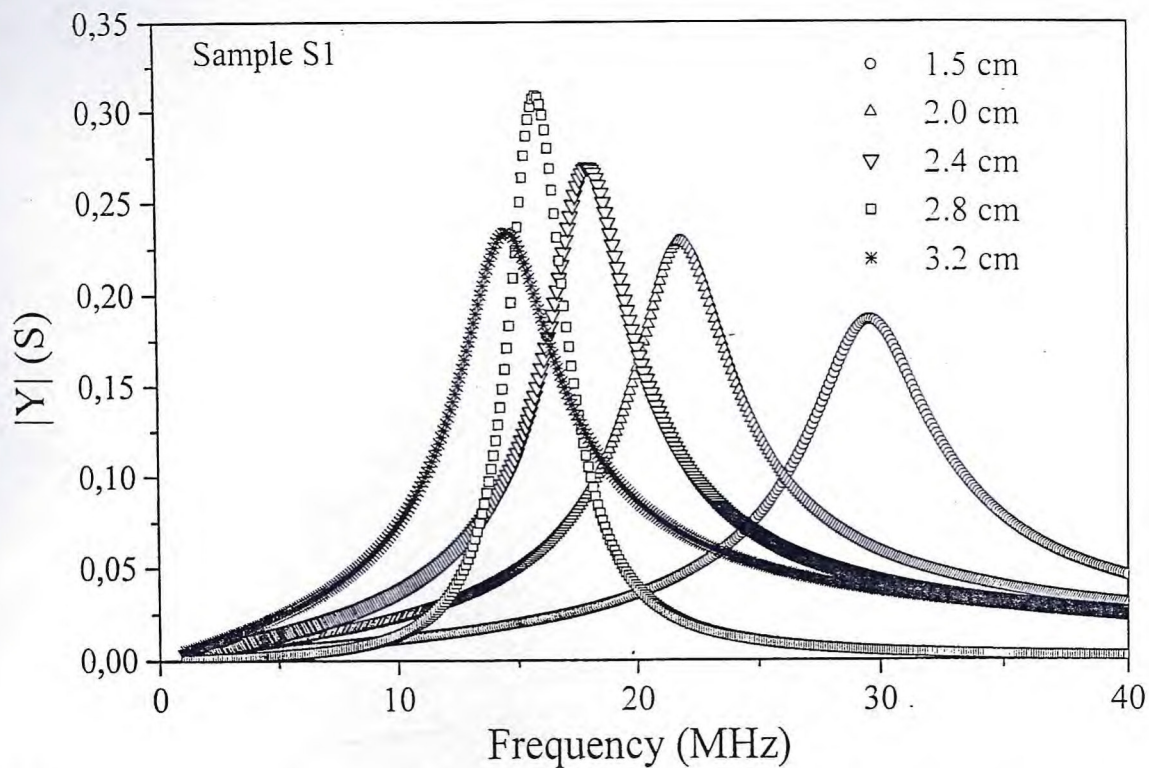


Figure 4 Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S1 (anionic collagen).

which could explain the increase of the piezoelectricity.

In this paper we did a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for the anionic and native collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to the alkaline treatment present lower thermal stability than those made from native collagen. However the treated samples presents a higher piezoelectricity compared with the native collagen. The frequency constant $f \cdot L$ obtained for the alkaline-treated sample (72 h) presents a higher value for the samples under study (444.1 kHz · m). We believe that the alkaline treatment leads to an increase of the organization of the microscopic structure of the sample, which could result in an increase of the piezoelectricity.

Acknowledgments

This work was partly sponsored by FINEP, CNPq (Brazilian agencies). The authors also acknowledge P. L. Sombra for the help with the draw of the experimental setup.

References

1. S. MASCARENHAS, "Bioelectrets: Electrets in Biomaterials and Biopolymers." Topics in Applied Physics, Vol. 23, Electrets (Springer-Verlag, Berlin, 1987).
2. E. FUKADA, "Piezoelectricity and Pyroelectricity of Biopolymers." Ferroelectric Polymers (Marcel Dekker, 1995) pp. 393-439.
3. M. E. NIMNI, "Collagen: Biotechnology." Vol. 3 (CRC Press, 1988).
4. J. A. CHAPMAN, *Electron Microsc. Rev.* 3 (1990) 143-182.
5. K. E. KADLER, *Biochem. J.* 316 (1996) 1-11.
6. G. W. HASTNIGS and F. A. MAHMUD, *J. Biomed. Eng.* 10 (1988) 515-521.
7. J. B. PARK and R. S. LAKES, "Biomaterials: An Introduction" (Plenum Press, New York, 1992).
8. A. A. MARINO *et al.*, *Calcif. Tissue Int.* 31 (1980) 257-259.
9. G. GOISSIS and C. M. MORIAK, BR 9.000.972, 2 de março de 1990.
10. J. S. ROMERO, M. PONS, M. C. COQUE and G. R. RAMOS, *Analytical Letters* 27(8) (1994) 1557-1567.
11. T. IKEDA, "Fundamentals of Piezoelectricity" (Oxford Science Publishers, 1996).
12. T. G. NETTO and R. L. ZIEMMERMAN, *Biophysical Journal* 15 (1975) 573-576.
13. G. N. RAMACHANDRAN, *Treatise on Collagen*, Vol. 1 (London, Academic Press, 1967).
14. A. VEIS, "The Macromolecular Chemistry of Gelatin" (Academic Press, 1964).
15. A. COOPER, *Biochem. J.* 118 (1970) 353.
16. D. G. WALLACE, *Biopolymers* 29 (1990) 1015-1026.

Received 9 December 1998

and accepted 24 February 1999

Piezoelectricity of native and anionic collagen

J. C. GÓES, S. D. FIGUEIRÓ

Departamento de Química Analítica e Físico-Química-UFC, Caixa Postal 12200, CEP 60.021-970, Fortaleza-CE-Brasil

E-mail: jcgoes@roadnet.com.br

J. A. C. DE PAIVA, I. F. DE VASCONCELOS, A. S. B. SOMBRA

Laboratório de Óptica não Linear e Ciência dos Materiais (LONLCM), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

E-mail: sombra@ufc.br

Some biological materials and biopolymers are found to exhibit the polar uniaxial orientation of molecular dipoles in their structure and can be considered as bi-electret. Such materials show pyroelectricity and piezoelectricity. Biocompatible polymeric materials are now used extensively after proper polarization treatment for biomedical applications such as antithrombogenic surfaces and artificial membranes [1]. Pyro and piezoelectric studies in various types of biological systems showed the presence of natural polarity in the structure of various parts of animals and plants. In many natural structures the polar molecules such as proteins are aligned in parallel with a preferred direction of the polar axis to form the crystalline structure. Therefore, such structures can be regarded as natural electrets. Because of this intrinsic polarization, pyroelectricity and piezoelectricity in the axial direction can be observed [2].

Collagen, the most abundant protein of the animal kingdom, has a long history as biomaterial. We can find it in prostheses of heart valves, in artificial skins, in contact lenses and in injectable gels for soft tissue augmentation [3]. Collagen molecules (molecular weight 300 000) are rod-like triple helix, which are 300 nm in length and 1.5 nm in diameter. Collagen fibers possess a high degree of axial alignment of collagen molecules and are characterized by a regular stagger of approximately 1/4 of a rod length between each molecule and its axially aligned neighbor [4, 5].

The piezoelectric properties of collagen have been investigated in complex biological systems such as bone and tendon. The piezoelectric properties of bone are of interest in view of their role in bone remodeling [6]. The magnitude of the piezoelectric sensitivity coefficients of bone depends on frequency, on direction of load, and on relative humidity. Values up to 0.7 pC/N have been observed in bone [7]. Marino *et al.* [8] examined the relation between collagen's film piezoelectricity and its electron microscopic appearance, in films with different degree of organization, and suggest that the piezoelectric effect originates either at the level of tropocollagen.

