

HIDRÓLISE SELETIVA DE CARBOXYAMIDAS DE RESÍDUOS DE ASPARAGINA E GLUTAMINA EM COLÁGENO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES ANIÔNICAS PARA USO COMO BIOMATERIAIS

Cristina Lacerda, Ana Maria de Guzzi Plepis e Gilberto Goissis

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - Av. Dr. Carlos Botelho, 1465 - 13560-250 - São Carlos - SP

Recebido em 14/3/97; aceito em 8/10/97

SELECTIVE HYDROLYSIS OF CARBOXYAMIDES OF ASPARAGINE AND GLUTAMINE RESIDUES OF COLLAGEN: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ANIONIC COLLAGEN MATRICES FOR BIOMATERIAL APPLICATIONS. This work describes the selective hydrolysis of carboxamide groups of asparagine and glutamine of collagen matrices for the preparation of negatively charged collagen biomaterials. The reaction was performed in the presence of chloride and sulfate salts of alkaline and alkaline earth metals in aqueous dimethylsulfoxide solution and, selectively hydrolysis of carboxamide groups of collagen matrices was promoted without cleavage of the peptide bond. The result is a new collagen material with controlled increase in negative charge content. Although triple helix secondary structure of tropocollagen was preserved, significant changes in thermal stabilities were observed in association with a new pattern of tropocollagen macromolecular association, particularly in respect microfibril assembly, thus providing at physiological pH a new type of collagen structure for biomaterial preparation, characterized by different charge and structural contents .

Keywords: anionic collagen; carboxamide; selective hydrolysis; biomaterials.

INTRODUÇÃO

O colágeno é amplamente utilizado como matéria prima para a produção de biomateriais^{1,2} nas formas de membranas, esponja, pó, como agente hemostático e materiais para o revestimento de queimaduras e outras lesões¹, ou ainda como suporte para crescimento de terminais nervosos periféricos danificados³. Na maioria dos casos, é utilizado na sua forma nativa ou reconstituída, associado principalmente à reações de reticulação com a finalidade de aumentar sua biocompatibilidade e propriedades mecânicas⁴. Apenas em alguns casos tem sido quimicamente modificado por esterificação⁵, acilação^{6,7}, desaminação de grupos ϵ -amino de lisina ou proteção de grupos guanidino dos resíduos de arginina⁸. Os novos materiais resultantes são matrizes colagênicas carregadas, utilizadas como suporte para crescimento celular, géis de colágeno viscoelástico para reposição do humor vítreo, géis de colágeno para liberação de droga ou ainda para o estudo da fibrilogênese do colágeno^{5,8}. Outros biomateriais de colágeno, com novas e melhores propriedades, tem sido preparados na forma de compósitos por associação com polímeros sintéticos⁹, como por exemplo, o polipirrol para o controle do processo de calcificação *in vivo* de válvulas cardíacas fixadas com glutaraldeído⁴.

Um processo interessante para a preparação de materiais de colágeno carregados negativamente a pH fisiológico, sem induzir a grandes modificações estruturais, é a hidrólise seletiva dos grupos carboxídeos dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias a do tropocolágeno¹⁰. A hidrólise total destes grupos tem como resultado, a formação de matrizes com um aumento de 130 cargas negativas, superpostas em regiões de carga negativa pré-existent na molécula nativa¹¹. Uma resultante importante desta alteração, é a formação de um centro de carga assimétrico (Figura 1), uma característica importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos¹² e que pode aumentar significativamente as propriedades piezoelétricas existentes no colágeno nativo¹³. Esses novos centros, caracterizados por uma elevada densidade de cargas negativas, para o caso do tropocolágeno concentram-se na região central da molécula (Figura

1a), e no período D do arranjo microfibrilar, as cargas negativas estão concentradas nas extremidades do período D (Figura 1b). Cargas positivas e negativas no tropocolágeno nativo ou no período D do agregado microfibrilar, estão uniformemente distribuídas (Figura 1a e 1b). Além disso, novas propriedades podem ser esperadas para estes novos materiais de colágeno, e algumas aplicações potenciais podem ser antecipadas como o recobrimento de próteses cardiovasculares¹⁴, preparação de géis injetáveis com melhores propriedades reológicas devido ao efeito da repulsão eletrostática^{7,15} e matrizes de colágeno mais eficientes para sistema de liberação de drogas catiônicas baseada nas propriedades de troca iônica⁷.

