

Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos

Zahra F. Chaudry, José L. Rocha, Ana Maria G. Plepis, Marcos Rossi e Gilberto Goissis

Resumo: Este trabalho descreve um processo para hidrólise seletiva de grupos carboxamidas de resíduos de asparagina e glutamina presentes em matrizes colagênicas, para a obtenção de colágeno aniônico para produção de novos biomateriais. Os resultados mostraram que em meio alcalino e na presença de metais alcalinos e alcalinos terrosos, os grupos carboxamidas da proteína são seletivamente hidrolizados para dar origem a pH neutro, a materiais de colágeno com um aumento de 106 de carga negativas, em relação à matrizes não modificadas. Embora não tenham sido observadas alterações na estrutura secundária da proteína ou na organização microfibrilar da matriz, modificações significativas foram observadas no padrão da sub-periodicidade do período D da estrutura microfibrilar, que provavelmente são devidas a um aumento da intensidade de interações eletrostáticas.

Palavras-chave: *Colágeno, carboxamidas, hidrólise seletiva.*

Introdução

Colágeno, matéria prima para gelatina, é uma proteína animal cujas funções no organismo vão desde a sustentação de órgãos e tecidos, até o armazenamento de energia em tendões de algumas espécies animais¹. Sua importância como biomaterial, até a década de 1980 era restrita à produção de fios cirúrgicos, desde então tal importância aumentou consideravelmente para aplicações mais nobres que vão desde o revestimento de próteses vasculares de grande calibre² até suporte para orientação do crescimento de células nervosas para restituição de funções motoras³. O aumento da aplicação do colágeno como biomaterial se deve à grande quantidade com que é encontrado no reino

animal, seu baixo índice de reações imunológicas mesmo quando originado de fontes heterólogas (outros animais) e sua capacidade de formar fibras a partir de preparações solúveis, cujas propriedades são similares àquelas encontradas nos tecidos.

É utilizado na maioria dos casos na sua forma nativa, apesar do grande potencial existente na sua estrutura em relação à modificações químicas, que para os poucos casos descritos na literatura deram origem à materiais com propriedades bastante especiais, como no caso da preparação de humor vítreo sintético por reação com cloretos de diácidos⁴. Portanto, modificações químicas em matrizes colagênicas podem se constituir em alternativas de elevado potencial para refinar ou mesmo modificar proprieda-

des nativas do colágeno, sejam elas mecânicas ou físico-químicas, para atender necessidades específicas na área de biomateriais.

Nesta direção, uma modificação interessante seria a transformação da molécula de tropocolágeno, que no seu estado nativo é eletricamente neutra, com ponto isoelétrico (pI) entre 6,7 e 7,0, em uma molécula carregada negativamente no pH fisiológico pela conversão por meio da hidrólise seletiva de grupos carboxâmidos de resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln), em grupos carboxílicos.

O colágeno do tipo I, aquele mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno com um peso molecular de 300 kDa e é formado por 3 cadeias polipeptídicas, duas iguais e denominadas de α_2 e uma diferenciada denominada de α_1 , com pesos moleculares aproximados de 100 kDa. Estas cadeias se organizam na forma de uma tripla hélice dando origem a uma molécula na forma de um bastão com cerca de 2500 Å de comprimento e 15 Å de diâmetro⁵. No tecido, dão origem às microfibrilas, formadas pela justaposição de cinco moléculas de tropocolágeno dispostas concêntrica e alternadas umas em relação às outras de 1/4 de seu comprimento (Figura 1).

