UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**COMPÓSITOS COLÁGENO ANIÔNICO:RAMSANA COMO
BIOMATERIAIS INJETÁVEIS: CARACTERIZAÇÃO E
MECANISMO DE INTERAÇÃO**

Márcio de Paula

**Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, USP, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Química Analítica).**

Orientador: Prof^o. Dr. Gilberto Goissis

São Carlos/SP

2003

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, em especial minha mãe *Aparecida Piran de Paula* (in memoriam),

Em primeiro lugar sou infinitamente grato pelo fato de me darem o que de mais precioso existe no universo, a vida. Em segundo, tenho que agradecer-los pelo valioso apoio, compreensão e voto de credibilidade que sempre depositaram em mim, sem o que, certamente não teria sido possível manter-me vivo nos estudos, num esforço diário compartilhado com a solidão. Mesmo inserida num contexto de uma dinâmica renovadora, essa, fôra exigente comigo ao ponto de impor-me muitas renúncias, acarretando-me perdas expressivas ao longo desses anos de dedicação... todavia, necessárias para pôr a prova minha vontade e determinação em superar-me a cada dia, e assim poder compartilhar com as pessoas que amo, o prazer desta vitória e recomeço. Mesmo não estando mais presente, sei que em algum lugar está feliz com minha vitória.

À *Rejane Maria Martinez Pegion*, minha esposa,

...que durante esta trajetória surgiu em minha vida, e desde então soube me compreender e animar em todas as fases deste trabalho.

À *Deus*,

...pois tudo em minha vida foi cuidadosamente permitido e conduzido por Ele.

AGRADECIMENTOS

No decorrer da trajetória percorrida na elaboração da presente tese, muitas pessoas me estimularam, seja de forma moral e até afetiva. Assim sendo, agradeço:

- Ao Prof^o. Dr. **Gilberto Goissis**, que investiu e acreditou em meu potencial humano e profissional, desde o primeiro contato, nortendo-me em meus estudos e pesquisas científicas, o que me possibilitou a superar limites e alcançar novos horizontes nessa existência.
- Ao suporte técnico e financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), concedido através dos processos 99/04806-0 e 01/06165-4.
- Aos professores doutores **Hidetake Iamasato** e **Janice Rodrigues Perussi**, pelas sugestões no exame de qualificação.
- Ao Prof^o. Dr. **Dirceu Spinelli** do SMM-EESC pelo auxílio nos ensaios de fluidez, e ao técnico **João** que se mostrou muito prestativo para realização destes ensaios.
- À Dr^a. **Virgínia C. A. Martins**, não só pela amizade e realização dos ensaios de reologia, mas principalmente pelos conhecimentos e habilidades que me foram transmitidos.
- Aos professores doutores **Ana Maria de Guzzi Plepis** e **Sérgio Yoshioka** pela amizade e apoio prestado quando solicitado.
- Aos docentes do Instituto de Química de São Carlos, pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos durante o curso de Pós-Graduação.

- Aos técnicos do laboratório de Bioquímica/Biomateriais **Ézer Biazin e Glauco Dimas Broch** não só pelo apoio técnico prestado, mas também pela amizade, paciência e convivência diária.
- Às funcionárias **Maria Silvia de Guzzi Plepis e Andréia Cristina Cardoso de Moraes**, da secretaria de Pós-Graduação, pelo acompanhamento nos processos das solicitações formais que fiz à CPG, e pelo apoio nas providências necessárias.
- Aos técnicos **Gallo** do IFSC/USP pelo recobrimento das amostras para MEV, e **Carlos** do IQSC/USP pela realização e apoio técnico nas análises de MEV.
- Aos técnicos da central de análise químicas do IQSC/USP, especialmente ao **Mauro** pelas análises de espectroscopia na região do infravermelho, e **Silvana** por constantemente ceder nitrogênio líquido.
- Ao pessoal da oficina mecânica e vidraria deste instituto, em especial ao **Ednelson**, que com sua capacidade, habilidade e paciência pode entender e desenvolver um acessório para realização dos ensaios de fluidez.
- Às bibliotecárias **Lia, Sônia, Solange, Vitória** que sempre foram prestativas e atenciosas quando solicitadas, e especialmente à **Vioneide** pelo incansável atendimento nas solicitações de artigos à outras entidades, e à **Eliana** nas correções das referências deste trabalho.
- Aos técnicos do Laboratório de Ensino do IQSC/USP; **Cidinha, Fernando, Renata**, pela disposição nas medidas de condutividade.
- À todo pessoal da Informática e serviço de áudio visual pelas consultorias fornecidas durante uma ou mais etapas no desenvolvimento do trabalho.
- Às secretárias **Karina, Claudia e Helena** pelos serviços prestados, gentileza e amizade.
- Aos meu colegas de laboratório Maria Helena, Adriana, Cláudia, Carolina, Fátima, Marcos, Fernando, Silvana, Cristien, Flávia pelo companheirismo e discussões durante todo o período de Pós-Graduação.
- Ao meu amigo **Eduardo T. Iamazaki** que além de nunca medir esforços para me ajudar, sempre esteve presente nos momentos difíceis.
- Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
GLOSSÁRIO	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Materiais Injetáveis para Correção Plástica	1
I.1.1. Géis injetáveis de colágeno	4
I.1.1.1. Histórico	4
I.1.1.2 Características dos géis injetáveis de colágeno	7
I.1.1.3 Estabilização de géis de colágeno injetável	8
I.2. Colágeno.....	11
I.2.1. Colágeno tipo I	11
I.2.2. Colágeno aniônico	13
I.3. Polissacarídeos Microbianos	15
I.3.1. Ramsana	16
I.4. Reologia	17
I.4.1. Oscilação	20
I.4.2. Fluência	22

I.4.3. Fluxo.....	23
I.4.4. Reologia de géis injetáveis	25
II. OBJETIVOS	27
III. PARTE EXPERIMENTAL	29
III.1. Materiais	30
III.1.1. Solventes e Reagentes.....	30
III.1.2. Matéria-prima para extração do colágeno	30
III.2. Preparações de colágeno.....	31
III.2.1. Gel de colágeno aniônico.....	31
III. 2.2. Compósitos colágeno aniônico:ramsana.....	31
III. 3. Caracterização dos materiais de colágeno	32
III. 3. 1. Determinação das concentrações	32
III.3.1.1. Liofilização	32
III.3.1.2. Via Hidroxiprolina	33
III.3.2. Determinação da Massa Molecular	36
III.3.3. Espectroscopia no Infravermelho	38
III.3.3.1. Preparação das membranas.....	38
III.3.4. Estabilidade térmica.....	38
III.3.5. Propriedades reológicas	39
III.3.5.1. Propriedades viscoelásticas	40
III.3.5.1.1. Medidas de oscilação.....	40
III.3.5.1.2. Medidas de fluência.....	40
III.3.5.2. Medidas de fluxo	41
III.3.5.2.1. Viscosidade.....	41
III.3.5.2.1.1. Viscosidade dinâmica	41
III.3.5.2.1.2. Viscosidade em função da temperatura	42
III.3.6. Ensaio de fluidez.....	42
III.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
IV.1. Caracterização dos géis de colágeno aniônico com e sem ramsana, e também na forma de membranas	44

IV.1.1. Concentrações dos géis de colágeno	44
IV.1.2. Massa Molecular dos géis de colágeno	46
IV.1.3. Espectroscopia no Infravermelho	48
IV.1.4. Estabilidade térmica	52
IV.1.4.1. Temperatura de encolhimento	52
IV.1.4.2. Temperatura de desnaturação	52
I.V.2. Estudos de Reologia	54
I.V.2.1. Propriedades viscoelásticas	54
I.V.2.2. Ensaaios de fluência	59
I.V.2.3. Ensaaios de fluidez	64
I.V.2.4. Viscosidade dinâmica	68
I.V.2.5. Viscosidade em função da temperatura	72
I.V.3. Microscopia eletrônica de Varredura	77
V. CONCLUSÕES	81
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colágeno bovino injetável comercial.	5
Figura 2. Colágeno injetável em cirurgia cosmética e procedimentos cirúrgicos não invasivos: 5 anos de comparação (1997-2001)	6
Figura 3. Estrutura do ácido hialurônico.....	9
Figura 4. Estrutura da ramsana.	10
Figura 5. Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla; (d) Modelo do quarto alternado pentafibrilar proposto por Smith	12
Figura 6. Esquema da hidrólise dos resíduos de glutamina e asparagina presentes no colágeno em meio alcalino.....	14
Figura 7. Hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas dos resíduos de asparaginas e glutaminas presentes no pericárdio bovino.....	15
Figura 8. Representação esquemática de deformação sob cisalhamento em placas sobrepostas	18
Figura 9. Fluxo oscilatório em cisalhamento	21
Figura 10. Curva de fluência (deformação/recuperação, 10/0Pa) para o gel de colágeno aniônico 0,7% (m/m) após 72h de tratamento alcalino.	22
Figura 11. Curva de fluência (deformação/recuperação, 15/0Pa) para o gel de colágeno aniônico:ramsana 0,7% (m/m) na proporção de 100:1.....	23

Figura 12. Comportamento típico de fluxo de fluidos Newtonianos e não Newtonianos.....	24
Figura 13. Fluxograma representativo do desenvolvimento experimental da preparação do gel de colágeno aniônico e de seu compósito com ramsana.	29
Figura 14. Representação esquemática do processo de concentração do gel de colágeno aniônico:ramsana.	32
Figura 15. Curva de padronização para determinação espectrofotométrica da concentração dos géis de colágeno via hidroxiprolina.....	35
Figura 16. Curva de calibração de proteínas padrão (β -galactosidade, Fosforilase <i>b</i> , albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica), em gel de poliacrilamida/SDS a 10% para a determinação da massa molecular das preparações de géis de colágeno.	37
Figura 17. Representação esquemática do sistema utilizado para o ensaio de fluidez	43
Figura 18. Eletroforese em gel poliacrilamida/SDS a 10% de: (a) proteínas padrão; (b) colágeno aniônico purificado; (c) colágeno aniônico “bruto”; (d) colágeno aniônico:ramsana a 4% (m/m); (e) colágeno aniônico:ramsana a 6% (m/m).	47
Figura 19. Densitogramas do gel de poliacrilamida/SDS a 10%, corados com Comassie Blue de: (a) colágeno aniônico 72h “bruto”; (b) colágeno aniônico:ramsana (75:1) a 4% (m/m); (c) colágeno aniônico:ramsana (75:1) 6% (m/m); (d) colágeno aniônico 72h purificado.	48
Figura 20. Espectros no infravermelho de membranas formatadas a pH 3,5: (a) Colágeno aniônico;(b) Colágeno aniônico:ramsana 100:1; (c) Colágeno aniônico:ramsana 75:1; (d) Colágeno aniônico:ramsana 50:1; (e) Colágeno aniônico:ramsana 25:1; (f) Ramsana.....	49

- Figura 21.** Curvas DSC de membranas conformadas em pH 7,4: (a) colágeno aniônico “bruto”; (b) colágeno aniônico purificado; (c) colágeno aniônico:ramsana a 4% (m/m); (d) colágeno aniônico:ramsana a 6% (m/m), (e) Ramsana..... 53
- Figura 22.** Módulo elástico e viscoso em função da concentração de géis de colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4: (a) colágeno aniônico:ramsana 75:1; (b) colágeno aniônico:ramsana 50:1. 55
- Figura 23.** *Módulo de armazenamento (G')* -■- colágeno aniônico 72h; -▼- colágeno aniônico:ramsana(100:1); -◆- colágeno aniônico:ramsana (75:1); -▲- colágeno aniônico:ramsana (50:1); -●- colágeno aniônico:ramsana (25:1) e *Módulo de perda (G'')* - - colágeno aniônico 72h; -▽- colágeno aniônico:ramsana (100:1); -◇- colágeno aniônico:ramsana (75:1); -△- colágeno aniônico:ramsana (50:1); -○- colágeno aniônico:ramsana (25:1) em função da frequência. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4. 56
- Figura 24.** Curvas de fluência para colágeno aniônico após 72 h de hidrólise sob condições de tensão entre 5,0 e 30,0 Pa. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4..... 60
- Figura 25.** Curvas de fluência das preparações de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana nas proporções de 100:1, 75:1, 50:1 e 25:1, obtidas a um stress de 10 Pa. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4. 61
- Figura 26.** Curvas de fluência dos compósitos colágeno aniônico:ramsana equilibrados a pH 7,4, obtidas após a aplicação de uma tensão de 10,0 Pa: (a) colágeno aniônico:ramsana 4% (50:1); (b) colágeno aniônico:ramsana 4% (75:1); (c) colágeno aniônico:ramsana 6% (50:1); (d) colágeno aniônico:ramsana 6% (75:1). 63
- Figura 27.** Escoamento de géis de colágeno aniônico e seus compósitos com ramsana, através de uma agulha (20x0,55 mm) e velocidade constante de escoamento de 1,0 mL/min: (A) géis de colágeno aniônico a 0,7% (m/m), e proporções de ramsana de 25:1 e 75:1 (m/m), pH 3,5; (B) compósitos colágeno ramsana nas concentrações de 4 e 6%, (75 e 50:1 m/m), pH 7,4. 66

- Figura 28.** Representação esquemática da deformação de uma partícula a medida em que uma força é aplicada durante a extrusão. 67
- Figura 29.** Viscosidade dinâmica de géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4. (a) amostras a 0,7% (m/m); (b) amostras a 4 e 6% (m/m). 70
- Figura 30.** Curvas de viscosidade dos géis de colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4, com concentrações dadas em relação de m/m: **A.** colágeno aniônico:ramsana 0,7% (75:1); **B.** colágeno aniônico:ramsana 0,7% (50:1); **C.** colágeno aniônico:ramsana 2% (75:1); **D.** 2% colágeno aniônico:ramsana 50:1; **E.** colágeno aniônico:ramsana 4% (75:1); **F.** colágeno aniônico:ramsana 4% (50:1); **G.** colágeno aniônico:ramsana 6% (75:1); **H.** colágeno aniônico:ramsana 6% (50:1). 73
- Figura 31.** Derivadas das curvas de viscosidade em função da temperatura dos géis de colágeno aniônico (CA) e colágeno aniônico:ramsana (CAR) nas proporções de 75 e 50:1, com concentrações dadas em relação de m/m. (a) 0,7 e 2% (m/m); (b) 4 e 6% (m/m). 74
- Figura 32.** Micrografias de membranas formatadas a pH 7,4 e 0,15 mol/L de força iônica: (a) colágeno aniônico; (b) colágeno aniônico:ramsana 100:1, (c) colágeno aniônico:ramsana 25:1; (5.000x)..... 78
- Figura 33.** Modelo para interação entre colágeno e ramsana a pH 7,4, baseada na reorganização de moléculas de água estruturada que envolvem a matriz colagênica..... 79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das preparações dos géis de colágeno aniônico 72h (bruto), purificado por precipitação salina, gel de colágeno aniônico:ramsana 4% e 6% (m/m).....	46
Tabela 2. Razão de absorbâncias (A_{1235}/A_{1450}) no infravermelho e medidas de estabilidade térmica via Ts e DSC em membranas de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana.....	51
Tabela 3. Ponto de gel para colágeno aniônico e o compósito colágeno aniônico:ramsana a 4% em diferentes proporções preparados a pH 3,5 e 7,4.	58
Tabela 4. Percentagem de recuperação dos géis de colágeno associados ou não com a ramsana quando submetidos a uma tensão de 5,0 Pa.	62
Tabela 5. Viscosidade dinâmica dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4, e seus respectivos valores obtidos da regressão linear.	71
Tabela 6. Energias de ativação dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana em diferentes proporções.....	76

GLOSSÁRIO

Definições¹

Abscesso perineal: formação de pus, devido a inflamação da área entre o ânus e os órgãos genitais.

Abscesso periuretral: é a formação de pus, devido a inflamação em torno da uretra.

Agente xenogênico: agente de espécies diferentes.

Cat-gut: fio de sutura torcido de origem animal obtido da camada serosa do intestino delgado bovino².

Cisto: é um tumor com conteúdo líquido, semi-líquido ou pastoso.

Citotóxico: que possui propriedades de citotoxina. *Citotoxina:* são substâncias celulares, tornadas tóxicas por um mecanismo de sensibilização, quando previamente introduzidas no organismo e são por eles destruídas.

Creep (Fluência): deformação lenta de um material; usualmente medido sob tensão de cisalhamento constante³.

Disfonia: alteração da voz; dificuldade para falar.

Divertículo periuretral: bolsa que sai da cavidade em torno da uretra.

FDA: Food and Drug Administration.

Fenotípico: indivíduo com aparência ou característica semelhantes, embora com fatores hereditários diversos.

Fibrose perifocal: é a formação de tecido fibroso ao redor de um foco.

¹ FORTES, H. *Dicionário Médico*, 3ª ed., Rio de Janeiro, 1968.

² <<http://experimentalsurgery.org.br/portuguese/fiosagulhas.html>>. Acesso em: 28 nov. 2002

³ TA INSTRUMENTS. *Rheology Solutions: Creep for AR 1000*. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-2. (Software Manual).

Flow (Fluxo): deformação na qual ao menos uma parte não é recuperável⁴.

Fluido sinovial: líquido viscoso da cavidade articular e que facilita o deslocamento dos ossos nas articulações.

Granuloma: tumor maligno constituído de tecido de granulação.

Incontinência urinária: é a incapacidade de exercer o controle voluntário da micção, ocorrendo perda de urina pela uretra.

Materiais aloplásticos: são materiais de origem sintéticas destinados a correção de tecidos moles.

Material endógeno: é um material que se origina dentro do organismo.

Morfométricas: mensuração da forma de culturas celulares.

