

Artigo Original

recebido em 02/05/2001 e aceito em 17/04/2001

**Compósitos de colágeno
aniônico:ramsana como géis
injetáveis para correções plástica:
preparação, caracterização e
propriedades reológicas.**

*Anionic collagen:rhamosan composites
as injectable gels for plastics recon-
struction: preparation, characteriza-
tion and rheological properties.*

**Márcio de Paula
Gilberto Goissis
Virginia Conceição Amaro Martins**

Departamento de Química e Física Molecular
Instituto de Química de São Carlos - USP
Av. Trabalhador São-carlense 400, São Carlos
CP 780 - CEP 13560-970 - São Paulo, Brasil.
Fax: 55-016 273-9985 - Tel: 55-016 273-9986
e-mail: ggoissis@iqsc.sc.usp.br

Resumo

Este trabalho descreve a preparação e a caracterização de compósitos de colágeno aniônico:ramsana, com o propósito de desenvolver géis injetáveis para correções plásticas. Os materiais foram caracterizados por eletroforese, espectroscopia no infravermelho, estabilidade térmica, titulação potenciométrica, propriedades reológicas e ensaios de fluidez. Independentemente do processamento, os materiais estudados são formados por colágeno não desnaturado, com um total de grupos carboxílicos de $345,9 \pm 9$ /mol de colágeno, o que representa a pH fisiológico um excedente de 106 ± 17 cargas negativas em relação ao colágeno nativo. O estudo reológico mostrou que: independentemente do pH, géis de colágeno aniônico e seus compósitos com ramsana apresentaram o módulo de armazenamento sempre maior que o módulo de perda ($G' > G''$ e $\delta < 45^\circ$); géis colágeno aniônico:ramsana equilibrados a pH 7,4, embora menos elásticos que os géis equilibrados a pH 3,5; géis contendo ramsana foram mais susceptíveis à deformação; a força necessária para o escoamento de géis contendo ramsana foi sempre significativamente menor do que aquela determinada para o colágeno aniônico e com um perfil mais limpo em relação à presença de picos de contrapressão, sugerindo que a associação colágeno aniônico:ramsana pode substituir com vantagens o glutaraldeído na estabilização das preparações comerciais do gel. Os resultados de biocompatibilidade de géis de CAR injetados na membrana vesical de coelho mostraram que estes compósitos são compatíveis com a sua utilização em correções plásticas.

Palavras-chaves: Biocompatibilidade, colágeno aniônico, compósito, ramsana, reologia.

Abstract

This paper describes the preparation and the characterization of anionic collagen gels and composites with rhamosan intended as injectable biomaterials for plastics reconstruction. All materials were characterized by electrophoresis, infrared spectroscopy, thermal stability, potentiometric titration, rheological properties and fluidity tests. Independently from processing, collagen secondary structure was preserved in all cases and, after 72 hydrolysis the determined carboxyl group content was $345,9 \pm 9$ that, at physiological pH corresponds to an increase in 106 ± 17 negative charges in comparison to native collagen. Rheological studies showed that: independently from pH, the viscoelastic behavior of anionic collagen materials was dependent on the frequency, with the storage modulus always greater than the loss modulus ($G' > G''$ and $\delta < 45^\circ$); although creep experiments showed that anionic collagen rhamosan composites equilibrated at pH 7.4 were less elastic in comparison to gels equilibrated at pH 3.5, former materials were more susceptible to deformation; flow experiments indicated that the force needed for the extrusion anionic collagen rhamosan composites, in comparison to anionic collagen, was significantly smaller and, associated with a smooth flow, suggesting that the association with rhamosan may be a good alternative in the replacement of glutaraldehyde to stabilize the microfibril assembly of commercial collagen gel preparations, and for the same purpose, Biocompatibility studies showed that anionic collagen rhamosan tissular reaction was compatible with the application of these gels in plastic reconstruction.

Keywords: anionic collagen, biocompatibility, composite, rhamosan, rheology.

Extended Abstract

Introduction

This paper describes the preparation and the characterization of anionic collagen gels and composites with rhamosan intended as injectable biomaterials for plastics reconstruction for the treatment of urinary incontinence and vocal chords augmentation, thus eliminating conventional invasive surgeries. Technically these gels correspond to fibrils suspensions, with collagen concentrations of 6% (w/w) stabilized by glutaraldehyde or, by the addition of polysaccharides such as glycosaminoglycans or hyaluronic acid. Aim: This work describes the use of rhamosan, a ionophore produced by *Alcaligenes ssp* ATCC 31961 in the preparation of composites with anionic collagen as biomaterial for plastic reconstruction. It is expected that gels prepared under this condition will be stable to precipitation during extrusion due to the action of the polysaccharide and the

inhibition of microfibril formation expected from collagen molecule with an increase negative charge content with respect to native collagen. Experimental: Anionic collagen was prepared from porcine intestine submucosa, by the selective and controlled hydrolysis of carboxamide side chain groups of asparagine and glutamine residues. Composites with rhamosan were prepared by mixing, followed by equilibration of gels at pH 3.5 and 7.4. All materials were characterized by electrophoresis, infrared spectroscopy, thermal stability, potentiometric titration, rheological properties and fluidity tests.

Results and Discussion

Independently from processing, collagen secondary structure was preserved in all cases and, after 72h hydrolysis the determined carboxyl group content was $345,9 \pm 9$ COOH/mol of collagen that at physiological pH corresponds to an increase in 106 ± 17 negative charges in comparison to native collagen (Figure 3).

Rheological studies showed that: independently from pH, the viscoelastic behavior of anionic collagen materials was dependent on the frequency, with the storage modulus always greater than the loss modulus ($G' > G''$ and $\delta < 45^\circ$) (Table 1).

Although creep experiments showed that anionic collagen rhamosan composites equilibrated at pH 7.4 were less elastic in comparison to gels equilibrated at pH 3.5, former materials were more susceptible to deformation (Figure 6).