In this work we did a study of the thermal, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of

cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery.

The anionic collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine serosa after a period of 72 h of treatment under alkaline conditions in presence of salts, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5 [9]. The native collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine serosa after treatment with acid acetic under low pH, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5. All samples were dialyzed against acetic acid solution, at pH 3.5, and brought to a final concentration of 1%, determined by hydroxyproline [10].

The membranes, cast in acrylic molds from a collagen solution, were equilibrated in phosphate buffer, 0.13 mol/l, pH 7.4 by 24 h, followed by extensive water washes and dried in laminar flow of air. The membranes were prepared from collagen with 0 and 72 h under alkaline treatment (samples S0 and S1 respectively).

The thermal stability of the collagen was determined by measures of its denaturation temperature, using an equipment Shimadzu DSC-50, membranes samples were sealed in aluminum cell and heated up with rate of 5 °C/min with N₂ atmosphere.

The complex dielectric function measurements were obtained from a HP 4291A Material Impedance Analyzer in conjunction with a HP 4194 Impedance Analyzer, which jointly cover the region of 100 Hz to 1.8 GHz.

Piezoelectricity may exist for certain symmetries of crystalline structures. In general anisotropic crystals have the piezoelectric effect and the matrix can represent their piezoelectric constants:

$$\begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix}$$

Where d_{ij} are called as the piezoelectric strain constants. Some of them are null, according to the symmetry of the material [11]. In the case of natural biopolymers the symmetry observed is D_{∞} , which show only shear piezoelectricity. In this case $d_{25} = -d_{14}$. In the case of bone, the piezoelectricity appears only when the shearing force acts on the orientated collagen fibers

so that they slip past one another [2]. Shear piezoelectricity is observed almost universally for the oriented textures of biopolymers [2]. For this symmetry the tensor is given by:

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Shear piezoelectricity is also observed for the oriented films of a variety of synthetic polymers with optical activity. Rectangular coordinates are assigned to the film sample. The 3 axis is taken in the direction of orientation, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample (Fig. 2). The piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectric is given by [11]:

$$d_{14} = k_{14} \sqrt{\epsilon_{11}^T s_{55}^E} \quad (1)$$

With

$$\epsilon_{11}^S = (1 - k_{14}^2) \epsilon_{11}^T \quad (2)$$

Where k_{14} is the shear piezoelectric coupling factor, ϵ_{11}^T is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance, ϵ_{11}^S is obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode and s_{55}^E is the elastic compliance which is determined from the successive resonance frequencies of the shear mode f :

$$\frac{1}{s_{55}^E (1 - k_{14}^2)} = 4\rho(f \cdot L)^2 \quad (3)$$

Where $f \cdot L$ is the frequency constant which is the product of the resonance frequency and the diameter of the sample and ρ is the sample density. From the experimental measurement of ϵ_{11}^T , ϵ_{11}^S , $f \cdot L$ and ρ one can obtain s_{55}^E (Equation 3), k_{14} (Equation 2) and d_{14} (Equation 1). In Table I one has the experimental values of these constants under study.

Fig. 1 shows the DSC curves of collagen films. The main feature in the DSC curves of collagen are the denaturation endotherm, at 78.33 and 57.38 °C for samples S0 and S1 respectively (see Table I). These results show that films made from anionic collagen have lower thermal stability than those made from native collagen. We can explain these results by the fact that

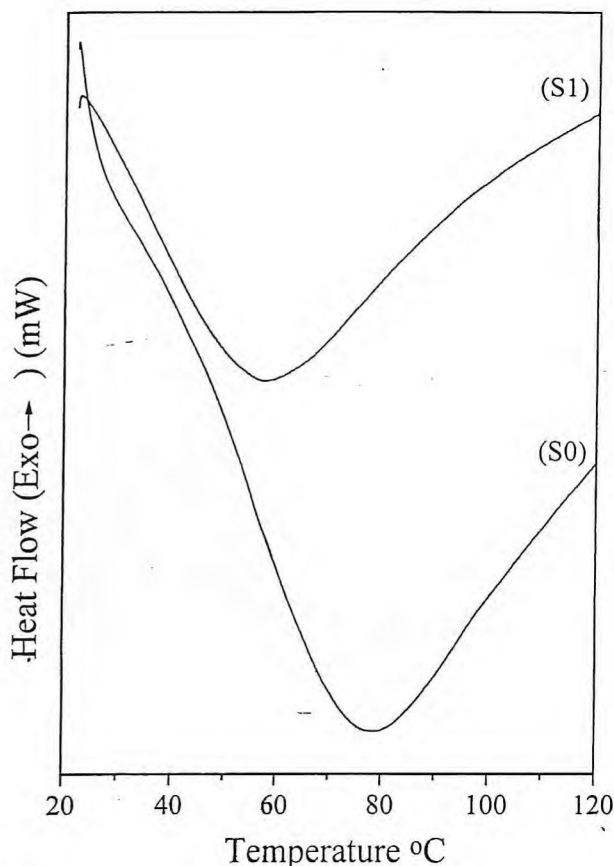


Figure 1 DSC curves of the samples S0 and S1 (native and anionic collagen).

alkaline treatment of the protein may cleave the esterlike bonds present in tropocollagen [12, 13]. Otherwise, it is known that the alkaline treatment hydrolyzes the carboxamide residues of asparagine and glutamine [14]. This hydrolysis results in a net negative charge of collagen molecules at neutral pH. The thermodynamics and kinetics of the collagen precipitation have been extensively studied [15, 16]. Temperature, pH and ionic strength all exert profound effects on fibril precipitation. Primarily electrostatic and hydrophobic interactions between amino acid side chains neighboring collagen triple helices stabilize the fibers. Attractive interactions result from pairing of oppositely charged amino acids and repulsive interactions result of like charged amino acids. The changes in net charge and number of ionized groups as pH varies would be expected to exert a significant effect on forces between molecules in fibers and hence on fiber physical properties.

In Fig. 2 one has the sample geometry we used for the dielectric and piezoelectric measurements. Rectangular

TABLE I Denaturation endotherm, density (ρ), thickness (e), dielectric permittivity (ϵ), frequency constant ($f \cdot L$) and piezoelectricity (d_{14}) of samples S0 and S1

	Denaturation endotherm (°C)	ρ (kg/m ³)	e (μ m)	$\epsilon_{11}^T/\epsilon_0$	$\epsilon_{11}^S/\epsilon_0$	$f \cdot L$ (kHz · m)	d_{14} (10^{-12} C N ⁻¹)
S0	78.33	998.47	85.45	2.56	2.23	437.69	0.066
S1	57.38	1020.62	67.5	3.15	2.66	444.11	0.079

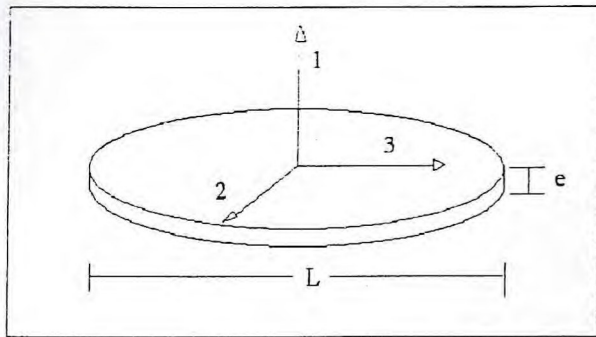


Figure 2 A rectangular coordinate assigned to the sample for the measurement of piezoelectric and dielectric constant.

