

Caracterização e extração de colágeno solúvel em ácido a partir de tendão bovino visando sua aplicação como biomaterial

Characterization and acid-soluble collagen extraction from bovine tendon targeting your application as biomaterial

Mariana Chiocheta Bueno
marianabueno@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Rafaela Valcarenghi
rafaelavalcarenghi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Mariana de Souza Sikora
marianasikora@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

RESUMO

Biomateriais à base de colágeno têm sido amplamente utilizados devido às suas capacidades, no quesito de biocompatibilidade e bioaceitação. Neste trabalho, o colágeno tipo I solúvel em ácido foi extraído de tendão bovino liofilizado usando uma extração ácida. Diferentes quantidades de tendão (2,5; 5,0; 7,5; 10 e 14,0 g) foram imersas em 0,5 L de ácido acético 3,5 mol L⁻¹ contendo 5 mg mL⁻¹ de pepsina por 48 horas a 4 ° C com agitação contínua. O sobrenadante foi coletado por centrifugação e em seguida a solução de colágeno foi salgada pela adição de NaCl (0,05 g L⁻¹, 72 h). O precipitado foi dialisado contra Na₂HPO₄ 0,2 mol L⁻¹ e PBS durante 72 h (12 h cada) sob 4° C para remover o sal. Após a purificação, as amostras foram liofilizadas, pesadas e, posteriormente, o rendimento do processo de extração foi calculado. Um aumento no rendimento foi observado com o aumento da massa do tendão. O maior rendimento foi obtido para 10 g de tendão liofilizado (7,04%), enquanto que para 14,0 g houve redução no rendimento (6,33%). As amostras foram caracterizadas por FTIR mostrando bandas características de colágeno tipo I e uma morfologia de fibras aglomeradas pôde ser observada por MEV.

PALAVRAS-CHAVE: Biomaterial. Tendão bovino. Colágeno tipo I.

ABSTRACT

Collagen-based biomaterials have been widely used because of their biocompatibility and bioaccumulation capabilities. In this work, acid-soluble type I collagen was extracted from lyophilized bovine tendon using acid extraction. Different amounts of tendon (2.5, 5.0, 7.5, 10 and 14.0 g) were immersed in 0.5 L of 3.5 mol L⁻¹ acetic acid containing 5 mg mL⁻¹ of pepsin per 48 hours at 4° C with continuous stirring. The supernatant was collected by centrifugation and then the collagen solution was salted by the addition of NaCl (0.05 g L⁻¹, 72h). The precipitate was dialyzed against 0.2 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ and PBS for 72 h (12 h each) at 4° C to remove the salt. After purification, the samples were lyophilized, weighed, and thereafter the yield of the extraction process was calculated. An increase in yield was observed with increased tendon mass. The highest yield was obtained for 10 g of lyophilized tendon (7.04%), while for 14.0 g there was reduction in yield (6.33%). The samples were characterized by FTIR showing characteristic bands of type I collagen and a morphology of agglomerated fibers could be observed by MEV

KEYWORDS: Biomaterial. Bovinetendon. Type I collagen.

Recebido: 29 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Matrizes de colágeno na forma de fibras, revestimentos e filmes são usados extensivamente para aplicações em biomateriais, para o desenvolvimento e regeneração normal dos tecidos. As propriedades específicas dessas matrizes, tanto em termos de características físicas e químicas, têm um impacto direto na adesão celular e no crescimento ósseo (ABRAHAM et al., 2008).

As fibras de colágeno são conjuntos de macromoléculas biológicas mais abundantes na matriz extracelular, onde fornecem as principais estruturas e suporte mecânico aos tecidos. Constitui aproximadamente 25-30% do total de proteínas encontradas em organismos multicelulares e contém diferentes tipos de colágeno, nomeados do tipo I ao tipo XXVII, que varia consideravelmente em sua complexidade e diversidade de estrutura (OLIVEIRA, 2016). As fibras de colágeno tipo I alinhadas são o principal motivo estrutural para tendão e ligamento e, portanto, os biomateriais com base nessas estruturas são considerados candidatos promissores para mediar a regeneração desses tecidos (KEW et al., 2011).

O colágeno pode ser extraído de várias fontes, as mais comuns para aplicações de engenharia de tecidos incluem pele e tendão bovino, os colágenos formadores de fibrilas são os mais comumente usados na produção de biomateriais à base de colágeno, no caso o colágeno do tipo I (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). Pode ser isolado através de vários métodos de extração, sal neutro ou alcalino, com ácido acético, ácido propiônico e enzimático. A extração ácida requer baixas temperaturas, removendo as impurezas sem que haja a desnaturação da proteína, utilizando vários reagentes, como por exemplo ácido acético e pepsina. A purificação pode ser feita através da precipitação salina e dialise (OLIVEIRA et al., 2017).