Flow experiments (Figure not show) indicated that the force needed for the extrusion anionic collagen rhamosan composites, in comparison to anionic collagen, was significantly smaller and, associated with a smooth flow, suggesting that the association of rhamosan with anionic collagen gel preparations for the same purpose. Biocompatibility studies showed that anionic collagen rhamosan tissular reaction was compatible with the application of these gels in plastic reconstruction.

Conclusion

The addition of rhamosan to anionic collagen gels prepared by selective hydrolysis of native collagen materials may be a potentially useful biomaterial in the form of gel intended for the reconstruction and correction of soft tissue defects.

Introdução

O colágeno em função de suas propriedades naturais que incluem baixa alergenicidade, antigenicidade e biocompatibilidade elevada, vem sendo utilizado como matéria prima para a fabricação de biomateriais sob as mais variadas formas (Rao *et al.*, 1988). Na forma de géis injetáveis, suas aplicações em correções plásticas (Kaplan *et al.*, 1983) incluem o tratamento da incontinência urinária (Benshushan *et al.*, 1998) e o aumento das cordas vocais (Remacle *et al.*, 1995), eliminando as técnicas cirúrgicas invasivas convencionais. Tecnicamente estes géis correspondem a suspensões fibrilares, com concentrações de colágeno de até 6% (m/m) (Frey *et al.*, 1997). Entretanto o comportamento viscoelástico necessário nestas suspensões fibrilares só são obtidas quando cerca de 90% do total das microfibrilas presentes têm diâmetros inferiores a 10 μm (McPherson *et al.*, 1985). Este comportamento é importante pois, além de facilitar o escoamento pela agulha, mantém os contornos necessários pós-implante frente às pressões resultantes do tecido adjacente (Wallace *et al.*, 1989). Maior estabilidade desta suspensão fibrilar é obtida pelo tratamento com glutaraldeído (GA), que introduz as ligações cruzadas via base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina, presentes na estrutura primária da proteína (McPherson *et al.*, 1986). O tratamento com GA controla também a extensão da biodegradação (Woodroof *et al.*, 1978). Entretanto, na prática, estes géis apresentam o inconveniente de precipitam durante o escoamento, ocasionando problemas técnicos indesejáveis durante sua aplicação (Wallace *et al.*, 1989). Outro problema associado ao GA é sua toxicidade localizada devido à sua liberação a partir das ligações cruzadas poliméricas (McPherson *et al.*, 1986).

A precipitação durante o escoamento do gel tem sido minimizado pela adição de polissacarídeos tais com a glicosaminoglicanas (GAGs) (Wood, 1960) ou ácido hialurônico (AH) (O'Brink, 1973), que são reguladores do tamanho das microfibrilas. Embora a presença destes polissacarídeos de alta massa molecular facilitem o escoamento do gel, seu uso é limitado devido à dificuldade de extração e purificação (Crescenzi *et al.*, 1994). O mecanismo proposto para a maior facilidade de escoamento de géis de colágeno com AH, está baseado na interação entre as duas macromoléculas, formando sobre o colágeno uma

superfície negativa que inibe o processo de agregação por repulsão eletrostática (O'Brink, 1973).

Com base no uso de polissacarídeos como estabilizantes de géis de colágeno, este trabalho se propôs a estudar o uso da ramsana associado ao colágeno aniônico para a obtenção de géis injetáveis para correção plástica. A ramsana é um polissacarídeo bacteriano, com características de um ionóforo negativo, produzido pela *Alcaligenes ssp ATCC 31961* (Florjanlil *et al.*, 1998). Por outro lado a introdução de cargas negativas extras na estrutura da tripla hélice do colágeno, por hidrólise de grupos carboxâmidos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln), deve em principio diminuir significativamente sua capacidade de fibrilogênese. Esta alteração deve minimizar sua precipitação na agulha resultando na obtenção de géis estáveis, o que já foi verificado para géis a 2,5% (m/m) em colágeno aniônico (CA) que mostraram boas características de fluidez (Trindade *et al.*, 1998). Além do que, o tipo de colágeno utilizado neste trabalho na forma de membranas, mostrou-se altamente biocompatível (Goissis, 1999). Os materiais foram caracterizados por técnicas eletroforese, infravermelho, titulação potenciométrica, estabilidade térmica, propriedades reológicas e ensaios de fluidez. Estes resultados serão a base para o desenvolvimento de compositos com concentrações de colágeno de até 6% (m/m), pois é nesta concentração que géis de colágeno injetáveis tem se mostrado mais eficientes na produção da adequada elevação e persistência de seu volume para uma reconstrução tecidual eficiente (Frey *et al.*, 1995).

Materiais e Métodos

Preparação do Gel de Colágeno e Caracterização.

A Sub-mucosa intestinal porcina (SP) foi tratada por tempos entre 0 e 125 h com uma solução alcalina (Goissis *et al.*, 1990), contendo 6% de dimetilsulfóxido (m/v), na presença de hidróxidos, cloretos e sulfatos de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , seguido de estabilização com uma solução neutra de cloretos e sulfatos dos mesmos cátions. Os sais residuais foram removidos com lavagens sucessivas com soluções de H_3BO_3 3% (3x, 6h), EDTA 0,3%, pH 11 (3x, 6h) e água deionizada (6x, 2h). Parte do material hidrolizado por 72 h, foi extraído com uma solução de ácidoacético pH 3,5 e a concentração final do gel ajustada para 0,7% (m/m). O colágeno obtido foi purificado por precipitação pela adição de NaCl 0,9%, centrifugação do precipitado a 15000 rpm a 20 °C por 30 minutos (Hitachi-CR20B2), 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 0,13 M, pH 7,4 (TF) até que a condutância da solução fosse igual àquela do tampão. A concentração desta preparação de colágeno foi ajustada também para 0,7% (m/m).