Esta organização dá origem a zonas periódicas denominadas de D, com cerca de 680 Å de largura, e caracterizado pela presença de duas zonas distintas, o Gap, com cerca de 400 Å e o Overlap, com cerca de 280 Å. Dentro da periodicidade D existe ainda um padrão sub-periódico, caracterizado pela presença de zonas denominadas de $c_2, c_3, d, e_1, e_2, a_1, a_2, a_3, a_4, b_1, b_2, c_1$, de tal forma que um período D corresponde à distância entre as regiões c_1 e c_2 . Este padrão sub-periódico⁶ se origina pela disposição ordenada de

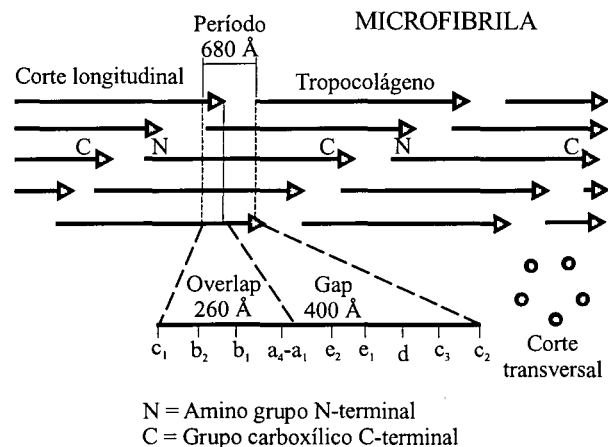


Figura 1. Diagrama da organização macromolecular do tropocolágeno segundo o modelo quarto alternado pentafibrilar

aminoácidos básicos e ácidos, e é detectado por microscopia de transmissão eletrônica, quando corados positivamente com metais pesados. As microfibrilas se organizam posteriormente à fibrilas e fibras (Figura 2).

Com base na estrutura primária das cadeias α_1 e α_2 presentes no colágeno tipo I⁶, se todos os grupos carboxâmidos/tropocolágeno são hidrolizados, o incremento em cargas negativas para a nova matriz será de 120/ molécula de tropocolágeno, número este correspondente ao número total de resíduos de Asn e Gln. Um aspecto interessante desta modificação é que a distribuição topográfica destas novas cargas será coincidente com aqueles sítios de cargas positivas e negativas presentes na molécula de tropocolágeno. Assim, a resultante de cargas da nova matriz, seja a nível do tropocolágeno, ou do período D, será caracterizada por uma distribuição assimétrica de carga, uma das condições estruturais para o desenvolvimento de materiais dielétricos⁷. Independente destas novas propriedades dielétricas, potenciais de aplicação destas matrizes colagênicas carregadas negativamente englobariam o recobrimento de próteses vasculares em substituição ao colágeno nativo, visto que superfícies negativas são menos trombogênicas⁸, a preparação de biocerâmicas compósitas do tipo hidroxiapatita:colágeno aniônico, para mimetização de efeito de polipeptídeos aniônicos no processo de calcificação de matrizes ósseas e suportes biodegradáveis para liberação controlada de drogas catiônicas, pelo fato de na sua forma aniônica a pH fisiológico, ser um trocador de íons.

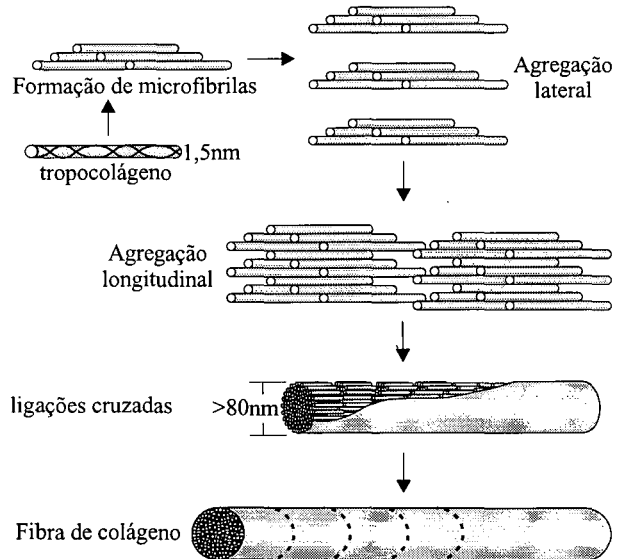


Figura 2. Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibras.

Portanto, tendo em vista que alterações químicas introduzidas no tropocolágeno devem preferencialmente não interferir com suas propriedades de arranjo macromolecular nativo, este trabalho teve como objetivo o estudo das características e propriedades biológicas de colágeno aniônico, obtido por hidrólise seletiva de grupos carboxâmidos de resíduos de Asn e Gln da proteína, em comparação com o colágeno nativo.