coordinates are assigned to the samples as shown in Fig. 2. The 3 axis is taken in the direction of the sample plane, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample. The flat faces of the samples are painted with a silver electrode. The thickness and the diameter of each sample are found in Table I. For all the studied samples the diameter 'L' was varied between 1.5 and 3.2 cm, and the thickness 'e' was 85 and 67 μm for samples S0 and S1 respectively. In Fig. 3 one has the frequency dependence of the absolute value $|Y|$ of the admittance of sample S0. The measurement was done with the sample in disk type geometry as shown in Fig. 2. In this figure, one has five measurements for five different diameters of the disk, which is indicated in the figure. From Fig. 3, the frequency constant, $f \cdot L$ associated to the shear piezoelectric mode of this sample was obtained. The average value obtained for the shear mode was $f \cdot L \sim 437.69 \text{ kHz} \cdot \text{m}$, which is a value of about two orders of magnitude higher compared with

PZT [11]. In Fig. 4 one has the admittance of sample S1. We also did the measurement of the dielectric permittivity ϵ_{11}^T at 1 MHz (which is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance) and ϵ_{11}^S at 1 GHz (which is the dielectric permittivity obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode). With the experimental measurements of ϵ_{11} , $f \cdot L$ and ρ and using Equations 1, 2 and 3 one can obtain the piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectricity (see Table I). The piezoelectric strain tensor element d_{14} obtained for the native collagen was around 0.066 pC/N, which is in good agreement compared with values reported in the literature obtained with other techniques [2, 8, 12]. In Ref. [8] collagen films were prepared by evaporation and electrodeposition from solution. It was observed the electrodeposited films were more organized presenting higher piezoelectric coefficients than the evaporated films, with values around 0.076 pC/N. In Fig. 4 one has the resonance's associated to samples S1. For sample S1 a slight increase of the value of the piezoelectricity (0.079 pC/N) was observed. The increase of the piezoelectricity for the S1 sample was not well understood up to this point in this study. From Table I one can see that sample S1 presents a higher density, dielectric permittivity and the frequency constant $f \cdot L$ compared with the native collagen. We believe that the alkaline treatment, of the native collagen, results in lower thermal stability of these samples compared with those made from native collagen. Which was observed with the decrease of the denaturation endotherm (see Table I). However the treatment led to an increase of the organization of the microscopic fiber structure of the sample,

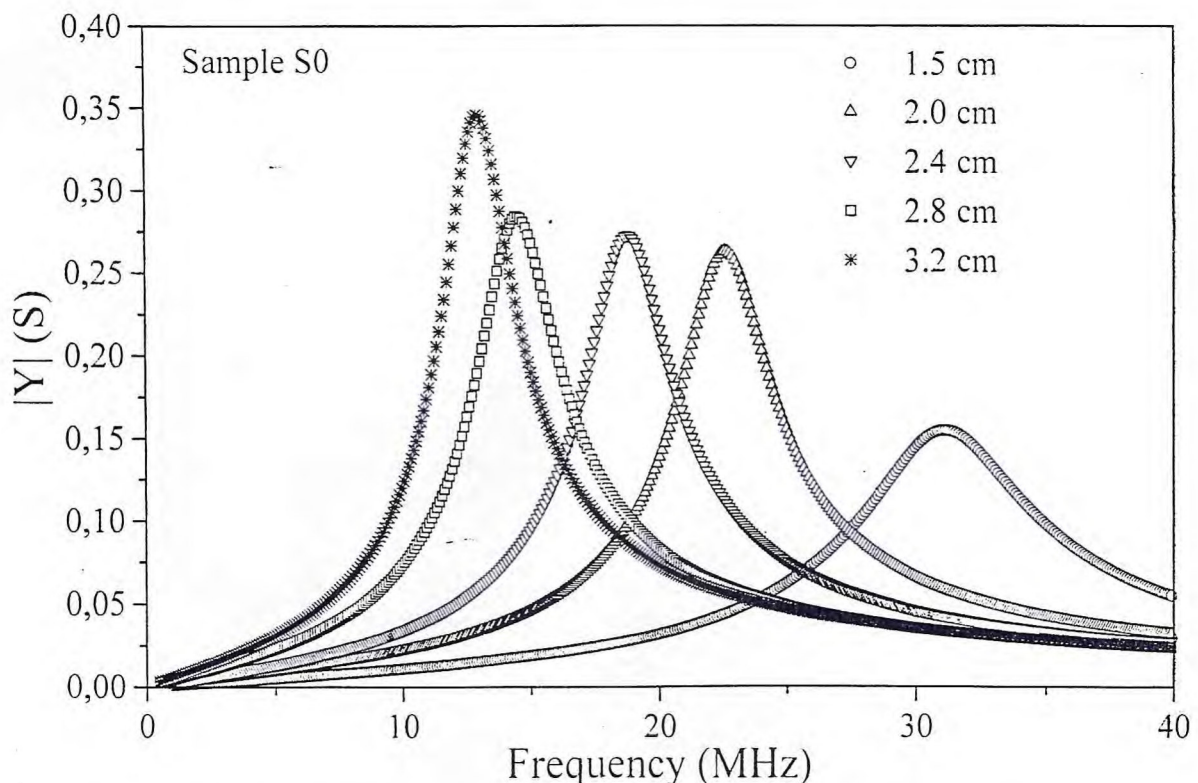


Figure 3 Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S0 (native collagen).

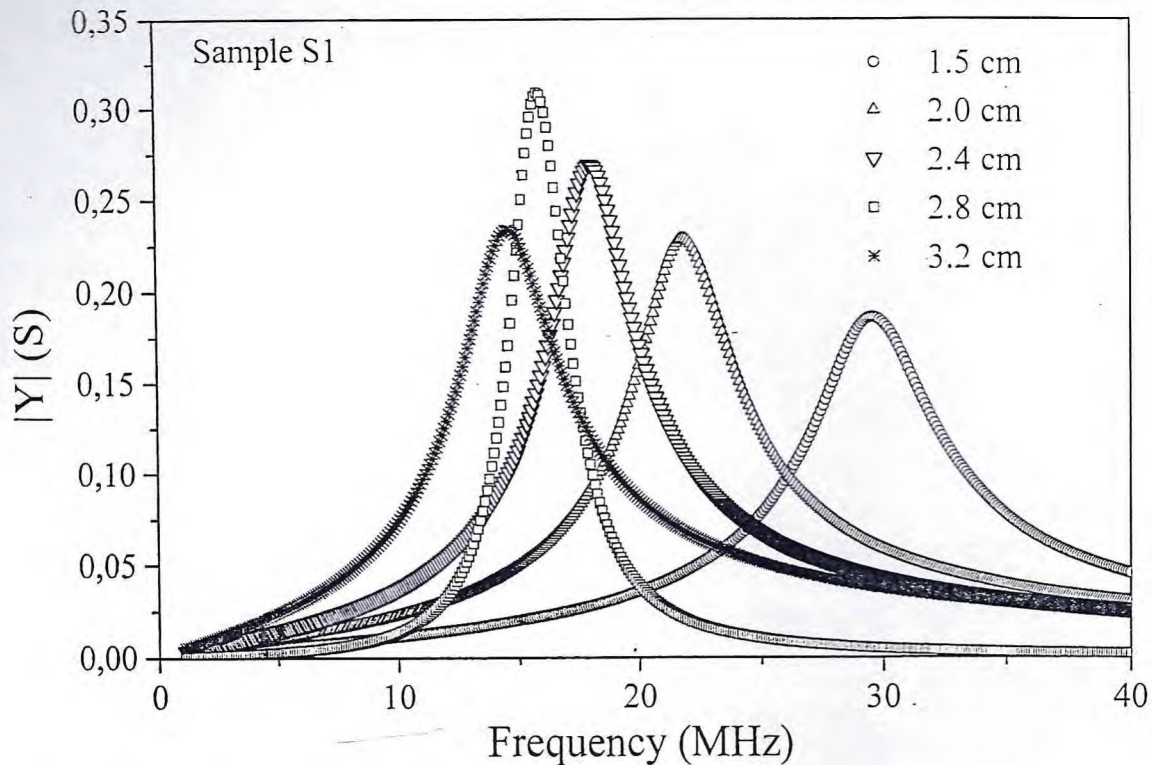


Figure 4 Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S1 (anionic collagen).

which could explain the increase of the piezoelectricity.