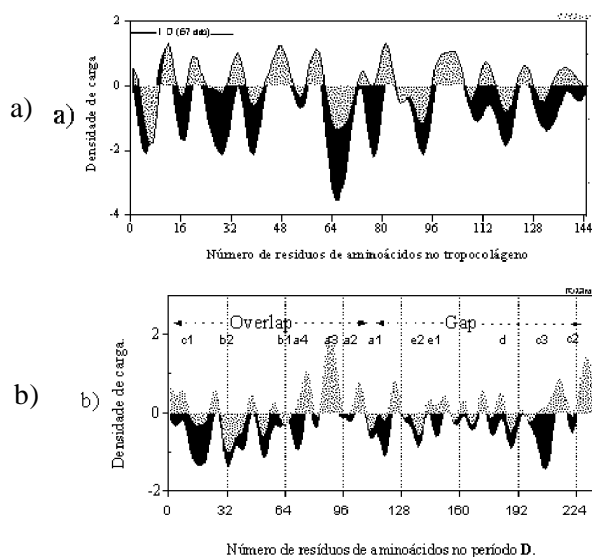


Figura 1. Resultante de carga líquida para o tropocolágeno (a) e no período D (b) para colágeno nativo (preto) e matrizes de colágeno aniônico (cinza), assumindo hidrólise completa dos grupos carboxídeos dos resíduos de asparagina e glutamina.

Este trabalho descreve a preparação e a caracterização de materiais de colágeno aniônico preparados por hidrólise seletiva de Asn e Gln, na tentativa de introduzir uma nova categoria de biomateriais derivados de colágeno para aplicações biomédicas.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparação do Colágeno

Matrizes aniônicas: pericárdio bovino (PB) foi tratado a 20°C, por um período de 0 a 72h, com uma solução aquosa alcalina na presença de sais e bases de metais alcalinos e alcalinos terrosos¹⁶. Os sais residuais foram removidos por lavagens com ácido bórico a 3% (3x, 6h), 0,3% EDTA pH 11,0 (3x, 6h) e água deionizada (6x, 2h).

Géis de colágeno aniônico: serosa porcina (SP) e tendão bovino (TB) foram tratados como descrito acima para PB por um período de 72h e depois de removidos os sais, os materiais foram suspensos em água deionizada e o pH ajustado para 3,5 por adição de ácido acético. A mistura foi homogeneizada e a concentração do gel ajustada para 0,7%, determinado por hidroxiprolina¹⁷.

Géis de colágeno nativo: estes foram preparados por tratamento de SP e TB a 20°C, com uma solução aquosa de ácido acético a pH 2,0 a 6% (v/v) em dimetilsulfóxido, com agitação ocasional pelo período de uma semana. A suspensão foi homogeneizada e o gel obtido, dialisado contra uma solução de ácido acético a pH 3,5 até completa remoção do dimetilsulfóxido. As concentrações finais dos géis foram ajustadas para 0,7% (m/m), como descrito acima para géis de colágeno aniônico.

Caracterização do Colágeno

Titulação potenciométrica de matrizes de PB: amostras de aproximadamente 600 mg de PB nativo e com tratamento alcalino como descrito acima por período de tempo entre 0 e 72h foram expandidas em solução de ácido acético 1mol.L⁻¹ por um período de 24h e a seguir liofilizadas. As amostras de PB sólido foram equilibradas em solução de ácido trifluoroacético 0,5mol.L⁻¹ por 24h, liofilizadas (3x) e secas até peso constante sob vácuo na presença de KOH. Estas foram então suspensas 20mL de água deionizada e deaeradas para completa embebição. O pH final destas soluções foram próximos de 2,0. O equilíbrio prévio em ácido trifluoroacético teve como objetivo não apenas a protonação dos grupos carboxílicos presentes na proteína, principalmente os grupos β e γ das cadeias laterais de resíduos de ácidos aspártico e glutâmico, mas também para manter níveis de embebição elevado para facilitar a titulação. As titulações foram realizadas com solução padrão de NaOH sob uma corrente de N₂ no intervalo de pH de 2,0 a 7,0. Os resultados das titulações correspondem à médias de 3 determinações independentes.