METODOLOGIA

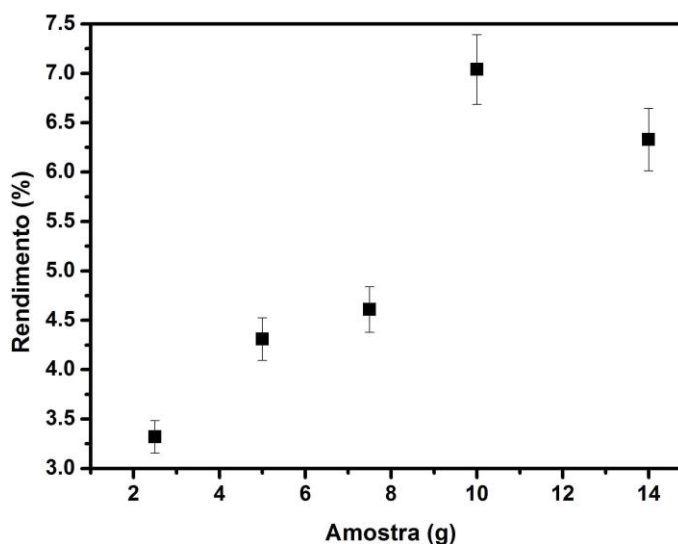
Várias massas em gramas de tendão de carne bovina foram usadas para obter o rendimento do processo de extração de colágeno (2,5; 5,0; 7,5; 10 e 14,0)g. O tendão bovino limpo foi liofilizado e cortado em pedaços de 1 cm². Em seguida as frações foram pesadas e tratadas em 500 mL de uma solução de ácido acético 3,5 mol L⁻¹ com adição de 5 g L⁻¹ de pepsina, a maior parte do colágeno pode ser solubilizado com esta enzima. O sistema permaneceu sob agitação contínua a baixa temperatura (4° C), por 48 horas, até a formação de um gel. Após 48 horas no refrigerador, o gel obtido foi filtrado e posteriormente precipitado em 350 mL de uma solução com NaCl 0,05 mol L⁻¹ onde pode-se observar a precipitação do colágeno. O sobrenadante foi coletado e centrifugado à 3500 rpm por 45 minutos. O excesso de sal e ácido acético no colágeno, foi removido por dialise, onde o precipitado foi dialisado contra Na₂HPO₄ 0,2 mol L⁻¹ e tampão fosfato (PBS) durante 72 h (12 h cada) sob 4°C.

As amostras foram liofilizadas após a purificação, pesadas e, posteriormente foi calculado o rendimento do processo de extração. As amostras foram caracterizadas com o auxílio Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Error! Reference source not found.**, mostra a quantidade de tendão utilizada no estudo e suas respectivas porcentagens de rendimento de colágeno que foi extraído.

Figura 1 – Quantidade de tendão bovino utilizadas para extração de colágeno e rendimento.

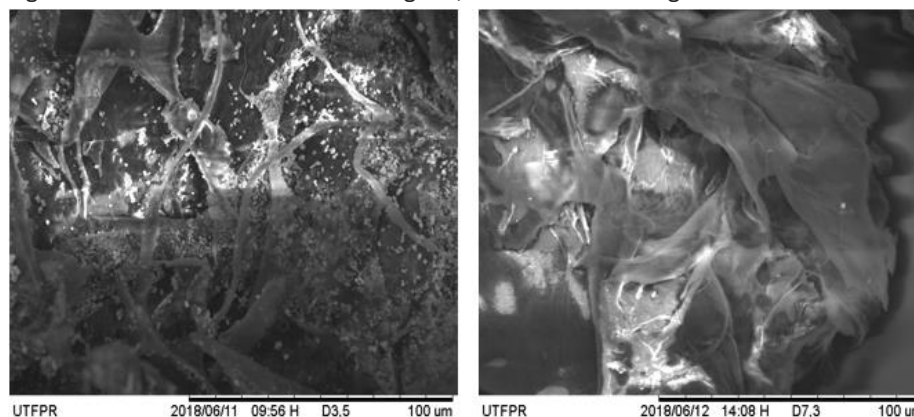


Fonte: Autoria própria (2018).

O maior rendimento obtido neste processo, foi com 10 g de tendão liofilizado (7,04%), enquanto que para 14 g houve uma redução no rendimento (6,33%), foram utilizadas várias proporções, no âmbito que o colágeno fosse o reagente limitante da reação. Nas condições estudadas, a melhor proporção de colágeno extraído foi com 10 g de tendão.