Caracterização do Gel

Massa molecular (MM) - Foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970), com gel de 5% para empacotamento e 10% de separação. A razão α_1/α_2 foi determinada por densitometria do gel, após coloração com Coomassie Blue. O padrão de proteínas utilizado foi da Sigma contendo uma mistura de: Miosina (205000 g/mol), β -galactosidase (117000 g/mol), Fosforilase b (97400 g/mol), Albumina de Soro Bovino (66000 g/mol), Ovalbumina (45000 g/mol), Anidrase Carbônica (29000 g/mol). Os padrões de colágeno utilizado foram o Collagen 1000 (CLR, Alemanha) e Tropocoll (Devro, EUA).

Espectroscopia no infravermelho (IV) - As membranas foram preparadas a partir de géis a 0,16% (m/m) obtidos de materiais hidrolizados por 72 horas e equilibrados a pH 3,5, por adição de 4,0 mL em moldes de acrílico com 4,0 cm de diâmetro. Após secagem em capela de fluxo laminar a temperatura ambiente, membranas típicas apresentaram uma massa de 0,4mg/cm². Os espectros foram obtidos em um equipamento modelo MB-102 (Bomem, Canadá) no intervalo entre 400 a 4000 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹. As razões 1235/1450 foram determinadas como uma medida da integridade da tripla hélice do colágeno (Silvester *et al.*, 1989).

Estabilidade térmica - Estas determinações foram feitas com membranas preparadas como descrito acima exceto que, com massas de 4 mg/cm² (9,0 mL do gel de colágeno a 0,7% m/m). Uma diferença foi que, antes da secagem, este gel foi previamente equilibrado por lavagens sucessivas com TF por 24 h, seguido por lavagens com água deionizada e secas em capela de fluxo laminar. As determinações de estabilidade térmica (T_d) foram realizadas em um equipamento modelo 2010 (TA Instruments, EUA), previamente calibrado com padrão de índio. As amostras com cerca de 10 mg, foram colocadas em painéis de alumínio e a varredura feita entre 25 e 100°C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min., sob atmosfera de N₂.

Determinação do incremento de grupos carboxílicos após a hidrólise seletiva - Amostras de aproximadamente 600 mg de SP foram submetidas a tratamento alcalino, como descrito acima para a preparação do gel por tempos entre 0 e 125 h. A seguir foram expandidas em solução de ácido acético (HAc) 1,0 M por um período de 24 h e lavadas com água até condutividade constante. As amostras foram liofilizadas, equilibradas em solução de ácido trifluoroacético 0,5 M por um período de 24 h, desaeradas (3x) e após serem novamente liofilizadas, foram deixadas sob vácuo até peso constante na presença de pastilhas de KOH por 72 h (remoção do ácido trifluoroacético). Em cada amostra foram adicionados 20 mL de água deionizada e após desaeração para completa embebição das matrizes, o pH da solução foi ajustado para 2,0. A acidificação com ácido trifluoroacético teve como objetivo a protonação dos grupos β e γ carboxílicos das cadeias laterais dos resíduos de ácidos aspártico e glutâmico. As titulações foram realizadas com solução padrão de KOH 0,02 Eq.L⁻¹ no intervalo de pH de 2,0 a 7,0. Os resultados das titulações foram a média de três determinações independentes.

Preparação dos compósitos colágeno aniônico: ramsana Os compósitos na forma de géis, foram preparados a partir do gel de CA obtido por hidrólise por 72 h e em dois pHs distintos:

pH 3,5: um volume de uma solução de ramsana 3 mg/mL em ácido acético pH 3,5 foi adicionado a uma massa de gel de CA (72h) 0,7% (m/m), pH 3,5, para resultar em compósitos com relações de massa de 100:1, 75:1, 50:1 e 25:1. A homogeneização foi feita mecanicamente.

pH 7,4: parte dos compósitos obtidos a pH 3,5 foram dializados contra TF até condutividade constante e igual à solução de TF utilizado para diálise. O gel resultante foi centrifugado à 17.000 rpm por 60 minutos a 20°C, seguido da adição de TF para dar origem a compósitos a 0,7% (m/m).

Propriedades Reológicas

Propriedades viscoelásticas - Essas determinações foram efetuadas em um reômetro de "stress" controlado modelo AR 1000N (TA Instruments, EUA) com geometria de placa paralela de 4 cm de diâmetro, na temperatura de 25°C (sistema Peltier) e 1,5 mm de "gap". Para obtenção da região viscoelástica dos materiais, foi efetuado varredura de deformação entre

0,1 à 10 Pa e os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') medidos em função da deformação a frequência constante de 10,0 rad/s.

Ensaio de "creep" - Estes experimentos foram realizados após o estabelecimento da região viscoelástica linear (2% de deformação). Estas determinações estão baseadas na aplicação de uma tensão constante (stress) ao gel, e as resultantes das deformações (strain) foram monitoradas em função do tempo. A varredura da tensão aplicada foi entre 5,0 e 30,0 Pa por 300 s e a monitoração da recuperação feita por 600 s, e os experimentos realizados com aproximadamente 10,0 mL de CA e CAR em concentrações de 0,7% (m/m) e relações de massa para o CAR de 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, a pH 3,5 e 7,4. A geometria empregada foi a mesma descrita no item acima.

Ensaio de fluidez - Géis de CA e CAR a 0,7% (m/m) na proporção de 75:1 e 25:1 equilibrados a pH 3,5, e géis de CA e CAR 4 e 6% na proporção de 75:1 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. O escoamento foi induzido por um equipamento da INSTRON, com uma célula de carga com capacidade máxima de 50Kg e com uma velocidade constante de escoamento de 1,0 mL/min.