Massa molecular: estas foram determinadas por eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS¹⁸, usando-se um gel de empacotamento de 5% e para resolução, de 10%. As razões a₁/a₂ foram determinadas por medidas densitométricas após coloração dos géis com Coomassie Blue, em comparação com padrões conhecidos de colágeno oCollagen 1000, CLR, Germany e Tropocoll, Devro Ltd. USA).

Espectroscopia de infravermelho (IV): espectros de absorção no IV foram obtidos em membranas preparadas por secagem dos géis de colágeno de TB e SP (0,4 mg/cm²), em moldes de Teflon. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro BOMEN (FTIR), entre 400 e 4000 cm⁻¹ e com uma resolução de 4 cm⁻¹. Antes das determinações, todas as membranas foram secas sob vácuo por 72h na presença de KOH. Membranas de gelatina para estudo comparativo de IV foram preparadas de modo similar. A razão das absorvâncias 1235/1450 foi determinada como uma medida da integridade da tripla hélice do colágeno.

Estabilidade térmica: foi medida como temperatura de

desnaturação (Td) ou temperatura de encolhimento (Ts) em PB (pedaços de tecido tratado) ou em membranas de colágeno de TB e SP preparadas em moldes de PVC : poliestireno, com concentrações próximas de 4,0 mg/cm².

a) **Temperatura de encolhimento (Ts):** foram determinadas em um equipamento de ponto de fusão Quimis adaptado para Ts, utilizando-se amostras de 2 x 0,2 cm, preparada como descrito acima, estas foram previamente equilibradas em soluções tampão apropriadas com a mesma força iônica em valores de pH 3,4 a 8,0. A taxa de aquecimento foi de 2,0 °C/min no intervalo de 20 a 100°C. Os valores de Ts (média de 4 determinações), foram obtidos com as amostras imersas na solução tampão apropriada, colocadas em um tubo de Pirex graduado de 20 mm imerso em banho de óleo de silicone.

b) **Temperatura de desnaturação (Td):** estas foram determinadas em materiais preparados como descrito para Ts, com amostras com cerca de 10 mg, exceto que equilibrados somente em pH 3,4, 4,6 e 7,4. O equipamento utilizado foi da TA Instruments DSC 2010, calibrado com padrão de índio. A taxa de aquecimento foi de 5°C/min para um intervalo de temperatura entre 20 a 120°C.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): fotomicrografias foram obtidas em amostras de PB nativo tratado em meio alcalino por 72h e previamente equilibradas em soluções tamponadas como descrito para Td. As Micrografias foram obtidas em um equipamento ZEISS DSM 960, operando com feixe de elétrons de 20 keV. Todas as amostras foram previamente cobertas com uma camada de ouro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas de Asn e Gln em PB, determinado dentro do intervalo de pH 2,0 a 7,0 mostrou em função do tempo do tratamento alcalino, um aumento progressivo no número de grupos tituláveis das matrizes colagênicas, que variou de 0,85 ± 0,03 mEq/g para o colágeno nativo até 1,30 ± 0,01 mEq/g, após 72h de tratamento alcalino (Figura 2). Os valores esperados para PB nativo e aquele submetido à hidrólise completa dos resíduos de Asn e Gln e, com base na massa molecular do tropocolágeno de 280.000 Da¹⁹, foram de respectivamente 0,82 mEq/g e 1,28 mEq/g. Os valores experimentais da figura 2, correspondem respectivamente a 235±8 e 364±4 grupos tituláveis/tropocolágeno para PB nativo e após 72h de tratamento alcalino, comparado com os valores calculados de 231 e 361¹⁰. Correções para os grupos α -carboxílicos (3 resíduos) e imidazólicos dos resíduos de histidina (pKa = 6,5²⁰), dentro do intervalo de pH estudado, resultaram em 224,5±8,0 e 353,0±4,0 grupos tituláveis/mol de tropocolágeno para PB nativo e após 72h de tratamento alcalino respectivamente. Esses valores correspondem a um aumento real líquido de 129 grupos tituláveis para material tratado, comparado com o valor esperado de 130¹⁰ para o pericárdio nativo, mostrando que após 72h todos os grupos carboxiamidas de Asn e Gln presentes no PB foram completamente hidrolisados a grupos carboxílicos, com a extensão da hidrólise controlada pelo tempo da reação (Figura 2).

