

ITALIAN LEATHER
RESEARCH INSTITUTE



STAZIONE SPERIMENTALE
PER L'INDUSTRIA DELLE PELLI
E DELLE MATERIE CONCIANTI

FOCUS SCIENTIFICO DEL 28 NOVEMBRE

"Uno studio spettroscopico della reticolazione del collagene"

Dr. FRANCESCO DE LAURENTIIS



L'applicazione della spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier ha assunto sempre maggiore importanza come mezzo potente e versatile per l'analisi molecolare. In particolare, si può sfruttare le possibilità offerte da questa tecnica analitica per la valutazione di strutture molecolari e delle loro variazioni correlate a matrici biologiche complesse in abbinamento ad altre tecniche di investigazione come la modellistica molecolare [1].

Un ruolo non secondario nell'applicabilità della tecnica spettroscopica è stato svolto dallo sviluppo di tecniche di campionamento che ampliano la platea dei campioni analizzabili.

Spettri FT-IR del collagene

Il collagene è una delle proteine fibrose della matrice extracellulare (ECM) presente negli animali multicellulari e più abbondantemente nei mammiferi, dove è il maggior componente delle ossa e dell'epidermide. Il collagene consiste di tre catene polipeptidiche organizzate in una conformazione a tripla elica.

Sul collagene animale l'analisi infrarossa in trasmittanza permette di registrare l'assorbimento di determinati gruppi funzionali, in particolare sulla parte polipeptidica sono stati individuati 9 assorbimenti caratteristici relativi alla Banda Amide, di cui 5 (A, B, I, II, III) utili ai fini dell'informazione strutturale.

Banda Amide	Numero d'onda o intervallo (cm ⁻¹)	Origine
A	3500	Risonanza di Fermi tra primo overtone di Amide II e stretching N-H
B	3100	Risonanza di Fermi tra primo overtone di Amide II e stretching N-H
I	1600 ÷ 1700	C=O stretching , correlata a conformazione dello scheletro
II	1510 ÷ 1580	Combinazione di vibrazione di bending <i>in-plane</i> N-H, stretching C-N e C-C
III	1300 ÷ 1400	Bande complesse combinazione di diversi moti coordinati

Tabella I

Ulteriori assorbimenti derivano dalle catene laterali degli amminoacidi componenti, di cui si riportano di seguito i numeri d'onda (cfr. Tabella II) [3]

AS	vibration		cm ⁻¹
Asp	-COO st as	pH>pK (~4.5)	1574
	-COOH st	pH<pK (~4.5)	1716
Glu	-COO st as	pH>pK (~4.4)	1560
	-COOH st	pH<pK (~4.4)	1712
Arg	-CN ₃ H ₅ ⁺ st as		1673
	st s		1633
Lys	-NH ₃ ⁺ bd as		1629
	bd s		1526
Asn	-C=O st		1678
	-NH ₂ bd		1622
Gln	-C=O st		1670
	-NH ₂ bd		1610
Tyr	ring-OH	pH<pK (~10)	1518
	ring-O	pH>pK (~10)	1602
			1498
His	ring		1596
Phe	ring		1494
terminal			
	-COO st as		1598
	-COOH st		1740
	-NH ₃ ⁺ bd as		1631
	bd s		1515
	-NH ₂ bd		1560

frequency, absorbance at the maximum (A₀), full width at half height (FWHH), surface of Gaussian band

st=stretching vibration

bd=bending

s=symmetrical

as=asymmetrical

(according to Venyaminov & Kalnin, [Biopolymers 1990;30\(13-14\):1243-57](#))

Tabella II

Struttura secondaria di composti modello (polipeptidi sintetici)

Polipeptidi modello, aventi strutture secondarie definite, sono stati caratterizzati spettroscopicamente [3] ed in particolare:

β a pieghe

Le strutture presentano 2 disposizioni, parallela (rara) ed antiparallela, delle sequenze di amminoacidi. Le assegnazioni della Banda Amide I sono:

- Beta-strand antiparallela 1629 cm⁻¹ (min 1615 cm⁻¹, max 1637 cm⁻¹) e 1696 cm⁻¹
- Beta-strand parallela vicino 1640 cm⁻¹