Resultados e Discussões

Caracterização do Material

A eletroforese em poliacrilamida/SDS de géis de CA preparados de SP após 72 h de hidrólise, antes e após purificação, bem como dos compositos CAR (Figura 1, aplicações c, b, d, e, respectivamente), mostrou que, embora as preparações antes e após purificação sejam caracterizadas pela presença das bandas correspondentes às cadeias α_1 e α_2 , o processo de purificação removeu contaminantes, principalmente aqueles de baixa massa molecular (Figuras 1, aplicação b). Em todas as preparações estudadas, as relações α_1/α_2 foram próximas de 2:1, confirmando a predominância de colágeno do tipo I, o principal componente da SP (Ramachandran, 1967). As massas moleculares calculadas para o CA após 72 h de hidrólise foram de 101000 Da para cadeia α_1 e 95000 Da para cadeia α_2 antes da purificação e, 100500 Da e 98100 Da após purificação. Para o composito CAR 75:1 as massas moleculares determinadas foram de respectivamente 100855 Da e 97600 Da.

Os espectros no IV das diferentes preparações mostraram as bandas típicas para colágeno em 1652 e 1550 cm^{-1} , correspondendo respectivamente à deformação axial da ligação $>\text{C}=\text{O}$ (amida I) e à deforma-

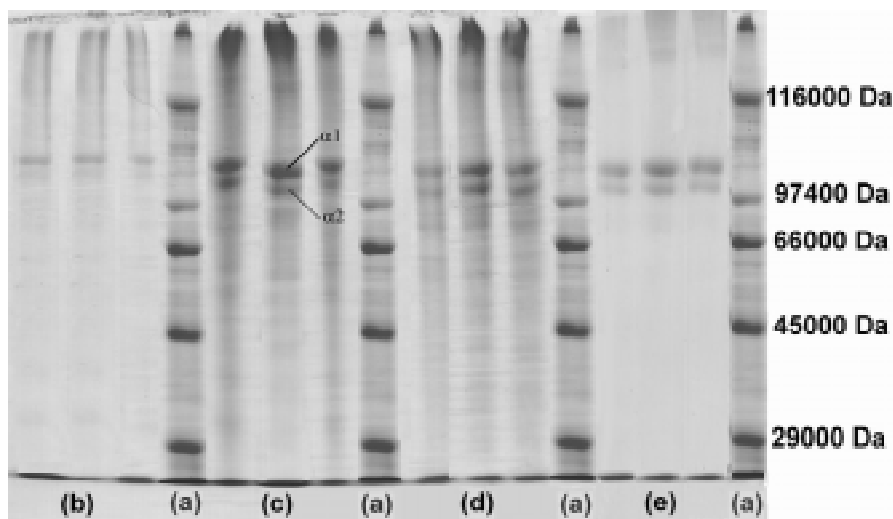


Figura 1. Eletroforese em gel poliacrilamida/SDS a 10%: **(a)** padrão de proteínas de alta massa molecular; **(b)** colágeno aniônico purificado após 72 h; **(c)** colágeno aniônico; **(d)** composito colágeno aniônico: ramsana 75:1 (m/m). **Figure 1.** Polyacrilamide/SDS gel electrophoresis at 10%: **(a)** high molecular mass proteins standard; **(b)** purified anionic collagen after 72 h hydrolysis; **(c)** crude anionic collagen preparation; **(d)** anionic collagen: ramsan 75:1 (w/w) composite.

ção angular da ligação >N-H (amida II) típicas de proteínas. A relação das absorvâncias A_{1235}/A_{1450} determinadas para os géis estudados foram próximas da unidade, sugerindo que a estrutura da tripla hélice do colágeno foi preservada (Silvester *et al.*, 1989). Esta relação para colágeno desnaturado e gelatina são significativamente menores e próximas de 0,60 (Silvester *et al.*, 1989). A banda em 1235 cm^{-1} corresponde às vibrações da amida III (estiramento C-N e vibração N-H) que são sensíveis à alterações na estrutura secundária do colágeno (tripla hélice), enquanto a banda em 1450 cm^{-1} corresponde às vibrações dos anéis pirrolidínico de prolina e hidroxiprolina que, diferentemente da banda em 1235 cm^{-1} tem sua intensidade independente das variações estruturais do colágeno. Bandas típicas das ligações do tipo éster presentes na ramsana em 1700 e 1200 cm^{-1} (Gordon, 1974), não foram observadas no compósito CAR 75:1, provavelmente devido à baixa concentração do polissacarídeo na preparação.

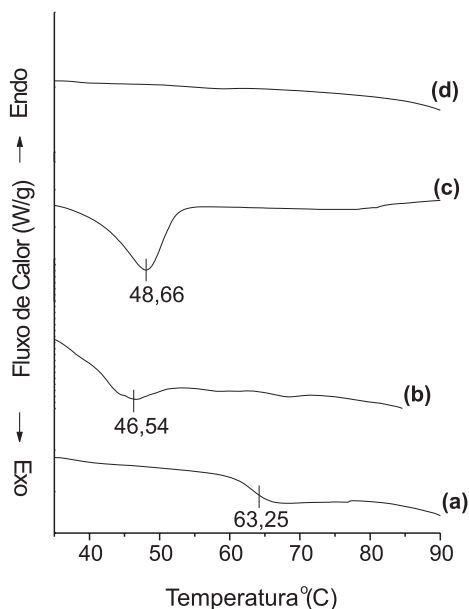


Figura 2. Termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial para membranas preparadas de géis equilibrados a pH 7,4: **(a)** colágeno nativo; **(b)** colágeno aniônico após 72 h de hidrólise; **(c)** compósito colágeno aniônico: ramsana 75:1 (m/m); **(d)** ramsana. **Figure 2.** Thermograms from differential scanning calorimetry for membranes prepared from gels equilibrated at pH 7.4: **(a)** native collagen; **(b)** anionic collagen after 72 h hydrolysis; **(c)** composite anionic collagen: ramsan 75:1 (w/w); **(d)** ramsan.