A análise do microscópio eletrônico de varredura, Figura 2, confirma a presença de estruturas fibrilares aglomeradas (ABRAHAM et al., 2008).

Figura 1 – MEV das amostras de colágeno, utilizando 10 e 14 g de tendão bovino



Fonte: Autoria própria (2018).

Este colágeno tem uma conformação de três subunidades polipeptídicas, apresentando uma conformação de hélice tripla e uma estrutura composta de cadeias que são ligadas por uma ligação de hidrogênio forte, elas se ligam devido a sua estrutura molecular semelhante (CHAPMAN et al., 1990).

O espectro vibracional FTIR mostrou a estrutura da tripla hélice do colágeno, através da relação das absorbâncias medidas entre 1250 e 1450 cm^{-1} , devidas à amida III (BET; GOISSIS; PLEPIS, 1997). As amostras de colágeno mostraram bandas características de colágeno do tipo I.

As ligações de hidrogênio nas proteínas de colágeno ocorrem entre os grupos hidroxila e carboxila presente nas três cadeias peptídicas e são responsáveis por manter a estabilidade da tripla hélice. Já os grupos da função orgânica amida (I, II, III) apresentam vibrações características. (CHANG; TANAKA, 2002).

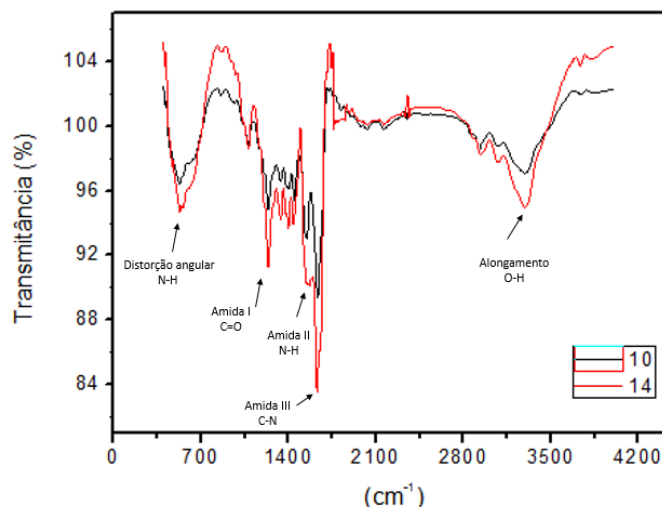
A faixa relacionada à vibração de alongamento do grupo carbonila (amida I) corresponde a um marcador sensível da estrutura secundária do peptídeo. As bandas correspondentes aos grupos amida II e amida III também são sensíveis a alterações na estrutura secundária da proteína (DE CASTRO et al., 2014). A **Error! Reference source not found.** e o **Error! Reference source not found.**, mostram as bandas características do colágeno do tipo I.

Quadro 1 – Bandas características do colágeno do tipo I

Grupo funcional	Região de comprimento de onda (cm^{-1})
Amida I, C=O	1627-1632
Amida II, N-H	1545- 1552
Amida III, C-N	1236-1537
Alongamento O-H	3296-3299
Distorção angular N-H	525- 529

Fonte: Adaptado de (DE CASTRO et al., 2014)

Figura 3 –Espectro infravermelho de colágeno solúvel em ácido de tendão bovino usando



Fonte: Autoria própria (2018).

CONCLUSÃO

A extração de colágeno tipo I com ácido acético e pepsina foi eficiente, a enzima auxiliou na extração do colágeno, apesar de apresentar um baixo rendimento. A extração do colágeno tipo I pôde ser comprovada uma vez que as ligações características da proteína orgânica foram observadas pela análise de infravermelho. A maior porcentagem de colágeno foi de 7,04%, utilizando 10g de tendão bovino. Os resultados deste estudo mostram que o rendimento máximo do processo de extração é obtido com 10g/500 mL (HAc 3,5 mol L⁻¹ + pepsina 5 g L⁻¹), para valores superiores à este maiores volumes de solução devem ser utilizados.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, L. C. et al. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 264–285, 2008.
- CHANG, M. C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 4811–4818, 2002.
- DE CASTRO, K. C. et al. Obtention and Characterization of Collagen and Chitosan Based Cements for Bone Regeneration. Part 1: Extraction and Characterization of Collagen. **Materials Science Forum**, [s. l.], v. 775–776, n. November, p. 29–33, 2014. Disponível em: <<http://www.scientific.net/MSF.775-776.29>>



KEW, S. J. et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 3237–3247, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.002>>

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1863>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Pato Branco.