Materiais e métodos.

Preparação do Colágeno solúvel

a) *Aniônico*: foi preparado por hidrólise de pericárdio bovino (PB), seguida de solubilização. A hidrólise foi realizada em uma solução aquosa de dimetilsulfóxido a 6% (m/v), na presença de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, e dos sais Na_2SO_4 , NaCl, KCl e CaSO_4 em meio alcalino, por um período de 48 horas⁹. A concentração final da preparação de colágeno solubilizado foi de 0,7% (m/m), determinada via hidroxiprolina (Hypro)¹⁰. A caracterização da preparação foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida, análise de aminoácidos, espectroscopia de infravermelho, estabilidade térmica (temperatura de desnaturação e temperatura de encolhimento) e microscopias de varredura e transmissão eletrônicas.

b) *Neutro*: foi preparado também por solubilização de PB com uma solução de ácido acético a pH 2,5 e 6% (m/v) em dimetilsulfóxido, a 5°C. Após a solubilização o material foi equilibrado em solução de ácido acético a pH 3,5 seguido de homogeneização do resíduo nesta mesma solução. A concentração do colágeno assim preparado foi de 0,75% (m/m), determinada via Hypro¹⁰. Os métodos de caracterização foram similares àqueles descritos para o colágeno aniônico.

Caracterização do Colágeno:

- *Análise de aminoácidos e determinação dos pesos moleculares das preparações*

• As análises de aminoácidos foram realizadas em hidrolizados ácidos da proteína¹¹ e os resultados expressos apenas em função dos aminoácidos Glicina, Prolina e Hypro, por serem os mais representativos

da estrutura primária do colágeno. A concentração de hidroxiprolina também foi determinada colorimetricamente pelo método do N,N - p - Dimetilaminobenzaldeído¹⁰.

• Os pesos moleculares foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS¹² a 7% (m/v), por comparação com padrões de pesos moleculares variáveis entre 200 e 14 kDa e em comparação com colágeno comercial. As relações entre as cadeias α_1 e α_2 , foram determinadas por densitometria dos géis.

- *Espectroscopia de infravermelho*: espectros foram obtidos a partir de membranas com 3,2 mg/cm² preparadas a partir de soluções de colágeno diluídas a 0,5% (m/m), a pH 3,5 em ácido acético, por secagem em câmara de fluxo laminar. As relações entre as absorvâncias das bandas em 1235 cm⁻¹ e 1450 cm⁻¹ foram determinadas¹³ utilizando-se um equipamento Nicolet 5SXC-FTIR com uma resolução de 2 cm⁻¹.

Estabilidade Térmica

a) Temperatura de encolhimento (Ts): foram obtidas em um aparelho para determinação de ponto de fusão adaptado para medidas de Ts. A temperatura de encolhimento (Ts) mede o encolhimento de matrizes de colágeno quando submetidas à aquecimento e o valor da temperatura em que o processo ocorre é proporcional à idade do tecido e ao seu grau de reticulação. Seu valor corresponde à temperatura onde a amostra teve seu tamanho diminuído em 20%. As amostras consistiam de membranas de 2,0 x 0,2 cm, preparadas como descrito acima, equilibradas a pH 3,5 ou em tampão fosfato 0,14M, pH 7,4. As amostras foram presas na parte interna inferior de um tubo pirex com 4 mm de diâmetro interno e espessura de 0,2 mm, imerso em silicone e o conjunto aquecido no intervalo entre 25 e 100 °C. A taxa de aquecimento do sistema foi de 2,0 °C/min e as amostras foram imersas em tampão fosfato pH 7,4 durante as medidas.

b) Temperatura de desnaturação (Td): foi realizada em membranas como descrito para Ts, em um equipamento Du Pont DSC-910 com uma velocidade de aquecimento de 5°C/min, no intervalo de temperatura entre 20 e 120°C.

