

Géis de Colágeno Aniônico: Ransana como Biomateriais. Preparação e Caracterização Físico-química.

Gilberto Goissis, Júlio C. Góes

Resumo: Este trabalho descreve o efeito da ransana, um polissacarídeo bacteriano, sobre géis de colágeno aniônico. A interação colágeno:ransana ocorreu independentemente do pH, mesmo com baixas concentrações de ransana, e os materiais obtidos no estado sólido foram caracterizados por serem mais estáveis termicamente à medida em que se aumenta a concentração do polissacarídeo. Nenhuma alteração na estrutura secundária em tripla hélice do tropocolágeno foi observada. O efeito mais significativo da ransana sobre os géis aniônicos de colágeno foi um aumento significativo da viscosidade, e as variações observadas em função de pH e temperatura sugerem que nesta interação, não estão envolvidas forças de natureza eletrostática ou hidrofóbica. Micrografias de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ransana mostraram a presença de estruturas vesiculares, diferente do padrão fibrilar característico de colágeno nativo. Um modelo de interação baseado na ação da ransana sobre a água estruturada, associada à organização macromolecular do colágeno em solução é proposto. Mais importante, géis de colágeno aniônico:ransana mostraram uma estabilidade térmica compatível com aquelas desejáveis para um biomaterial injetável de colágeno, evitando o uso do glutaraldeído como agente de estabilização.

Palavras-chave: *Colágeno aniônico, ransana, géis, biomateriais, caracterização.*

Introdução

O colágeno, devido a várias de suas propriedades, dentre elas sua baixa alergenicidade mesmo quando extraído de fontes heterólogas, vem sendo amplamente utilizado como matéria prima para a fabricação de biomateriais para usos em medicina e odontologia sob as mais variadas formas¹. Na forma de géis injetáveis, estes biomateriais são utilizados como suportes para a reconstrução de tecidos moles em defeitos de natureza traumática ou estética², na correção da incontinência urinária³, no aumento de

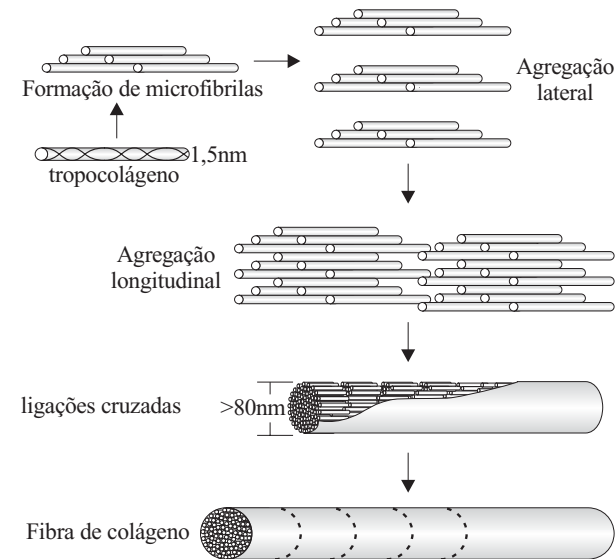
volume de cordas vocais⁴ e correção precoce de miopia pelo espessamento da parede escleral². Sua grande vantagem é a eliminação das técnicas cirúrgicas invasivas. Tecnicamente estes géis correspondem a suspensões fibrilares preparadas por fibrilogênese (Esquema I) a partir de soluções ácidas de colágeno⁵, com concentrações aproximadas de 35 mg/mL, onde por problemas de fluidez cerca de 90% do total das microfibrilas presentes devem apresentar diâmetros inferiores a 10 μm ⁶. Nestas condições estes géis apresentam um comportamento viscoelástico, resultante do entrelaçamento das fibrilas, que é importante tan-

Gilberto Goissis, Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, Av. Dr. Carlos Botelho 1465, São Carlos, SP, CEP 13560-250, Tel: 016-274-9181, Fax 016-274-9180, Júlio C. Góes, Departamento de Química Analítica e Físico-química, Universidade Federal do Ceará

to para facilitar a extrusão pela agulha, quanto para a manutenção dos contornos necessários frente às pressões resultantes do tecido adjacente pós-implante⁷. Outra característica importante nestes géis é a sua biodegradabilidade, cujo controle garante o crescimento eficiente do novo tecido à medida que é biodegradado²⁻⁴. Esta propriedade é controlada pelo tratamento com glutaraldeído, que introduz as ligações cruzadas via base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina, presentes na estrutura primária da proteína⁸. O tratamento com o glutaraldeído tem também a função de estabilizar a suspensão fibrilar e conferir à suspensão a estabilidade térmica compatível com a temperatura corporal².