In this paper we did a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of anionic and native collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for the anionic and native collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to the alkaline treatment present lower thermal stability than those made from native collagen. However the treated samples presents a higher piezoelectricity compared with the native collagen. The frequency constant $f \cdot L$ obtained for the alkaline-treated sample (72 h) presents a higher value for the samples under study (444.1 kHz · m). We believe that the alkaline treatment leads to an increase of the organization of the microscopic structure of the sample, which could result in an increase of the piezoelectricity.

Acknowledgments

This work was partly sponsored by FINEP, CNPq (Brazilian agencies). The authors also acknowledge P. L. Sombra for the help with the draw of the experimental setup.

References

1. S. MASCARENHAS. "Bioelectrets: Electrets in Biomaterials and Biopolymers." Topics in Applied Physics, Vol. 23, Electrets (Springer-Verlag, Berlin, 1987).
2. E. FUKADA, "Piezoelectricity and Pyroelectricity of Biopolymers." Ferroelectric Polymers (Marcel Dekker, 1995) pp. 393–439.
3. M. E. NIMNI. "Collagen: Biotechnology." Vol. 3 (CRC Press, 1988).
4. J. A. CHAPMAN. *Electron Microsc. Rev.* **3** (1990) 143–182.
5. K. E. KADLER. *Biochem. J.* **316** (1996) 1–11.
6. G. W. HASTNIGS and F. A. MAHMUD. *J. Biomed. Eng.* **10** (1988) 515–521.
7. J. B. PARK and R. S. LAKES. "Biomaterials: An Introduction" (Plenum Press, New York, 1992).
8. A. A. MARINO *et al.* *Calcif. Tissue Int.* **31** (1980) 257–259.
9. G. GOISSIS and C. M. MORIAK. BR 9.000.972, 2 de março de 1990.
10. J. S. ROMERO, M. PONS, M. C. COQUE and G. R. RAMOS. *Analytical Letters* **27**(8) (1994) 1557–1567.
11. T. IKEDA. "Fundamentals of Piezoelectricity" (Oxford Science Publishers, 1996).
12. T. G. NETTO and R. L. ZIEMMERMAN. *Biophysical Journal* **15** (1975) 573–576.
13. G. N. RAMACHANDRAN. Treatise on Collagen. Vol. 1 (London, Academic Press, 1967).
14. A. VEIS. "The Macromolecular Chemistry of Gelatin" (Academic Press, 1964).
15. A. COOPER. *Biochem. J.* **118** (1970) 353.
16. D. G. WALLACE. *Biopolymers* **29** (1990) 1015–1026.

Received 9 December 1998

and accepted 24 February 1999

Effect of the pH on the piezoelectric properties of collagen films

C.C. Silva ^a, A.G. Pinheiro ^b, D. Thomazini ^c, J.C. Góes ^d, S.D. Figueiró ^e,
J.A.C. de Paiva ^b, A.S.B. Sombra ^{b,*}

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica-UFC, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Laboratório de Óptica não Linear e Ciência dos Materiais (LONLCM) Departamento de Física,
Universidade Federal do Ceará Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Universidade de Fortaleza-UNIFOR, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Departamento de Engenharia Mecânica-UFC, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Departamento de Bioquímica-UFC, Caixa Postal 6030, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

Received 4 December 2000; accepted 16 January 2001

Abstract

In this paper, we did a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant S_{55} , and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to different pH treatment lead to different electrical behavior. For sample S2 (pH = 5.2) one has a higher denaturation temperature ($T_d = 80.55^\circ\text{C}$), lowest density ($\rho = 909.6 \text{ kg m}^{-3}$), highest dielectric function, lowest frequency constant product ($f \times L = 320.33 \text{ kHz.m}$) and higher piezoelectricity ($d_{14} = 0.122 \text{ pC/N}$) which is our major interest in this study. The loss factor Q^{-1} measured for all the samples shows that for all the electrodes dimensions sample S2 present the highest loss factor which is between 0.68 and 0.76. We believe that the different pH treatment is critical to the final level of organization of the microscopic structure of the sample, which could result in an increase of the piezoelectricity. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Collagen films; Piezoelectric properties; Loss factor

1. Introduction

Collagen, which exists in a variety of morphological forms, is the most abundant structural protein of the animal connective tissue and has a long history as biomaterial [1]. Individual molecules of collagen, which are semi flexible rods $\sim 280 \text{ nm}$ in length and $\sim 1 \text{ nm}$ in diameter, undergo self-assembly to form interwoven network-like structures, ranging from long fibrils to complex. The native fibril possess a high degree of axial alignment of collagen molecules and are characterized by a regular stagger of approximately 1/4 of a rod length between each molecule and its axially aligned neighbor, which is characterized by a banding pattern

with a $\sim 67 \text{ nm}$ period [2]. Type I collagen molecules form stable solutions in acids, $\text{pH} \leq 3.5$ and low ionic strength at any temperature from freezing to denaturation. Monomeric native molecules are also soluble and form stable solutions at $3.5 \leq \text{pH} \leq 7.4$ and low ionic strength at temperatures in the range from freezing to maximum of 20°C . At temperatures greater than this, aggregates and fibrils begin to form, although the rates obviously depend on the solution conditions. The fibrils, which ultimately form are usually well ordered pattern similar to those observed in vivo. Self-assembly in pure systems is very dependent upon the temperature, ionic strength, nature of the added salt, and pH, which suggests that growth of the fibrils is largely directed by hydrophobic and electrostatic forces [3]. Collagen fibril assembly is an example of an entropy-driven self-assembly process, which is driven by the loss of collagen-bound solvent molecules [4].

* Corresponding author.

E-mail address: sombra@ufc.br (A.S.B. Sombra).

The piezoelectric properties of collagen have been investigated in complex biological systems such as bone and tendon. The piezoelectric properties of bone are of interest in view of their role in bone remodeling [5]. The stress generated potential of bone promoted osteogenesis, which are mediated by electrical current generated by piezoelectric materials through changing pressure [6]. The magnitude of the piezoelectric sensitivity coefficients of bone depends on frequency, on direction of load, and on relative humidity. Values up 0.7 pC/N have been observed in bone [7]. Marino and et al. [8] examined the relation between collagen's film piezoelectricity and its electron microscopic appearance, in films with different degree of organization, and suggested that the piezoelectric effect originate either at the level of tropocollagen. In this paper, we did a study of collagen membranes prepared in different pH: 4.1, 5.2, 6.3 and 7.4 (samples S1, S2, S3, S4, respectively), followed by extensive water washes and dried in laminar flow of air. We did a study of the piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant S_{55} and the dielectric function ϵ_{11} of the samples. The loss factor Q^{-1} of the samples was also measured using the admittance resonance method.

2. Experimental methods

2.1. Soluble collagen

The collagen was prepared by solubilization of collagen from bovine serosa after 72 h of treatment under alkaline conditions in presence of salts, followed by homogenization in acetic acid solution, at pH 3.5 [9]. The samples were dialyzed against acetic acid solution, at pH 3.5, and brought to a final concentration of 1%, determined by hydroxyproline [10].