- *Titulação potenciométrica*: soluções de colágeno neutro e colágeno alcalino foram dialisadas exaustivamente contra uma solução de HCl até que a medida de condutividade do dialisado fosse

constante e igual àquela obtida para a solução de HCl 0,010 mol/L utilizada para a diálise. As concentrações finais das soluções de colágeno determinadas via hidroxiprolina foram respectivamente 0,4 e 0,5% m/m. Alíquotas de 10 ml destas soluções foram tituladas entre pH 2,0 e 7,0 sob constante borbulhamento de nitrogênio, por meio de um autotitulado da Radelkis, Mod. OH-407, com solução de NaOH 0,049 N. Cálculos de mili-equivalentes consumidos pela proteína no intervalo estudado levaram em consideração a titulação de um volume igual de HCl 0,010 N. Os resultados finais foram expressos em número de grupos ionizáveis/mol de tropocolágeno

Microscopia Eletrônica

a) Microscopia eletrônica de transmissão: as avaliações de microscopia de transmissão eletrônica foram realizadas em um equipamento Zeiss Mod. PQ 2300, em peças de PB bovino nativas e peças tratadas como descrito para a obtenção do colágeno aniônico e em seguida coradas positivamente com acetato de uranila e fosfotungstato de amônia de acordo com técnicas convencionais¹⁴.

b) Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias de MEV foram obtidas de membranas pericárdio bovino preparadas com o mesmo procedimento alcalino utilizado para extração de colágeno. As amostras foram então recobertas com uma camada de ouro de cerca de 30nm e levadas ao microscópio eletrônico de varredura da marca ZEISS modelo DSM 960, operado com um feixe de elétrons primário de 20KV.

Resultados e Discussão

Os resultados de titulação potenciométrica de soluções de colágeno nativo e aniônico (Tabela 1) mostraram um número de equivalentes/300 kDa (massa molar do tropocolágeno) de 255 e 361mEq/mol. O valor teórico para o colágeno nativo, calculado com base no conteúdo de resíduos de ácidos aspártico (Asp) e glutâmico (Glu), presentes na estrutura primária das cadeias α_1 e α_2 é de 231 mEq/mol de tropocolágeno¹⁵, enquanto para o colágeno aniônico, assumindo hidrólise completa dos grupos β e γ carboxâmidas dos resíduos de Asn e Gln é de 351 mEq/mol de tropocolágeno. Nestas determinações não estão incluídas as contribuições

Tabela 1. Número de equivalentes de resíduos de ácidos aspártico e glutâmico determinados por titulação potenciométrica em amostras de colágeno nativo e colágeno aniônico, obtido por hidrólise seletiva de resíduos de asparagina e glutamina

Número de resíduos Tituláveis			
Colágeno Nativo		Colágeno Aniônico	
Teórico ^{a,b}	Experimental	Teórico ^{a,b}	Experimental
231	255	351	361

a - calculados a partir do número de resíduos de Asp e Glu que foram determinados a partir da estrutura primária da molécula de tropocolágeno; b - inclui número de equivalentes de resíduos de Histidina tituláveis no intervalo de pH entre 2,0 e 7,0.

da titulação da histidina, num total de 12/ mol de tropocolágeno, que tem uma contribuição efetiva para o total de mEq calculados, no intervalo de pH entre 2,0 e 7,0.

Assumindo-se um valor de pK_a médio de 6,5¹⁶ para os grupos imidazólicos, até o valor limite da titulação, pH 7,0, cerca de 75% destes grupos são titulados, fazendo com que sua contribuição para o número total de miliequivalentes no intervalo entre pH 2,0 e 7,0 corresponda a 9 grupos imidazólicos tituláveis. Corrigindo com este valor, o número total de mili-equivalentes determinados experimentalmente para colágeno nativo e aniônico (Tabela 1), o número de grupos carboxílicos tituláveis para colágeno nativo e aniônico passa a ser 246 e 352, respectivamente, mais próximos dos valores teóricos esperados.