Polissacarídeos extracelulares: são polissacarídeos que podem ser encontrados na forma de uma discreta cápsula que envolve a célula microbiana e que é parte da própria parede celular.

Refluxo vésico-uretral: condições patológicas na qual a urina contida na bexiga retorna ao rim contra o fluxo normal, podendo levar a danos renais irreversíveis.

Strain (Deformação): medida de deformação em relação a de comprimento, área ou volume⁵.

Stress (Tensão): tensão de cisalhamento que é dada em força por unidade de área⁵.

Submucosa: camada de tecido areolar abaixo da mucosa. Mucosa: É a camada celular que forma as superfícies das cavidades do corpo (intestinos, bexiga, etc).

⁴ TA INSTRUMENTS. *Rheology Solutions: Flow for AR 1000*. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-3. (Software Manual).

⁵ TA INSTRUMENTS. *Rheology Solutions: Oscillation for AR 1000*. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-6,7. (Software Manual)

Substâncias esclerosantes: são substâncias que alteram tecidos ou órgãos, e são caracterizadas pela formação de tecido fibroso que substitui o elemento anatômico normal.

Uretrite: inflação da uretra. Pode ser anterior ou posterior, conforme a porção inflamada da uretra.

Vesical: relativo à bexiga ou vesícula.

RESUMO

Este trabalho descreve a preparação, caracterização e mecanismos de interação de compósitos de colágeno aniônico:ramsana, com o propósito de desenvolver géis injetáveis para correções plásticas com concentrações similares aquelas encontradas comercialmente, e sem o uso do glutaraldeído. Os materiais foram caracterizados por eletroforese, espectroscopia no infravermelho, estabilidade térmica, propriedades reológicas e ensaios de fluidez. Os materiais obtidos independentemente do processamento, são formados por colágeno não desnaturado, com preservação da estrutura secundária da proteína. Os estudos reológicos mostraram um comportamento viscoelástico para todas as preparações independentemente do pH, e com módulo de armazenamento sempre maior que o módulo de perda ($G' > G''$ e $\delta < 45^\circ$), bem como uma maior resistência à deformação de géis de colágeno aniônico:ramsana equilibrados a pH 7,4 com relação aos géis equilibrados a pH 3,5. Medidas de viscosidade mostraram que além de um comportamento não newtoniano, a adição do polissacarídeo mesmo em baixas concentrações promove efeitos significativos sobre a viscosidade dos géis, indicando que a interação colágeno ramsana além de não comprometer a estrutura secundária do colágeno, sugere que esta interação ocorre provavelmente por ordenação da água ao redor do complexo formado. Já viscosidade dinâmica encontradas para as diferentes preparações, indicam que os compósitos obtidos são candidatos potenciais para serem utilizados em laringologia. Ensaio de fluidez mostraram que a força necessária para o escoamento de géis contendo ramsana foi sempre significativamente menor e com um perfil mais homogêneo do que aquela determinada para o colágeno aniônico, sugerindo que a associação colágeno aniônico:ramsana pode substituir com vantagens o glutaraldeído na estabilização das preparações comerciais do gel.

ABSTRACT

This work describes the preparation, characterization and mechanisms of interaction anionic collagen:rhamosan composites, with the purpose of developing injectable gels for plastic corrections with similar concentrations to the commercially founded without the use of glutaraldehyde. The materials were characterized by electrophoresis, infrared spectroscopy, thermal stability, rheological properties and fluidity tests. The materials obtained independently from processing are formed by no desaturated collagen with the preservation of secondary structure protein. The rheological studies showed a viscoelastic behavior for all the preparations independently of pH, and with storage modulus always greater than the loss modulus ($G' > G''$ and $\delta < 45^\circ$), as well a higher resistance to the deformation of anionic collagen:rhamosan gels equilibrated at pH 7.4 in relation to the gels equilibrated at pH 3.5. Measure of viscosity showed that besides a non Newtonian behavior of the polysaccharide addition even at low concentrations causes significant effects on the viscosity of the gels, indicating that collagen:rhamosan interaction probably occurs due to the water disposition around the complex already formed and it does not damage the secondary structure of the collagen. On the other hand, dynamic viscosity found for different preparations indicate that the composites obtained are potential candidates to be utilized in laringology. Flow experiments indicated that the force needed for the extrusion for anionic collagen:rhamosan composites, in comparison to anionic collagen, was significantly smaller and associated with a smooth flow, suggesting that the collagen anionic:rhamosan association can substitute glutaraldehyde with advantage in the stabilization for the gels commercial preparations.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Materiais Injetáveis para Correção Plástica

O histórico dos diversos produtos injetáveis surgidos ao longo desses anos, talvez nos ajude a compreender melhor a arte do desenvolvimento desses materiais, e mais importante ainda, onde poderemos chegar.

Ao percorrermos a história da civilização iremos encontrar que o uso de injeções de biomateriais na prática médica datam desde a época dos gregos, romanos, egípcios e fenícios, onde estes já tinham conhecimentos de alguns tipos de resinas e óleos minerais¹. Em torno de 1830, o aparecimento de um hidrocarboneto saturado e não solúvel no meio biológico, a parafina, nos trouxe o primeiro material artificial usado para alguns tipos de correções de defeitos de contorno facial como aumento de volume do queixo e também para aumento do volume da mama e perna². Particularmente na urologia, este material foi experimentado para tratamento da incontinência urinária³. No início de 1900 começaram a surgir os primeiros trabalhos descrevendo as complicações provenientes do uso indiscriminado da parafina, que vão desde reação inflamatória grave⁴ até a migração de partículas para os pulmões⁵. Entretanto, como as complicações principalmente pós-operatórias foram maiores que

seus benefícios, este material foi abandonado⁶ durante a I guerra mundial no mundo médico ocidental, mas no oriente seu uso continuou até os anos 60. Porém, nos E.U.A e na Europa, a parafina continuou sendo injetada pelos próprios pacientes para escapar do serviço militar⁷.

Repetidas tentativas para encontrar um agente satisfatório continuaram. Por volta de 1930 entramos na era do silicone líquido injetável. Em 1963 uma empresa americana desenvolveu um fluído de silicone de grau médico conhecido. Devido ao uso indiscriminado, inclusive por pessoas não pertencentes à área médica, fizeram com que complicações como migração para outros órgãos e reação inflamatória intensa logo surgissem⁸. Com isso, em 1965 o FDA proibiu o uso desse tipo de silicone e pediu a esta empresa que desenvolvesse uma nova formulação com um grau de pureza maior. Paralelo a isso, o FDA pediu ajuda a ASAPS (Associação Americana de Cirurgia Plástica e Estética) para acompanhar os resultados dessa nova formulação após implantado. A empresa então desenvolveu um novo silicone líquido injetável e ao mesmo tempo exigiu que seus compradores assinassem um contrato de que não injetariam mais a formulação antiga em humanos. Estudos da ASAPS relataram problemas semelhantes aos da primeira formulação e com isso, o dilema sobre o uso deste novo tipo de silicone continuou até a década de 70, quando então, o FDA proibiu formalmente o uso do silicone líquido injetável⁹. Porém, até hoje alguns países como o Japão e Itália ainda permitem o seu uso, pois especialistas destes países alegam que quando bem indicado e corretamente aplicado, o seu efeito é altamente satisfatório. No que nos concerne, no Brasil a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica Estética e Reconstructiva (SBCPER) proíbe o seu uso¹⁰.

Por volta de 1987, uma nova formulação de silicone voltada para correções de paralisia da corda vocal¹¹ e cirurgia estética¹² foi desenvolvida sob o nome de Bioplastike^{TM13}. Os fabricantes alegam que o tamanho de suas partículas são maiores do que aquelas do silicone dos anos 30, o que segundo eles impede a sua migração no tecido. Na verdade, não é bem isso que tem acontecido. Resultados histopatológicos tem mostrado problemas semelhantes ao silicone dos anos 30¹⁴. Por outro lado, o custo elevado por 1mL de BioplastikeTM tem dificultado a sua indicação.

Mais recentemente, outros materiais aloplásticos que causam menos efeitos colaterais e que são destinados para os mesmos fins tem sido estudados. Os mais utilizados são a pasta de politetrafluoroetileno^{15,16} e os géis de colágeno^{17,18}.

A pasta de politetrafluoroetileno é formada pela associação, na mesma proporção de politetrafluoroetileno, glicerina e polissorbato. Quando introduzido em tecido animal, as partículas de politetrafluoroetileno estimulam o crescimento local de fibroblastos e estes mantêm essas partículas dentro do tecido. Uma das primeiras aplicações da pasta de politetrafluoroetileno na terapia médica foi a injeção em cordas vocais para tratamento de disfonia¹⁹, seguido na década de 70 para a correção da incontinência urinária¹⁵ e refluxo vésico-ureteral após a década de 80²⁰. Entretanto, em função de sua elevada estabilidade biológica, suas aplicações na maioria das vezes eram acompanhadas por complicações localizadas, tais como o abscesso perineal e periuretral, uretrite, divertículo periuretral, granuloma gigante e cisto, além da migração da substância do local de injeção para outros órgãos²¹. Esses problemas até hoje tornam discutível o uso do politetrafluoroetileno para correções de defeitos de tecidos moles.

Em resumo, os uso de polímeros sintéticos injetáveis utilizados para correções defeitos de tecidos moles é limitado devido as severas reações inflamatórias e imunológicas¹⁴.

I.1.1. Géis injetáveis de colágeno

I.1.1.1. Histórico

Na opinião de diversos autores²², uma substância ideal como material injetável, deve ser de fácil aplicação, apresentar risco mínimo para o paciente, possibilitar a repetição do procedimento em caso de falha e não reduzir as opções futuras de tratamento. O ideal é utilizar materiais em que a probabilidade de efeitos colaterais sejam pequenos, pois as técnicas de implante variam de médico para médico. Outros fatores importantes que devem ser considerados para o sucesso de um implante, é que o produto escolhido deve ser biodegradável e de fácil acesso, ter efeitos previsíveis, durar o tempo necessário quando implantado com a técnica correta e ser acessível financeiramente²³. Por fim, deve-se ter a aprovação de órgãos competentes de cada país, pois desta forma estará garantindo a qualidade do material, possibilitando menores riscos aos pacientes.

Um dos produtos mais utilizados por técnicas de preenchimento e correções de defeitos de tecidos moles e que tem preenchido quase todos os requisitos acima é o colágeno bovino injetável (Figura 1). O primeiro passo em direção ao desenvolvimento deste material, tornou-se conhecido em 1958 quando verificou-se que em condições fisiológicas, um gel denso poderia ser produzido através de um aquecimento brando da solução de colágeno até a temperatura do corpo²⁴. Em 1960, foi descoberto que a remoção seletiva dos telopeptídeos amino e carboxi terminais

não helicais reduziriam significativamente a antigenicidade da molécula de colágeno²⁵.

Como alternativa à pasta de teflon e, para a satisfação daqueles que tinham problemas a corrigir, surgiu no final da década de 70 o colágeno bovino injetável²⁶, comercialmente conhecido como Zyderm® (Figura 1).

Gel injetável de colágeno uma vez implantado, deve produzir adequada elevação e persistência de seu volume, possuir elasticidade e fluidez suficiente para não causar obstrução na agulha durante o procedimento²⁷, ser biodegradável desde que mantenha seu efeito terapêutico. Em outras palavras, a substância injetada deve ser substituída por material endógeno, ocorrendo processo cicatricial controlado. Estas foram algumas das justificativas para o desenvolvimento dos géis de colágeno para correções plásticas em geral²⁸, tratamento de incontinência urinária²⁹ e aumento de volume de cordas vocais³⁰. Devido aos excelentes resultados apresentados, em 1979 o produto foi aprovado por médicos dos EUA e tem tido grande aceitação até os dias de hoje.

Figura 1. Colágeno bovino injetável comercial³¹.

Em uma recente história poucos produtos médicos tem estimulado maior interesse que o colágeno injetável. Entretanto, em 1981 após 6,5 anos dos primeiros resultados médicos apresentados com o produto, o FDA aprovou o seu primeiro agente injetável xenogênico para aumento de tecido mole⁹. Segundo a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica, desde a sua liberação, mais de um milhão de pacientes, em mais de 28 países receberam o implante de colágeno bovino injetável³². Um estudo realizado durante cinco anos, mostrou um aumento de 216% pela a procura de implante de colágeno injetável (Figura 2), mostrando grande aceitação e satisfação das pessoas que tem algum problema para corrigir. Devido ao grande sucesso do Ziderm I[®] (35mg/mL), pouco tempo depois, outras formas adicionais do produto foram liberadas, o Zyderm II[®] (65 mg/mL) que hoje é encontrado comercialmente e o Zyplast[®].

Figura 2. Colágeno injetável em cirurgia cosmética e procedimentos cirúrgicos não invasivos: 5 anos de comparação (1997-2001). **Fonte:** THE AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY (ASAPS)³².

Deve-se destacar que são preconizadas, antes da utilização do colágeno, a realização de teste cutâneo e avaliação da presença de reação de sensibilidade durante 4 semanas³³, pois resultados tem mostrado que 3% da população apresentam reação de hipersensibilidade²⁵.

Como pode-se observar, a busca para encontrar um implante ideal para preenchimento de defeitos de tecido mole, resultou na descoberta de vários materiais ao longo desses anos, deixando um grande arsenal de técnicas e produtos no mercado. No entanto deve-se destacar dois pontos: 1) embora existam vários materiais no mercado, ainda não se encontrou um que seja totalmente ideal; 2) dentre os materiais existentes, cabe ao cirurgião em última instância, devido ao “*know how*” acumulado através de seus anos de experiência, orientar seus pacientes, para que juntos estabeleçam metas a fim de escolher a terapia mais eficaz. Vale sempre lembrar que milagres não existem, temos limitações impostas pelo organismo e pelas técnicas existentes, por isso, precisamos conhecê-las e respeitá-las.

I.1.1.2 Características dos géis injetáveis de colágeno

Estes géis inicialmente são formados por uma dispersão microfibrilar de colágeno em tampão fosfato a pH 7,2 preparado a partir da precipitação controlada de microfibrilas a partir de colágeno solúvel pepsinado, em uma concentração final de 35 mg/mL³⁴. Recentemente, preparações comerciais de géis injetáveis de colágeno com concentrações de 65 mg/mL tem sido desenvolvidas, e vem mostrando serem mais eficiente na produção adequada da elevação e persistência do seu volume com relação ao 35mg/mL já existentes^{35,36}.

No entanto, a produção destes géis exige um rígido controle de qualidade em todas as etapas, desde a extração até a operação de formação das fibrilas, as quais devem possuir uma faixa restrita de tamanho, ou seja, aproximadamente 90% do total das fibras devem possuir diâmetros inferiores a 10 nm³⁷. Isto porque, para um bom desempenho técnico e funcional, é necessário que ao ser injetado o material tenha o comportamento de um fluido viscoso e que apresente no local de aplicação um comportamento semelhante a de um sólido elástico. Este por sua vez, deve permanecer no sítio sem solubilização por longo tempo e responder aos esforços mecânicos de maneira similar aos tecidos nas vizinhanças.

I.1.1.3 Estabilização de géis de colágeno injetável

Um aspecto importante na aplicação do colágeno injetável é a persistência do implante. Em muitos casos, o implante deve resistir à degradação o tempo suficiente para que se processe a regeneração do tecido, evitando a necessidade de sucessivas aplicações. Em vista disso, tem sido utilizado nas preparações comerciais o glutaraldeído (1,5-pentanodial), um aldeído bifuncional que interliga covalentemente grupos ϵ -amino de lisina e hidroxilisina de cadeias laterais adjacentes por meio de ligações do tipo base de Schiff. Esta reticulação no caso dos géis injetáveis é realizada com concentrações tão baixas como 0,0075%. Como todo agente de reticulação apresenta benefícios como também riscos, estas preparações são caracterizadas por efeitos citotóxicos localizados³⁸ e pela precipitação de fibras na agulha dificultando seu escoamento, comprometendo assim a eficiência da correção pretendida³⁹.

Para minimizar esses problemas, algumas alternativas tem sido propostas. Uma delas consiste na filtração dessas dispersões, utilizando telas de aço inoxidável como meio filtrante⁴⁰. Este método embora reduza a incidência de obstruções na agulha durante a extrusão do gel, tem o inconveniente do custo do processo. Outra alternativa é o uso de glicosaminoglicanas (GAG) na preparação de colágeno injetável⁴¹. Esses polissacarídeos aniônicos de alta massa molecular, presentes na matriz extracelular do tecido conjuntivo juntamente com o colágeno e a elastina tem um papel importante na fibrilogênese do colágeno, regulando a cinética de formação das fibras e seu tamanho⁴².

No caso do emprego do ácido hialurônico (AH) (Figura 3), quando adicionado à suspensão de colágeno reticulado na concentração de 5 mg/mL, facilita significativamente o escoamento do gel. Testes reológicos dessas misturas tem demonstrado que a presença de AH reduz a força necessária para se realizar a deformação e escoamento do material⁴¹, evitando a associação entre as fibras de colágeno por um mecanismo de repulsão eletrostática⁴². Apesar dos resultados favoráveis, o uso comercial de GAG é limitado devido à dificuldade em sua extração e posterior purificação, aumentando portanto o custo final da preparação⁴³.

Figura 3. Estrutura do ácido hialurônico (AH)³⁸.

Uma terceira alternativa foi a utilização de colágeno aniônico obtido através da hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas de asparagina e glutamina, associada ao polímero de origem bacteriana, a ramsana⁴⁴ (Figura 4), com a expectativa de obter géis de colágeno mais estáveis e com baixa capacidade de fibrilogênese em virtude da repulsão eletrostática. Dessa forma evitou-se o uso do glutaraldeído na estabilização, minimizando a citotoxicidade localizada.