α-elica

- Banda Amide I 1652 cm⁻¹
- Banda Amide II 1548 cm⁻¹

β -turn

- Assorbimento vicino a 1680 cm^{-1} (relativo a struttura secondaria non regolare di forma ad anello, che genera inversione di direzione della catena polipeptidica causata da sequenza di amminoacidi prolina-glicina)

Struttura secondaria di proteine

Le assegnazioni spettroscopiche della struttura secondaria sono state rese possibili dalla disponibilità di spettri digitalizzati ad alto rapporto segnale/disturbo. Essi permettono l'elaborazione dei segnali spettrali, come la auto-deconvoluzione di Fourier, per la risoluzione di bande sovrapposte non risolte strumentalmente e l'elaborazione in derivata seconda per la identificazione di picchi.

La molecola di collagene consiste di tre catene polipeptidiche organizzate in una conformazione a tripla elica, che ne costituisce la sua peculiare struttura secondaria, identificabile dal punto di vista spettroscopico dalla banda Amide II situata nell'intervallo $1538 - 1548\text{ cm}^{-1}$ [2].

Le altre assegnazioni sul collagene solubile (acido solubile e pepsina solubile) risultano essere: Amide A intervallo $3292-3315\text{ cm}^{-1}$ (legami ad idrogeno), Amide I 1656 cm^{-1} ; Amide III intervallo $1232-1238\text{ cm}^{-1}$ [4].

Analisi FT-IR di pelle conciata [5,6]

La tecnica di campionamento in *Riflettanza Totale Attenuata* (ATR) si presta alla registrazione di spettri infrarossi su materiali che non possono essere solubilizzati, come è il caso della pelle sottoposta al processo di concia. Nell'esempio seguente vengono esaminati quattro tipi di pelle (fig.1).

1. Pelle conciata al cromo con riconcia al cromo (per guanti da lavoro), campione " Cr^{Cr} gloves"
2. Pelle conciata al cromo con riconcia al cromo e tannino sintetico, campione " Cr^{Cr} "
3. Pelle conciata al cromo con riconcia al vegetale e tannino sintetico, campione " Cr^{Veg} "
4. Pelle conciata al vegetale con riconcia al tannino vegetale (mimosa), campione " Veg^{Veg} "

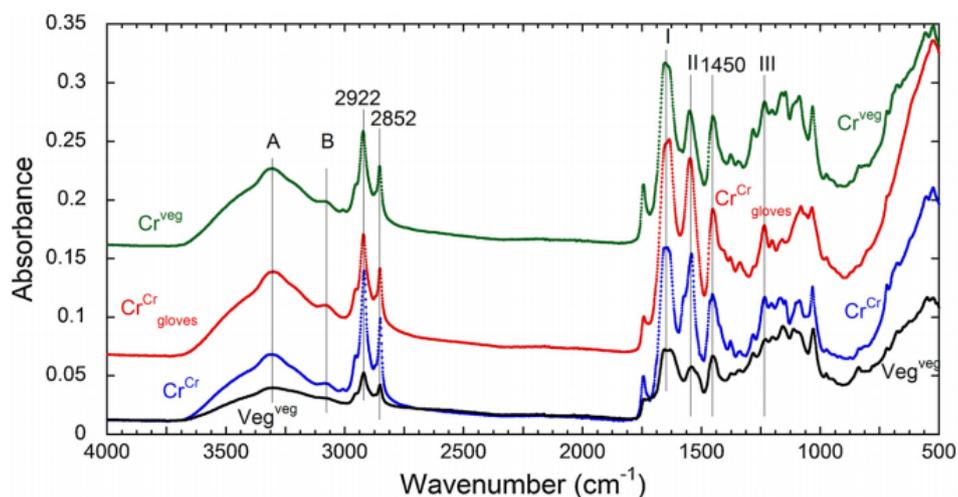


Figura 1) Spettri di campioni di pelle con tecnica ATR (riportati come sovrapposizione off-set per chiarezza)

Tutte le pelli mostrano le bande di assorbimento tipiche del collagene, che vengono riassunte nella tabella seguente [6].