A eletroforese em gel poliacrilamida-SDS a 10%, corada com Coomassie Blue (Figura 3) mostrou que o gel de colágeno obtido a partir da SP, após 72h de hidrólise, foi caracterizado pela presença de duas bandas de maior intensidade, com massas moleculares de 98.000 Da e 104.000 Da, correspondendo respectivamente às cadeias α_1 e α_2 , e com uma relação α_1/α_2 de 1,9, comparada com aquela esperada de 2,0 para o colágeno tipo I²¹. Outra banda de intensidade significativa foi observada com uma massa molecular estimada de 159.000 Da, provavelmente cadeias do tipo β (duas cadeias α unidas). Bandas para componentes de massas moleculares inferiores a 100.000 Da também foram detectadas, mas de baixa intensidade (Figura 3), sugerindo que nas condições utilizadas, a hidrólise de grupos carboxiamidas foi seletiva e sem degradação ou solubilização extensiva

da matriz. Isto foi confirmado pela extração do colágeno dos materiais tratados em solução de ácido acético pH 3,5, onde os rendimentos foram sempre superiores a 85%¹⁶. Géis de colágeno obtidos de TB mostraram resultados similares após 72h de hidrólise.

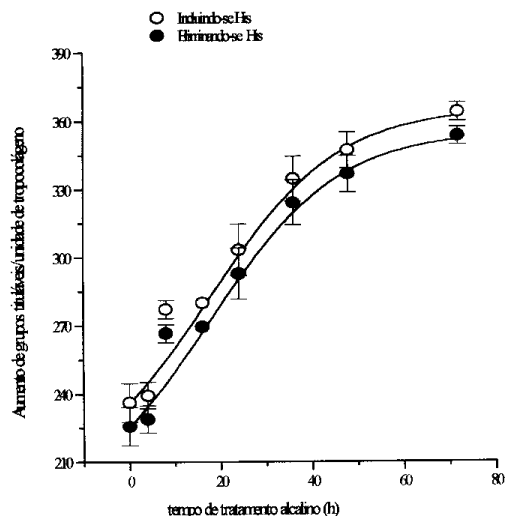


Figura 2. Variação do número de miliequivalentes em pericárdio bovino submetido à hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas dos resíduos de asparagina e glutamina em meio alcalino, em função do tempo de hidrólise

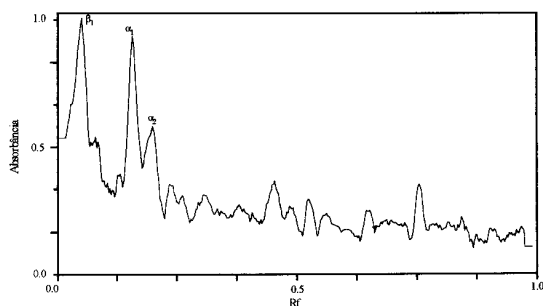


Figura 3. Curva densitométrica para gel de colágeno de serosa porcina com grupos carboxiamidas completamente hidrolisados, obtida de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS a 10% após coloração com Comassie Blue.