As concentrações de Gly, Pro e Hypro (Tabela 2) mostraram, como esperado para matrizes de colágeno do tipo I, valores médios de 25,6; 15,2 e 13,3 g/100g de proteína respectivamente¹⁷. A eletroforese em gel de poliacrilamida para uma preparação solúvel de colágeno aniônico, mostrou a presença de duas bandas principais, com massas molares de cerca de 104 e 110 kDa, correspondentes respectivamente às cadeias α_1 e α_2 . Uma banda de menor intensidade e de massa molar em torno de 159 kDa também foi observada e provavelmente corresponde às cadeias β , isto é, duas cadeias α quimicamente ligadas. Este perfil foi similar àquele do colágeno padrão, cujos pesos moleculares determinados foram de 98, 104 e 142 kDa para as cadeias α_1 , α_2 e β respectivamente. A relação das áreas das cadeias α_1 e α_2 em colágeno aniônico, determinada com auxílio de medidas densitométricas em géis

corados com Comassie Blue R. foi de 1,9, para um valor teórico esperado para colágeno do tipo I de 2,0.¹⁸

A análise dos espectros de absorção no infravermelho (Tabela 2) mostrou que a relação entre valores de absorbância em 1235 cm⁻¹ (vibrações no plano para a amida III) e 1450 cm⁻¹ (o empacotamento do anel pirrolidínico) foi de 1,1, sugerindo que as membranas confeccionadas com colágeno aniônico são caracterizadas pela presença da estrutura de tripla hélice do tropocolágeno^{13,19}, indicando que processo do tratamento alcalino para a hidrólise seletiva dos grupos carboxamidas de Asn e Gln não desnatura o colágeno pois membranas confeccionadas com colágeno desnaturado (gelatina) preparadas nas mesmas condições apresentam uma relação de absorbâncias 1235/1450 cm⁻¹ de cerca de 0,50¹³ enquanto que no colágeno estruturado esta relação é próxima da unidade.

A manutenção da estrutura secundária da tripla hélice do tropocolágeno da matriz colagênica foi confirmada também pelos resultados de temperatura de desnaturação (Td) e temperatura de encolhimento (Ts) (Tabela 2). Matrizes de colágeno desnaturado não apresentam qualquer transição térmica no intervalo estudado. As diferenças observadas nos valores de Ts e Td determinadas para colágeno aniônico e nativo em pH 7,40 e 3,50 também foram típicas de estruturas colagênicas, isto é, os valores de Ts e Td determinados a pH 7,40 foram sempre superiores àqueles determinados a pH 3,50. Esta diminuição se deve ao fato de que enquanto a pH inferiores a 4,25 em matrizes colagênicas predominam a estrutura denominada de "swollen collagen", uma estrutura desordenada das moléculas de tropocolágeno, mas que ainda mantém sua estrutura secundária, a pH 7,40 predominam as estruturas fibrilares²⁰, que são obtidas *in vitro* devido à capaci-