Entretanto, na prática, estes géis apresentam três graves inconvenientes: sua frequente precipitação durante a extrusão, prejudicando de modo significativo os resultados da correção; a elevada citotoxicidade associada ao glutaraldeído, mesmo nas baixas concentrações utilizadas⁸; estabilidade limitada das suspensões para concentrações de cerca de 30 mg/g de gel, que não é a concentração mais eficiente como suporte da reconstrução⁵.

Os problemas da precipitação durante a extrusão do gel têm sido minimizados por processos de filtração⁹, a adição de glicosaminoglicanas (GAGs), um regulador do tamanho das microfibrilas¹⁰ ou ácido hialurônico (AH) (Figura 1)¹¹. Os dois polissacarídeos apesar de facilitarem de modo significativo o escoamento^{10,11} tem seu uso limitado em função



Esquema I: Diagrama para o processo de fibrilogênese de colágeno a partir de soluções ácidas.

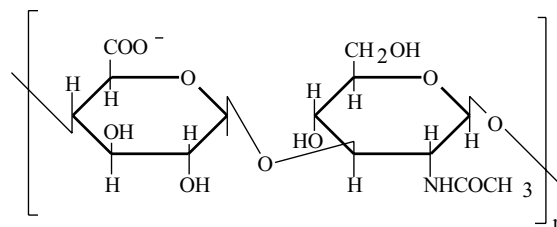


Figura 1. Estrutura da unidade repetitiva do ácido hialurônico.

das dificuldades de suas extrações e purificações¹². Para o caso do AH o mecanismo proposto para a maior facilidade no escoamento de géis de colágeno está baseado na sua fraca interação com o colágeno que confere ao gel uma superfície negativa que inibe o processo de agregação por repulsão eletrostática¹¹.

Com base neste mecanismo de estabilização de géis de colágeno por AH, a proposta deste trabalho é o desenvolvimento de géis injetáveis de colágeno pelo uso de colágeno aniônico, um colágeno com resultante de carga negativa em pH neutro, que pode ser preparado por hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas de resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes na proteína¹³. A expectativa é a obtenção de géis de colágeno injetáveis mais estáveis, que além de não necessitar do tratamento com glutaraldeído para a sua estabilização, permita ainda a preparação de géis com maiores amplitudes de concentração. Ainda no sentido de melhorar a fluidez, é proposto também para a preparação destes géis, a utilização de um polissacarídeo de origem bacteriana com ação lubrificante em substituição à GAGs e AH. Este polissacarídeo é a ransana, que em soluções aquosas se apresenta na conformação de hélice dupla bastante estável a variações de temperatura, pH e força iônica. Este polissacarídeo não forma géis, mas dá origem a soluções altamente viscosas¹⁴. A ransana é um polissacarídeo com uma massa molecular de cerca de 1.000.000D, com uma unidade repetitiva correspondente a um tetrassacarídeo, com uma ramificação periódica por

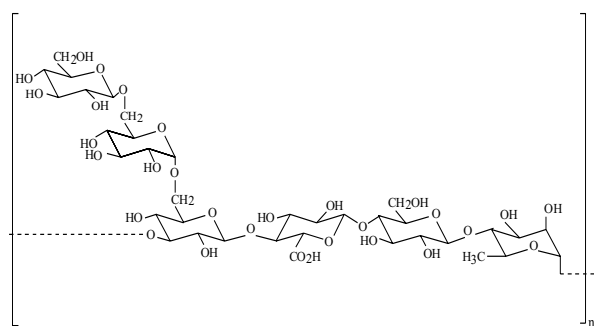


Figura 2. Estrutura primária de uma das cadeias da dupla hélice da ransana.

unidade (Figura 2). Na sua unidade básica, apresenta um resíduo de ácido D-glicosilurônico que lhe confere um caráter de um polieletrólito aniônico em soluções neutras. Seu pK_o é de 2,85¹⁵. Além do que, é um polissacarídeo amplamente utilizado na indústria de alimentos¹⁴. Este trabalho descreve a preparação e a caracterização de géis injetáveis de colágeno aniônico em associação com ransana como substitutos de GAGs e AH, na preparação de géis injetáveis de colágeno para aplicações médica e odontológica, visando a minimização de processos de precipitação observado com géis convencionais e a eliminação do glutaraldeído como agente de controle da estabilidade da suspensão microfibrilar e da biodegradabilidade.