Os resultados da injeção destes géis em submucosa vesical de coelho e, em comparação com as alterações morfométricas e histopatológicas⁴⁵ das preparações convencionais de colágeno associado à glutaraldeído quando injetados em submucosa vesical⁴⁶, mostraram que além das boas características de injetabilidade, são altamente biocompatíveis e eficientes na produção adequada da elevação e persistência do seu volume, em função do crescimento tecidual.

Figura 4. Estrutura da ramsana⁴⁴.

Mais recentemente, as preparações comerciais de géis injetáveis de colágeno tem sido desenvolvidas com concentrações de 6%, pela maior eficiência como suporte para o crescimento de tecido envolvido diretamente na correção plástica desejada^{47,48}.

I.2. Colágeno

O colágeno é a principal proteína estrutural dos tecidos dos vertebrados, correspondendo de 5 a 33% da proteína total e por conseguinte, a 6% em peso do corpo humano⁴⁹. Ela é responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas dentro do organismo. As diferentes propriedades destes tecidos são em parte devido ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com grande resistência à tração⁵⁰. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno possui também outras características, tais como a função de orientar tecidos em desenvolvimento^{51,52} que é altamente compatível na utilização como biomaterial.

De acordo com a estrutura primária das cadeias α que o constituem, hoje são conhecidos 19 tipos de colágeno⁵¹, cuja localização depende do tecido. Dentre eles se encontra o colágeno do tipo I, o mais abundante do tecido conjuntivo. Este é considerado como sendo de fácil obtenção, podendo ser encontrado na pele, tendões, ossos e submucosa intestinal porcina, como é o caso deste trabalho.

I.2.1. Colágeno tipo I

O colágeno tipo I tem como unidade básica o tropocolágeno (Figura 5b), uma macromolécula linear, semiflexível cuja massa molecular média é de aproximadamente 280.000 Da⁵³ e com dimensões de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. O tropocolágeno é formado por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α do mesmo tamanho (Figura 5b), sendo duas iguais (α_1) e uma diferenciada (α_2). Essas cadeias entrelaçam-se entre si formando uma hélice tripla em forma de um bastonete (Figura 5c)⁵¹⁻⁵⁴, e cada uma contém 1055 e 1029

resíduos de aminoácidos, respectivamente. A sequência desses resíduos de aminoácidos é notavelmente regular, e apresentam-se na forma de unidades repetitivas, os tripletes do tipo: $(\text{-Gly-X-Pro-})_n$ ou $(\text{-Gly-X-Hyp-})_n$, onde X é um aminoácido qualquer que é essencial para a organização do colágeno em fibras^{53,54} (Figura 5a). Esta sequência de resíduos, resulta em uma proteína com um conteúdo de glicina (Gly) de 33%, prolina (Pro) 12% e hidroxiprolina (Hyp) 11%, cuja estrutura na forma de hélice tripla é estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.

O tropocolágeno apresenta uma região helicoidal e extremidades não helicoidais, denominadas de telopeptídeos N e C-terminais, que possuem respectivamente 16 e 25 resíduos de aminoácidos (Figura 5)⁵¹⁻⁵⁴.

Figura 5. Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla; (d) Modelo do quarto alternado pentafibrilar proposto por Smith⁵¹⁻⁵⁴.

Nos tecidos, o colágeno organiza-se em estruturas fibrilares que são estabilizadas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta organização fibrilar tem origem na microfibrila, cujo modelo mais aceito é o de Smith⁵⁴ (Figura 5d). Neste modelo, as moléculas de tropocolágeno estão deslocadas um quarto em relação à molécula adjacente, apresentando também uma região de espaçamento vazio entre duas moléculas alinhadas longitudinalmente (“*gap*”), seguidas de uma região de sobreposição (“*overlap*”) destas moléculas (Figura 5d).

Devido as suas várias propriedades físico-químicas (reticulação variável, que controla o grau de embebição); Físico-mecânicas (entrelaçamento ou orientação das fibras) e biológicas (antigenicidade mínima, reduzida por tratamento com enzimas ou por reticulação); o colágeno é largamente utilizado como material para implante, tanto na sua forma pura como géis de colágeno⁵⁵, ou ainda associado a outras moléculas, como polissacarídeos biológicos e microbianos⁵⁶.

I.2.2. Colágeno aniônico

Modificações químicas em matrizes colagênicas^{57,58} constituem-se em alternativas de elevado potencial para melhorar ou modificar as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas. Nesse aspecto, a adição de cargas sobre matrizes colagênicas modifica a energia de superfície⁵⁹, resultando em uma melhor interação com o tecido atendendo então, as necessidades específicas da área de biomateriais.

Matrizes colagênicas com superfícies carregadas podem ser produzidas por reações químicas como a esterificação⁶⁰, succinilação⁶¹, deaminação⁶² e com o glutaraldeído⁶².

Um outro processo para a preparação de materiais de colágeno carregados negativamente a pH 7,4, e o qual foi utilizado neste trabalho, é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do colágeno tipo I⁶³ (Figura 6). Esta modificação conduz a um aumento total de até 106 cargas negativas⁶⁴ por unidade de tropocolágeno após tratamento alcalino de 72 horas, tempo de hidrólise utilizado neste trabalho.

Figura 6. Esquema da hidrólise dos resíduos de glutamina e asparagina presentes no colágeno em meio alcalino.

Como resultado, tem observado que a reação de hidrólise promove alterações no padrão da organização da estrutura microfibrilar da matriz colagênica, que estão relacionadas com o rompimento das ligações cruzadas do tecido e também com o novo padrão de interações eletrostáticas, que ocorre em função do aumento de cargas negativas da matriz⁶⁴. Este aumento inibe significativamente a habilidade de moléculas de colágeno em formar fibrilas, tendo uma completa inibição após 72 horas de hidrólise (Figura 7). Este fato é extremamente importante na obtenção do colágeno injetável, pois desta forma evitará o problema de precipitação de fibras durante a extrusão que é comumente encontrado nas preparações comerciais.

Outra vantagem é sua facilidade de obtenção, baixo custo e principalmente pelo fato de ser um tecido natural proveniente de diversas fontes, tais como tendões, serosa, pericárdio entre outras, que estão facilmente disponíveis no mercado.

Figura 7. Hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas dos resíduos de asparaginas e glutaminas presentes no pericárdio bovino⁶⁴.

1.3. Polissacarídeos Microbianos

Os polissacarídeos constituem um dos grupos mais abundantes e diversificados de biopolímeros⁶⁵. Esses apresentam alto grau de organização com relação a suas cadeias, que os fazem serem susceptíveis a mudanças de força iônica, temperatura e natureza do solvente. Em forma nativa ou modificada, estes polissacarídeos tem sido utilizados em indústrias de alimentos, farmacêuticas, agrícolas, cosméticas, exploração de petróleo⁴⁴ e mais recentemente para aplicações em biomateriais⁶⁶. Estas áreas de aplicações foram por muito tempo dominadas por polissacarídeos originados de plantas e algas marinhas, mas há mais de 30 anos este quadro tem

mudado com a exploração de polissacarídeos bacterianos que têm grande potencial de aplicação^{67,68}.

O primeiro polissacarídeo microbiano a ser comercializado foi a dextrana, seguido da xantana. O sucesso comercial deste último em várias áreas de aplicações deu origem a um grande interesse e concentração de esforços na pesquisa de novos polissacarídeos de origem microbiana. Como resultado dessas pesquisas muitos polissacarídeos microbianos com estruturas e propriedades diferentes tem sido desenvolvidos, estudados e patenteados nos últimos anos⁶⁷, dentre os quais se destacam a ramsana.

I.3.1. Ramsana

A ramsana (Figura 4) é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Alcaligenes ssp.* (ATCC 31961) sob condições de fermentação aeróbica⁶⁸. Sua estrutura química é semelhante a dos polissacarídeos gelana, welana diferenciando-se basicamente nas cadeias ramificadas. No entanto, deve-se destacar que esta diferença tem uma influência profunda no seu comportamento em meio aquoso, pois enquanto a gelana forma géis estáveis na presença de sais, a welana e a ramsana originam soluções muito viscosas com elevada estabilidade térmica e força iônica⁶⁹.

Sua aplicação na área de biomateriais, principalmente na produção de biomaterias injetáveis é recente^{46,70,71}, tendo início no grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos. O uso deste polissacarídeo para confecção de biomateriais foi motivado pelo seu histórico na área petroquímica, principalmente na perfuração de poços de petróleo onde é utilizado como agente lubrificante. Assim como esperado, quando associou-se ao colágeno para obtenção

de géis injetáveis a 2,8% (m/m) para correções plásticas em geral, ele apresentou boas características de injetabilidade⁷¹ e recuperação quando submetidos a tensões de até 30 Pa⁵⁶. Surpreendentemente, mostrou-se ser biocompatível quando injetado na submucosa vesical de coelho para correção do refluxo urinário⁴⁵. Dessa forma, tem-se conseguido evitar o uso do glutaraldeído encontrado nas preparações comerciais para estabilização destes géis, minimizando além da citotoxicidade localizada, o custo destes géis que hoje está em torno de 300 dólares cada mL⁷².

I.4. Reologia

Reologia é definida como sendo a ciência que estuda o fluxo e a deformação da matéria, na qual descreve a inter-relação entre força, deformação e tempo⁷³. O termo reologia vem de grego *rheos* que significa medida de fluxo⁷⁴. Já o filósofo grego Heraclitus descreveu a reologia como sendo o *rei de panta* = tudo flui, o que traduzido em termos reológicos por Marcus Reiner significa que tudo fluirá desde que se espere o tempo suficiente para que isto ocorra⁷⁴.

Para iniciar nossas discussões em reologia, devemos nos perguntar, como os materiais respondem à uma força aplicada por um determinado tempo? Para responder a esta pergunta é conveniente termos em mente alguns conceitos, como força e quais os modos de aplicá-la, e também deformação, pois ambas dependem da forma e tipo de amostra, bem como de suas dimensões relativas.

Em reologia, a força em um plano de cisalhamento é de importância primária, juntamente com compressão ou extensão⁷⁴. Por outro lado, a deformação é definida como o deslocamento relativo de pontos em um corpo, e pode ser dividido em dois tipos⁷⁵:

1) Fluxo = parte irreversível da deformação. Quando a tensão é removida o material não recupera sua configuração original.

2) Elasticidade: parte reversível da deformação. Quando a tensão é removida o trabalho aplicado é largamente recuperado e o corpo retém sua configuração original.

Deve-se destacar que o tipo de deformação depende do estado da matéria. Por exemplo, gases e líquidos deverão fluir quando uma força for aplicada, enquanto que os sólidos deverão deformar e assim esperamos que eles recuperem a sua forma original quando a força for removida. Isto nos lembra imediatamente que nós temos que considerar soluções e dispersões e não simplesmente materiais puros. Embora podem ser consideradas amostras de várias formas, vamos limitar esta forma como sendo várias placas sobrepostas exemplificando um modelo de lamelas, para definirmos alguns termos e conceitos (Figura 8)

Figura 8. Representação esquemática de deformação sob cisalhamento em placas sobrepostas⁷⁶.

Assim uma força de cisalhamento é aplicada paralelamente na parte superior e a deformação resultante é representada pelo Δx . De uma maneira mais geral, a tensão de cisalhamento (σ) pode ser usada para calcular o deslocamento de diferentes formas de amostras dividindo a força pela área em cima da qual a força foi aplicada. Deve-se lembrar que a pressão é o tamanho compressivo da tensão e por isso apresenta as mesmas unidades⁷⁵. Como foi aplicado uma tensão, uma deformação (γ) deverá ocorrer (ângulo mostrado na Figura 8). A fim de facilitar os cálculos, podemos definir esta deformação como relativa, isto é, a deformação por unidade de comprimento, onde o comprimento é aquele no qual as deformações acontecem (Figura 8).

Em materiais duros como sólidos, são tradicionalmente caracterizados pelo seus módulos (G), na qual é a razão da tensão aplicada e a deformação resultante⁷⁵. Alternativamente a compliância (J) pode ser usada⁷⁷. Esta é a relação inversa da deformação e tensão (Item III.3.5.1.2). Desta forma, se um material é um sólido mas não perfeitamente elástico, este fenômeno pode ser observado. Neste caso, uma deformação inicial é medida em momentos muito pequenos, mas a deformação é observada para crescer com o tempo. Removendo-se a tensão o material pode exibir ou não uma recuperação⁷⁶. Com relação aos líquidos, há várias classes de “líquidos elásticos” e por isso, não vamos nos prender à isso.

Como conclusão, materiais do “mundo real” são sólidos raramente elásticos ou líquidos viscosos, mas podem ser modelados com a combinação das duas propriedades. Eles são mais comumente chamados de materiais viscoelásticos⁷⁸. Devemos então nos fazer a seguinte pergunta, que medidas deveremos fazer em função do material que temos?

As técnicas reológicas mais comumente utilizadas são a oscilação (tensão e deformação controlada), fluência (para tensão controlada e tensão de relaxação para deformação controlada), e fluxo (tensão e deformação controlada). O último teste é intuitivamente destrutivo para as estruturas das amostras, e normalmente fornecem somente dados de viscosidade. Já os ensaios de fluência e de oscilação não destroem necessariamente a estrutura do material, mas podem ser estabelecidos para deformar a amostra até que esta retorne em seu estado inicial. Informações viscoelásticas são derivadas destes testes.

Embora análise de dados destas técnicas envolvem uma matemática um tanto complexa, os princípios destas técnicas são relativamente simples. Desta forma, o conteúdo matemático que será apresentado envolvendo estas técnicas serão o mínimo necessário para tal entendimento.

I.4.1. Oscilação

A técnica de oscilação é um teste não destrutivo, e mede simultaneamente o comportamento elástico e viscoso da amostra⁷⁶. Nestes testes de oscilação, uma amostra é submetida a deformação de cisalhamento oscilatório de amplitude máxima γ_{max} e frequência angular ω , na qual também pode ser expressada como $2\pi f$, onde f é a frequência:

$$\gamma(t) = \gamma_{max} \sin \omega t \dots \dots \dots \text{Equação 6}$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = \gamma_{max} \omega \cos \omega t \dots \dots \dots \text{Equação 7}$$

A resposta mecânica expressada como tensão de cisalhamento em função do tempo, $\tau(t)$, é também oscilatória e pode ser separada em componentes fora de fase ou em fase com a deformação⁷⁸ (Figura 11):

$$\tau(t) = \tau'(t) \sin \omega t + \tau'' \cos \omega t = G' \gamma_{\max} \sin \omega t + G'' \gamma_{\max} \cos \omega t \dots \dots \dots \text{Equação 8}$$

A componente da resposta de tensão que está em fase com a deformação aplicada (Figura 9a), está relacionada ao módulo elástico ou armazenamento, $G' = \tau' / \gamma_{\max}$, e a componente fora de fase (Figura 9b) está relacionada com o módulo viscoso ou de perda, $G'' = \tau'' / \gamma_{\max}$. G' é a medida da quantidade de energia estocada a partir do processo deformativo, enquanto que G'' é a medida da quantidade de energia dissipada no processo deformativo.

Figura 9. Fluxo oscilatório em cisalhamento⁷⁸.

Nós já vimos que poucas amostras são perfeitamente elásticas ou líquidas. A maioria delas exibem ambas propriedades nas quais variam em grau. A resposta elástica ideal é essencialmente instantânea, assim o atraso de fase entre os dois sinais é zero (Figura 9a). Para um líquido Newtoniano sem nenhuma elasticidade, a

diferença de fase é de 90° (Figura 9b). O ângulo de fase mostrado (δ) é corrigido por um sistema de inércia, e pode somente variar entre 0 e 90° .

I.4.2. Fluência

Outro tipo de deformação que existe é a fluência. Este modo consiste na aplicação de uma tensão nos materiais, e a deformação resultante é monitorada com o tempo⁷⁹. Para um melhor entendimento, acompanhem as Figuras 10 e 11 extraídas dos resultados deste trabalho e utilizadas como exemplo. A Figura 10, mostra uma curva de fluência para o gel de colágeno aniônico para uma tensão aplicada de 10 Pa por 300s. A faixa correspondente a deformação em uma curva de fluência, pode ser dividida em 3 partes⁸⁰. A primeira parte da Figura 10 (número 1) representa a componente elástica do material. A natureza viscoelástica do material é representada pela segunda parte (número 2). A parte final da curva (número 3), a deformação aumenta linearmente com o tempo.

Figura 10. Curva de fluência (deformação/recuperação, 10/0Pa) para o gel de colágeno aniônico 0,7% (m/m) após 72h de tratamento alcalino.

A Figura 11 mostra outra curva de fluência, desta vez para gel de colágeno aniônico:ramsana. Dependendo da força aplicada, está será suficiente para quebrar as ligações responsáveis pelo comportamento elástico do material, ou seja, a deformação aumenta significativamente e o comportamento do material é puramente viscoso.

Figura 11. Curva de fluência (deformação/recuperação, 15/0Pa) para o gel de colágeno aniônico:ramsana 0,7% (m/m) na proporção de 100:1.

I.4.3. Fluxo

O fluxo descreve a relação entre a tensão (relacionada a força aplicada) e a taxa de cisalhamento (gradiente de velocidade causada pela tensão) da amostra⁸¹. As equações 1, 2 e 4 da Figura 8 são as mais importantes em termos de fluxo.

Um gráfico de tensão de cisalhamento (σ) versus taxa de cisalhamento é denominado de curva de fluxo (Figura 12). Para um fluido Newtoniano a tensão cresce linearmente com o cisalhamento e embora não mostrado, a viscosidade permanece constante independente do cisalhamento.