2.2. Films

The membranes, casted in acrylic molds from a collagen solution, were equilibrated in phosphate buffer by 24 h, 0.1 3 mol l⁻¹, in the following pH: 4.1, 5.2, 6.3 and 7.4 (samples S1, S2, S3, S4, respectively), followed by extensive water washes and dried in laminar flow of air.

2.3. Thermal analysis

The thermal stability of the collagen samples (S1, S2, S3, S4) were determined by measures of its denaturation temperature, using an equipment Shimadzu DSC-50, membranes samples were sealed in aluminum cell and heated up with rate of 5°C min⁻¹ with N₂ atmosphere.

2.4. Microscopy

The photomicrograph of membranes of collagen, casted in phosphate buffer pH 7.4 under 0.15 mol L⁻¹ of ionic strength, were obtained on a Scanning Electron Microscope with Energy Dispersive Spectroscopy (ED S), Phillips XL-30, operating with bunches of primary electrons ranging from 12 to 20 keV, in rectangular lyophilized samples, covered with a layer of carbon of 30 nm of thickness.

2.5. Dielectric function measurements

The complex dielectric function measurements were performed with a HP 4291 A Material Impedance Analyzer in conjunction with a HP 4194 Impedance Analyzer, which jointly cover the region of 100 Hz–1.8 GHz. The electrodes were deposited by painting silver powder suspension.

3. Piezoelectric model

Piezoelectricity may exist for certain symmetries of crystalline structures. In general, anisotropic crystals have the piezoelectric effect and their piezoelectric constants can be represented by the matrix:

$$d_{ij} \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix}$$

Where d_{ij} are called as the piezoelectric strain constants. Some of them are null, according to the symmetry of the material [12]. In the case of natural biopolymers, the symmetry observed is $D_{\infty 2}$, which show only shear piezoelectricity. In this case $d_{25} = -d_{14}$. In the case of bone, the piezoelectricity appears only when the shearing force acts on the orientated collagen fibers so that they slip past one another [11]. Shear piezoelectricity is observed almost universally for the oriented textures of biopolymers [11]. For this symmetry the tensor d_{ij} is given by [11]:

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Shear piezoelectricity is also observed for the oriented films of a variety of synthetic polymers with optical activity. For the same symmetry group the dielectric tensor ϵ_{ij} is given by:

$$\begin{pmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{pmatrix}$$

For this symmetry the elastic compliance tensor S_{ij} is given by

$$\begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & 0 & 0 & 0 \\ S_{12} & S_{11} & S_{13} & 0 & 0 & 0 \\ S_{13} & S_{13} & S_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & S_{55} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & S_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & S_{66} \end{pmatrix}$$

Rectangular coordinates are assigned to the film sample. The 1 axis is perpendicular to the plane of the sample, plane 2–3 (Fig. 2).

The coupled electromechanical equations for our system is:

$$S_i = S_{ij}^E T_j + d_{ij} E_j \quad (1)$$

$$D_i = \varepsilon_{ij}^T E_j + d_{ij} T_j \quad (2)$$

Where S_i ($S_1 \dots S_6$) is the strain and T_j ($T_1 \dots T_6$) is the stress, E_j is the electric field and D_i is the displacement vector. With constants S_{ij}^E (compliance for constant electric field), ε_{ij}^T (dielectric permittivity for constant stress) and the piezoelectric strain element d_{ij} . Using the tensors defined before in Eqs. (1) and (2), and taking into account that the electric field is applied in direction 1 ($E_2 = E_3 = 0$) one has:

$$D_1 = \varepsilon_{11}^T E_1 + d_{14} T_4 \quad (3)$$

$$S_4 = S_{55}^E T_4 + d_{14} E_1 \quad (4)$$

From Eqs. (3) and (4) one can see the electro-mechanical coupling through the d_{14} piezoelectric tensor element. In this geometry one has a mechanical wave propagating in the plane of the sample ($S_4 \leftrightarrow S_{23}$) coupled with the electric field in the '1' axis. After an easy manipulation one has for D_1 vector:

$$D_1 = \varepsilon_{11}^T \left(1 - \frac{d_{14}^2}{S_{55}^E \varepsilon_{11}^T} \right) E_1 + \frac{d_{14}}{S_{55}^E} S_4 \quad (5)$$

One can define now k_{14} , which is the piezoelectric coupling factor:

$$k_{14}^2 = \frac{d_{14}^2}{S_{55}^E \varepsilon_{11}^T} \quad (6)$$

From the definition of k_{14} , one can define the relations of elastic compliance and electric permittivity measured under different conditions:

$$\frac{S_{55}^D}{S_{55}^E} = \frac{\varepsilon_{11}^S}{\varepsilon_{11}^T} = 1 - k_{14}^2 \quad (7)$$

The piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectric is given by Eq. (6) [12]:

$$d_{14} = k_{14} \sqrt{\varepsilon_{11}^T S_{55}^E} \quad (8)$$

With Eq. (7):

$$k_{14} = \sqrt{1 - \frac{\varepsilon_{11}^S}{\varepsilon_{11}^T}} \quad (9)$$

Where k_{14} is the piezoelectric coupling factor, ε_{11}^T is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance, ε_{11}^S is obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode. The measurement of the dielectric permittivity was done in the range of 1 MHz to 1 GHz in the geometry of Fig. 2 (see Fig. 7). The obtained values for 1 MHz, and 1 GHz could be found in Table 1. In our calculations we assume ε_{11}^T at 1 MHz (below the piezoelectric resonance frequency) and ε_{11}^S at 1 GHz (above resonance). From Eqs. (3) and (4), one has for T_4 :

$$T_4 = \frac{1}{S_{55}^D} S_4 - \frac{d_{14}}{S_{55}^E \varepsilon_{11}^S} D_1 \quad (10)$$

assuming that $\partial D_1 / \partial x_4 = 0$ we can obtain the equation of motion:

$$\frac{\partial^2 u_4}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho S_{55}^D} \frac{\partial^2 u_4}{\partial x_4^2} \quad (11)$$

Where u_4 is the displacement on the plane of the sample (plane perpendicular to electric field, see Fig. 2), and ρ is the density. The obtained velocity is:

$$V = \frac{1}{\sqrt{\rho S_{55}^D}} = \frac{\omega}{k} \quad (12)$$

Where ω is the frequency and k is the wavenumber ($k = 2\pi/\lambda$). The elastic compliance S_{55}^D , which is determined from the successive resonance frequencies of the shear mode could be calculated from Eq. (12), assuming that the most pronounced resonances are those

Table 1

Denaturation endotherm T_d , Density (ρ), thickness (e), dielectric permittivity (ε), frequency constant ($f \times L$) and piezoelectricity (d_{14}) of samples S1, S2, S3, and S4

	pH	T_d (°C)	ρ [Kg m ⁻³]	e μ m	1 MHz $\varepsilon_{11}^T/\varepsilon_0$	1 GHz $\varepsilon_{11}^S/\varepsilon_0$	$f \times L$ [kH.m]	d_{14} [10^{-12} CN ⁻¹]
S1	4.1	64.12	970.3	77.13	1.83	1.48	445.37	0.071
S2	5.2	80.55	909.6	76.53	2.13	1.65	320.33	0.122
S3	6.3	65.76	984.6	54.86	1.60	1.34	423.94	0.057
S4	7.4	65.22	913.96	54.13	1.64	1.41	449.88	0.056