Experimental

Géis de Colágeno Aniônico:Ransana: o colágeno foi obtido por tratamento de serosa bovina em meio alcalino¹⁶ seguido da extração com solução de ácido acético pH 3,5. A concentração final da preparação foi de 1%, determinado via hidroxiprolina¹⁷. Os géis colágeno aniônico:ransana foram preparados pela adição a um volume do gel de colágeno, de um volume de solução de ransana para dar origem a géis nas proporções 100:1, 75:1, 50:1, 50:1, 25:1 e 1:1. Em seguida estes géis foram ou não dialisados contra tampão fosfato 0,13M pH 7,4, o material resultante centrifugado e suas concentrações ajustadas para 2,5% (m/m), determinadas por liofilização.

Preparação de Membranas: as membranas com massa variáveis entre 0,4 a 1,0 mg/cm², foram preparadas a partir dos géis obtidos a pH 3,5 tratadas ou não com tampão fosfato pH 7,4 0,13M, seguidas de secagem ao ar.

Estabilidade Térmica

- *Temperatura de encolhimento (Ts):* foi determinada em membranas de colágeno e colágeno:ransana nas relações de massa de 100:1, 50:1, 25:1 e 1:1 em um equipamento para determinação de ponto de fusão adaptado da Quimis, Q 340-13, com amostras de 20 x 2 mm imersas em solução de ácido acético pH 3,5 ou tampão fosfato pH 7,4, 0,13M. A velocidade de aquecimento empregada foi de 0,5 °C/min.

- *Temperatura de desnaturação (Td):* foi determinada em um equipamento da Du Pont DSC-910

acoplado a um termoanalisador Du Pont 9900. As amostras em forma de disco, com cerca de 10 mg, foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas em atmosfera de N₂ com uma taxa de aquecimento de 5°C/min.

Espectroscopia no Infravermelho: os espectros de absorção foram obtidos em um equipamento da NICOLET Modelo 5SXC-FTIR a partir de membranas de ransana, colágeno e colágeno:ransana com aproximadamente 0,4 mg/cm² nas proporções 100:1, 50:1, 25:1 e 1:1. Foram utilizadas apenas membranas conformadas a pH 3,5.

Ensaio de Viscosidade

pH 3,5: volumes de 10 mL da solução de gel de colágeno ou colágeno ransana: na proporção de 100:1 com concentrações de 5 mg/g de gel foram ensaiados em um viscosímetro capilar do tipo Ostwald número 300, no intervalo de temperatura entre 20 e 45 °C.

pH 7,4: as viscosidades de géis de colágeno e de colágeno:ransana nas proporções de 75:1 e 50:1, com concentrações de 25 mg/g de gel foram determinadas em um viscosímetro Brookfield DVII, adaptado com camisa de aquecimento e velocidade de rotação constante de 0,3 rpm. Rotor utilizado: S3; intervalo de temperatura entre 20 e 50 °C.

Microscopia Eletrônica de Varredura: as fotomicrografias de membranas de colágeno e colágeno:ransana 50:1, de concentração superficial de 0,7 mg/cm², conformadas em solução tampão fosfato pH 7,4 e força iônica 0,15M, foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura, marca ZEISS modelo DSM 960, operando com feixes de elétrons primários de 20 keV. Todas as amostras foram recobertas com uma camada de ouro (30 nm).

Resultados e Discussão

Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS mostrou que o colágeno aniônico tem o perfil densitométrico esperado do colágeno tipo I, com uma relação de cadeias $\alpha 1/\alpha 2$ de 1,95, para uma relação teórica de 2,0¹⁸. Foram observadas também, bandas de cadeias β e outras bandas correspondentes a fragmentos de colágeno com massa moleculares menores que 100.000 Da (massa molecular para 1 cadeia α). No infravermelho, as bandas típicas para colágeno fo-

ram observadas em 1652 e 1550 cm^{-1} (amidas I, C=O e II. N-H), e a relação das absorvâncias para as bandas em 1235 e 1450 cm^{-1} foram sempre superiores à unidade, mostrando que a estrutura secundária do colágeno foi preservada (Tabela 1). Estas bandas correspondem respectivamente ao estiramento das ligações C-N (amida III), sensível a variações estruturais do colágeno e ao empacotamento do anel pirrolidínico da prolina e hidroxiprolina que não são sensíveis a variações da estrutura secundária da proteína¹⁹. Para colágeno formatado em meio ácido estas relações são próximas à unidade (forma “swollen”) e aumentam até 1,4 para a estrutura fibrilar que se desenvolve a valores de pHs próximos da neutralidade²⁰. Bandas de absorção para a ransana foram observadas em 1700 e 1200 cm^{-1} , correspondentes às ligações ésteres na forma de acetatos¹⁶.