Por outro lado, muitos materiais são não Newtonianos e seus comportamentos são mais complicados. Dentre esses se destacam:

- **Pseudoplásticos** (“*shear thinnig*”) na qual a viscosidade diminui com o aumento do cisalhamento. Matematicamente, este comportamento conhecido como “*shear thinnig*” pode ser modelado pela lei das potências (equação 10 da Figura 12, onde $n < 1$ e K é o coeficiente de viscosidade).

- **Dilatantes** (“*shear thickening*”) que ao contrário dos pseudoplásticos a viscosidade aumenta com o aumento do cisalhamento. Este comportamento é menos comum do que aqueles apresentados pelos pseudoplásticos, mas não obstante, alguns exemplos práticos incluem alguns aditivos de óleos poliméricos. Matematicamente, este comportamento também pode ser descrito pela lei das potências (equação 11 da Figura 12, onde $n > 1$).

- **Plásticos:** que apresentam viscosidade estrutural e que, adicionalmente, possuem um limite de escoamento ou fluidez, de tal forma que não escoam até que as forças de coesão que formam a estrutura tridimensional quando o fluido está em repouso sejam perturbadas ou rompidas, resultando na deformação elástica ou colapso da rede intermolecular, respectivamente.

Figura 12. Comportamento típico de fluxo de fluido Newtoniano e não Newtoniano⁸¹.

I.4.4. Reologia de géis injetáveis

Uma das maneiras de se avaliar as características de fluidez é um estudo das propriedades reológicas das dispersões de fibras de colágeno reconstituído ou de compósitos de colágeno formados com ramsana. Mesmo tendo relatos de um interesse crescente na caracterização reológica de géis de biopolímeros nos últimos anos⁸², trabalhos envolvendo colágeno são poucos na literatura, e estão limitados à medidas de compliância⁷⁷ e de forças de extrusão⁸³. Portanto, um levantamento experimental de parâmetros reológicos tornam-se relevantes, pois podem nos fornecer informações muito importantes a respeito das propriedades de escoamento e deformação dos materiais⁸⁴, além de nos ajudar a estabelecer uma relação entre as várias características estruturais destes géis fibrilares, uma vez que estruturas com geometrias definidas manifestam-se quando sujeitas a tensões cisalhantes. No caso particular deste trabalho, estas características são extremamente importantes, tanto no contexto dos estudos das relações estruturas/propriedades como no que diz respeito às aplicações finais.

Através do estudo da reologia pode-se avaliar duas componentes que atuam na deformação de um material sob a influência de uma tensão mecânica, que em geral atuam juntamente à elasticidade e a viscosidade. Um sólido perfeito é completamente elástico, enquanto que um líquido perfeito é completamente viscoso⁷⁸. No entanto, o comportamento mecânico da grande maioria dos materiais, em níveis variáveis, é regido por uma contribuição conservadora elástica, quanto por uma contribuição dissipativa viscosa⁷⁸. No caso de géis injetáveis essas propriedades são imprescindíveis, pois como dito no item I.1.1.2, para que se tenha uma boa aplicação para correção de tecidos moles, os géis a serem injetados deverão resistir a altas

tensões e no local da aplicação apresentar um comportamento semelhante a de um sólido elástico.

II. OBJETIVOS

No mecanismo proposto de estabilização do colágeno na presença do ácido hialurônico, ocorre uma fraca interação deste com o colágeno, o que confere ao gel uma superfície negativa que inibe o processo de agregação por repulsão eletrostática. Tal fato, resulta em um aumento da fluidez e uma diminuição de problemas de obstrução durante o processo de injeção. Com base nesse mecanismo, este trabalho tem como objetivo os seguintes pontos:

- Desenvolver e caracterizar compósitos de colágeno aniônico:ramsana com concentrações de colágeno de até 6% (m/m), pois é nesta concentração que as preparações de géis de colágeno injetável encontradas comercialmente, tem se mostrado mais eficientes na produção da adequada elevação e persistência de seu volume, para uma reconstrução tecidual eficiente. Uma vantagem é a substituição do glutaraldeído pela ramsana, visto que o glutaraldeído é um reagente com elevada citotoxicidade.

- Avaliar até que ponto a quantidade de ramsana afeta as propriedades de fluidez dos compósitos obtidos, visto que o comportamento reológico antes e durante

a extrusão em uma seringa, é uma característica extremamente importante de qualquer produto candidato a ser injetável.

- Em virtude da introdução de cargas na estrutura da hélice tripla do colágeno, pode-se perguntar quais são os efeitos causados pela ramsana em soluções de colágeno solúvel em meio ácido ou em géis em meio neutro. Com a finalidade de tentar responder a esta questão, julgamos importante o estudo de parâmetros reológicos como viscosidade, deformação e fluência destes géis. Outro aspecto importante, é tentar avaliar o tipo de interação que ocorre entre as duas macromoléculas através das medidas de viscosidade e energias de ativação dos compósitos.

Para alcançar estes objetivos, consideramos necessário o estudo do comportamento de soluções de colágeno na presença de ramsana, seguindo-se do desenvolvimento do gel e estudo de suas propriedades reológicas visando seu emprego como injetável para correção plástica em geral.

III. PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi desenvolvido de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma representativo do desenvolvimento experimental da preparação do gel de colágeno aniônico e de seu compósito com ramsana.

III.1. Materiais

III.1.1. Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados neste trabalho foram de grau P.A e estão relacionados a seguir: ácido fosfórico, borato de sódio penta hidratado, cloreto de sódio, ácido clorídrico, cloreto de cálcio, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de cálcio, EDTA, ácido bórico, ácido cítrico monohidratado, acetato de sódio trihidratado, metanol, *n*-propanol, ácido acético, tampão Tris, cloramina *T*, *p*-dimetil-amino-benzaldeído, 4-hidroxiprolina, Comassie Brilhante Blue R-250, dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida, glicina, glicerol, β -mercaptoetanol, *N,N,N',N'* tetrametiletilenodiamina (TEMED), ramsana (massa molecular de aproximadamente 1 milhão), padrão Sigma de proteínas para eletroforese. Foi utilizado também solução tampão fosfato 0,13M no valor de pH 7,4 e solução aquosa de ácido acético pH 3,5⁸⁵.

III.1.2. Matéria-prima para extração do colágeno

A matéria-prima utilizada para obtenção do colágeno foi a submucosa intestinal porcina (SIP) de animais com aproximadamente 5 anos de idade, purificada como normalmente feito para obtenção de “*cat-gut*”⁸⁶ e em forma de fitas. A serosa foi mantida congelada por volta de -10°C até antes de sua utilização. Após o descongelamento, o excesso de água da serosa foi removido com auxílio de papel de filtro e, em seguida picotada em pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento.

III.2. Preparações de colágeno

III.2.1. Gel de colágeno aniônico

O colágeno foi solubilizado a partir da submucosa intestinal porcina (SIP), após 72 h de tratamento em solução alcalina⁸⁷ contendo hidróxidos, cloretos e sulfatos de Na⁺, K⁺, Ca⁺², seguido de estabilização com uma solução de cloretos e sulfatos dos mesmos cátions citados acima, baseado na série de Holfmeister⁸⁸. Os sais residuais foram removidos por lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3% (3x, 6h), EDTA 0,3% a pH 11 (3x, 6h) e água destilada (6x, 2h). Finalmente o colágeno foi extraído com uma solução de ácido acético pH 3,5, de forma que a concentração final de colágeno correspondeu a 1% (m/m). Cerca de 50% do gel obtido foi purificado por precipitação pela adição de NaCl 0,9%, e centrifugação do precipitado a 15000 rpm a 20°C por 30 minutos, seguido de solubilização em ácido acético pH 3,5. Após alguns ciclos, o precipitado da centrifugação foi colocado em saco de diálise (limite de exclusão 1000 Da) e dialisado exaustivamente contra tampão fosfato (TF) 0,13M, pH 7,4 até que a condutância da solução fosse igual àquela do tampão. Após estabelecido o equilíbrio (condutividade constante), estes géis foram desaerados e estocados em frascos à temperatura de aproximadamente 5°C. As concentrações finais do géis foram ao redor de 1% (m/m).

III. 2.2. Compósitos colágeno aniônico:ramsana

O compósito foi preparado pela adição de um volume de uma solução de ramsana 3,0 mg/mL solubilizada em ácido acético pH 3,5 a uma massa de gel de colágeno aniônico pH 3,5, de tal modo a resultar em compósitos com relação de massa entre 1:100 a 1:25. Após homogeneização, estes géis foram dialisados contra

TF até condutividade constante e igual á uma solução de TF utilizado na diálise. Os géis resultantes foram centrifugados à 17.000 rpm por 120 minutos a 20°C, e suas concentrações ajustadas para 2, 4 e 6% (m/m). O ajuste destas concentrações foram feitas por evaporação da água dos géis contidos em tubos de plásticos graduados, com dimensões de 1,4 cm de diâmetro e 10 cm de altura, dentro de um dessecador em atmosfera controlada com o auxílio de uma bomba de vácuo e na presença de hidróxido de potássio (Figura 14).

Figura 14. Representação esquemática do processo de concentração do gel de colágeno aniônico:ramsana.

III. 3. Caracterização dos materiais de colágeno

III. 3. 1. Determinação das concentrações

III.3.1.1. Liofilização

A concentração do gel de colágeno aniônico “*bruto*” (antes da purificação), colágeno aniônico purificado e do compósito colágeno aniônico:ramsana 0,7; 2 e 4 e 6% (m/m), foram determinadas pela liofilização de aproximadamente 2,0 g destes géis, previamente congelados em nitrogênio líquido, em um liofilizador da EDWARDS modelo FREEZE DRYER *Modulyo*, até que as amostras atingissem massa constante. Esta determinação foi feita em duplicata.

III.3.1.2.Via Hidroxiprolina (Hypro)

As concentrações das amostras de colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado, e do compósito colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) na proporção de 75:1, foram determinadas pelo teor de hidroxiprolina^{89,90}, visto que o colágeno do tipo I é um material rico neste aminoácido, cerca de 13% (m/m)⁹¹.

a. Hidrólise

Amostras em duplicata dos géis de colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado, colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) com concentrações de 1,0; 1,1; 4,0 e 6,0% (m/m) respectivamente, foram liofilizadas e os resíduos (cerca de 0,5 g de cada amostra), foram hidrolisados em tubos hermeticamente fechados, com 2,0 mL de HCl 6 Mol/L a 110°C em banho de areia 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 do resíduo ácido e cada amostra foi diluída em 25,0 mL com água destilada.

b. Preparação dos reagentes⁸⁵

Solução I – *Tampão citrato 0,24 Mol.L⁻¹/acetato 0,99 Mol.L⁻¹pH 6,0*

A solução I foi preparada pela dissolução de 50,0 g de ácido cítrico monohidratado e 120,0 g de acetato de sódio trihidratado em 50,0 mL de água destilada, com adição de 12,0 mL de ácido acético (96%). Ajustou-se o pH da solução para 6,0 com adição de NaOH, e completou-se o volume para 1,0 L.

Solução II

A solução II foi preparada pela adição de 100,0 mL da solução I em uma mistura de 20,0 mL de água e 30,0 mL de *n*-propanol.

Solução III – Cloramina T 0,062 Mol.L⁻¹

Dissolveu-se 0,35 g de cloramina T em 2,5 mL de água destilada e adicionou-se 2,5 mL de *n*-propanol, completando-se o volume para 25,0 mL com solução II.

Solução IV – *p*-N,N-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB) 1,00 Mol.L⁻¹

Dissolveu-se 3,75 g de *p*-DAB em 10,0 mL de *n*-propanol. Resfriou-se a solução em banho de gelo e em seguida adicionou-se lentamente 6,5 mL de ácido perclórico (HClO₄) 60%, completando-se o volume final para 25,0 mL com *n*-propanol, sendo a solução estocada ao abrigo de luz.

Solução V – Hidroxiprolina 1 μg.mL⁻¹

Dissolveu-se 10,0 μg de hidroxiprolina em 8,0 mL de água destilada acidificada com HCl 6,0 Mol.L⁻¹. Após a dissolução total, completou-se o volume para 10,0 mL com água destilada.

c. Curva de padronização

Volumes de 0,1 a 2,0 mL da solução V, foram colocadas em tubos de ensaio e o volume completado para 2,0 mL com água destilada. A seguir, adicionou-se a cada amostra 1,0 mL da solução III. Estas soluções permaneceram em repouso por 20 minutos, e em seguida adicionou-se 1,0 mL da solução IV sob vigorosa agitação. Estas soluções foram aquecidas em banho-maria durante 15 minutos. Após este

tempo, os tubos foram retirados do banho e as leituras das absorbâncias a 550 nm em um espectrofotômetro da HITACHI (Modelo U-3000), foram efetuadas de modo a obter a curva de calibração (Figura 15).

Figura 15. Curva de padronização para determinação espectrofotométrica da concentração dos géis de colágeno via hidroxiprolina.

d. Determinação da concentração da solução de colágeno

Os produtos de hidrólise, item III.3.1.2.a, foram diluídos de modo a obter uma concentração que ficasse dentro dos valores de concentrações empregadas na curva de padronização (Figura 15), ou seja, entre 0,1 a 1,0 µg.mL⁻¹. Para isto, as amostras hidrolisadas foram primeiramente diluídas em um balão de 25,0 mL com água destilada. Em seguida, retirou-se 1,0 mL de cada amostra e transferiu-se para balões de 100,0 mL, completando-se o volume com água destilada. Destes balões foram retirados 0,5, 1,0 e 1,5 mL para serem submetidos a mesma metodologia do item c, descrito acima. O cálculo das concentrações de hidroxiprolina foram feitos por interpolação gráfica dos valores de absorbâncias da amostra, na curva de padronização (Figura 15).

III.3.2. Determinação da Massa Molecular (MM)

As massas moleculares do gel de colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado, colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) na proporção de 75:1, foram determinadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS como descrito por Laemmli⁹². As concentrações dos géis utilizadas foram de 10% para o gel de resolução e de 7% para o empilhamento.

As amostras de colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado e colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) foram preparadas por diluição em ácido acético à pH 3,5, obtendo-se uma concentração final de 3,0 µg/µL. 100,0 µL desta solução foi homogeneizada com 50,0 µL de tampão da amostra formado por Tris-HCl 2,0 mol/L (pH 6,8), SDS 10%, EDTA 0,2 mol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,5%, seguido de aquecimento em banho-maria por 3 minutos. O volume de amostra aplicada ao gel de poliacrilamida ficou entre 10,0 µL e 30,0 µL. Como referência, utilizou-se padrão de massas moleculares altas da Sigma, que é uma mistura de: Miosina (205000 g/mol), β -galactosidase (117000 g/mol), Fosforilase *b* (97400 g/mol), Albumina de Soro Bovino (66000 g/mol), Ovo albumina (45000 g/mol), Anidrase Carbônica (29000 g/mol). O volume de padrão aplicado foi de 5,0 µL.

As condições para eletroforese foram inicialmente desenvolvidas com 20 mA (65 V), até que as amostras entrassem no gel de resolução, passando-se em seguida para 30mA (100 V). Após o término da eletroforese, o gel foi fixado com solução de metanol:água:ácido acético (40:53:7) e as zonas correspondentes às proteínas foram reveladas com corante Comassie Brilliant Blue R- 250. Em seguida, o excesso de corante foi removido com sucessivas lavagens de ácido acético 7%, deixando-se o

gel secar entre duas folhas de celofane contendo uma solução de metanol:glicerol:água (30:3:7) durante 4 horas. Passado este tempo, o gel foi colocado em placa de vidro para secagem por 24h onde depois foi submetido a análise densitométrica. Para isto utilizou-se um aparelho da NONIUS Delft-Holanda com lâmpada de tungstênio de 40 Watts. As massas moleculares foram calculadas em função dos valores da mobilidade relativa (R_f) dos padrões que é dado por:

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela proteína}}{\text{Distância percorrida pelo corante}} \dots\dots\dots \text{Equação 12}$$

a partir dos quais construiu-se uma curva de calibração (Figura 16).

Figura 16. Curva de calibração de proteínas padrão (β -galactosidade, Fosforilase *b*, albumina bovina, ovo albumina, anidrase carbônica), em gel de poliacrilamida/SDS a 10% para a determinação da massa molecular das preparações de géis de colágeno.

III.3.3. Espectroscopia no Infravermelho

III.3.3.1. Preparação das membranas

As membranas a pH 3,5 foram preparadas pela adição de 4,0 mL de uma solução a 0,16% dos géis de colágeno aniônico, compósitos com ramsana nas proporções entre 100 e 25:1 e ramsana em moldes de acrílico com 4,0 cm de diâmetro dando origem a membranas de cerca de 0,4 mg/cm². Estas foram secas em capela de fluxo laminar a temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos em um aparelho BOMEM Modelo MB-102, no intervalo entre 400 a 4000 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹.

III.3.4. Estabilidade térmica

As medidas de estabilidade térmica foram determinadas como temperatura de desnaturação (T_d) e temperatura de encolhimento (T_s). As membranas foram preparadas pela adição de 9,0 mL dos géis de colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado, colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m), ramsana e compósitos com ramsana nas proporções entre 100 e 25:1 a pH 3,5 em uma concentração de 0,67% em moldes de acrílico com 4,5 cm de diâmetro dando origem a membranas de 4 mg/cm². Estas foram então equilibradas em tampão fosfato pH 7,4 com força iônica de 0,13 mol.L⁻¹ por um período de 24 horas. Atingido o equilíbrio, as membranas foram lavadas com água deionizada e secas em capela de fluxo laminar.

a) Temperatura de desnaturação (T_d)

Cerca de 10 mg das membranas preparadas acima, foram cortadas em discos e colocadas em cadinho de alumínio. Estes foram aquecidos a uma razão de 5 °C/min. (25 a 100 °C) sob atmosfera de N₂ em um equipamento DSC 2010 da TA INSTRUMENTS previamente calibrado com padrão de índio.

b) Temperatura de encolhimento (T_s)

As temperaturas de encolhimento foram determinadas em um equipamento de medida de ponto de fusão da Quimis (modelo Q 340-13), adaptado. De cada amostra foram removidas 2 tiras de dimensões de aproximadamente 2 x 0,2 cm a qual permaneceu em repouso em tampão fosfato 0,13 M a pH 7,4 por um período de 24 h. Após este tempo, cada tira foi introduzida em um tubo cilíndrico de 3,0 mm de diâmetro interno contendo tampão fosfato pH 7,4. O tubo foi colocado no aparelho onde se procedeu um aquecimento na razão de 2,0 °C/min., a partir da temperatura ambiente.