Banda osservata nella zona (cm ⁻¹)	Assegnazione
3302-3313	“Picco A”, vibrazioni di stretching del N-H di aminoacidi
3077-3088	“Picco B”, vibrazioni di stretching del N-H di aminoacidi
1633-1653	“ Amide I ”, assegnata principalmente a vibrazioni di stretching di C=O dello scheletro proteico
1540-1549 (1552 [1])	“ Amide II ”, vibrazioni di bending di N-H (60%) e vibrazioni di stretching di C-N (40%) e/o stretching antisimmetrico di COO ⁻ (aspartato), e/o triptofano (1554 cm ⁻¹)
1450	Vibrazioni di bending C-H (gruppi alifatici)
1200 - 1350 [11]	“ Amide III ”, vibrazioni di bending C-N, vibrazioni di bending in-plane di N-H da legami ammidici e vibrazioni di wagging CH ₂ di gruppi laterali di Glicina e Prolina

Tutte le tre bande amide (I-III) sono dovute alla conformazione a tripla elica mentre i legami a idrogeno sono responsabili dell'allargamento del Picco A.

A 2919-2924 cm⁻¹ e 2851-2854 cm⁻¹ vi sono bande assegnabili allo stretching di C-H di acidi grassi che possono derivare da sostanze grasse. Il campione “Cr_{Cr gloves}” non evidenzia alcuna delle bande correlate ai tannini vegetali attorno a 1160 cm⁻¹ (assegnato alle vibrazioni di rocking (alifatico) antisimmetrico di CH₃ e le vibrazioni di rocking (aromatico) o a 1000-1350 cm⁻¹ (correlate alle vibrazioni di bending dei gruppi aromatici dei tannini vegetali).

Spettri di confronto pelle conciata e non conciata

Il processo di fissazione del cromo induce delle modifiche allo spettro di assorbimento infrarosso, sebbene di lieve entità, se ci si limita al solo spettro IR.

Nello spettro riportato in Figura 2 e relativo al campione di pelle conciata al cromo si può rilevare l'effetto del cromo sulla banda di assorbimento caratteristica a 1636 cm⁻¹, che è attribuita alla probabile interazione del cromo con la proteina (-Cr-OOC-). Questa banda è spostata dai 1650 cm⁻¹ della vibrazione di stretching di C=O del COOH, Amide I.

Inoltre, la banda a 1558 cm⁻¹ (Amide II) è attribuita all'interazione del cromo con il gruppo amminico (-Cr-NH-) ed è spostata dai 1552 cm⁻¹ e ridotta nella sua intensità. Questa deviazione è dovuta al cromo coordinato con i centri attivi del collagene (Amide I e II) per formare cromo-complessi. Tuttavia, le restanti bande caratteristiche a 1454, 1337, 1236 e 755 cm⁻¹ decrescono in intensità, ma non vengono spostate.

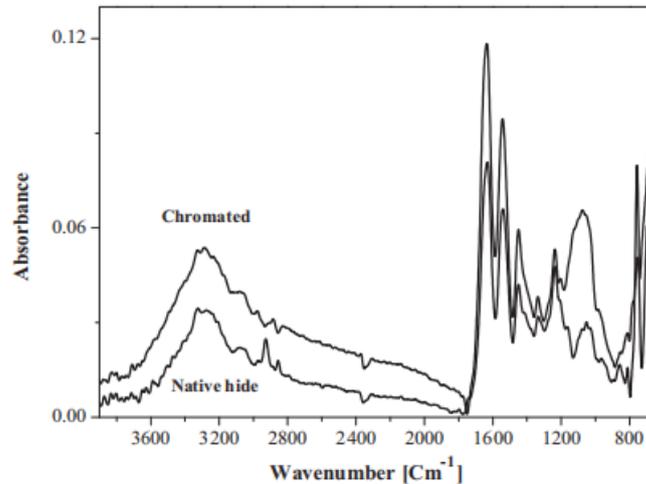


Figura 2) Spettri ATR-FTIR di pelle conciata cromo vs. non conciata

Una visione più approfondita della struttura molecolare può essere ottenuta attraverso l'algoritmo di deconvoluzione (Fig.3).

Ad esempio, gli spettri mostrano la caratteristica banda di assorbimento a 1745 cm^{-1} nella pelle depilata, che scompare nel campione conciato, mentre due bande appaiono a 1771 e 1726 cm^{-1} . La scomparsa della banda a 1745 cm^{-1} e la comparsa di quella a 1726 cm^{-1} può essere riferita alla formazione del complesso di cromo, mentre la banda a 1771 cm^{-1} può essere riferita ai gruppi carbossilici liberi di oligomeri prodotti per frammentazione.