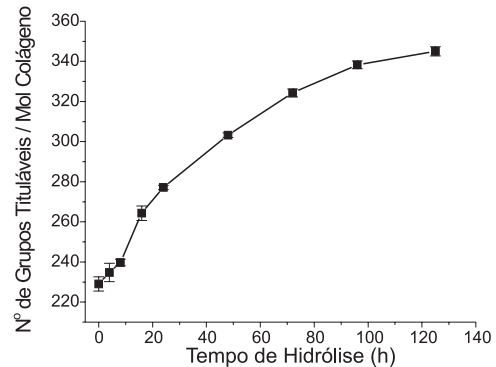


Figura 3. Conteúdo de grupos carboxílicos determinados em submucosa intestinal de porco em função do tempo de hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas de asparaginas e glutaminas presentes na estrutura primária da proteína. **Figure 3.** Carboxyl groups content of porcine intestine submucosa after the selective hydrolysis of carboxyamide side-chain groups of asparagine and glutamine present in the primary structure protein, as function of time.

Os valores de Td (temperatura de desnaturação) determinadas a partir dos termogramas da Figura 2 foram de respectivamente $63,2$, $48,6$, e $46,5^\circ\text{C}$ para o colágeno nativo (Figura 2a), CAR 75:1 (Figura 2c) e CA 72h purificado (Figura 2b). A presença destas transições mostra que em todas as preparações a estrutura em tripla hélice do colágeno está preservada, confirmando os resultados de infravermelho. Colágeno desnaturado não apresenta qualquer transição térmica no intervalo de temperatura estudado (Fladin *et al.*, 1984). No intervalo estudado, a ramsana não apresentou qualquer transição térmica (Figura 2d). Por outro lado, a similaridade dos valores de transição térmica de CAR e CA sugerem que, na forma de membranas, nenhuma interação parece ocorrer entre as duas macromoléculas.

A titulação potenciométrica de SP submetida à hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas de Asn e Gln por tempos variáveis e no intervalo de pH 2,0 a 7,0 mostrou um aumento progressivo no número de grupos carboxílicos (COOH) que variou de 239 ± 8 COOH/mol de colágeno para o colágeno nativo, até 370 ± 7 COOH/mol de colágeno após 125 h de hidrólise (Figura 3). Os valores teóricos calculados a partir da estrutura primária do colágeno tipo I nativo e aquele no qual todos os grupos carboxiamidas de Asn e Gln houvessem sido hidrolisados são respectivamente 231 e 361 COOH/mol de colágeno (Ramachandran, 1967). Para o colágeno submetido por 72 h de hidrólise

este número foi de 345 ± 9 COOH/mol de colágeno, portanto, um aumento do número de grupos COOH de aproximadamente 106 ± 17 , em comparação com o colágeno nativo e que a pH fisiológico resulta em um número equivalente de cargas negativas devido à sua ionização.

Estudos de Reologia

Os dados de viscoelasticidade foram obtidos após prévio estabelecimento de uma varredura de deformação a frequência constante de 10 rad/s, para estabelecer a faixa linear do comportamento viscoelástico dos géis de CA e CAR equilibrados a pH 3,5 e 7,4. A faixa linear foi determinada para o limite de 2% deformação. Nesta região, foram determinados para géis de CA e CAR os módulos de armazenamento (elástico, G'), módulo de perda (viscoso, G'') e os ângulos de fase ($\delta = G''/G'$) em função da frequência (Tabela 1). Os resultados mostraram 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 ou do pH do gel, com valores maiores de G' para os géis equilibrados a pH 3,5. Em ambos os pHs, a adição de ramsana provocou efeitos significativos sobre o valor do módulo elástico G' (Tabela 1).

Para os experimentos de varredura de frequência entre 1,0 a 60 rad/s (faixa de 2% de deformação) e embora não apresentado, géis de CA e CAR equilibrados a pH 3,5 e 7,4, confirmaram os resultados a frequência constante, pois os valores de $G' \gg G''$, evidenciando as características elásticas deste géis. A análise do módulo complexo G^* , que é uma medida da resistência à deformação dos materiais, também confirmou as propriedades elásticas destes géis visto que a pH 3,5 e 7,4, $G^* \cong G'$ (Tabela 1).

Para realização dos experimentos de "creep", foi necessário determinar a tensão para a obtenção da

recuperação máxima. Esta tensão foi determinada, submetendo-se os géis a deformações induzidas por tensões variáveis, seguido da monitoração da recuperação em um intervalo de tempo, 300 s (Wallace *et al.*, 1987) (Figura 4). 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. O intervalo menor para géis a pH 7,4 deveu-se a alterações irreversíveis da estrutura do gel observadas para valores > 15 Pa (Figura 5). Nestas condições, maiores recuperações da deformação induzida para os géis equilibrados nos dois pHs foi 5,0 Pa, a tensão operacional definida para os experimentos de "creep".

As curvas de "creep" dos géis de CAR nas composições entre 100:1 e 25:1 estão mostradas na Figura 6. Os resultados de recuperação mostraram que géis equilibrados a pH 3,5 recuperam com maior eficiência que aqueles equilibrados a pH 7,4 (Tabela 2) e, com valores menores quando se adiciona a ramsana. Enquanto a percentagem de recuperação para o CA a pH 3,5 foi de 98,4% a presença de ramsana no composto a 25:1 a recuperação foi de 47,9% (Tabela 2), a pH 7,4 estes valores foram de respectivamente de 68,3 e 27,6% para o CA e CAR a 25:1. Entretanto, os géis equilibrados a pH 7,4 são mais deformáveis, principalmente após a adição da ramsana (Figura 6), uma propriedade importante para géis injetáveis destinados à correção plástica.

Os ensaios de fluidez de géis de CA e CAR nas proporções de 75 e 25:1 equilibrados a pH 3,5 e extrudados através de uma agulha de 20x 0,55 mm (Figura 7a), mostraram de modo significativo a influência da ramsana no comportamento destes géis. Enquanto a força necessária para o escoamento do CA foi de 2,15 Kgf, para CAR 75:1e 25:1 estas forças foram significativamente menores e 1,34 e 1,22 Kgf.