Os valores de Ts para as membranas de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ransana (Tabela 1), confirmaram a manutenção da estrutura secundária da proteína, pois o colágeno desnaturado (ausência da estrutura secundária) não apresenta qualquer transição no intervalo estudado¹⁸. A estabilidade térmica das membranas conformadas a pH 7,4 foram sempre superiores em relação àquelas conformadas a pH 3,5, independentemente da presença de ransana. Para o colágeno aniônico, os valores de Ts em meio ácido e neutro foram de respectivamente $44,4 \pm 0,3$ e $58,2 \pm 0,7$ °C. Aumentos na concentração de ransana, independentemente do pH, deram origem a materiais progressivamente mais estáveis termicamente. Para membranas conformadas em meio ácido, nas proporções colágeno:ransana 100:1, 75:1 e 25:1 e 1:1, os valores de Ts foram respectivamente $45,7 \pm 0,8$, $46,0 \pm 0,6$, $47,1 \pm 0,5$ e $49,0 \pm 0,9$ °C; para membranas confor-

Tabela 1: Temperatura de encolhimento (Ts) e razão para as absorvâncias das bandas no infravermelho 1235/1450 cm^{-1} para membranas de colágeno conformadas a pH 3,5 e 7,4.

Compósito	1235-1450 ^a	Ts (°C) ^b	
		pH 7,4	pH 3,5
1:0	1,09	$58,2 \pm 0,7$	$44,4 \pm 0,3$
100:1	1,08	$60,5 \pm 0,5$	$45,7 \pm 0,8$
50:1	1,10	$61,2 \pm 1,3$	$46,0 \pm 0,6$
25:1	1,11	$62,0 \pm 1,0$	$47,1 \pm 0,5$
1:1	1,20	$63,7 \pm 1,0$	$49,0 \pm 0,9$

a - relações para membranas conformadas a pH 7,4 não foram determinadas por não serem transparentes;

b - valores médios para três determinações independentes.

madas em meio neutro estes valores foram na mesma ordem de $60,5 \pm 0,5$, $61,2 \pm 1,3$, $62,0 \pm 1,0$, $63,7 \pm 1,0$ °C.

Diferenças de estabilidades térmica observadas em função do pH estão de acordo com os resultados descritos para colágeno nativo: a pH baixo, o colágeno se encontra na forma “swollen”, uma estrutura não organizada, mas ainda caracterizada pela presença do tropocolágeno com sua estrutura secundária íntegra, enquanto a pH 7,4, predominam as estruturas ordenadas na forma de microfibrilas, que apresentam maior estabilidade térmica²⁰. Independente dessas diferenças, as variações de Ts observadas em função dos aumentos na concentração de ransana sugerem que colágeno e ransana interagem, mesmo para baixas concentrações do polissacarídeo, confirmado também os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho. Enquanto para colágeno aniônico a relação 1235/1450 cm^{-1} foi de 1,09, para o colágeno aniônico:ransana 1:1, foi de 1,20. Esta relação, para membranas de colágeno conformadas em meio ácido é aproximadamente 1,0²⁰, e aumenta com o aumento do pH, até valores próximos da neutralidade, onde o colágeno, tipicamente apresenta uma estrutura microfibrilar.

O padrão de estabilidade térmica determinada como Td para membranas de colágeno:ransana 100:1, 50:1, 25:1 e 1:1, equilibradas a pH 3,5 (Figura 3) foi similar àquele observado com Ts. Para o colágeno aniônico Td foi observado em 47,79 °C, enquanto para

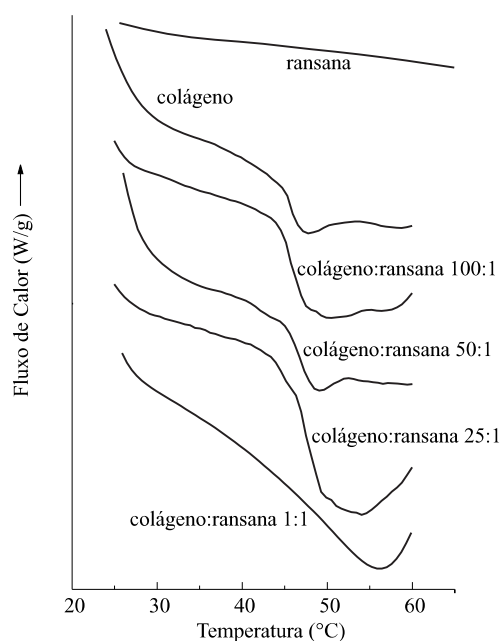


Figura 3. Calorimetria exploratória diferencial para membranas colágeno:ransana com concentrações variáveis do polissacarídeo, conformadas a pH 3,5.