In aggiunta, una nuova banda compare nel campione conciato a 1128 , 1077 e 1027 cm^{-1} , che derivano dalla probabile interazione tra il cromo con i gruppi carbossilato. La banda a 570 cm^{-1} corrisponde al legame Cr-O-Cr. Lo spettro di deconvoluzione evidenzia una riduzione di intensità della struttura proteica secondaria di alfa-elica a 1650 cm^{-1} ed un incremento dell'intensità della banda della forma beta a 1626 cm^{-1} .

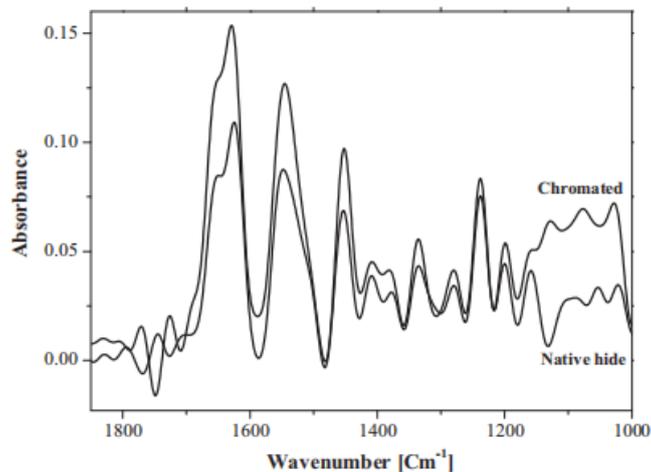


Figura 3) Spettri di deconvoluzione di pelle conciata cromo vs. non conciata

Applicazioni di spettroscopia in analisi di processo conciario [7,8].

Nei processi di concia al vegetale i parametri di controllo come il Grado di Concia e le Sostanze Organiche Legate richiedono l'esecuzione di diversi metodi di analisi chimica (IUC). Sono stati pertanto sviluppati metodi di analisi basati sulla spettroscopia FT-IR ATR associata ad una elaborazione chemiometrica dei segnali spettrali, ottenendo valori che sono in accordo con i parametri ottenuti per via classica.

Il metodo prevede la raccolta degli spettri infrarossi del materiale conciato con campionamento ATR, la loro elaborazione utilizzando la Regressione dei Minimi Quadrati Parziale (PLSR) [9] quale metodo di calibrazione multivariata, utilizzando come variabile dipendente il valore di riferimento, ovvero ottenuto attraverso i parametri misurati con i metodi analitici classici IUC (IUC 4,5,6,7,10).

Utilizzando invece una tecnica di campionamento in trasmittanza, vi sono lavori sui quali [10] vengono registrati lo spettro IR di film di collagene non trattato e film di collagene trattati con polimero acrilico, tannino vegetale e una combinazione di tannino vegetale e polimero acrilico (fig. 4). Le bande Amide I-III sono osservate per tutti i campioni. Il segnale del C=O del polimero acrilico a 1708 cm^{-1} viene osservato per il collagene trattato con il polimero acrilico, sebbene non dia origine ad un picco nitido, ma con un accoppiamento con il picco dell'Amide I.

Quando è presente il tannino il segnale del carbossile acrilico non si manifesta e questo lascia presumere una influenza del tannino. I picchi nella regione dei $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$, relativi al film di collagene trattato con tannini vegetali, sono relativi alle vibrazioni di bending aromatico dei tannini. Altra differenza viene evidenziata dallo stretching di N-H degli amminoacidi a 3324 cm^{-1} per il collagene non trattato, mentre questo valore si sposta ad energia maggiore, intorno a 3350 cm^{-1} , con allargamento del picco per quello trattato con tannini vegetali. Tale segnale non può derivare da stretching di ossidrilici (che appare sopra i 3550 cm^{-1}) e quindi deve ritenersi causato dai legami a idrogeno che si instaurano tra i tannini vegetali ed il collagene. Tale allargamento viene amplificato quando il collagene viene trattato con la combinazione tannino-polimero acrilico.

La tecnica di campionamento in trasmittanza, sebbene dia origine a spettri di maggiore intensità, è di limitato uso quando i materiali da analizzare hanno caratteristiche di insolubilità e opacità, come la pelle sottoposta alla concia.