Outra característica observada para o escoamento dos géis de CAR em relação ao CA, foi a menor

Tabela 1. Parâmetros de cisalhamento dinâmico obtidos a $\omega = 1$ rad/s para géis de colágeno (CA) e seus compostos com ramsana (CAR) à pH 3,5 e 7,4. **Table 1.** Parameters of dynamic shear obtained at $\omega = 1$ rad/s for collagen gels (CA) and their ramsan composites (CAR) at pH 3.5 and 7.4.

pH	Parâmetro	Compostos				
		0	100:1	75:1	50:1	25:1
3,5	G' (Pa)	80,34	41,92	41,89	42,64	60,51
	G'' (Pa)	32,30	18,59	18,92	19,49	24,63
	G^* (Pa)	86,59	45,85	45,96	46,89	65,33
	δ (graus) ^(a)	21,90	23,92	24,56	24,31	22,15
7,4	G' (Pa)	18,99	24,31	19,57	18,07	18,50
	G'' (Pa)	8,26	12,21	11,14	8,99	9,10
	G^* (Pa)	19,78	25,28	22,8	20,18	19,83
	δ (graus) ^(a)	23,68	24,64	30,87	26,39	26,87

(a) Tangente do ângulo de defasagem entre o módulo de perda (G'') e o módulo de armazenamento (G').

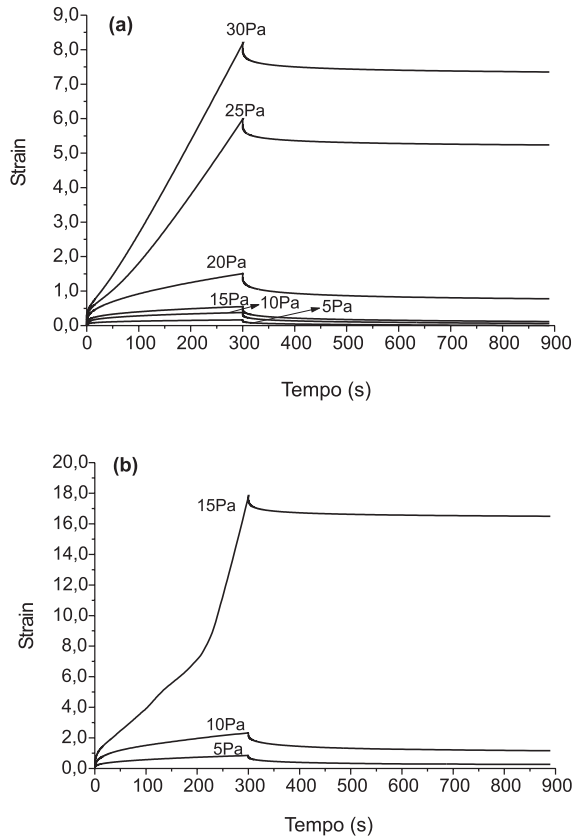


Figura 4. Experimentos de fluência para colágeno aniônico após 72 h de hidrólise sob condições de tensão entre 5,0 e 30,0 Pa. **(a)** pH 3,5; **(b)** pH 7,4. **Figure 4.** Creep experiments for anionic collagen after 72 h of hydrolysis submitted to variable stress between 5.0 and 30.0 Pa. **(a)** pH 3.5; **(b)** pH 7.4.

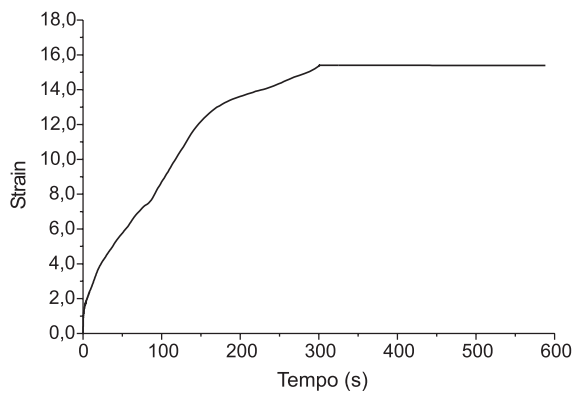


Figura 5. Experimentos de fluência para colágeno aniônico após 72 h de hidrólise, a uma tensão de 20 Pa. **Figure 5.** Creep experiments for anionic collagen 72 h of hydrolysis determined after a stress of 20 Pa.