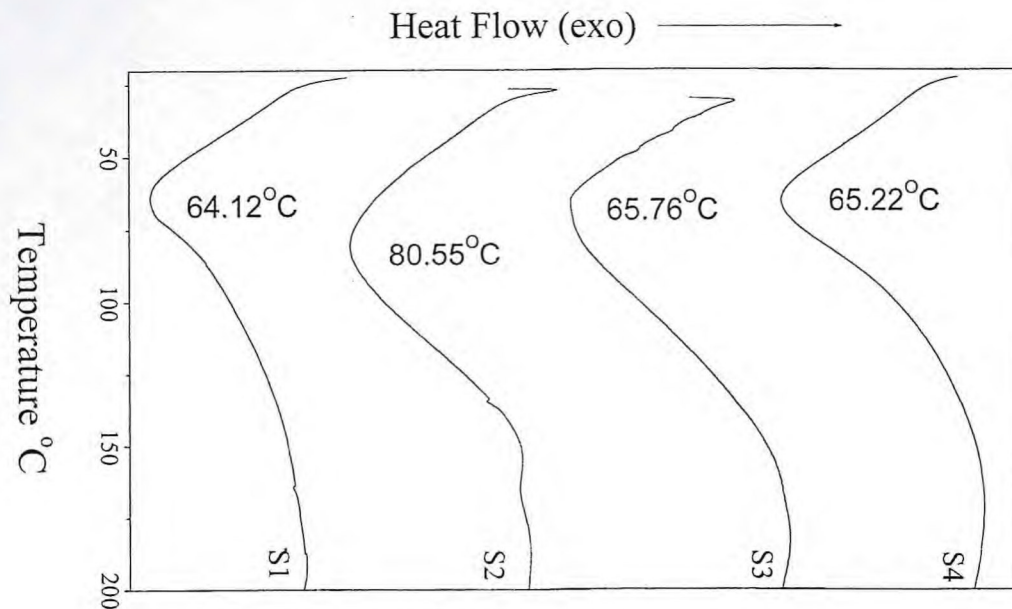


Fig. 1. DSC curves of the samples S1, S2, S3 and S4.

where the body can accommodate one half wavelength of the standing elastic wave ($L = \lambda/2$). In this case one can obtain s_{55}^D from Eq. (12)

$$s_{55}^D = \frac{1}{4\rho(f \times L)^2} \quad (13)$$

Where $f \times L$ is the frequency constant which is the product of the resonance frequency and the diameter of the sample (controlling dimension of the sample, $L > e$, see Fig. 2) and ρ is the sample density. From the experimental measurement of ϵ_{11}^T , ϵ_{11}^S , $f \times L$ and ρ one can obtain s_{55}^D (Eq. (13)), k_{14} (Eq. (9)) and d_{14} (Eq. (8)). In Table 1 one has the experimental values of these constants under study.

3.1. Loss factor measurement

For the ceramics that are used as transducers for the generation of ultrasonic waves, considerable heat, is generated in the transducer at a high power level, and thus limits the maximum radiated power. The origin of this effect has been investigated by some authors. Some of them attributed it to the dielectric hysteresis [17], but its main cause was interpreted as the internal friction of the ceramic [12]. The dissipation of mechanical energy near the resonance must be represented by an internal resistance. For the piezoelectric ceramics the internal friction and dielectric loss are found to be mostly caused by the dissipations within the grain crystallite, and the major contribution of the dissipation in the grain may be the average in some sense, involving mechanical and dielectric loss losses of single domain crystal. The loss factor was measured Q^{-1} using the electric admittance resonance curve by:

$$Q^{-1} = \frac{f_2 - f_1}{f_0}$$

The frequencies corresponding to $|Y| = |Y_m| 0.707$ are indicated by f_2 and f_1 where $|Y_m|$ is the peak value of the resonance and f_0 is the frequency of the resonance.

4. Results and discussion

Fig. 1 shows the DSC curves of collagen films. The main feature in the DSC curves of collagen are the denaturation endotherm, at 64.12, 80.55, 65.76 and 65.22°C for samples S1, S2, S3 and S4, respectively (See Table 1). We can explain these results by the fact that at pH 5.2 (sample S2) the protein might be near to its isoelectric point. This low isoelectric point can be explained by the fact that alkaline treatment of the protein may hydrolyze the carboxamide residues of asparagine and glutamine [13]. This hydrolysis results in a net negative charge of collagen molecules at neutral pH. The thermodynamics and kinetics of the collagen precipitation have been extensively studied [14,15]. Temperature, pH and ionic strength all exert profound effects on fibril precipitation. Primarily electrostatic and hydrophobic interactions between amino acid side chains neighbouring collagen triple helices stabilize the fibers. Attractive interactions result from pairing of oppositely charged amino acids and repulsive interactions result of like charged amino acids. The changes in net charge and number of ionized groups as pH varies would be expected to exert a significant effect on forces between molecules in fibers and hence on fiber physical properties [16].

In Fig. 2 one has the sample geometry we used for the dielectric and piezoelectric measurements. Rectangular coordinates are assigned to the samples as shown in Fig. 2. The 2–3 plane is the sample plane, and the 1 axis is perpendicular to the plane of the sample. The flat faces of the samples are painted with a silver electrode. The thickness and the diameter of each sample are found in Table 1. For all the studied samples the diameter ' L ' was varied between 1.2 and 4 cm, and the thickness ' e ' was 77.13, 76.53, 54.86 and 54.13 μm for samples S1, S2, S3 and S4, respectively. In Fig. 3 one has the frequency dependence of the absolute value $|Y|$ of the admittance of sample S1. The measurement was done with the sample in disk type geometry as shown in Fig. 2. In this figure, one has six measurements for six different diameters of the disk, which is indicated in the figure. From Fig. 3, the frequency constant, $f \times L$ associated to the shear piezoelectric mode of this sample

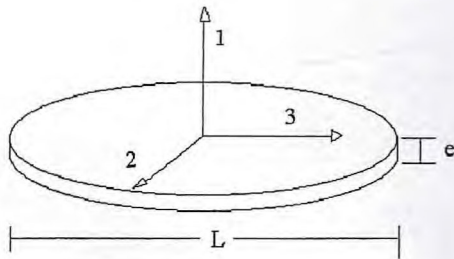


Fig. 2. A rectangular coordinate assigned to the sample for the measurement of piezoelectric and dielectric constant.

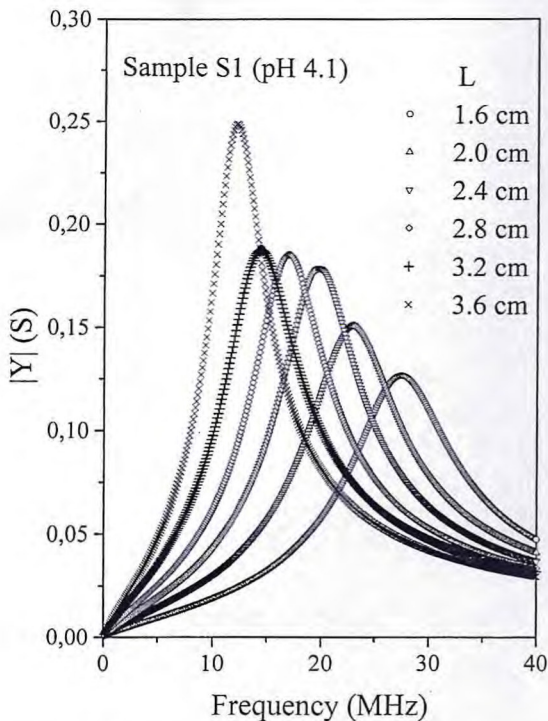


Fig. 3. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S1.