III.3.5. Propriedades reológicas

Comportamento reológico dos géis de colágeno aniônico e géis de colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções entre 100 e 25:1, e colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1 como viscoelasticidade, fluência e medidas de viscosidade, foram investigadas usando um reômetro de “stress” controlado da TA INSTRUMENTS (*modelo AR 1000N*), com geometria de placa paralela (4,0 cm de diâmetro-inox) e temperatura de 25°C (sistema Peltier), 1,5mm de “gap”. Foram utilizados aproximadamente 3,0 mL de amostras.

III.3.5.1. Propriedades viscoelásticas

III.3.5.1.1. Medidas de oscilação

Foram avaliados os módulos de armazenamento (elástico, G'), módulo de perda (viscoso, G''), módulo complexo (G^*), ângulo de fase (δ), dos géis descritos no item anterior. Para se obter a região viscoelástica destes géis, foi efetuado uma varredura de deformação entre 0,1 a 80Pa, onde os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram medidos como uma função da deformação a uma frequência constante de $10,0 \text{ rad.s}^{-1}$. Após o estabelecimento da região viscoelástica linear, experimentos dentro desta região foram realizados em uma variação de frequência de 1,0 a 60 rad.s^{-1} .

III.3.5.1.2. Medidas de fluência

Estas medidas estão baseadas na aplicação de uma tensão constante (“*stress*”) ao material e a deformação resultante (“*strain*”), é monitorada em função do tempo. Esta é uma medida da recuperação da deformação, e como consequência, um parâmetro importante na avaliação de géis potencialmente viáveis para aplicação como injetáveis, em virtude do processo de extrusão na seringa. A varredura efetuada na tensão aplicada foi entre 5,0 e 30,0 Pa por 300s e a recuperação do material foi monitorada por 600s⁷⁷ com o intuito de verificar em qual tensão aplicada ocorreria uma máxima recuperação dos materiais sem comprometer a estrutura macromolecular dos géis. Esta tensão determinada foi de 10 Pa para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a 0,7; 4 e 6% (m/m). A fim de proporcionar ao cirurgião responsável que for utilizar estes géis uma maior garantia com relação a quanto de força aplicar dependendo do tipo de correção pretendida,

efetuou-se medidas a tensões entre 10 e 30 Pa para os géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1. Nas curvas de fluência, a compliância (J) foi determinada por:

$$J(t) = \gamma(t)/\sigma \dots\dots\dots \text{Equação 13}$$

onde σ é a tensão imposta, e γ é a deformação.

Os experimentos foram realizados com aproximadamente 3,0 mL de gel de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana em concentrações de 0,7% (m/m) com relações de massa de 100:1, 75:1, 50:1, 25:1 a pH 3,5 e 7,4; e em géis de colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1. A geometria empregada foi a mesma descrita no item anterior.

III.3.5.2. Medidas de fluxo (“flow”)

III.3.5.2.1. Viscosidade

III.3.5.2.1.1. Viscosidade dinâmica

Medidas de viscosidade dinâmica foram efetuadas após determinação da região viscoelástica linear dos materiais, como descrito no item III.3.5.1.1. Após o estabelecimento da região viscoelástica linear (2% de deformação), experimentos dentro desta região com géis de colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções de 100 a 25:1 e géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1, foram realizados com uma variação de frequência de 1,0 a 60 rad.s^{-1} para obtenção da viscosidade dinâmica.

III.3.5.2.1.2. Viscosidade em função da temperatura

A viscosidade dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a 0,7, 2, 4 e 6% (m/m) e nas proporções de 75 e 50:1, foi determinada no equipamento com geometria e “gap” já descritos no item III.3.5. Os experimentos foram conduzidos a uma rampa de temperatura entre 25 a 60°C por 10 minutos a uma taxa de cisalhamento de 150 s⁻¹. A dependência da viscosidade em função da temperatura nos permitiu determinar a energia de ativação⁹³ dos géis de colágeno e de seus compósitos com ramsana para as inclinações dos gráficos $\ln \eta \times 1/T$ antes e após a temperatura de desnaturação do colágeno, 25 a 38°C e 38 a 48°C, respectivamente.

III.3.6. Ensaio de fluidez

Os géis de colágeno aniônico, colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções de 75 e 25:1 equilibrados a pH 3,5 e géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1 equilibrados a pH 7,4, foram colocados em uma seringa de 5,0 mL e extrudados através de uma agulha de 20 mm de comprimento e diâmetro interno de 0,55 mm, com auxílio de um aparelho, marca INSTRON. Uma célula de tração com capacidade máxima de 50Kg (Figura 17), foi utilizada para determinar a força necessária para mover o êmbolo, com velocidade de extrusão mantida em 1,0 mL/min.

Figura 17. Representação esquemática do sistema utilizado para o ensaio de fluidez

III.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um equipamento LEO com um detector Oxford, operando com feixe de elétrons de 20 keV. As amostras foram recobertas com 20nm de ouro em um metalizador Balsers modelo SDC 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias foram obtidas de membranas de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) nas proporções de 100 e 25:1, previamente equilibradas em TF pH 7,4. Todas essas membranas foram cortadas nas dimensões de 0,5x0,5cm e coladas em suporte próprio para MEV, com auxílio de fita adesiva de carbono.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Caracterização dos géis de colágeno aniônico com e sem ramsana, e também na forma de membranas

IV.1.1. Concentrações dos géis de colágeno

As concentrações dos géis de colágeno aniônico obtidas por hidrólise alcalina seletiva de grupos carboxiamidas da submucosa intestinal porcina, determinadas pelo processo de liofilização e indiretamente pela determinação de hidroxiprolina após hidrólise ácida da proteína, foram respectivamente de 1,0 e 0,89% (m/m). Para o caso do gel purificado por precipitação em NaCl e posterior solubilização em solução de ácido acético pH 3,5 as concentrações foram respectivamente de 1,1 e 0,99% (m/m). Neste caso o rendimento do processo de purificação em relação à quantidade de gel bruto utilizado foi de 56%, sugerindo que muito dos componentes presentes como contaminantes foram eliminados.

O procedimento experimental para a obtenção do compósito colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m), seria similar àquele utilizado para obtenção do compósito colágeno aniônico a 2,8% (m/m)⁷⁰, ou seja, somente pelo processo de centrifugação. No entanto, verificou-se que para obtenção de compósitos de géis de

colágeno aniônico:ramsana nas concentrações de 4 e 6% (m/m), este procedimento não foi adequado, pois a máxima concentração obtida para o compósito através da centrifugação foi de 3,2% (m/m), mesmo a 35.466g (18.000 rpm no rotor 7). O método alternativo adotado foi a combinação do processo de centrifugação, seguido da evaporação controlada do gel resultante com auxílio de vácuo e na presença de KOH sólido (Figura 14). O controle da evaporação foi realizada pela determinação da redução da altura do gel, que estava colocado em frascos cilíndricos com uma escala externa graduada em centímetros. Nestas condições, uma redução da altura de 8,60 cm para 6,81 cm correspondeu a um gel cujas concentrações foram de 4,0% (m/m) determinado por liofilização e 3,93% (m/m) via hidroxiprolina, e uma redução da altura de 9,20 cm para 4,90 cm correspondeu a um gel cujas concentrações foram de 6,1% (m/m) determinado por liofilização e 6,02% (m/m) via hidroxiprolina. A vantagem deste processo em relação à centrifugação, é ser facilmente controlado (presença ou não do KOH em função do tempo) e poder ser aplicado a volumes relativamente grandes de gel.

Em todos os casos, as concentrações determinadas por liofilização foram sempre superiores às determinadas via hidroxiprolina (Tabela 1). Esta diferença é explicada pelo fato de que materiais de colágeno quando liofilizados, após serem removidos do equipamento absorvem água rapidamente em valores de massa que podem chegar a atingir até 20% do seu peso⁹⁴. Na realidade a liofilização das preparações de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana, foi utilizada com o intuito de se obter uma estimativa da concentração dos géis para facilitar o ajuste da concentração na obtenção do compósito a 4 e 6% (m/m).

Tabela 1. Concentrações das preparações dos géis de colágeno aniônico 72h “bruto”, purificado por precipitação salina, gel de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m).

Amostras	Concentração % (m/m)	
	Liofilização	Hidroxiprolina (<i>Hypro</i>)
Colágeno aniônico 72h (bruto)	1,0	0,89
Colágeno aniônico purificado	1,1	0,99
Colágeno aniônico:ramsana	4,0	3,93
Colágeno aniônico :ramsana	6,1	6,02

IV.1.2. Massa Molecular (MM) dos géis de colágeno

As massas moleculares dos componentes protéicos presentes nos géis preparados, foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 10%, com auxílio de uma curva de calibração obtida pela mobilidade no mesmo gel, de proteínas padrões de massas moleculares conhecidas (Figura 18, aplicação a). Como mostra o densitograma do gel após coloração com Comassie Brilliant Blue R- 250 (Figura 19), a preparação do gel de colágeno aniônico 72h denominada de “bruta”, foi caracterizada por duas bandas com massas moleculares bem evidentes de 101000 Da 97850 Da, correspondentes as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, típicas para colágeno do tipo I⁸⁸. Foram observadas também a presença de contaminantes correspondentes a agregados de elevada massa molecular (mobilidade próxima de zero, Figura 19), bem como componentes de pequena massa molecular (mobilidade entre 0,7 à 1,0, Figura 19). Grande parte deste material contaminante, principalmente aqueles componentes com massas moleculares menores que 100.000 Da (Figura 18), foram eficientemente removidos pela precipitação do gel pela a adição de NaCl. Este método de purificação está baseado no fato de que componentes de massas

moleculares menores que aqueles das cadeias α não formam microfibrilas e portanto não precipitam. Massas moleculares determinadas para as cadeias α_1 e α_2 foram respectivamente de 100500 Da e 98100 Da. (Figura 18, aplicação b).

Figura 18. Eletroforese em gel poliacrilamida/SDS a 10% de: (a) proteínas padrão; (b) colágeno aniônico purificado; (c) colágeno aniônico “bruto”; (d) colágeno aniônico:ramsana a 4% (m/m); (e) colágeno aniônico:ramsana a 6% (m/m).

O densitograma para o gel de colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) foram caracterizados por um perfil similar aos anteriores com as cadeias α_1 e α_2 com massas moleculares de 100855 Da e 97600 Da, respectivamente (Figura 18, aplicação d). Outra característica mostrada pelo densitograma da Figura 18 foi a determinação das relações das intensidades entre as cadeias α_1 e α_2 que para o colágeno do tipo I é de 2,0 em virtude de sua composição, isto é, colágeno do tipo I é formado por duas cadeias α_1 idênticas e uma α_2 ⁸⁸. Estas relações foram respectivamente 1,84 para o colágeno aniônico “bruto”, 1,92 para o colágeno aniônico purificado e 1,93 para o colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m), como esperado para o colágeno do tipo I onde a relação é de 2,0⁸⁸. Estes resultados nos mostram que a hidrólise foi seletivamente realizada nos grupos carboxâmidos e que a

presença de ramsana para obtenção do compósito colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% não causou interferência na estrutura do colágeno .

Figura 19. Densitogramas do gel de poliacrilamida/SDS a 10%, corados com Comassie Blue de: **(a)** colágeno aniônico 72h “bruto”; **(b)** colágeno aniônico:ramsana (75:1) a 4% (m/m); **(c)** colágeno aniônico:ramsana (75:1) 6% (m/m); **(d)** colágeno aniônico 72h purificado.

IV.1.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Embora os resultados da análise por eletroforese mostrem a composição preservada das cadeias α_1 e α_2 , em virtude da ação desnaturante do SDS, esta técnica não garante que os géis obtidos isoladamente ou na forma de compósitos com ramsana, se encontrem na forma de hélice tripla. Esta característica de integridade da hélice tripla foi então avaliada em primeiro lugar por espectroscopia na região do infravermelho de membranas de géis de colágeno aniônico “bruto”, colágeno aniônico purificado e colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções entre 100 e 25:1 (Figura 20), 4 e 6% (m/m) na proporção de 75:1 formatadas em pH 3,5. Os espectros foram caracterizados pela presença de bandas típicas para amida I em

1654 cm^{-1} (estiramento do grupo $>\text{C}=\text{O}$, amida I) e bandas de amida II, em 1554 cm^{-1} resultantes das vibrações no plano da ligação N-H e estiramento C-N⁹⁵. As bandas largas observadas ao redor de 3300 cm^{-1} , são devidas ao estiramento O-H presentes no colágeno (treonina, serina e hidroxiprolina) e na ramsana (um polissacarídeo). A banda em 1236 cm^{-1} , corresponde à amida III e ao estiramento C-N da deformação da ligação N-H, enquanto aquela em 1454 cm^{-1} corresponde à conformação dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina⁹⁶.

Figura 20. Espectros no infravermelho de membranas formatadas a pH 3,5: (a) Colágeno aniônico; (b) Colágeno aniônico:ramsana 100:1; (c) Colágeno aniônico:ramsana 75:1; (d) Colágeno aniônico:ramsana 50:1; (e) Colágeno aniônico:ramsana 25:1; (f) Ramsana.

A fim de verificar se o tratamento alcalino e a presença de ramsana afetou a integridade das preparações em termos de manutenção da estrutura secundária do colágeno, foram determinadas as relações de absorvâncias para as bandas

A_{1235}/A_{1450} . Esta relação fornece a integridade da hélice tripla, pois a intensidade da banda em 1235 cm^{-1} corresponde às vibrações no plano do tipo amida III (C-N e à vibração N-H) são sensíveis a variações na estrutura tridimensional do colágeno, enquanto que a banda em 1450 cm^{-1} é praticamente constante, ou seja, corresponde as vibrações dos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina e são independentes das variações estruturais do colágeno, podendo assim ser utilizadas como um padrão interno⁹⁷. A integridade da hélice tripla fica demonstrada quando a razão é igual a 1,0 em colágeno na forma ácida e 1,20 para colágeno a pH neutro⁹⁷.

Como mostrado na Tabela 2, as relações de absorbâncias para as bandas A_{1235}/A_{1450} foram próximas ou maior a unidade, mostrando que a estrutura secundária (hélice tripla) foi preservada durante o processo de extração do colágeno e quando adicionado a ramsana para obtenção do compósito a 4 e 6% (m/m), uma vez que para materiais desnaturados esta relação é próxima de 0,6⁹⁵. As relações encontradas para o colágeno aniônico “bruto”, colágeno aniônico purificado e colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) foram respectivamente de 0,99; 1,02; 1,18 e 1,22. Para os compósitos a 0,7% (m/m) com proporções de ramsana entre 100:1 a 25:1, essa variação foi na mesma ordem (Tabela 2), sugerindo que de alguma forma ocorre uma interação entre o colágeno e o polissacarídeo, pois em relação à membranas de colágeno, esta relação foi significativamente maior. Desta forma, estes resultados sugerem que a molécula de ramsana pode estar induzindo uma maior organização estrutural das moléculas de colágeno.

A membrana de ramsana formatada em pH 3,5 foi caracterizada pela presença, além da banda em 3000 cm^{-1} mencionada acima, por bandas típicas de vibrações axiais de ésteres (C=O) em 1728 e 1200 cm^{-1} , indicando que este polissacarídeo se

encontra na forma acetilada, uma vez que a ausência destas são indicativas que o polissacarídeo se encontra na forma desacetilada⁶⁷. Estas bandas, por sua vez não foram observadas no compósito colágeno aniônico:ramsana provavelmente devido a sua baixa concentração do polissacarídeo na preparação, 75:1.

Tabela 2. Razão de absorbâncias (A_{1235}/A_{1450}) no infravermelho e medidas de estabilidade térmica via Ts e DSC em membranas de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana.

Amostras	1235/1450 ^(a)	Estabilidade térmica	
		Ts (°C) ^(b)	DSC (°C) ^(b)
CA “bruto”	0,99	46,5±0,2	48,1
CA purificado	1,02	46,8±0,2	48,2
CAR 4% (75:1)	1,16	48,6±0,6	48,8
CAR 6% (75:1)	1,19	49,5±0,2	49,9
Ramsana	-----	-----	-----
Amostras a 0,7%			
100:1	0,98	-----	42,4
75:1	1,05	-----	42,4
50:1	1,18	-----	42,7
25:1	1,22	-----	42,7

(a) Relações das membranas formatadas a pH 3,5, visto que membranas formatadas em pH 7,4 são muito opacas.

(b) Membranas formatadas em pH 7,4.

IV.1.4. Estabilidade térmica

A integridade da hélice tripla do colágeno presente nos géis foi também verificada pela presença de transição térmica⁹⁸ obtidas por DSC e por medidas de T_s ⁸⁸ (Tabela 2), visto que as formas desnaturadas de colágeno não são caracterizadas por nenhuma transição térmica no intervalo de temperatura estudado⁹⁸.