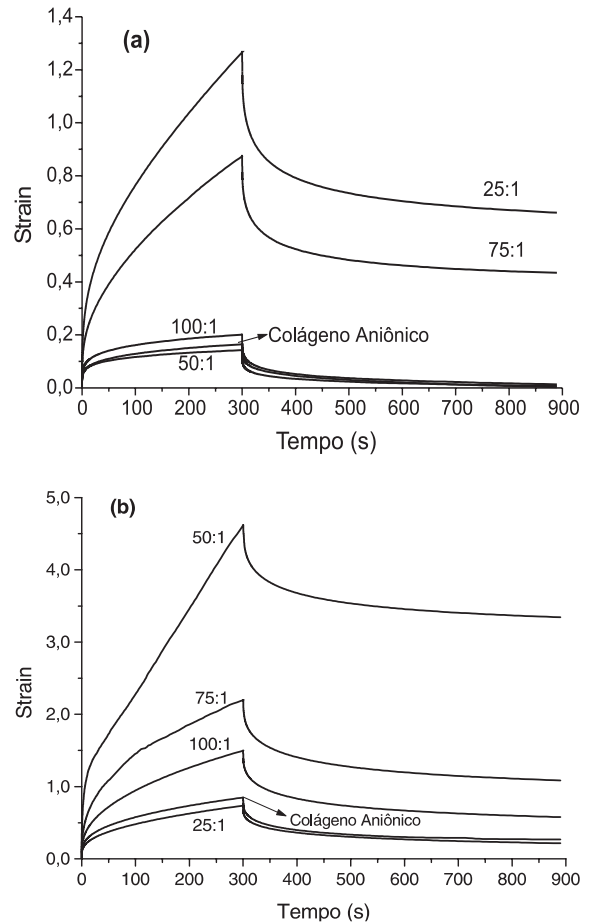


Figura 6. Experimentos de fluência para colágeno aniônico e compósitos colágeno aniônico: ramsana nas proporções de 100:1, 75:1, 50:1 e 25:1 (m/m), determinadas após a aplicação de tensão de 5,0 Pa. **(a)** pH 3,5; **(b)** pH 7,4. **Figure 6.** Creep experiments for anionic collagen and anionic collagen: ramsan with ratios (w/w) of 100:1, 75:1, 50:1 e 25:1, submitted to a stress of 5.0 Pa. **(a)** pH 3.5; **(b)** pH 7.4.

Tabela 2 Percentagem de recuperação determinados em experimentos de fluência para compósitos colágeno aniônico^(a): ramsana com relação de massas variáveis e submetidos à tensão de 5,0 Pa. **Table 2.** Percent recovery determined after creep experiments for anionic collagen^(a): ramsan composites submitted to a stress of 5.0 Pa.

Preparações (m/m)	% Recuperação	
	pH 3,5	pH 7,4
0	98,4	68,3
100:1	93,3	61,4
75:1	50,4	50,7
50:1	94,9	70,8
25:1	47,9	27,6

(a) Colágeno aniônico é aquele obtido após 72h de hidrólise, com excedente de cargas negativas de 160 ± 17 .

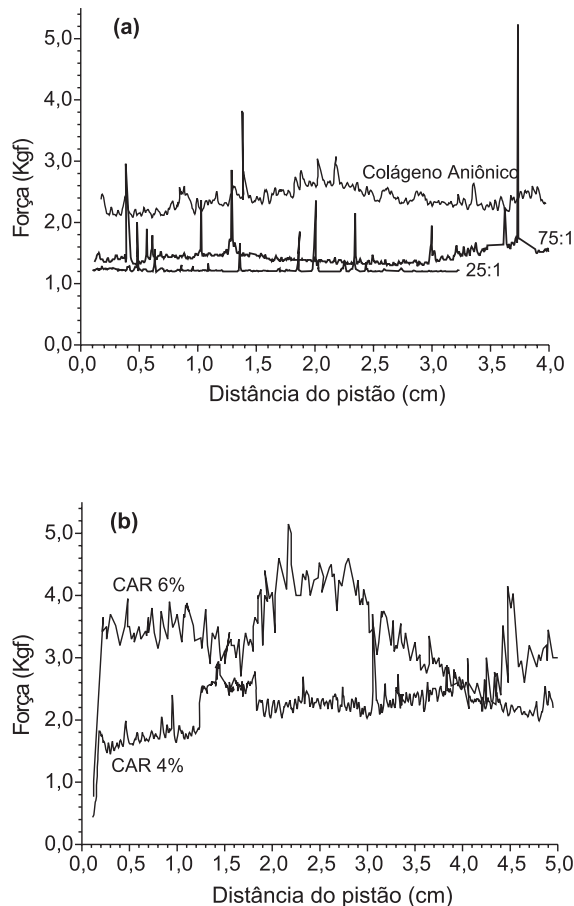


Figura 7. Escoamento de géis de colágeno aniônico e seus compositos com ramsana, através de uma agulha (20x0,55mm) e velocidade constante de escoamento de 1,0 mL/min. **(a)** géis de colágeno aniônico à 0,7% (m/m), e proporções de ramsana de 25:1 e 75:1 (m/m), pH 3,5; **(b)** compositos colágeno: ramsana nas concentrações de 4 e 6% (75:1 m/m), pH 7,4. **Figure 7.** Flow experiments for anionic collagen and composites with rhamosan through a needle with dimensions of 20x5.5mm, at constant flow of 1.0 mL/min. **(a)** anionic collagen gel at 0.7% (w/w) a composites with ratios of 25:1 and 75:1 (w/w), at pH 3.5; **(b)** 75:1 anionic collagen:rhamosan composites at 4 and 6% (w/w), pH7.4.

freqüência da presença de picos de contrapressão, provavelmente devido a problemas similares aos descritos para os géis estabilizados com GA (Wallace *et al.*, 1989). Resultados de fluidez preliminares para géis de CAR 4 e 6% equilibrados a pH 7,4 (Figura 7b), mostraram que os mesmos apresentaram um comportamento similar aos obtidos em pH 3,5 nas concentrações de 0,7% (m/m), mesmo não tendo sido estabilizados com GA.

Os resultados para géis de CAR a 2,5% injetados na membrana vesical de coelhos (Figura 8) mostraram que 30% dos implantes após 120 dias foram caracterizados por intensa fibrose ou formação de pseudo cápsula, que são eventos mais convenientes para o caso de efeitos plásticos do que cicatrizes hipertróficas. Uma observação técnica foi que sob condições práticas de cirurgia normal, este gel escoou com facilidade através da agulha.

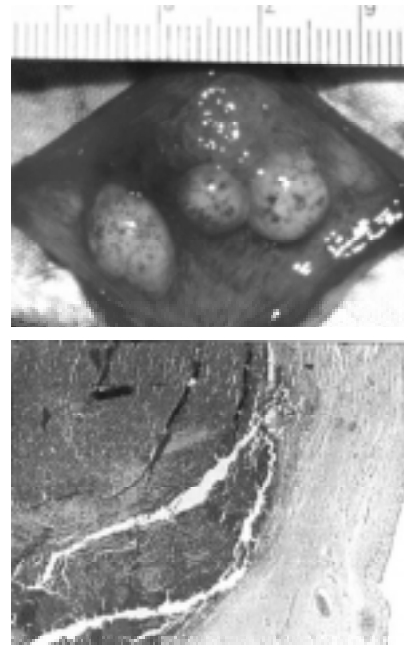


Figura 8. Comportamento biológico de colágeno aniônico:ramsana 75:1 (m/m) a 2,5% (m/m), implantado na membrana vesical de coelho: **(a)** ilustração da introdução do gel; **(b)** formação de pseudo-cápsula após 120 dias do implante. H.E, 200x. **Figure 8.** Biological behavior of anionic collagen:rhamosan composite 75:1 (w/w) with a gel concentration of 2.5% (w/w), after implantation in the vesical membrane of rabbits: **(a)** illustration of gel implantation; **(b)** formation of pseudo-capsule after 120 days of implant H.E, 200x.