As relações de absorvâncias no IV, A_{1235}/A_{1450} , determinadas para membranas de colágeno preparadas a partir de géis de SP e TB a pH 3,5 foram de respectivamente 1,0 e 1,1, sugerindo que a estrutura em hélice tripla do tropocolágeno foi preservada durante a hidrólise. Valores típicos para membranas de colágeno nativo preparadas nas mesmas condições são próximos de 1,0²². Os valores para membranas de colágeno desnaturado ou gelatina são significativamente menores e próximos de 0,60²². O valor desta relação para a membrana de gelatina determinado neste trabalho foi de 0,56. 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 tropocolágeno (hélice tripla), 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 da matriz do colágeno²².

A integridade da estrutura secundária hélice tripla no colágeno foi confirmada também em todos os materiais, pela presença de transição térmica²³ determinada como Ts ou Td (Tabela 1) e, para

todas as preparações de colágeno, independentemente de ter sido ou não submetido à reação de hidrólise, os valores de Ts e Td a pH 3,5 foram sempre menores, quando comparados com os aqueles determinados a pH 7,4. A pH 3,5 essas transições térmicas variaram no intervalo entre $44,5 \pm 0,8^\circ\text{C}$, para PB completamente hidrolisado (72h) e $48,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ para membranas de SP nativa.

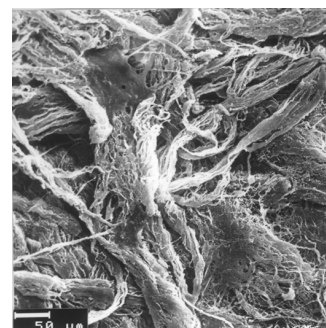
Tabela 1. Estabilidade térmica ($^\circ\text{C}$) para materiais^{a,b} de colágeno nativo e colágeno após hidrólise completa dos grupos carboxiamidas, equilibrados a pH 3,5 e 7,4.

pH	Material					
	Pericárdio ^a		Serosa ^b		Tendão ^b	
	Td	Ts	Td	Ts	Td	Ts
Nativo						
3,5	47,3	$48,5 \pm 0,5$	47,5	$48,5 \pm 0,7$	-	$55,5 \pm 0,5$
7,4	63,4	$62,1 \pm 0,2$	63,8	$64,5 \pm 0,4$	-	$64,8 \pm 0,2$
Aniônico						
3,5	46,9	$44,5 \pm 0,8$	46,5	$47,5 \pm 0,2$	-	$44,3 \pm 0,5$
7,4	51,8	$48,0 \pm 0,7$	52,5	$51,8 \pm 0,3$	-	$52,8 \pm 0,7$

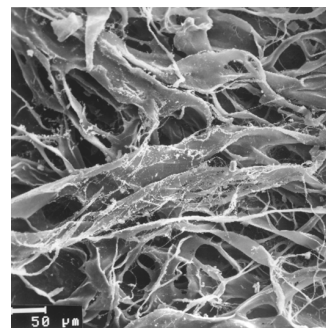
a - determinado em tecidos tratados; b - determinado em membranas de colágeno reconstituído.

A pH 7,4, os materiais nativos mostraram transições térmicas próximas a 63°C e cerca de 14 a 16°C maiores quando comparadas com as transições observadas para os mesmos materiais equilibrados a pH 3,5 (Tabela 1). Estas diferenças para materiais submetidos à hidrólise foram de apenas 6 a 7°C .

Para o caso dos materiais de colágeno nativo, as diferenças observadas nas estabilidades térmicas determinadas a pH 3,5 e 7,4, estão de acordo com a desorganização do arranjo macromolecular (microfibrilas) que caracterizam o colágeno nativo a pH 7,4 (Figura 4a), mas que em pHs inferiores a 4,25 se transforma no colágeno "swollen"²² (Figura 4b), uma estrutura amorfa, sem qualquer padrão de arranjo macromolecular.