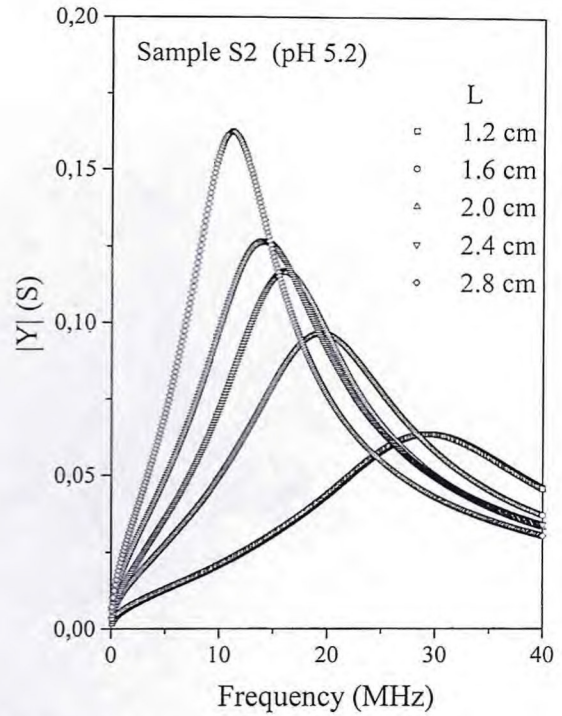


Fig. 4. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S2.

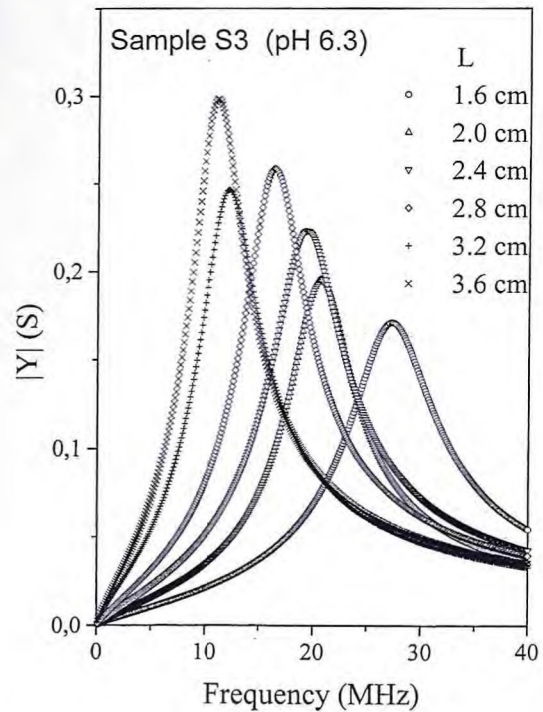


Fig. 5. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S3.

was obtained. The average value obtained for the shear mode was $f \times L \sim 445.37 \text{ kHz}\cdot\text{m}$, which is a value, of about two orders of magnitude higher compared with PZT [11]. In Figs. 4–6 one has the admittance of samples S2, S3 and S4. In Fig. 7 one has the dielectric

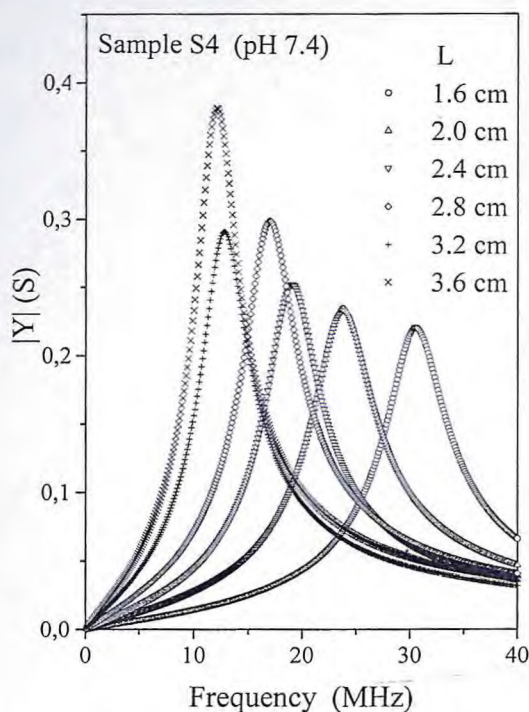


Fig. 6. Electrical admittance as a function of external frequency and the disk diameter (L) for sample S4.

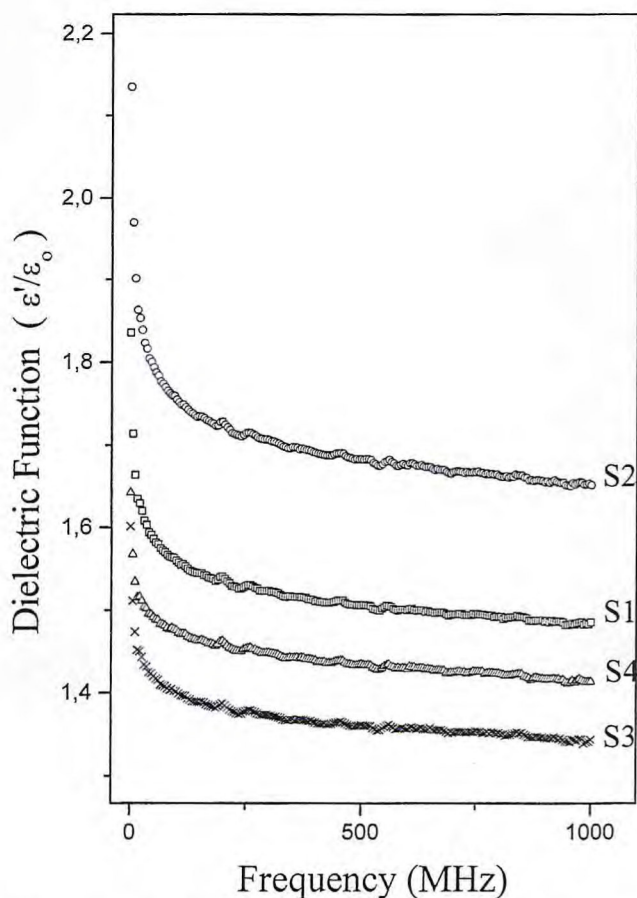


Fig. 7. Dielectric function of the samples as a function of the frequency.

function in the region of 1 MHz to 1 GHz to all the samples. One can observe that sample S2 (pH = 5.2) present the highest value for the dielectric permittivity in the region under study. From Fig. 7 one has the dielectric permittivity ϵ_{11}^T at 1 MHz (which is the dielectric permittivity obtained by a measurement of the capacitance at a frequency below the fundamental resonance) and ϵ_{11}^S at 1 GHz (which is the dielectric permittivity obtained by measurement of the capacitance at a frequency above the resonance mode), (Fig. 7). With the experimental measurements of ϵ_{11} , $f \times L$ and ρ and using Eqs. (8), (9) and (13) one can obtain the piezoelectric strain element d_{14} for the shear piezoelectricity (see Table 1). The piezoelectric strain tensor element d_{14} obtained for sample S1 was around 0.071 pC/N, which is in good agreement compared with values reported in the literature obtained with other techniques [8,11]. In [8] collagen films was prepared by evaporation and electro-deposition from solution. It was observed the electrodeposited films were more organized presenting higher piezoelectric coefficients than the evaporated films, with values around 0.076 pC/N. From Table 1 one observe that sample S2 (pH 5.2) presents the higher denaturation temperature ($T_d = 80.55^\circ\text{C}$), lowest density ($\rho = 909.6 \text{ Kg m}^{-3}$), highest dielectric function, lowest frequency constant product ($f \times L = 320.33 \text{ kHz.m}$) and higher piezoelectricity ($d_{14} = 0.122 \text{ pC/N}$) which is our major interest in this study. In Table 2 one has all the values of the loss factor Q^{-1} for all the samples. For all the electrodes dimensions sample S2 present the highest loss factor which is between 0.68 and 0.76.