membranas colágeno aniônico:ransana 100:1, 50:1, 25:1 e 1:1, em 49,91 °C; 48,47 °C; 54,06 °C e 56,54 °C respectivamente. No intervalo estudado, nenhuma transição foi observada para a membrana de ransana, em função de sua grande estabilidade térmica^{14,15}. Valores maiores para Td em relação àqueles de Ts, podem ser resultantes da maior hidratação da matriz das amostras utilizadas para a determinação de Ts²¹, que em função do método são previamente hidratadas a pHs 3,5 ou 7,4.

Medidas de viscosidade específicas determinadas para os géis de colágeno:ransana a pH 3,5 (Figura 4) mostraram que a adição do polissacarídeo, mesmo em baixas concentrações (100:1), têm efeitos significativos sobre a viscosidade do gel, diminuindo gradativamente no intervalo entre 20°C e 40°C, para valores similares àqueles determinados para os géis de colágeno. Esta diminuição provavelmente está associada à desnaturação do colágeno. Estes resultados (Figura 4), além de confirmarem a interação colágeno aniônico:ransana, mostraram que esta interação só ocorre com o colágeno estruturado na forma de tripla hélice, principalmente levando-se em consideração que no intervalo de temperatura estudado, a ransana nas mesmas condições de concentração presente no gel 100:1 (0,05 mg/mL), não mostrou qualquer efeito sobre a viscosidade de solvente similares. Os valores para a temperatura de desnaturação em solução, determinados pelos pontos de inflexão das curvas (primeira derivada) foram de 31,6 °C para o colágeno aniônico e de 32,4 °C para colágeno aniônico:ransana.

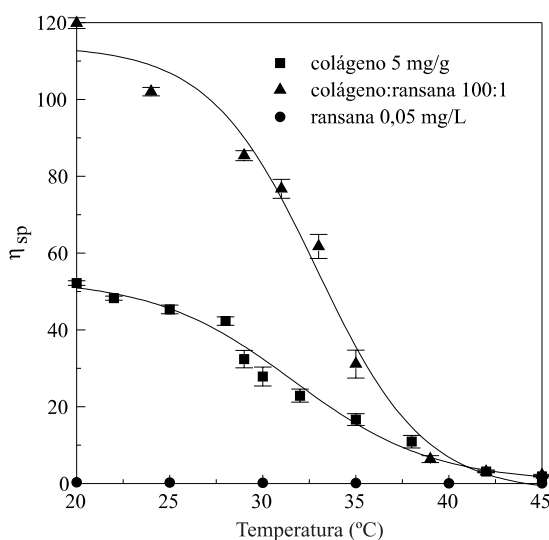


Figura 4. Efeito da temperatura sobre a viscosidade específica de géis de colágeno:ransana em solução de ácido acético, pH 3,5. Concentração de colágeno de 5 mg/g de gel.

A pH 7,4, assim como a pH 3,5 (Figura 4) a viscosidade de géis de colágeno aniônico:ransana foram significativamente superiores “aquela determinada para o gel de colágeno aniônico, aumentando com aumentos da concentração da ransana presente. A diferença observada foi que, enquanto a pH 7,4 a viscosidade mostrou decréscimos significativos apenas para temperaturas maiores que 40°C, a pH 3,5, diminuições significativas já foram observadas para temperaturas a partir de 25°C.

Os resultados para o comportamento da viscosidade determinados para valores de pHs 3,5 (Figura 4) e 7,4 (Figura 5), sugerem que forças de natureza eletrostáticas não estão envolvidas nesta interação pois, enquanto a pH 3,5 o colágeno aniônico é um policação, em virtude do maior estado de protonação de carboxilas β e γ de resíduos de Asn e Gln, a pH 7,4, é um poliânion. O pI para o colágeno aniônico foi estimado entre 4,7 a 5,0, similar àquele calculado para a gelatina extraída em meio alcalino¹⁸. Nestes dois valores de pHs, a ransana se comporta como sempre como um poliânion em função do valor de pKa₀ para os grupos carboxílicos e igual a 2,84¹⁵.