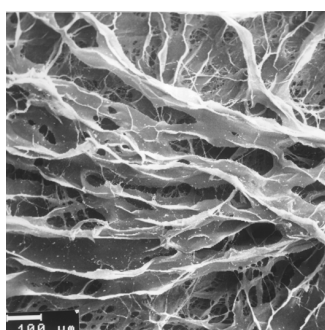
(a)



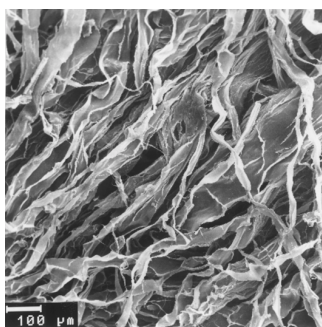
(b)

Figura 4. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para pericárdio bovino nativo equilibrado a pH neutro (a) e a pH 3,5 (b). 200x

A figura 5 mostra as micrografias de MEV para PB hidrolisado por 72h, equilibrado a pH 7,4 (Figura 5a) e a pH 3,5 (Figura 5b). Embora a estrutura observada para o PB equilibrado a pH 3,5 seja semelhante à do colágeno "swollen" observada para o PB nativo nas mesmas condições (Figura 4b), o PB equilibrado a pH 7,4 (Figura 5a), não apresentou o mesmo padrão microfibrilar característica para material nativo (Figura 4a). Em seu lugar, foi observada uma estrutura do tipo lamelar, sugerindo que a introdução de cargas negativas em matrizes de PB impedem o tropocolágeno de se organizar no arranjo microfibrilar, provavelmente como resultado de um novo padrão de interações eletrostáticas que se estabelecem a nível das interações macromoleculares. Este comportamento foi similar àquele descrito para colágeno succinilado⁷ com um excesso de carga negativa de 85% em relação ao nativo e que apresenta um pI estimado de 4,5. O colágeno aniônico descrito neste trabalho deve apresentar um pI semelhante àquele descrito para gelatina extraída em meio alcalino, e de 4,5-4,8¹⁹, onde os grupos carboxílicos de Asn e Gln também são totalmente hidrolisados¹⁹.



(a)



(b)

Figura 5. Micrografias de por microscopia eletrônica de varredura para pericárdio bovino com grupos carboxiamidas completamente hidrolisados equilibrado a pH 7,4 (a) em pH 3,5 (b). 100x

As mudanças no padrão de interação introduzidas pelo aumento no conteúdo de cargas negativas na matriz colagênica também foram sugeridas pelo estudo da dependência da estabilidade térmica de PB, medida como T_s , no intervalo de pH entre 3,4 e 8,0 (Figura 6), realizados com o material nativo e aquele submetido à hidrólise completa após 72h de reação. Para o material nativo os valores mínimos e máximos de T_s foram observados respectivamente a pH 3,4 e 7,4, e estão de acordo com a transição do colágeno na forma "swollen" (Figura 4b) para a estrutura fibrilar (figura 4a)²². Os valores de T_s foram de respectivamente $48,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $62,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ (Figura 6b). Entretanto para PB completamente hidrolisado, enquanto o valor mínimo de T_s também foi observado a pH 3,5 e com um valor de $44,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$, o valor máximo para T_s foi observado a pH 4,7, e com um valor de $53,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$ (Figura 6a). A pH 7,4 o valor determinado para T_s foi de $51,0 \pm 0,6^\circ\text{C}$. Comportamentos similares de T_s foram observados para membranas de TB e SP

nativo em relação aos respectivos materiais completamente hidrolisado (Figuras 6b e 6a).

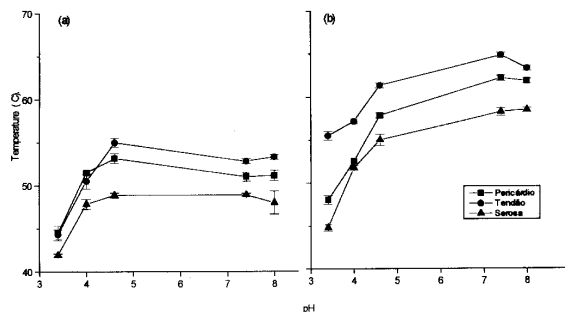
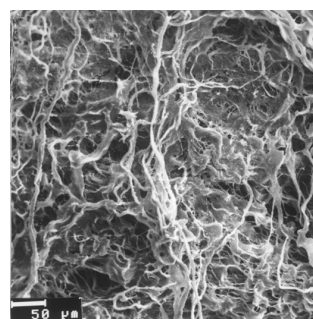
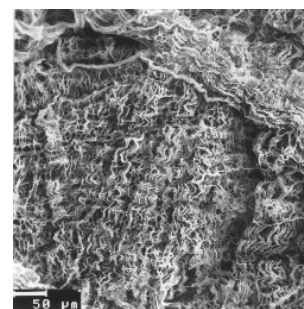


Figura 6. Estabilidade térmica em função do pH determinada como temperatura de encolhimento (T_s) para materiais de colágeno aniônico (a) e nativos (b). Pericárdio bovino, tecido integro; tendão bovino e serosa porcina, membranas.