In Fig. 8, the photomicrographs of casted membranes do not show any morphological feature with the microfibrillar structure, typical of native collagen which were formed in these conditions. However, the sample S2 shows a higher organization of the microscopic structure on its surface, which could explain the increase of the piezoelectricity.

5. Conclusions

In this paper we did a study of the physicochemical, dielectric and piezoelectric properties of collagen films, considering the development of new biomaterials which have potential applications in coating of cardiovascular prostheses, support for cellular growth and in systems for controlled drug delivery. The piezoelectric strain tensor element d_{14} , the elastic constant s_{55} and the dielectric permittivity ϵ_{11} were measured for collagen films. It was observed that the collagen samples submitted to different pH treatment lead to different electrical behavior. For sample S2 (pH = 5.2) one has a higher denaturation temperature ($T_d = 80.55^\circ\text{C}$), lowest density ($\rho = 909.6 \text{ Kg m}^{-3}$), highest dielectric function,

Table 2
Loss factor (Q^{-1}) for each sample as a function of the sample diameter

	pH	$L = 1.6 \text{ cm } Q^{-1}$	$L = 2.0 \text{ cm } Q^{-1}$	$L = 2.4 \text{ cm } Q^{-1}$	$L = 2.8 \text{ cm } Q^{-1}$	$L = 3.2 \text{ cm } Q^{-1}$	$L = 3.6 \text{ cm } Q^{-1}$
S1	4.1	0.32	0.34	0.34	0.39	0.44	0.37
S2	5.2	0.71	0.68	0.76	0.69	0.78	0.72
S3	6.3	0.26	0.27	0.31	0.32	0.41	0.39
S4	7.4	0.17	0.22	0.25	0.27	0.31	0.28

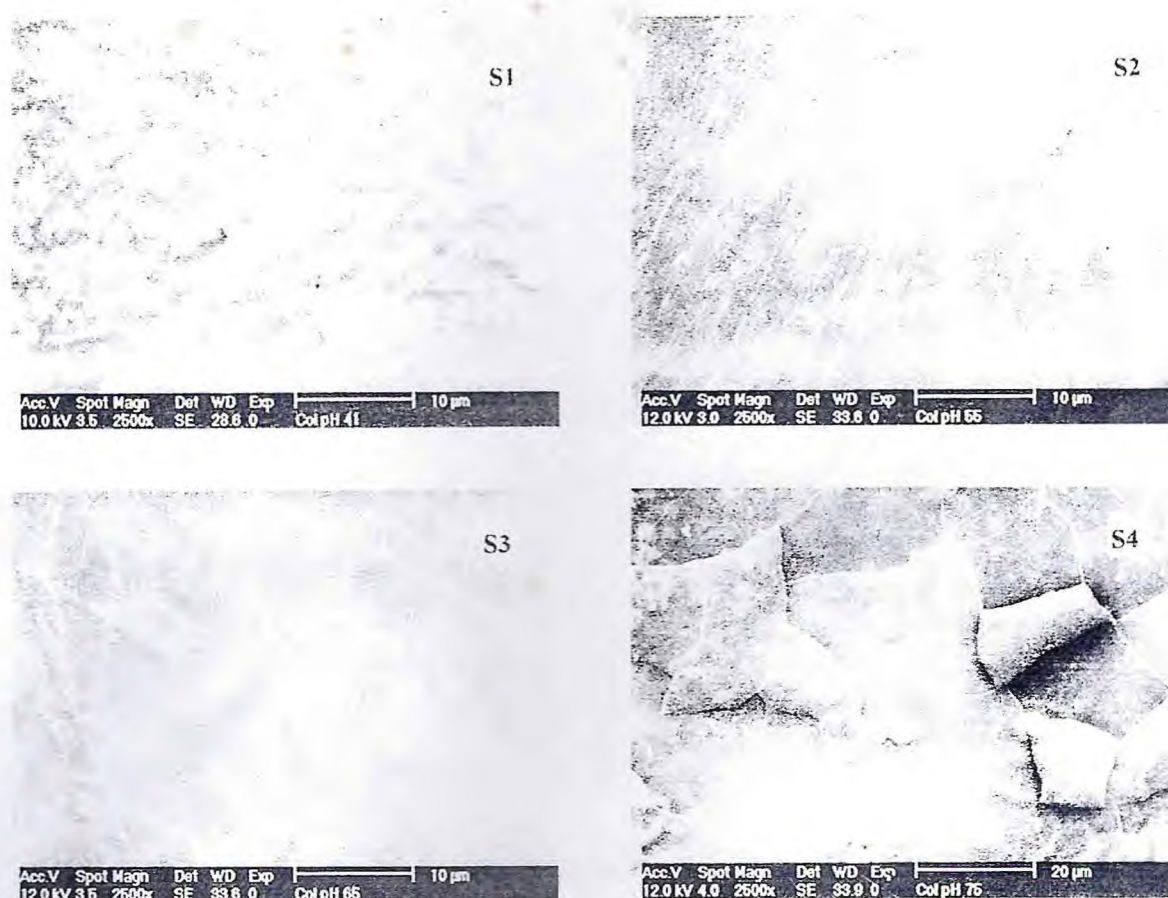


Fig. 8. Photomicroscopy of the samples.

lowest frequency constant product ($f \times L = 320.33 \text{ kHz.m}$) and higher piezoelectricity ($d_{14} = 0.122 \text{ pC/N}$) which is our major interest in this study. The loss factor Q^{-1} measured for all the samples shows that for all the electrodes dimensions, sample S2 presents the highest loss factor which is between 0.68 and 0.76. We believe that the different pH treatment is critical to the final level of organization of the microscopic structure of the sample, which could result in an increase of the final piezoelectricity.

Acknowledgements

This work was partly sponsored by FINEP, CNPq, CAPES (Brazilian agencies). The authors also acknowl-

edge P.L. Sombra for the help with the draw of the experimental setup.

References

- [1] M.E. Nimni, Collagen: Biotechnology, vol. 3, CRC, Boca Raton, FL, 1988.
- [2] J.A. Chapman, Electron Microsc. Rev. 3 (1990) 143–182.
- [3] R. Komasa-Penkova, Biochim. Biophys. Acta 1297 (1996) 171–181.
- [4] K.E. Kadler, Biochem. J. 316 (1996) 1–11.
- [5] G.W. Hastnigs, F.A. Mahrhud, J. Biomed. Eng. 10 (1988) 515–521.
- [6] F. Jianqing, Y. Huipin, Z. Xingdong, Biomaterials 18 (1997) 1531–1534.
- [7] J.B. Park, R.S. Lakes, Biomaterials: An Introduction, Plenum Press, New York, 1992.

- [8] A.A. Marino, et al., *Calcif. Tissue Int.*, Vol. 31, 257–259 1980.
- [9] G. Goissis, C.M. Moriak, BR 9.000.972, 2 de março de 1990.
- [10] J.S. Romero, M. Pons, M.C. Coque, G.R. Ramos, *Analytical Lett.* 27 (8) (1994) 1557–1567.
- [11] E. Fukada, *Ferroelectric Polymers*, Marcel Dekker Inc, New York, 1995, pp. 393–439.
- [12] T. Ikeda, *Fundamentals of Piezoelectricity*, Oxford Science Publication, Oxford, 1996.
- [13] A. Veis, *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*, Academic press, New York, 1964.
- [14] G.N. Ramachandran, *Treatise on Collagen*, vol. 1, Academic Press, London, 1967.
- [15] A. Cooper, *Biochem. J.* 118 (1970) 353.
- [16] D.G. Wallace, *Biopolymers* 29 (1990) 1015–1026.
- [17] T. Ikeda, *J. Phy. Soc. Jpn.* 13 (1958) 809.