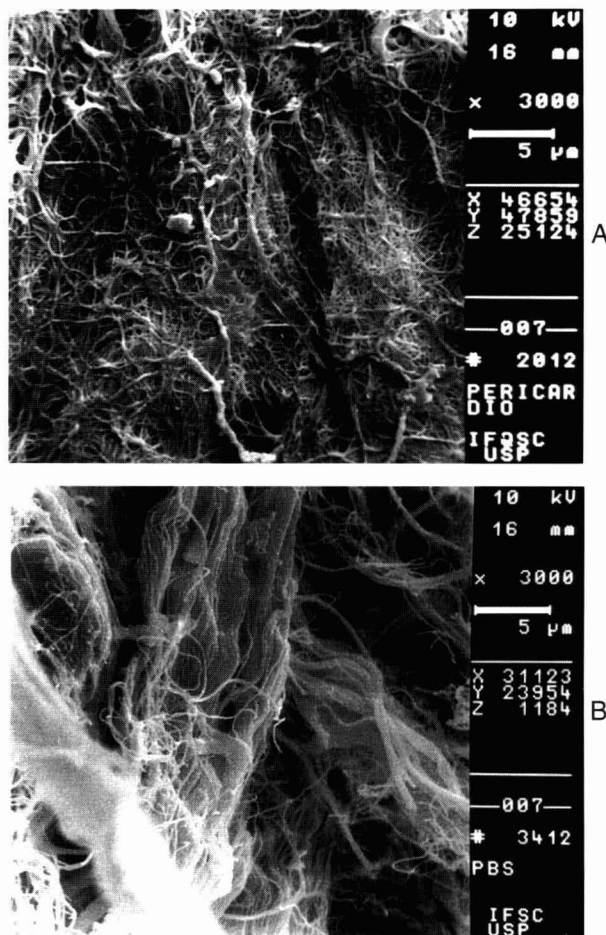


Figura 3. Micrografia de microscopia eletrônica de varredura para pericárdio bovino: (a) bovino nativo; (b) submetido a processo de hidrólise seletiva de grupos carboxamidas de asparagina e glutamina.

dade de reconstituição do colágeno solúvel. Os menores valores encontrados para a estabilidade térmica do colágeno aniônico podem ser explicados pelo menor índice de ligações cruzadas da preparação induzidas, pelo elevado pH a que são submetidas à hidrólise seletiva dos resíduos de Asn e Gln.

Tabela 2. Resultados comparativos de análise de aminoácidos, estabilidade térmica, e infravermelho para colágeno nativo e aniônico.

Estabilidade Térmica (°C)													
pH 3,5							pH 7,4						
Análise de Am.ac. ^a			Nativo		Aniônico		Nativo		Aniônico		Relação		
Gly	Pro	Hypro	Ts	Td	Ts	Td	Ts	Td	Ts	Td	α_1/α_2^b	1235/1450 cm ⁻¹	
26,6	14,4	12,8	48,5	-	47,5	46,5	54,5	-	51,8	52,5	1,9	1,06 ^c	

a - expresso em gramas de aminoácidos/ 100 gramas de proteína;

b - relação de áreas determinadas por densitometria dos géis de poliacrilamida após coloração do colágeno com Comassie Blue R.;

c - obtida a partir das absorbâncias no IR em membranas preparadas em pH 3,50.

Tabela 3. Distâncias (Å) das bandas c_1 a c_2 determinadas em colágeno nativo e aniônico, pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão após fixação negativa com fosfotungstato de amônia e acetato de uranila.

	Distância das bandas a partir de c_1 (Å) ^a								
	b_2	b_1	e_2	e_1	d	c_3	c_2	Overlap	Gap
Colágeno Nativo	68 (74) ^b	142 (211)	353 (61)	414 (94)	508 (48)	556 (49)	605	270	335
Colágeno Nativo Reconstituído	69 (69)	138 (236)	374 (49)	423 (83)	506 (55)	561 (49)	610	266	345
Colágeno Aniônico	49 (53)	110 (149)	259 (55)	311 (67)	378 (30)	408 (49)	457	179	285

a - Não estão incluídas distâncias inter-bandas entre a_4 e a_1 por falta de resolução das micrografias;

b - Número entre parênteses: distância inter-bandas subsequentes.

Resultados de microscopia eletrônica de varredura de amostras de pericárdio bovino (Figura 3a) e de pericárdio tratado nas mesmas condições empregadas para obtenção do colágeno aniônico na sua forma solúvel (Figura 3b) mostraram que a organização microfibrilar também é preservada após o tratamento alcalino de hidrólise seletiva dos grupos carboxamidas da matriz colagênica.

Entretanto, apesar dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão de amostras coradas positivamente com acetato de uranila e fosfotungstato de