Esse comportamento da estabilidade térmica mostrado pela figura 6, está de acordo com as variações estruturais mostradas pelas micrografias de MEV para PB nativo e aniônico das figuras 4, 5 e 7, que são decorrentes do fato de que, interações eletrostáticas para proteínas ocorrem em um pH igual ao pI, que para o colágeno nativo esta próximo de 7,0 e para o colágeno aniônico a pH 4,7. Na figura 7, embora a pH 4,7 o PB nativo (Figura 7a) tenha mostrado uma estrutura similar àquele equilibrados a pH 3,5 (Figura 4b), o PB completamente hidrolisado (Figura 7b) foi caracterizado pela presença de filamentos finos, com alguma semelhança à estrutura microfibrilar observada para o PB nativo equilibrado a pH 7,4 (Figura 4a). Como mostrado pela figura 5a, PB hidrolisado por 72h, não apresentou qualquer padrão de organização microfibrilar que é característica do PB nativo neste pH.



(a)



(b)

Figura 7. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para pericárdio bovino nativo (a) e com grupos carboxiamidas completamente hidrolisados (100x) (b) equilibrados a pH 4,7. 200x.

Como resultado, as diferenças na estabilidade térmica entre materiais de colágeno aniônico e nativo equilibrado a pH 3,5, 4,7 e 7,4 devem-se a mudanças na capacidade de agregação molecular do tropocolágeno induzidas por um novo padrão de interações eletrostáticas. Estas novas interações explicariam de uma certa forma, as maiores diferenças de estabilidade térmica observadas para colágeno nativo equilibrado a pHs 3,5 e 7,4 (cerca de 16 °C), em relação àquelas determinadas para o colágeno aniônico, e de cerca de 6 °C (Tabela 1). Enquanto para o primeiro, as maiores diferenças de estabilidade térmica são devidas principalmente à transição do colágeno na sua forma "swollen" não organizada, para uma estrutura microfibrilar altamente ordenada (Figura 4), para o colágeno aniônico, as transições térmicas devem corresponder apenas a desnaturação da tripla hélice (Figura 5).