Como a dependência da viscosidade com a temperatura para soluções poliméricas pode ser descrita pela equação $\eta = Ae^{E/RT}$ ²², onde E é a energia de ativação para o escoamento viscoso e A é uma constante, os valores de E para o comportamento viscoso dos géis de colágeno estudados a pH 7,4 foram calculadas a partir das inclinações das curvas $\ln \eta \times 1/T$, para os intervalos de temperatura entre 20 e 35 °C e 40 e 50 °C (Tabela 2).

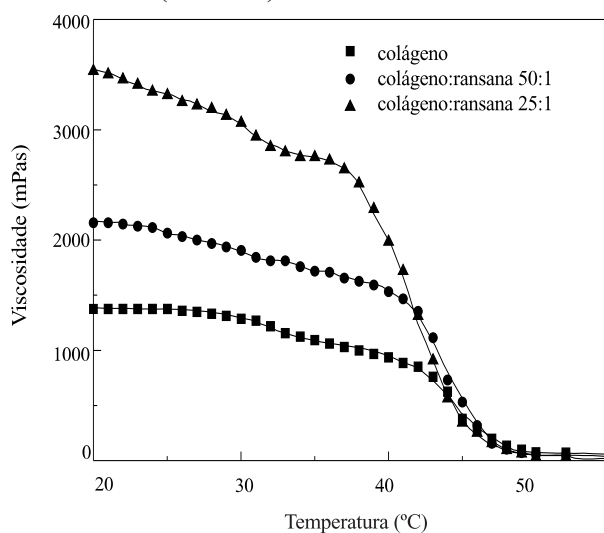


Figura 5. Efeito temperatura sobre a viscosidade de géis de colágeno:ransana determinadas em tampão fosfato, 0,13M, pH 7,4. Concentração de colágeno de 25 mg/g de gel.

Tabela 2. Energias de ativação para o escoamento viscoso em kJ/mol de géis de colágeno:ransana determinadas em tampão fosfato, 0,13M, pH 7,4. Concentração de colágeno de 25 mg/g de gel.

Material	Energia de ativação (kJ/mol)	
	20 - 35 °C	40 - 50 °C
Colágeno	9,77	275,12
Colágeno:ransana 50:1	11,58	308,17
Colágeno:ransana 25:1	13,50	351,25

Para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ransana 50:1 e 25:1, no intervalo entre 20 e 35 °C, os valores de E_a , em relação ao intervalo entre 40 e 50 °C, apresentaram aumentos menos acentuados e de respectivamente, 9,77; 11,58 e 13,50 kJ/mol., sugerindo que neste intervalo, de modo análogo ao observado para o colágeno nativo, a ransana não afeta significativamente a componente de interação hidrofóbica da matriz colagênica^{23,24}. Como consequência, a fração volumétrica de solvente contida no interior da matriz, provavelmente correspondente a águas estruturadas dos níveis I, II, diretamente associadas a tripla hélice do tropocolágeno²⁵. Entretanto para o intervalo entre 40 e 50 °C, que corresponde ao intervalo de desnaturação da proteína, as energias de ativação para escoamento viscoso também foram dependentes da concentração de ransana, entretanto com diferenças mais acentuadas, e com valores de E_a de respectivamente 275,1; 308,2 e 351,2 kJ/mol para o colágeno aniônico, colágeno:ransana 50:1 e 25:1. Na mesma ordem os valores de T_d foram 44,5; 43,6 e 42,3 °C (Figura 5).

Como forças de natureza hidrofóbicas e eletrostáticas não parecem contribuir significativamente para o comportamento viscoso, principalmente a pH 7,4, as diferenças entre E_a observadas no intervalo de temperatura correspondente à desnaturação da proteína, podem estar relacionadas com diferenças da organização do solvente ao redor da matriz colagênica, principalmente levando-se em consideração que colágeno aniônico, como mostrado pela Figura 6, não dá origem a pH 7,4 a estruturas fibrilares, características para colágeno nativo²⁰.

Micrografias obtidas de membranas conformadas a partir de géis de colágeno aniônico e colágeno:ransana equilibradas a pH 7,4 foram caracterizadas pela presença de estruturas vesiculares com tamanhos médios de cerca de $1,81 \pm 0,4$ μm (Figura 6a e b), que mesmo em grandes aumentos não apresentaram qualquer característica morfológica com a estrutura microfibrilar típica para colágeno nativo que são formadas nestas condições (Figura 6c). Como a estrutura vesicular foi observada também para o colágeno aniônico independentemente da presença da ransana (Figura 6a), é provável que o polissacarídeo interfira apenas nos níveis de ordenação da água ao redor destas estruturas. Resultados similares em relação à incapacidade de se organizar em estruturas fibrilares a pH 7,0, também foram descritas para géis de colágeno modificados por succinilação²⁶ ou deaminação²⁷, duas reações que tornam o tropocolágeno uma molécula negativa a pHs próximo da neutralidade.