IV.1.4.1. Temperatura de encolhimento (T_s)

Os valores de T_s (Tabela 2) mostraram que o processo de solubilização e formação das membranas não causou a desnaturação da proteína, independentemente do processo de extração, purificação ou associação com a ramsana, visto que uma característica de matrizes de colágeno desnaturado é não apresentar qualquer transição no intervalo de temperatura estudado⁹⁸. Para as membranas de colágeno aniônico “bruto”, colágeno aniônico purificado e o compósito colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m), estes valores foram respectivamente de $45,7 \pm 0,9$, $46,8 \pm 0,2$, $48,6 \pm 0,6$, $49,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ e diferentemente dos espectros no infravermelho, sugerem que nenhuma interação parece ocorrer entre as duas macromoléculas, devido a similaridade dos valores de transição térmica.

IV.1.4.2. Temperatura de desnaturação (T_d)

Embora a temperatura de encolhimento (T_s) seja utilizada como uma medida do comportamento térmico de materiais de colágeno, foi empregada também a calorimetria exploratória diferencial para melhor definição das características térmicas dos materiais, principalmente para definir ou não a interação sugerida pelo IV. As curvas de estabilidade térmica por DSC de membranas de colágeno aniônico

antes e após a purificação, colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) e ramsana formatadas a pH 7,4, são mostradas na Figura 21. As temperaturas de desnaturação observadas para o colágeno aniônico “*bruto*”, colágeno aniônico purificado e o composto colágeno aniônico:ramsana a 4e 6% (m/m), apresentaram valores similares aos descritos para o Ts. As curvas obtidas também não foram indicativas de uma provável interação entre o colágeno e a ramsana, visto que os valores de Td determinados para o colágeno aniônico “*bruto*”, purificado e para o composto foram similares e de 48,08, 48,21 e 48,80 e 49,88°C respectivamente e com perfis muito similares.

Figura 21. Curvas DSC de membranas conformadas em pH 7.4: **(A)** colágeno aniônico “*bruto*”; **(B)** colágeno aniônico purificado; **(C)** colágeno aniônico:ramsana a 4% (m/m); **(D)** colágeno aniônico:ramsana a 6% (m/m), **(E)** Ramsana.

Embora não mostrado, o mesmo comportamento e com a mesma magnitude também foi observado para os compósitos com ramsana nas proporções entre 100 e 25:1 (Tabela 2). Como esperado a membrana de ramsana não mostrou qualquer transição térmica em função da sua estabilidade neste intervalo de temperatura⁹⁹.

Estes resultados mostram que não há influência da ramsana sobre a estrutura secundária do colágeno, pois no intervalo de temperatura estudado a ramsana não apresentou nenhuma transição térmica. Mostram também, que a ramsana não interfere na capacidade de organização das moléculas de tropocolágeno em meio ácido ou exposto a tampão fosfato.

I.V.2. Estudos de Reologia

I.V.2.1. Propriedades viscoelásticas

O conhecimento das propriedades viscoelásticas no desenvolvimento de géis injetáveis, torna-se necessário, pois ao ser injetado estes géis tem que apresentar um comportamento de um fluido viscoso e no local de aplicação apresentar um comportamento semelhante a de um sólido elástico.

Os dados de viscoelasticidade foram obtidos após prévio estabelecimento de uma varredura de deformação a frequência constante de 10 rad.s^{-1} , para estabelecer a região linear do comportamento viscoelástico dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana equilibrados a pH 3,5 e 7,4. A região linear foi determinada para o limite de 2% deformação. Nesta região, foram determinados para géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana, os módulos de armazenamento (elástico, G'), módulo de perda (viscoso, G'') e os ângulos de fase ($\delta = \arctan G''/G'$) a uma frequência de $1,0 \text{ rad.s}^{-1}$ (Figura 22). Os resultados

mostram que, apesar dos módulos G' e G'' variarem em magnitude, o módulo elástico sempre predominou sobre o viscoso ($G' > G''$ e $\delta < 45^\circ$), independentemente da composição do gel (Figura 22). Embora não mostrado, os resultados à pH 3,5 foram na mesma magnitude.

Figura 22. Módulo elástico e viscoso em função da concentração de géis de colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4: **(a)** colágeno aniônico:ramsana 75:1; **(b)** colágeno aniônico:ramsana 50:1.

Análise dos reogramas de frequência para géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana 0,7% (m/m) nas proporções entre 100 e 25:1, mostrou o

mesmo comportamento para experimentos a uma frequência fixa, ou seja, indicaram a predominância do caráter elástico das preparações. Tanto para as amostras a pH 3,5 como para pH 7,4, G' e G'' apresentaram comportamentos similares, com valores de G' consideravelmente maiores que G'' (Figura 23).

Figura 23. *Módulo de armazenamento (G')* ■ - colágeno aniônico 72h; ▼ - colágeno aniônico:ramsana(100:1); ◆ - colágeno aniônico:ramsana (75:1); ▲ - colágeno aniônico:ramsana (50:1); ● - colágeno aniônico:ramsana (25:1) e *Módulo de perda (G'')* -- colágeno aniônico 72h; ▽ - colágeno aniônico:ramsana (100:1); ◇ - colágeno aniônico:ramsana (75:1); △ - colágeno aniônico:ramsana (50:1); ○ - colágeno aniônico:ramsana (25:1) em função da frequência. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4.

Comparando o colágeno aniônico com os seus compósitos na presença de ramsana à pH 3,5, pode-se observar que o colágeno tem um módulo de armazenamento (elástico) maior que para seus compósitos (Figura 23). Isto ocorre porque neste pH o colágeno aniônico obtido após 72h em meio alcalino, possui 163 cargas positivas⁶⁴ que lhe confere uma grande camada de solvatação, fazendo com que o módulo elástico seja maior quando comparado com o colágeno na presença de um polieletrólito carregado negativamente (ramsana). A presença deste polieletrólito, faz com que parte destas cargas positivas presentes no colágeno aniônico hidrolisado sejam neutralizadas, acarretando uma diminuição no módulo elástico (G'). No entanto, a pH 3,5 $G'_{\text{colágeno}} > G'_{\text{compósito}}$.

A pH 7,4, a situação é diferente, pois ocorre a predominância de cargas negativas, chegando a aproximadamente 91 cargas⁶⁴. Com isso, ao adicionar um polieletrólito carregado negativamente, a ramsana, essa quantidade de cargas negativas aumentam fazendo com que uma maior solvatação do colágeno aniônico na presença de ramsana seja maior em relação ao colágeno aniônico. Neste caso $G'_{\text{compósito}} > G'_{\text{colágeno}}$.

Uma avaliação a nível estrutural destes dados, nos conduzem a dizer que feixes de fibras mais ordenados, que ocorre a pH 7,4, resultam em faixas mais estreitas de deformação viscoelástica, independente da presença de ramsana. Tal comportamento pode ser explicado a partir da orientação fibrilar progressiva na direção do escoamento, provocando uma diminuição na deformação da camada de hidratação das fibras proteicas

Embora não mostrado, a análise dos reogramas de deformação em função do tempo nos possibilitou identificar o ponto de gel ($G' = G''$) nos diferentes pHs. Os

resultados obtidos (Tabela 3), mostram uma diminuição significativa na redução do ponto de geleificação quando se adiciona a ramsana no colágeno aniônico, independente da proporção e do pH. A pH 3,5, esta redução foi de aproximadamente 104 segundos (459,8 a 355,5 segundos) no colágeno aniônico para no compósito a 75:1. Já a pH 7,4 esta redução foi de aproximadamente de 25 segundos (298,1 a 274,6 segundos). Esta redução no ponto de gel sugere, assim como os resultados na região do IV e das propriedades viscoelásticas, que na formação do compósito uma interação está ocorrendo entre o colágeno e a ramsana. Sugere também que a presença da ramsana mesmo em pequenas proporções pode permitir a obtenção de géis mais concentrados e com melhor fluidez quando submetidos a grandes tensões de cisalhamento sem comprometer a estrutura macromolecular, podendo desta forma evitar a precipitação colágeno.

Tabela 3. Ponto de gel para colágeno aniônico e o compósito colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) em diferentes proporções preparados a pH 3,5 e 7,4.

Preparações (m/m)	Tempo (s)	
	pH 3,5	PH 7,4
0	459,8	298,1
100:1	355,8	286,0
75:1	355,5	274,6
50:1	355,7	274,8
25:1	401,3	274,3

I.V.2.2. Ensaios de fluência

Para obter uma melhor compreensão dentro da origem da resposta viscoelástica dos géis de colágeno aniônico e dos compósitos, foram feitos experimentos de fluência. Deve-se destacar que queremos materiais com comportamento viscoelástico (Figura 10), pois assim que o cirurgião for efetuar a aplicação, deseja-se que o material mantenha as suas propriedades, o que não acontece na Figura 11. Primeiramente determinou-se a tensão na qual as diferentes preparações apresentaram máxima recuperação. A determinação desta tensão é extremamente importante, pois qualquer produto candidato a ser injetável deve resistir a altas tensões e no local de aplicação deve também apresentar um comportamento semelhante a de um sólido elástico. Esta tensão foi determinada, submetendo-se os géis a deformações induzidas por tensões variáveis, seguido da monitoramento da recuperação em um intervalo de tempo, 600s⁷⁷ (Figura 24a). Esta varredura foi entre 5,0 - 30,0 Pa para géis equilibrados a pH 3,5 e de 5,0 - 15 Pa para géis equilibrados a pH 7,4 (Figura 24b). O intervalo menor para géis a pH 7,4 deve-se a alterações irreversíveis da estrutura do gel observadas para valores > 15 Pa (Figura 11). Como a recuperação da estrutura implica na reorientação e reagregação do colágeno, maiores recuperações da deformação para os géis equilibrados nos dois pHs foi 10Pa, a tensão operacional definida para os experimentos de fluência.

Embora não mostrado, tensões de até 30Pa puderam ser aplicadas em amostras de géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) na proporção de 75:1, sem comprometimento da estrutura macromolecular e com recuperações superiores a 75%.

Figura 24. Curvas de fluência para colágeno aniônico após 72 h de hidrólise sob condições de tensão entre 5,0 e 30,0 Pa. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4.

Tendo em vista que a 10Pa ocorre uma melhor recuperação dos materiais (melhor comportamento viscoelástico), amostras de colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções entre 100 e 25:1 foram submetidas a esta tensão. A Figura 25 mostra as curvas de fluência obtidas. Essas indicam que a presença da ramsana, mesmo em pequena proporção promove um aumento bastante significativo relacionado a deformação dos géis tanto a pH 3,5 como pH 7,4, ou seja, o maior raio

de giro das partículas compostas pelo agregado colágeno aniônico:ramsana faz com que estas sejam mais resistentes a deformação quando submetidas a uma dada tensão, pois enquanto a recuperação para o colágeno aniônico a pH 3,5 foi de 98,4% a presença de ramsana no compósito a 25:1 a recuperação foi de 47,9% (Tabela 4). Já a pH 7,4 estes valores foram respectivamente de 68,3 e 27,6% para o colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana 25:1.

Figura 25. Curvas de fluência das preparações de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana nas proporções de 100:1, 75:1, 50:1 e 25:1, obtidas a um stress de 10 Pa. (a) pH 3,5; (b) pH 7,4.

Essas diferenças observadas nas preparações a diferentes pHs, são caracterizadas pelo fato de que a pH 3,5 as moléculas de tropocolágeno estão mais solvatadas que a pH 7,4. Embora a pH 3,5 estas preparações apresentem um melhor comportamento viscoelástico que as preparações a pH 7,4, por sua vez são menos resistentes a deformação, o que não é viável para o tipo de aplicação a que se destinam essas preparações.

Tabela 4. Percentagem de recuperação dos géis de colágeno associados ou não com a ramsana quando submetidos a uma tensão de 10 Pa.

Preparações	% Recuperação	
	pH 3,5	pH 7,4
Amostras a 0,7%		
Colágeno aniônico 72h	98,4	68,3
Colágeno aniônico ramsana (100:1)	93,3	61,4
Colágeno aniônico ramsana (75:1)	50,4	50,7
Colágeno aniônico ramsana (50:1) ^(a)	94,9	70,8
Colágeno aniônico ramsana (25:1)	47,9	27,6
Amostras a 4 e 6% a pH 7,4		
Colágeno aniônico ramsana 6% (75:1)	88,18	
Colágeno aniônico ramsana 6% (50:1)	96,14	
Colágeno aniônico ramsana 4% (75:1)	94,44	
Colágeno aniônico ramsana 4% (50:1)	83,52	

(a) Estes resultados nos indicam que possivelmente não deva ter ocorrido uma completa homogeneização do material, visto que os valores estão próximos dos obtidos sem a ramsana.

Análises dos compósitos colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) a pH 7,4 nas proporções de 75 e 50:1, também foram realizadas. Após varredura de tensão, esta também foi fixada em 10 Pa.

A Figura 26 mostra as curvas de fluência obtidas para colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) a pH 7,4 nas proporções de 75 e 50:1. Da mesma forma que para os compósitos a 0,7% (m/m), essas curvas nos mostram que a ramsana mesmo em pequenas proporções, promove um aumento bastante significativo com relação a deformação dos géis, evidenciando melhor que o maior raio de giro das partículas compostas pelo agregado colágeno aniônico:ramsana originadas devido ao aumento da concentração, faz com que estas sejam mais deformativas quando submetidas a uma dada tensão. Isto é confirmado pelas recuperações dos compósitos colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% na proporção de 75:1, onde estas foram de 88,18 e 94,44%, respectivamente (Tabela 4).

Figura 26. Curvas de fluência dos compósitos colágeno aniônico:ramsana equilibrados a pH 7,4, obtidas após a aplicação de uma tensão de 10,0 Pa: **(a)** colágeno aniônico:ramsana 4% (50:1); **(b)** colágeno aniônico:ramsana 4% (75:1); **(c)** colágeno aniônico:ramsana 6% (50:1); **(d)** colágeno aniônico:ramsana 6% (75:1).

Embora ainda não se saiba o tipo de interação que está ocorrendo entre o colágeno e a ramsana, fica evidente que a presença do polissacarídeo em pequenas proporções faz com que o compósito seja mais resistente a deformação quando comparado com o colágeno sem o polissacarídeo. Esses resultados sugerem que as partículas formadas pelo agregado colágeno aniônico parecem estar realizando o papel de um “colchão de água”, semelhante ao modelo entre colágeno e as GAG *in vivo* que em tecidos são capazes de absorver solicitações mecânicas^{100,101}. Este é o caso das cartilagens articulares que são constituídas de colágeno, água e proteoglicanas (PG). Nesta matriz as fibras de colágeno fornecem a resistência, enquanto que as PG contribuem para a resistência da estrutura através da pressão osmótica originada da repulsão eletrostática entre os excessos de cargas negativas na matriz. De modo geral, para que haja um equilíbrio com o fluido sinovial, um balanço entre a tensão exercida pela matriz colagênica e a pressão externa aplicada deve existir. No entanto, no equilíbrio a pressão aplicada deve ser igual a diferença entre as pressões do domínio das PG e do colágeno, pois assim, água e íons pequenos se deslocarão através da matriz colágeno:PG da cartilagem e se redistribuirão entre os domínios, em resposta a variações de pressão externa.

I.V.2.3. Ensaios de fluidez

O fato de considerarmos que as partículas formadas pelo agregado colágeno:ramsana realizam um papel de um “colchão de água”, devido a manutenção das propriedades viscoelásticas após deformações reversíveis observadas nas curvas de fluência, devemos esperar que os géis na presença do polissacarídeo melhorem as propriedades de fluidez, uma vez que a estrutura colagênica e a interface colágeno:ramsana formam domínios diferenciados para fixação de água. Com isso,

ao ser aplicado uma pressão para escoar o gel da seringa, as moléculas de água se rearranjam entre esses domínios fazendo com que a partícula se deforme.

A propriedade de fluidez, é uma característica importante de qualquer produto candidato a ser injetável. O comportamento viscoelástico observado nos experimentos de fluência deve ser mantido durante a extrusão em uma seringa, pois para que se tenha uma boa aplicação para correção de tecidos moles, os géis ao serem injetados deverão resistir a altas tensões e no local da aplicação apresentar um comportamento semelhante a de um sólido elástico. A não ocorrência de precipitação de fibras destes géis durante a extrusão é uma outra característica muito importante no desenvolvimento de géis injetáveis.

Os ensaios de fluidez de géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções de 75 e 25:1 equilibrados a pH 3,5 e extrudados através de uma agulha de 20x 0,55 mm (Figura 27a), mostraram de modo significativo a influência da ramsana no comportamento destes géis. Enquanto a força necessária para o escoamento do colágeno aniônico foi de 21,08 N, para o compósito colágeno aniônico:ramsana 75:1 e 25:1, estas forças foram significativamente menores e 13,14 N e 11,96 N.

Outra característica observada para o escoamento dos géis de colágeno aniônico:ramsana em relação ao gel de colágeno aniônico, foi a menor frequência da presença de picos de contrapressão, provavelmente devido a problemas similares aos descritos para os géis estabilizados com glutaraldeído (GA)⁹⁷. Resultados de fluidez para géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) equilibrados a pH 7,4 (Figura 27b), mostraram que os mesmos apresentaram um comportamento similar aos

obtidos a pH 3,5 nas concentrações de 0,7% (m/m), mesmo não tendo sido estabilizados com GA.

Figura 27. Escoamento de géis de colágeno aniônico e seus compósitos com ramsana, através de uma agulha (20x0,55 mm) e velocidade constante de escoamento de 1,0 mL/min: **(A)** géis de colágeno aniônico a 0,7% (m/m), e proporções de ramsana de 25:1 e 75:1 (m/m), pH 3,5; **(B)** compósitos colágeno ramsana nas concentrações de 4 e 6%, (75 e 50:1 m/m), pH 7,4.