Como conclusão, os resultados acima mostraram que a hidrólise controlada e seletiva dos grupos carboxiamidas de Asn e Gln pode ser realizada em matrizes de colágeno para produzir materiais com densidades de cargas controlada a pH fisiológico, sem fragmentação ou destruição da estrutura secundária da tripla hélice do tropocolágeno. Em relação às diferenças observadas na estabilidade térmica do colágeno nativo e colágeno hidrolisado, estas são devidas principalmente a alterações na capacidade de agregação macromolecular do tropocolágeno hidrolisado em microfibrilas, uma característica do tropocolágeno nativo, e que provavelmente tem origem num novo padrão de interações eletrostáticas que se estabelece a diferentes pHs, principalmente a pH 7,4. Como conclusão final, espera-se que a hidrólise controlada dos grupos carboxiamidas de matrizes colagênicas possa introduzir uma nova classe de biomateriais de colágeno, com novas e melhores propriedades para aplicações em medicina e odontologia. Como exemplo, estudos das propriedades dielétricas realizados em membranas de colágeno aniônico (hidrólise completa), mostraram que estes materiais são caracterizados por coeficientes piroelétricos consideravelmente superiores quando comparados com aqueles determinados para fluoreto polivinilideno ou seus copolímeros fluoreto de vinilideno: trifluoretileno²⁴, propriedade esta que foi significativamente melhorada em compósitos colágeno aniônico: fluoreto de vinilideno: trifluoretileno²⁵.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ezer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica. Ao PADCT, contratos n° 620.228/91-1 e 620001/96.8/FNM, PADCT/CNP) e FAPESP, Proc. n° 1966/2455-8, pelo apoio financeiro. Este foi realizado em colaboração com Instituto de Ciência de Materiales de Barcelona (Progr. Iberoamer. Ciên. Tecn. para el Desar., CYTED). Cristina Lacerda é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Chvapil, M. *Biology of Collagen*, vol. I; Viidik, A.; Vuust, J., Ed.; Academic Press; London, 1980; 313.
2. Rao, K. P.; Joseph, T.; In *Collagen*, vol. III; Nimni, M. E., Ed.; CRC Press; Boca Raton, 1988; 63.
3. Yannas, I. V. *Collagen*, vol. III; Nimni, M. E., Ed.; CRC Press; Boca Raton, 1988; 87.
4. Grimm, M. M.; Eybl, M.; Spreitzer, H.; Jager, W.; Grimm, G.; Bock, P.; Muller, M. M.; Wolner, E.; *Surgery* **1992**, *111*, 78.
5. Reid, G. G.; Gorham, S. D.; Lackie, J. M.; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **1993**, *4*, 201.
6. Scherrer, S. A.; *E. P. Patent*, 0214853, **1986**.
7. Shenoy, V.; Roseblatt, J.; *Macromol.* **1995**, *29*, 8751.
8. Hu, X. W.; Knight, D. P.; Grant, R. A.; *Tis. Cell Res.* **1996**, *28*, 215.
9. Giusti, P.; Lazzeri, L.; Barbani, N.; Lelli, L.; De Petris, S.; Cascone, M. G.; *Macromol. Symp.* **1994**, *78*, 285.
10. Ramirez, J. A. *Collagen*, vol. IV; Nimni, M. E., Ed.; CRC Press; Boca Raton, 1988; 21.
11. Chapman, J. A.; Tzaphlidou, M.; Meek, K. M.; Kadler, K. E.; *Electron Microsc. Rev.* **1990**, *3*, 143.
12. Pollack, S. T.; *Symposium on Electrically Induced Osteogenesis*; vol. 15; W. B. Daunders Company; Pennsylvania, 1984; p 3.
13. Liboff, A. R.; *Ann. NY Acad. Sci.* **1974**, *238*, 26
14. Noishiki, Y.; Yamane, Y.; Tomizawa, Y. Okoshi, T.; Satoh, S.; Kosuge, T.; Ishii, M.; Ichikawa, Y.; Kajiwara, H.; Tomiyama, I.; *ASAIO J.* **1992**, *38*, 158.
15. Obrink, B.; *Eur. J. Biochem.* **1973**, *34*, 129.
16. Goissis, G.; Plepis, A. M. G.; Rocha, J. L.; *B. R. Patent*, 9.405.043-0, **1994**.
17. Stegemann, H. H.; Stalder, K.; *Clin. Chim. Acta* **1967**, *18*, 267.
18. Laenmli, U. K.; *Nature* **1970**, *227*, 680.
19. Eastoe, J. E. In *Treatise on Collagen*, vol. I; Ramachandran, G. N., Ed.; Academic Press; London, 1967; p 1.
20. Mahller, H. R.; Cordes, E. H. In *Biological Chemistry*; Harper and Row Publishers; New York, 1996; p 87.
21. Huc, A.; *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **1985**, *80*, 195.
22. Silvester, M. F.; Yannas, I. V.; Forbes, M. J.; *Thromb. Res.* **1989**, *55*, 135.
23. Flandin, F.; Buffevant, C.; Herbage, D.; *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *791*, 205.
24. Plepis, A. M. G.; Goissis, G.; Das Gupta, D. K.; *Pol. Eng. Sci.* **1996**, *36*, 2932.
25. Goissis, G.; Piccirilli, L.; Plepis, A. M. G.; Das Gupta, D. K.; Aceito para publicação no *Pol. Eng. Sci.*, junho, 1997.