Assumindo que as micrografias de membranas obtidas a partir de géis de colágeno aniônico, com ou sem ransana, sejam reflexo da sua organização macromolecular em solução, principalmente a

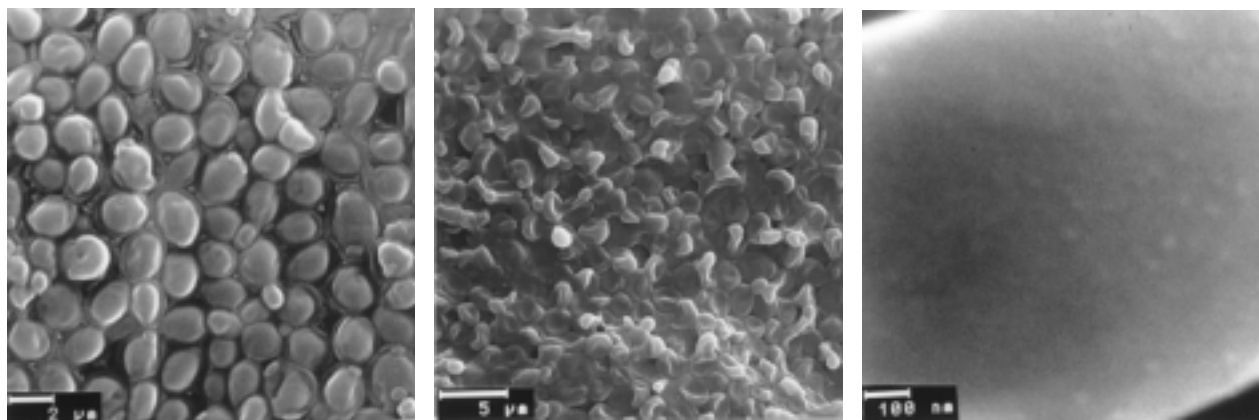


Figura 6. Micrografias para membranas de colágeno aniônico, (a, 3.000x), colágeno aniônico:ransana na proporção de 50:1 (b, 20.000x) e colágeno aniônico:ransana 50:1 (c, 100.000), todas pré-equilibradas previamente em tampão fosfato pH 7,4.

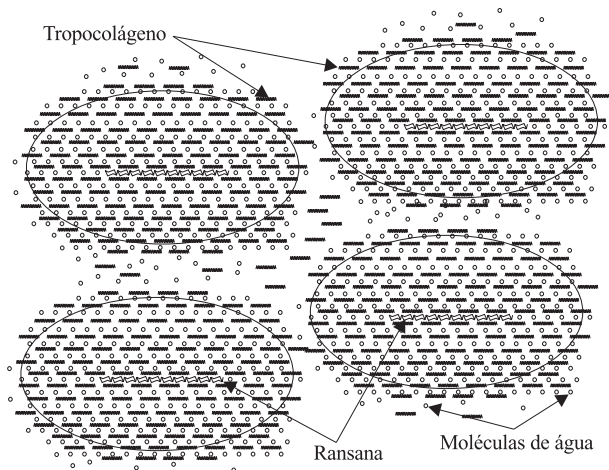


Figura 7. Modelo para a interação entre o colágeno e a ransana a pH 7,4 baseada na reorganização de moléculas de água estruturada que envolvem a matriz colagênica.

pH 7,4 e que a função da ransana seja aquela de promover uma maior ordenação das moléculas de água ao redor destas estruturas, um modelo para esta interação é proposto e mostrado pela Figura 7. Este modelo é caracterizado pela presença de molécula linear de ransana envolta por um número limitado de moléculas de colágeno, cujo comprimento é de aproximadamente 1/4 daquele da ransana, envolvido por água estruturada, com quantidade dependente da concentração de ransana. Como resultante, partículas com raio de giração variáveis poderiam ser formadas, explicando os aumentos significativos na viscosidade observados para géis de colágeno aniônico quando na presença do polissacarídeo.