Tanto a pH 3,5 com géis a 0,7% (m/m) como a pH 7,4 com géis de 4 e 6% (m/m), os efeitos observados com a adição de ramsana são bastante importantes e significativos, pois forças de extrusão abaixo de 40 N são facilmente alcançadas pela força muscular manual⁸³, possibilitando ao cirurgião uma maior facilidade de manipulação do material durante o procedimento cirúrgico. Deve-se destacar que picos de força alcançados na presença de ramsana estão abaixo daqueles conseguidos com as preparações comerciais a 3,5 mg/mL⁸³, indicando que além de excluir o problema da citotoxicidade associada ao glutaraldeído, a ramsana vem facilitar o trabalho do cirurgião durante a extrusão.

Uma avaliação estrutural destes dados juntamente com aqueles de fluência e viscoelasticidade, nos conduzem a dizer que feixes de fibras mais ordenados (pH 7,4) resultam em uma menor frequência de aparecimentos de picos de contra-pressão e faixas mais estreitas de deformação viscoelástica, independente da presença de ramsana. Tal comportamento pode ser explicado a partir da progressiva orientação fibrilar na direção do escoamento a medida em que a força é aplicada, provocando uma diminuição na deformação da camada de hidratação das fibras proteicas (Figura 28).

Figura 28. Representação esquemática da deformação de uma partícula a medida em que uma força é aplicada durante a extrusão.

I.V.2.4. Viscosidade dinâmica

A viscosidade de um material é a medida de sua resistência ao cisalhamento e é sempre associada com dissipação de energia interna, tipicamente como aquecimento. Um material com baixa viscosidade desliza facilmente, com pouca energia interna sendo dissipada no processo de cisalhamento. Um material altamente viscoso, contudo, desliza mais vagarosamente e dissipa mais energia no processo. Essa resistência é quantificada por viscosidade dinâmica. Poucos dados deste parâmetro relacionado a biomateriais, principalmente aqueles utilizados em urologia e laringologia estão disponíveis na literatura. Particularmente em laringologia, onde estes dados ainda são mais escassos, um estudo de viscosidade dinâmica do colágeno servirá para suprir esta situação, visto que este parâmetro caracteriza a fricção interna do material durante deformação oscilatória em torno de uma posição de equilíbrio podendo ser definida no contexto do cisalhamento oscilatório sinusoidal.

A viscosidade dinâmica é um parâmetro bastante importante em fono-cirurgia, pois quando uma força de cisalhamento oscilatório sinusoidal é aplicada em uma amostra de material viscoelástico, assim como é o colágeno⁵⁶, um estado constante fixo pode ser alcançado, fazendo com que a força de cisalhamento sinusoidal tenha uma relação constante em uma dada frequência de oscilação¹⁰². Então, uma força de amplitude será proporcional a amplitude de tensão em uma fase de intervalo constante. Com isso, a viscosidade dinâmica pode ser derivada desta fase de intervalo e do raio de tensão para força de amplitude.

Matematicamente, a viscosidade dinâmica é obtida através do relacionamento entre tensão e força de cisalhamento, de acordo com o modelo de viscoelasticidade proposto por Kelvin-Voigt^{78,84}:

$$\tau = \mu \dot{\gamma} + \eta \cdot \dot{\gamma} \dots \dots \dots \text{Equação 14}$$

onde τ é tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é força de cisalhamento (rad), $\dot{\gamma}$ é razão de força (s^{-1}), μ é o módulo elástico (Pa) e η é viscosidade dinâmica (Pa.s). Por sua vez, a viscosidade dinâmica está relacionada à contribuição viscosa ou a dissipação de energia em cada ciclo, podendo ser representada da seguinte forma:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \dots \dots \dots \text{Equação 15}$$

onde, G'' é o módulo de perda (Pa), ω é a frequência (s^{-1}).

A Figura 29 mostra a viscosidade dinâmica em função da frequência para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a 0,7% (m/m) nas proporções entre 100 e 25:1 (Figura 29a) e de géis de colágeno aniônico:ramsana a 4 e 6% (m/m) nas proporções de 75 e 50:1 (Figura 29b). Como G'' e η' são propriedades viscoelásticas lineares e são obtidas em regime oscilatório de pequena amplitude, uma pequena variação na concentração de ramsana no compósito, promoveu efeitos significativos na viscosidade dos géis (Figura 29a).

Figura 29. Viscosidade dinâmica de géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4. **(A)** amostras a 0,7% (m/m); **(B)** amostras a 4 e 6% (m/m).

A Figura 29 apresenta o efeito conhecido como “*shear thinning*”, onde a viscosidade dinâmica diminui em função da frequência, e que é observado para a maioria das biomacromoléculas e materiais poliméricos⁷⁸. A queda da viscosidade é aproximadamente linear na escala log-log independente da concentração de ramsana, o que indica que a relação entre viscosidade dinâmica e frequência podem ser modeladas pela lei das potências:

$$\eta = kf^n \dots \dots \dots \text{Equação 16}$$

onde f é a frequência, k e n são constantes.

Dados para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana em diferentes proporções e concentrações apresentados na Figura 29, e após regressão linear efetuada utilizando a equação 16, são mostrados na Tabela 5 com os respectivos valores de k , n e coeficiente de correlação r . Os valores obtidos são muito bem marcados pela equação de regressão, apresentando coeficientes de correlação

acima de 0,99. A diminuição da viscosidade dinâmica com a frequência foi de aproximadamente na mesma razão para as diferentes preparações, com declives muito similares (valores de n), como mostrado claramente na Figura 29. As principais diferenças entre os materiais podem ser descritas pela separação vertical das curvas na Figura 29 ou nas diferenças de valores de k na Tabela 5.

Tabela 5. Viscosidade dinâmica dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4, e seus respectivos valores obtidos da regressão linear.

Concentração	Proporção	η' (Pa.s)	k	n	r
0,7%	CA	0,33	1,91	-0,78	-0,99
	100:1	0,37	2,16	-0,78	-0,99
	75:1	0,37	2,17	-0,78	-0,99
	50:1	0,40	2,47	-0,80	-0,99
	25:1	0,43	2,68	-0,81	-0,99
4%	50:1	1,76	12,45	-0,86	-0,99
	75:1	1,12	6,89	-0,83	-0,99
6%	50:1	1,88	14,45	-0,91	-0,99
	75:1	2,72	20,87	-0,99	-0,99

Se compararmos os resultados obtidos com os compósitos colágeno aniônico:ramsana e aqueles apresentados por Chan¹⁰³ e Finkellor¹⁰², no qual compara a viscosidade de diferentes biomateriais utilizados para a correção de cordas vocais, inclusive o colágeno, podemos sugerir que o uso de géis de colágeno aniônico:ramsana nas concentrações de 4 e 6% (m/m) também podem ser utilizados

em fono-cirurgia, pois géis em concentrações maiores tem-se mostrados mais eficientes na produção adequada da elevação e persistência do seu volume conduzindo a uma facilidade de fonação. Deve-se destacar que estas propriedades juntamente com aquelas relacionadas a fluidez são essencialmente importantes na etapa inicial que envolve o implante, devendo-se estas serem consideradas juntamente com referência médica, principalmente com relação a resposta do tecido biológico.

I.V.2.5. Viscosidade em função da temperatura

O fato da ramsana dar origem a soluções muito viscosas e com alto grau de estabilidade térmica⁹⁹, e por outro lado saber-se que a viscosidade dos materiais, como todas as suas propriedades físicas, sofre de forma palpável os efeitos da variação de temperatura⁷⁸, uma avaliação da viscosidade dos géis de colágeno aniônico em diferentes concentrações de ramsana e nas proporções de 75 e 50:1 foram efetuadas em função da temperatura e são mostrados na Figura 30. As curvas mostram que a adição do polissacarídeo mesmo em baixas concentrações promove efeitos significativos sobre a viscosidade dos géis. A razão molar utilizada quando adicionamos o polissacarídeo corresponde a 330 moléculas de colágeno para uma de ramsana, por si só não justifica esse aumento da viscosidade. No entanto, é possível que o modelo semelhante ao de um “colchão de água” realmente seja válido.

No intervalo de temperatura estudado, a ramsana nas mesmas condições de concentração no gel 75:1 não mostrou qualquer medida mensurável dentro das condições do experimento, nos levando a concluir, da mesma forma que os

resultados obtidos na região do IV, que a interação colágeno:ramsana depende da conformação da hélice tripla do colágeno.

Figura 30. Curvas de viscosidade dos géis de colágeno aniônico:ramsana a pH 7,4, com concentrações dadas em relação de m/m: **A.** colágeno aniônico:ramsana 0,7% (75:1); **B.** colágeno aniônico:ramsana 0,7% (50:1); **C.** colágeno aniônico:ramsana 2% (75:1); **D.** 2% colágeno aniônico:ramsana 50:1; **E.** colágeno aniônico:ramsana 4% (75:1); **F.** colágeno aniônico:ramsana 4% (50:1); **G.** colágeno aniônico:ramsana 6% (75:1); **H.** colágeno aniônico:ramsana 6% (50:1).

As derivadas das curvas de viscosidade em função da temperatura (Figura 31) mostram que os géis de colágeno aniônico independente da presença ou não de ramsana, não apresentaram transições significativas além daquelas relacionadas a desnaturação do colágeno entre 38 e 48°C, com Td em torno de 43°C. Pode-se observar uma queda mais acentuada na viscosidade dos géis a medida em que se aumenta a quantidade de ramsana no composto, como por exemplo no colágeno aniônico:ramsana 50:1 independente da concentração, em relação ao colágeno puro,

indicando que um aumento de temperatura na faixa de transição provoca uma desestruturação do agregado colágeno ramsana.

Figura 31. Derivadas das curvas de viscosidade em função da temperatura dos géis de colágeno aniônico (CA) e colágeno aniônico:ramsana (CAR) nas proporções de 75 e 50:1, com concentrações dadas em relação de m/m. (A) 0,7 e 2% (m/m); (B) 4 e 6% (m/m).

A pequena variação térmica entre as preparações são semelhantes àsquelas observadas com Ts e Td. Deve-se destacar que os maiores valores observados nos Ts e Td em relação aos pontos de inflexão da curvas de viscosidade dos géis de

colágeno aniônico:ramsana, são devido aos níveis de hidratação da matriz, visto que os resultados de T_s é determinado na forma de membranas em meio aquoso tamponado enquanto os resultados de viscosidade foram determinados com géis de colágeno aniônico:ramsana.

Esses resultados de viscosidade, voltam a confirmar que a interação entre as duas macromoléculas ocorre apenas com o colágeno estruturado em sua conformação de hélice tripla. Da mesma forma que os resultados de fluência e fluidez, os aumentos de viscosidade aqui observados quando na presença de ramsana, está associado a fixação de moléculas de água envolvidas na estrutura do complexo formado por estas duas macromoléculas. Para tal confirmação, foram obtidas as energias de ativação para estas preparações.

Os valores de viscosidade apresentados acima variaram amplamente com a temperatura, diminuindo a medida que a temperatura aumenta. Para soluções poliméricas, quantitativamente esta dependência segue a relação de Arrhenius⁹³,

$$\eta = Ae^{E/RT} \dots\dots\dots \text{Equação 17}$$

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

Desta forma, calculou-se os valores de E para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana a partir das inclinações das curvas $\log \eta \times 1/T$, nos intervalos de temperatura entre 25 a 38°C e 38 a 48°C (Tabela 6). Para os géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana 75 e 50:1 no intervalo entre 25 e 38°C, apresentaram aumentos menos acentuados em relação àqueles entre 38 e 48°C (Tabela 6). A diferença de energia de ativação entre o gel de colágeno aniônico e dos géis de colágeno aniônico:ramsana, 8,56; 9,48 e 12,72 °C respectivamente, demonstra

que a barreira energética a ser ultrapassada pelo agregado formado na presença polissacarídeo no compósito independente de sua concentração, é maior que aquela apresentada pelo colágeno e próximas daquelas encontrados em proteínas¹⁰⁴.

Tabela 6. Energias de ativação dos géis de colágeno aniônico e colágeno aniônico:ramsana (CAR) em diferentes proporções.

Concentração	CAR (proporções)	Energias de ativação (kJ/mol de colágeno)	
		25 a 38 °C	38 a 48 °C
0,7%	Colágeno	8,56	385,78
	CAR 75:1	9,48	394,14
	CAR 50:1	12,72	415,63
2%	CAR 75:1	6,92	392,18
	CAR 50:1	14,32	491,19
4%	CAR 75:1	18,32	473,16
	CAR 50:1	21,04	539,04
6%	CAR 75:1	21,26	405,61
	CAR 50:1	26,65	482,19

Da mesma forma que admitimos quando analisamos as curvas de DSC, onde a transição do colágeno puro é quase totalmente devido a desestruturação da hélice tripla, podemos relacionar agora o aumento das energias de ativação quando na presença de ramsana, e atribuir isso a dois fenômenos. Primeiro, a progressiva destruição da camada de água seguido da destruição do agregado colágeno:ramsana e, finalmente a ruptura completa da molécula de tropocolágeno, observado na Figura 30, pela convergência das curvas a partir da temperatura de desnaturação do

colágeno, 43⁰C. Podemos então concluir, assim como já fizemos, que o efeito produzido pela adição de ramsana é dependente da conformação da hélice tripla do colágeno, pois a estrutura tridimensional da ramsana não é afetada no intervalo de temperatura estudado.

I.V.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de avaliar a estrutura da matriz colagênica das membranas de colágeno na presença ou não de ramsana, submeteu-se estas membranas à microscopia eletrônica de varredura. As micrografias mostram que membrana de colágeno aniônico (Figura 32a) embora apresente uma superfície amorfa, estruturas filamentosas são identificadas. Contudo, as membranas de colágeno na presença de ramsana nos revelam que estas superfícies são formadas na sua grande maioria por estruturas esféricas, as quais são mais pronunciadas a medida em que se aumenta a quantidade de ramsana no compósito (Figuras 32b e 32c). Estas ainda apresentam pequenos agrupamentos de formas filamentosas com uma morfologia característica da microfibrila do colágeno nativo (setas). Mesmo sabendo que as informações com relação a morfologia de membranas de géis de colágeno deixam um pouco a desejar, as micrografias aqui apresentadas parecem indicar que a ramsana forma em torno de si, um agregado de moléculas de tropocolágeno, cuja estrutura é capaz de fixar uma grande quantidade de água.

Figura 32. Micrografias de membranas formatadas a pH 7,4 e 0,15 mol/L de força iônica: (A) colágeno aniônico; (B) colágeno aniônico:ramsana 100:1, (C) colágeno aniônico:ramsana 25:1; (5.000x).

Assumindo que a interação colágeno aniônico:ramsana tem o comportamento semelhante de um “colchão de água” e que as micrografias destas preparações sejam reflexo da organização macromolecular em solução a pH 7,4 e que a função da ramsana 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 33.

Figura 33. Modelo para interação entre colágeno e ramsana a pH 7,4, baseada na reorganização de moléculas de água estruturada que envolvem a matriz colagênica.

Este modelo é caracterizado pela presença da molécula de ramsana envolta por um número limitado de moléculas de colágeno, envolvida por água estruturada com quantidade dependente da concentração de ramsana. Podemos sugerir que esta quantidade de água se encontra na interface colágeno:ramsana. Neste caso, provavelmente as ramificações da cadeia de ramsana devem fornecer uma quantidade de sítios apropriados para fixação de água no interior da partícula, quando associada ao colágeno. Como resultante, partículas mais resistentes a deformação e com melhores características de fluidez podem ser formadas, explicando os aumentos

significativos da viscosidade observados para géis de colágeno aniônico quando na presença do polissacarídeo.

V. CONCLUSÕES

- O novo método utilizado para obtenção de compósitos colágeno aniônico:ramsana na concentração de até 6% mostrou-se bastante eficiente, pois além de não causar a desnaturação do colágeno, apresenta grande vantagem de poder ser aplicado em volumes relativamente grande de géis na ausência de glutaraldeído e sem precipitação de fibrilas. Outra vantagem, é a redução de custo quando comparado com as preparações comerciais encontradas comercialmente.

- Nas condições estudadas, os resultados apresentados mostram que os efeitos provocados tanto em membranas como em soluções de colágeno aniônico pela adição de ramsana são característicos de uma interação entre as duas macromoléculas. Esta interação ocorre com preservação da estrutura secundária da proteína mesmo em baixas concentrações de ramsana, resultando em géis com maior viscosidade que em géis similares de colágeno, bem como estabilidade térmica compatível com aquela necessária para biomateriais de colágeno.

- Os resultados de viscoelasticidade mostraram que apesar dos módulos viscoso (G'') e elástico (G') variarem em magnitude, o caráter elástico dos géis na presença ou não de ramsana e independente do pH, sempre predominou sobre o viscoso

($G' > G''$). Um melhor comportamento viscoelástico e uma diminuição no ponto de gel na presença de ramsana a pH 7,4 foi observado, sugerindo que géis de colágeno aniônico:ramsana podem apresentar um melhor comportamento com relação a fluidez quando submetido a uma força de deformação.

- Os resultados de fluência confirmam além do comportamento viscoelástico, a predominância do caráter elástico dos géis de colágeno aniônico:ramsana 4 e 6% (m/m) equilibrados a pH 7,4. Tal comportamento também foi observado para os géis a 0,7% (m/m) nas diferentes proporções na qual apresentou maior capacidade de recuperação a medida que aumenta a quantidade de ramsana no compósito quando submetido a tensões de até 30 Pa.