Conclusões

Os resultados descritos acima mostraram que: (i) - os materiais obtidos, independentemente do processamento, são formados por colágeno não desnaturado e com um conteúdo de grupos carboxílicos de $345,9 \pm 9$, o que significa a pH fisiológico a um aumento efetivo de 106 ± 17 cargas negativas em relação ao colágeno nativo; (ii) - independentemente do pH, géis de CA e CAR foram caracterizados por módulo de armazenamento (G') sempre maior que o módulo de perda (G''); (iii) - os resultados de "creep" juntamente

com os ensaios de fluidez, mostraram que géis de CAR equilibrados a pH 7,4, embora menos elástico que os géis equilibrados a pH 3,5, são mais susceptíveis à deformação, um comportamento confirmado pelos estudos preliminares de escoamento; (iv) Os resultados de biocompatibilidade de géis de CAR realizados em membrana vesical de coelho mostraram que este compósito são compatíveis com a sua utilização em correções plásticas, principalmente pelo fato de não utilizarem o glutaraldeído com agente de estabilização das suspensões microfibrilares das preparações comerciais.

Agradecimentos

A E. Biazin e G.D Broch pelo apoio técnico prestado e à FAPESP pelo apoio financeiro (Proc. 97/04558). Márcio de Paula é bolsista FAPESP no programa de pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos/USP (Proc. 99/04806-0).

Referências

- Benshushan, A.; Brzezinski, A.; Shoshani, O.; Rojansky, N. (1998), "Periurethral injection for the treatment of urinary incontinence", *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 53, p. 383-388.
- Crescenzi, V. (1994), "Polysaccharide science and technology: development and trends", *TRIP*, v. 23, p. 104-109.
- Fladin, F.; Buffevant, C.; Herbage, D. (1984), "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.
- Filho, J. C. S. T. (1998), *Injeção de colágeno associado à ramsana na submucosa vesical. Estudo experimental no coelho*, Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Bauru, UNESP, Botucatu, 98 p.
- Florjanlil, U. K.; Umer, M. (1998), "Influence of temperature and polymer concentration on rheological properties of ramsam", *Acta Chimica Slovenia*, v. 45, p. 419-428.
- Frey, P.; Mangold, S. (1995), "Physical and histological behavior of a new injectable collagen (GAX 65) implanted into the submucosa space of the mini-pig bladder", *Journal of Urology*, v. 154, p. 1812-815.
- Frey, P.; Gudinchet, F.; Jenny, P. (1997), "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.
- George, A.; Veis, A. (1991), FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. *Biochemistry*, v. 30, p. 2372-2377.
- Goissis, G.; Moriwaky, C. M. (1990), "Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável" Patente Industrial, n. 9.000.972.
- Goissis, G.; Marcantônio Júnior, E.; Marcantônio, R.A.C.; Lia, R.C.C.; Cancian, D.C.J.; Carvalho, W.M. (1999), "Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking", *Biomaterial*, v. 20, p. 27-34.
- Gordon, P. L. (1994), "The Far-infrared spectrum of collagen", *Macromolecules*, v. 7, p. 954-955.
- Kaplan, E. N.; Falces, E.; Tolleth, H. (1983), "Clinical utilization of injectable collagen", *Annals of Plastic Surgery*, v. 10, p. 437-51.
- Laemmli, U.K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, v. 227, p. 680.
- McPherson, J. M.; Wallace, D.G. (1985), "Collagen fibril formation in vitro: a characterization of fibril quality as a function of assembly conditions", *Collagen and Related Research*, v. 5, p. 119-125.
- McPherson, J.M.; Sawamura, S.; Armstrong, R. (1986), "An examination of biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20, p. 93-107.
- O'Brink, B. (1973), "The influence of glycosaminoglycans on the formation of fibers from monomeric tropocollagen in vitro", *European Journal of Biochemistry*, v. 34, p. 129.
- Ramachandran, G. N. (1967), "Treatise on Collagen", London, Acad. Press, v. 1.
- Rao, K. P.; Joseph, K.T. (1988), "Collagen graft copolymers and their biomedical applications", *Collagen: Biotechnology*. CRC Press, v. 3, p. 63-65.
- Remacle, M.; Lawson, G.; Dujardin, J.M. (1995), "Treatment of vocal fold immobility by glutaraldehyde-cross-linked collagen injection: long-term results", *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, v. 104, p. 437-441.
- Silvester, M.F.; Yannas, I.V.; Forbes, M.J. (1989), "Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction", *Thrombosis Research*, v. 55, p. 135-148.
- Wallace, D.G.; Rhee, W.; Weiss, B. A. (1987), "Shear creep of injectable collagen biomaterials", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 21, p. 861-880.
- Wallace, D. G.; Rhee, W.; Reihanian, H.; Ksander, G.; Lee, R.K.; Braun, W.B.; Weiss, B. A.; Pharriss, B.B. (1989), "Injectable crosslinked collagen with improved flow properties", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 23, p. 931-945.
- Wood, G.C. (1960), "Formation of fibrils from collagen solutions", *Biochemistry Journal*, v. 75, p. 605-611.
- Woodroof, A. (1978), "Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves" *Journal of Bioengineering*, v. 2, p. 1-19.