Conclusões

Os resultados acima mostram que o colágeno aniônico e o polissacarídeo ransana interagem no estado sólido ou em soluções com preservação da estrutura secundária da proteína, mesmo para baixas concentrações de polissacarídeo, para dar origem em meio ácido ou neutro, géis com viscosidades significativamente maiores que soluções similares de colágeno, com estabilidades térmicas compatíveis com aquelas necessárias para biomateriais de colágeno na forma de géis. Estes resultados sugerem que para valores de pHs próximos da neutralidade, interação colágeno ransana provavelmente ocorre por meio de um mecanismo de ordenação da água ao redor do complexo formado, principalmente porque nem interações eletrostáticas ou hidrofóbicas têm par-

ticipação significativa na sua estabilização. Resultados de análise térmica mostraram que os géis de colágeno aniônico:ransana a pH 7,4 apresentam uma estabilidade térmica desejada, tornando-o potencialmente interessantes como um novo material de colágeno para a área de biomateriais.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a Ézer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica prestada e ao FNM/PADCT/CNPq, contratos nº 620.228/91 e 620001/96-8 pelo suporte financeiro.

Júlio C. Góes foi bolsista PICD-CAPES da Universidade Federal do Ceará, junto à Pós-graduação em Físico-química do Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

Referências Bibliográficas

1. Rao, K.P., Joseph, K.T. - Collagen graft copolymers and their biomedical applications. Collagen: Biotechnology., CRC Press, v. 3, p. 63-65 (1988).
2. Kaplan, E. N. - Ann. Plast. Surg., 10, 437-51 (1983).
3. Leonard, M. P. - J. of Urology, 145, 115-19 (1991).
4. Ford, C. N. - Laryngoscope, 94, 513-18 (1984).
5. Wallace, D. G., Woonza, R., Reihanian, H., Ksander, G., Lee, R., BRAUN W. - J. Biomed. Mater. Res., 23, 931-45 (1989).
6. Mc Pherson, J. M., Wallace, D. G. - Coll. Rel. Res, 5, 119-115 (1985).
7. Wallace, D. G., Mc. Pherson. J. M. - Injectable collagen for tissue augmentation, Collagen: Biochemistry and Molecular Biology, v. 3, M. Nimni, CRC Press, Boca Raton, FI (1987).
8. Mc.Pherson, J. M., Sawamura, S., Armstrong, R. - J. Biomed. Mater. Res., 20, 79-92 (1986).
9. Nguyen, H. M., Chu, G. H. - Mechanically Sheared Collagen Implant Material and Method, US 4642117, (1987).
- 10- Wood, G. C. - Biochem. J., 75, 605-611 (1960).
11. O'Brink, B. - Eur. J. Biochem., 34, 129 1973.
12. Crescenzi, V. - TRIP, 2, 104-109 (1994).

13. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por carga: hidrólise seletiva de grupos carboxâmidos internas. José L. Rocha, Ana Maria G. Plepis, Zhara F. Chaudry, Marco Rossi e Gilberto Goissis. Aceito para publicação em "Polímeros, Ciências e Tecnologia", (1996).
14. Kwon, K.P., Foss, P.A., Rha, C. - Rheological characterization of high viscosity polysaccharides, *Industrial Polysaccharides*, Elsevier Science Publ., 253 - 266, (1987).
15. Campana, S. P., Ganter, J., Rinaudo, M. *Carbohydr. Res.*, 231, 31-38 (1992).
16. Goissis, G., Moriwaki, C.M.E.Y. - Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável. BR9000972, (1990).
17. Jamall, I.S., Finelli, V. N., Que Hee, S.S. - *Anal. Biochem.*, 112, 70-75, (1981).
18. Ramachandran, G. N. - *Treatise on Collagen*, London, Acad. Press, v. 1, (1967).
19. Renugopalakrishnan, V. et al. - *Macromolecules*, 22, 41-21 (1989).
20. Silvester, M.F., et al., *Thromb. Res.*, 55, 135-148 (1989).
21. Koop, K., Bonnet, M., Renou, J.P. - *P. - Matrix*, 9, 443 (1989).
22. Wallace, D.G. - *Biopolymers*, 29, 1015-1026 (1990).
23. Rosemblat, J., Devereux, B. - *J. Appl. Pol. Sci.*, 50, 953-63 (1993).
24. Rosemblat, J., Deverux, B. - *Biomaterials*, 13, 878-886 (1992).
25. Pineri, M.H., Escoubes, M., Roche, G. - *Biopolymers*, 17, 2799, (1978).
26. Shenoy, V. and Rosemblatt, J., - *Macromolecule*, 29, 8751-8758 (1995).
27. Hu, X. W., Knight, D.P. and Grant, R.A. - *Tis. Cell Res.*, 28, 215-222 (1996).