- Os resultados de fluidez confirmaram os ensaios de fluência, pois a medida que aumenta a quantidade de ramsana no compósito uma menor incidência de picos de contra-pressão foram observados, indicando que a ramsana é um forte candidato a para substituir o glutaraldeído das preparações comerciais.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASTON, S. J. The choice of suture material for skin closure. **Journal of Dermatologic Surgery**, v. 2, p. 57-61, 1976.
2. MATTON, G.; ANSEEUW, A.; KEYSER, F. The history of injectable biomaterials and the biology of collagen. **Aesthetic Plastic Surgery**, v.9, p. 133-140, 1985.
3. MURLESS, B. C. The injection treatment of stress incontinence. **Journal of Obstetrics and Gynecology of the British Empire**, v.45, p.67-73, 1938.
4. HEINDINGSFELD, M. L. Histopathology of paraffin prothesis. **Journal of Cutaneous Diseases**, v. 24, p.513-520, 1906.
5. URBACH, F.; WINE, S. S.; JOHNSON, W. C.; DAVIES, R. E. Generalized parffinoma (sclerosing lipogranuloma). **Archives of Dermatology**, v. 103, p. 277-85, 1971.
6. KHOO, B. C. Paraffinoma. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.36, p. 101-109, 1965.

7. MOULY, R.; DUFORMENTEL, C. Les paraffinomes des membres. **Annales De Chirurgie Plastique**, v. 9, p. 210-214, 1964.
8. BEN-HUR, N. NEUMAN, Z. Siliconoma: Another cutaneous response to dimethylpolysiloxane. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.36, p. 629-635, 1965.
9. COLLAGEN and liquid silicone injections. Disponível em:<<http://www.fda.gov>> Acesso em: 06 dez. 2002.
10. USO restrito do silicone é aprovado no senado federal. Disponível em:<http://boasaude.uol.com.br/news/index.cfm?news_id=4073&mode=browse. Acesso em: 10 dez. 2002.
11. ALVES, C. B.; LOUGHRAN, S.; MACGREGOR, F. B.; DEY, J. I. R.; BOWIE, L. J. Bioplastique™ medialization therapy improves the quality of life in terminally ill patients with vocal cord palsy. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 27, p. 387 – 392, 2002.
12. ERSEK, R. A.; GREGORY, S. R.; SALISBURY, A. V. Bioplastique at 6 years: clinical outcome studies. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.100, p.1570-4, 1997.
13. ERSEK, R. A.; BEISANG, A. A. Bioplastique: A new textured copolymer microparticle promises permanence in soft tissue augmentation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, p. 693-702, 1991.
14. RUDOLPH, C.M.; SOYER, H. P.; SCHULLER, S. P.; KERL, H. Foreign body granulomas due to injectable aesthetic microimplants. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 23, p.113-7, 1999.

15. POLITANO, V. A.; SMALL, M. P.; HARPER, J. M.; LYNNE, C. M.
Periurethral teflon injection for urinary incontinence. **Journal of Urology**, v.111, p.180-3, 1974.
16. HERSCHOR, N. S.; GLAZER, A. A. Early experience with small volume
periurethral polytetrafluoroethylene for female stress urinary incontinence.
Journal of Urology, v. 163, p.1843-1844, 2000.
17. APPELL, R.A. Collagen injection therapy for urinary incontinence. **Urologic
Clinics of North America**, v.21, p.177-82, 1994.
18. WINTERS, J.C.; CHIVERTON, A.; SCARPERO, H.M.; PRATS JÚNIOR, L. J.
Collagen injection therapy in elderly women: long-term results and patient
satisfaction. **Urology**, v. 55, p. 856–861, 2000.
19. ARNOLD, G. E. Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. **Archives of
Otolaryngology**, v.76, p.82-92, 1962.
20. HERSCHOR, N. S.; GLAZER, A. A. Early experience with small volume
periurethral polytetrafluoroethylene for female stress urinary incontinence.
Journal of Urology, v. 163, p.1843-1844, 2000.
21. STEYAERT, H.; SATTONNET, C.; BLOCH, C.; JAUBERT, F.; GALLE, P.;
VALLA, J. S. Migration of PTFE paste particles to the kidney after treatment
for vesico-ureteric reflux. **British Journal of Urology International**, v. 85,
p.168-169, 2000.
22. SCALES, J. T. Materials for hernia repair. **Proceedings of the Royal Society of
Medicine**, v.46, p. 647-652, 1953.

23. CHENG, J. T.; PERKINS, S. W.; HAMILTON, M. M. Collagen and injectable fillers. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 35, p. 73-85, 2002.
24. KLEIN, A. W. Collagen substitutes: Bovine collagen. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 26, p. 53-62, 2001.
25. ARAGONA, F.; D'URSO, L.; MARCOLONGO, R. Immunological aspects of bovine injectable collagen in humans. A review. **European Urology**, v. 32, p. 129-33, 1998.
26. COLLAGEN AESTHETICS INTERNATIONAL. **Catalog Ziderm (collagen implant) & Ziplast (collagen implant) Explained**. Wicklow, Ireland, Collagen Aesthetics International Ltda, 1981. p. 16.
27. WALLACE, D.G. Injectable Collagen for tissue augmentation. In: NIMNI, M. **Collagen Biochemistry and Molecular Biology**. Boca Raton, CRC, 1987. v.3.
28. KLEIN, A. W. Skin filling. Collagen and other injectables of the skin. **Dermatologic Clinics**, v. 19, p.491-508, 2001.
29. KASSOUF, WASSIN; CAPOLICCHIO, G.; BERARDINUCCI, G.; CORCO, J. Collagen injection for treatment of urinary incontinence in children. **Journal of Urology**, v.165, p.1666-1668, 2001.
30. HOFFMAN, H.; McCABE, D.; McCULLOCH, T.; JIN, S. M.; KARNELL, M. Laryngeal collagen injection as adjunct to medialization laryngoplasty. **The Laryngoscope**, v. 112, p. 1407-1413, 2002.

31. FACIAL aesthetics:ziderm & Ziplast – Product Information. Disponível em:
<<http://www.inamed.com/products/facial/us/patient/zz/prodinfo.html>>.
Acesso em: 05 dez. 2002.
32. THE AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY.
Cosmetic Surgery National Data Bank: 5-Years comparisons for nearly 30
cosmetic procedures. New York, ASAPS, 2001. 20p.
33. CHARRIERE, G.; BEJOT, M.; SCHNITZLER, L.; VILLE, G.; HARTMANN,
D. J. Reactions to a bovine collagen implant. **Journal of the American
Academy of Dermatology**, v. 21, p120-138, 1989.
34. WALLACE, D. G.; WADE, S. B. **Collagen implant material and method for
augmenting soft tissue**. U.S. 4.424.208. Jan. 03, 1984.
35. FREY, P.; MANGOLD, S. Physical and histological behavior of a new
injectable collagen (GAX 65) implanted into the submucosal space of the
mini-pig bladder. **Journal of Urology**, v.154, p.1812-815, 1995.
36. FREY, P.; GUDINCHET, F.; JENNY,P. GAX 65: A new injectable cross-linked
collagen for the endoscopic treatment of vesicoureteral reflux – a double blind
study evaluating its efficiency in children. **Journal of Urology**, v.158,
p.1210-1213, 1997.
37. MCPHERSON, J.M AND WALLACE, D.G. Collagen fibril formation in vitro:
a characterization of fibril quality as a function of assembly a conditions.
Collagen and Related Research, v.5, p. 119-125, 1985.

38. MCPHERSON, J.M.; SAWAMURA, S.; ARMSTRONG, R. An examination of biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implant. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, p.93-107, 1986.
39. WALLACE, D. G.; RHEE, W.; REIHANIAN, H.; KSANDER, G.; LEE, R. K.; BRAUN, W. B.; WEISS, B. A.; PHARRISS, B. B. Injectable crosslinked collagen with improved flow properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, p.931-945, 1989.
40. NGUYEN, H. M. e CHU, G. H. **Mechanically Sheared Collagen Implant Material and Method**. U.S.4.642.117. Fev.10.1987.
41. O'BRINK, B. The influence of glycosaminoglycans on the formation of fibers from monomeric tropocollagen *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, v. 34, p. 129, 1973.
42. WOOD, G. C. Formation of fibrils from collagen solutions. **Biochemistry Journal**, v. 75, 605-611, 1960.
43. CRESCENZI, V. Polysaccharide science and technology: development and trends. **TRIP**, v. 23, p.104-109, 1994.
44. LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, v. 63, p. 19-23, 1995.
45. TRINDADE FILHO, J. C. S.; VERCESI, L. A. P.; BACCHI, C. E.; GOISSIS, G.; PADOVANI, C. A. Avaliação morfológica e histológica do colágeno aniônico associado a ramsana, injetado em submucosa vesical de coelho. In: CONGRESO DE LA CONFEDERACIÓN AMERICANA DE UROLOGÍA, 24.,Cancún, 1998. **Livro de Resumos**. Cancún, 1988. p.33

46. TRINDADE FILHO, JOSÉ CARLOS DA SILVA. **Injeção de colágeno associado à ramsana na submucosa vesical: Estudo experimental no coelho.** Botucatu, 1998. 98p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Bauru, Universidade Estadual Paulista.
47. FREY, P.; MANGOLD, S. Physical and histological behavior of a new injectable collagen (GAX 65) implanted into the submucosal space of the mini-pig bladder. **Journal of Urology**, v.154, p.1812-815, 1995.
48. FREY, P.; GUDINCHET, F.; JENNY, P. GAX 65: A new injectable cross-linked collagen for the endoscopic treatment of vesicoureteral reflux – a double blind study evaluating its efficiency in children. **Journal of Urology**, v.158, p.1210-1213, 1997.
49. VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen.** London, Academic Press, 1980. v.1, p.313-324.
50. MAYNE, R. ; BURGESSON, R. E. **Structure and function of collagen types.** London, Academic Press, 1987. p. 232.
51. PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.403-434, 1995.
52. TRAUB, W.; PIEZ, K.A. The chemistry and structure of collagen. In: ANFINSEN, C. B., EDSALLA, J. T., RICHARDS, F. M., eds. **Advances in Protein Chemistry.** New York, Academic Press, 1971. v. 25, p.245.

53. LIGHT, N.; BAYLEI, A.J. Molecular structure and stabilization of the collagen fibre. In: VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of Collagen**. London, Academic Press, 1980. p.15-38.
54. SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, v.219, p.157-63, 1968.
55. FRIESS, W. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.
56. DE PAULA, M; GOISSIS, G.; MARTINS, V. C. A. Compósitos de colágeno aniônico:ramana como géis injetáveis para correção plástica: preparação, caracterização e propriedades reológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 18, p.113 –122, 2002.
57. NICOLAS, F.L.; GAGNIEU, C.H. Denatured thiolated collagen II. Cross-linking by oxidation. **Biomaterials**, v.18, p.815-821, 1997.
58. RADHIKA, M.; SEHGAL, P.K. Studies on the desamination of bovine collagen. **Journal of Biomededical Materials Research**, v.35, p.497-503, 1997.
59. PINATTI, A.A. GOISSIS, G. Preparation and characterization of native and anionic collagen impregnated dracon. **Artificial Organs**, v.21, p.538, 1997.
60. REID, G.G.; GORHAM, S.D.; LACKIE, J.M. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.4, p.201-209, 1993.

61. SINGH, M.P.; STEFKO, J.; LUMPKIN, J.A.; ROSENBLATT, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.1205-1210, 1995.
62. JAYAKRISHNAM, A.; JAMELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-484, 1996.
63. LACERDA, C.; PLEPIS, A.M.G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como bioateriais. **Química Nova**, v.21, n.3, p. 267-271, 1998.
64. BET, MR; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagine and Glutamine Carboxyamide Side Chains. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1074-1079, 2001.
65. SUTHERLAND, I. W. Industrially useful microbial polysaccharides. **Microbiological Sciences**, v. 3, p. 5 – 9, 1986.
66. GOISSIS, G.; PICCIRILLI, L.; GOES, J.C.; PLEPIS, A.M.G.; DAS-GUPTA, D.K. Anionic collagen: Polymer composites with improved rheological and dielectric properties. **Artificial Organs**, v.22, p.203-209, 1998.
67. CRESCENZI, V. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in europe. **Biotechnology Progress**, v. 11, p.251-259, 1995.

68. PODOLSAK, A. K.; TIU, C. Rheological properties and some applications for rhamosan and xanthan gum solutions. **Polymer International**, v.40, p.155-167, 1996.
69. FLORJANLIL, U. K.; UMER, M. Influence of temperature and polymer concentration on rheological properties of rhamosan. **Acta Chimica Slovenica**, v.45, p. 419-428, 1998.
70. FERREIRA, JÚLIO CESAR GÓES. **Géis injetáveis de colágeno: rhamosan: Caracterização e Aplicação**. São Carlos, 1996. 103p. Tese (Doutorado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
71. GOISSIS, G.; GÓES, J.C. Géis de colágeno aniônico: rhamosan como biomateriais: preparação e caracterização físico-química. **Polímeros. Ciência e Tecnologia**, v.7, p. 32-39, 1997.
72. PROCEDURES Fees & Product costs. Disponível em:
<<http://www.facialplasticsurgery.net/costs.htm>>. Acesso em: 09 dez. 2002.
73. BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **Introduction to Rheology**. Elsevier, Amsterdam, 1989. 199p.
74. MACOSKO, C. W. **Rheology: Principles, Measurements and Applications**. New York, Wiley-VCH, 1994. 549p.
75. FERGUSON, J.; KEMBLOWSKI, Z. **Applied Fluid Rheology**. London, Elsevier, 1991. 323p.
76. TA INSTRUMENTS. **Rheology Solutions: Oscillation for AR 1000**. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-6,7. (Software Manual).

77. WALLACE, D.G.; RHEE, W.; WEISS, B. A. Shear creep of injectable collagen biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, p.861-880, 1987.
78. FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York, Wiley, 1970. p. 1-33
79. TA INSTRUMENTS. **Rheology Solutions: Creep for AR 1000**. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-6,7. (Software Manual).
80. CEULEMANS, J.; VAN SANTVLIET, L.; LUDWIG, A. Evaluations of continuous shear and creep rheometry in the physical characterization of ointments. **International Journal of Pharmaceutics**, v.176, p. 187-202, 1999.
81. TA INSTRUMENTS. **Rheology Solutions: Flow for AR 1000**. New Castle, TA Instruments, 1996. p. A-6,7. (Software Manual).
82. BAROCAS, V. H.; MOON, A. G.; TRANQUILLO, R. T. The fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force-part 2: measurement of the cell traction parameter. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 117, p. 161-170.
83. WALLACE, D. G.; RHEE, W.; REIHANIAN, H.; KSANDER, G.; LEE, R.K.; BRAUN, W.B.; WEISS, B. A.; PHARRISS, B.B. Injectable crosslinked collagen with improved flow properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, p.931-945, 1989.
84. WORLOW, R.W. **Rheological techniques**. Chincester, Ellis Horwood, 1980. p. 243 – 307.

85. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes**. 2. ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1972. 627p.
86. MAJOR, R.H. **A history of medicine**. Oxford, Blackwell Scientific, 1954. 200p
87. GOISSIS, G.; MORIWAKY, C. M. Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável. P. I. 9.000.972. 02.03. Mar. 02, 1990.
88. RAMACHANDRAN, G. N. **Treatise on Collagen**. London, Academic Press, 1967. v. 1.
89. JAMALL, I.S.; FINELLI, V.N.; QUEHEE, S. S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hidroxyproline in biological tissue. **Analytical Biochemistry**, v.112, p. 70-75, 1981.
90. STEGEMANN, H.H.; STALDER, K. Determination of hidroxyproline. **Clinica Chimica Acta**, v.18, p.267, 1967.
91. TRAUB, W.; PIEZ, K.A. The chemistry and structure of collagen. In: ANFINSEN, C. B., EDSALLA, J. T., RICHARDS, F. M., eds. **Advances in Protein Chemistry**. New York, Academic Press, 1971. v. 25, p.245.
92. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 1970.
93. BRETAS, R. E. S.; D'AVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. São Carlos, UFSCAR, 2000. 196p.

94. BET, MARCOS ROBERTO. **Preparação e caracterização de biocerâmica compostas de colágeno e sais de fosfato de cálcio**. São Carlos, 1995. 63p.
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
95. GEORGE, A.; VEIS, A. FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, v. 30, p.2372-2377, 1991.
96. GORDON, P. L. The Far-infrared spectrum of collagen. **Macromolecules**, v.7, p.954-955, 1974.
97. SILVESTER, M.F.; YANNAS, I.V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. **Thrombosis Research**, v.55, p.135-148, 1989.
98. FLADIN, F.; BUFFEVANT, C.; HERBAGE, D. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. **Biochimica Biophysica Acta**, v.791, p.105-213, 1984.
99. TAKO, M. Molecular of thermal stability of rhamnsan gum in aqueous media. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v 57, p.1182-1184, 1993.
100. SCOTT, J.E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. **Biochemistry Journal**, v. 252, p. 313-323, 1988.
101. URBAN, J. P.; MAROUDAS, A.; BAYLESS, M. T.; DILLON, J. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilagenous tissues. **Biorheology**, v. 16, p. 447- 453, 1979.

102. FINKELHOR, B. K.; TITZE, I. R.; DURHAM, P. L. The effect of viscosity changes in vocal folds on the range of oscillation. **Journal of Voice**, v. 1, p. 320 – 325, 1987.
103. CHANG, R. W.; TITZE, R. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery. **Laryngoscope**, v. 108, p.725-731, 1998.
104. JUFFER; A. H.; EISENHABER, F.; HUBBARD, S. J.; WALTHER, D.; ARGOS, P. Comparasion of atomic solvation parametric stes: Applicability and limitations in protein folding and binding. **Protein Science**, v. 4, p.2499 – 2509, 1995.