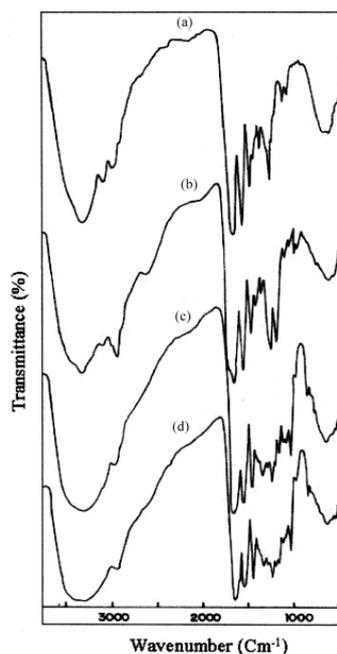


Figura 4) Spettri FT-IR di film di collagene: a) film di collagene nativo; b) film di collagene trattato con polimero acrilico; c) film di collagene trattato con tannini vegetali; d) film di collagene trattato con polimero acrilico, seguito da tannini vegetali

Conclusioni

La spettroscopia FT-IR, essendo in grado di misurare le variazioni a livello molecolare è una tecnica analitica molto utile nel monitorare le modifiche impartite al collagene da trattamenti di natura conciaria.

L'analisi di matrici complesse come quelle proteiche genera una quantità di segnali composti da molti dati, che rendono necessario un notevole grado di elaborazione statistica e chemiometrica, per poter ottenere una accurata interpretazione.

Lo sviluppo di tecniche di campionamento semplici e non distruttive e di metodologie di elaborazione dei dati rende questo approccio alle analisi sui materiali sempre più promettente.

Bibliografia

- [1] E.H.A. Nashy, O. Osman, A.A. Mahmoud, M. Ibrahim "Molecular spectroscopic study for suggested mechanism of chrome tanned leather" *Spectrochimica Acta Part A* 88 (2012) 171–176
- [2] Tehseen Riaz, Rabia Zeeshan, Faiza Zarif, Kanwal Ilyas, Nawshad Muhammad, Sher Zaman Safi, Abdur Rahim, Syed A. A. Rizvi & Ihtesham Ur Rehman "FTIR analysis of natural and synthetic collagen", *Applied Spectroscopy Reviews*, DOI: 10.1080/05704928.2018.1426595
- [3] "Determination of Secondary Structure in Proteins by FTIR Spectroscopy - JenaLib" https://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html

- [4] Zhang, M., Li, Z., Jiang, P., Lin, T., Li, X., and Sun, D. (2017) "Characterization and cell response of electrospun *Rana chensinensis* skin collagen/poly (L-lactide) scaffolds with different fiber orientations". J. Appl. Polym. Sci. 134(34): 45109 (1-12)
- [5] R.Yuliatmo, T.Maryati; A.Rahmawati, D.J.M. Adamu, A. Mizan "Influence of Retanning Agents on Physical Characteristics of Snow-White Glove Leather from Goat Skin". Buletin Peternakan 48 (2): 138-145, May 2024
- [6] Y.S. Hedberg, C. Lidèn, I.O. Wallinder "Correlation between bulk- and surface chemistry of Cr-tanned leather and the release of Cr(III) and Cr(VI)". Journal of Hazardous Materials 280 (2014) 654–661
- [7] T. Canals, J.M. Morera, F. Combalià, E. Bartoli, "Determination of the tanning degree of vegetable tanned leather by infrared spectroscopy (FTIR)". JALCA Vol 106, 2011
- [8] T. Canals, J.M. Morera, F. Combalià, E. Bartoli, "Application of infrared spectroscopy (FTIR and NIR) in vegetable tanning process control". Journal- Society of Leather Technologists and Chemists · May 2013
- [9] "Multivariate Calibration", 1st ed., H. Martens and T. Naes, John Wiley & Sons, pp. 116-163, 1989.
- [10] B. Madhan, C. Mulidharan, R. Jayakumar, "Study on stabilisation of collagen with vegetable tannins in presence of acrylic polymers". Biomaterials 23 (2002) 2841–2847
- [11] D. Tintor, K. Ninkovic, J. Milosevic, N.D. Polovic "Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy". Vibrational Spectroscopy 134 (2024) 103726