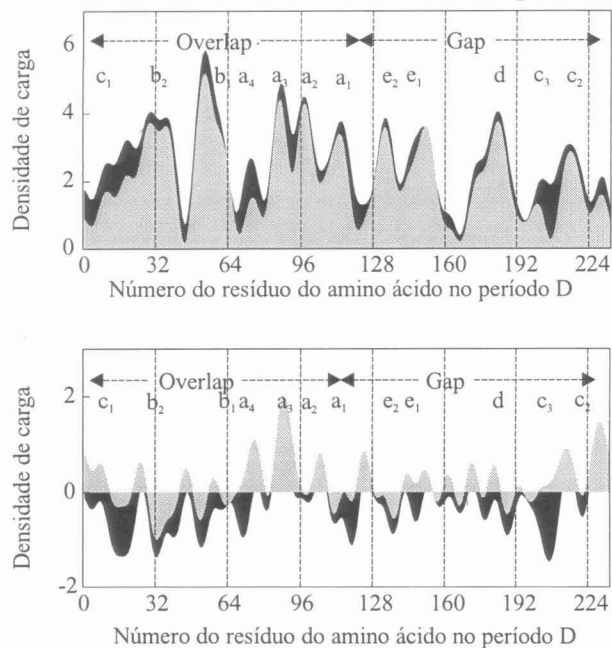
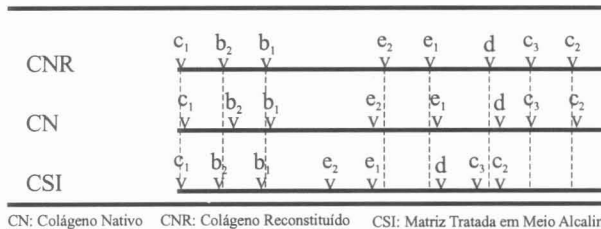


Figura 4. Perfil para distribuição (a) e resultante de carga (b) para um período D da estrutura microfibrilar de colágeno nativo e aniônico, assumindo neste último, a hidrólise completa dos resíduos de asparagina e glutamina.



CN: Colágeno Nativo CNR: Colágeno Reconstituído CSI: Matriz Tratada em Meio Alcalino

Figura 5. Variação das distâncias sub-periódicas da estrutura microfibrilar observada para colágeno submetido à hidrólise seletiva de resíduos de asparagina e glutamina.

amônio terem mostrado que aparentemente, a nível da morfologia padrão da microfibrila, não ocorreram mudanças significativas, a avaliação das distâncias inter-bandas características do período D, mostrou que estas foram alteradas em função do tratamento alcalino D (Tabela 3).

Enquanto para matrizes colagênicas não tratadas o valor determinado para o período D foi de 610 Å, para matrizes tratadas em meio alcalino esta distância foi de 537 Å e ocorreu em função de uma diminuição generalizada nas distâncias inter-bandas, principalmente aquelas distâncias correspondentes ao intervalo entre as bandas b_1 e e_2 , situadas na zona limite entre Overlap e Gap. O valor do período D, determinado neste trabalho para a matriz de colágeno nativo, está de acordo com os resultados descritos na literatura^{8,17} cujos valores variam entre 630 e 680 Å dependendo da técnica utilizada.

As reduções observadas para as distâncias inter-bandas do período D em matrizes tratadas em meio alcalino são provavelmente resultante do aumento de interações eletrostáticas a nível da estrutura macromolecular da microfibrila, principalmente levando-se em consideração que a distribuição dos resíduos de asparagina e glutamina ao longo do período D e, principalmente ao longo das distâncias inter-bandas, é coincidente com aquela determinada para as cargas positivas e negativas observadas para colágeno nativo (Figura 4). Isto pode ser visto para o intervalo inter-bandas entre b_2 e e_1 (Figura 5) onde foram observados os menores encurtamentos nas distâncias em relação à matriz nativa e também um aumento mais significativo na distribuição de cargas negativas provenientes da reação de hidrólise dos resíduos de Asn e Gln

Como consequência do incremento da densidade de carga negativa em função do tratamento alcalino, em relação a matrizes nativas que são neutras a pH fisiológico, estas serão carregadas negativamente (figura 4b), com um aumento efetivo de carga de cerca de 120 resíduos.

Conclusão

Os resultados acima mostram a viabilidade da obtenção de colágeno aniônico por hidrólise seletiva dos grupos carboxâmidos de asparagina e glutamina presentes em matrizes colagênicas, sem alterações significativas tanto da estrutura secundária da proteína, que é o tropocolágeno, como de sua organização microfibrilar. Grandes alterações, no entanto, estão associadas às características superficiais deste novo tipo de matriz colágeno, visto que diferentemente do colágeno nativo, em condições fisiológicas apresentará uma superfície negativa; característica esta importante dentro da conceituação de biomateriais modernos, principalmente na área cardiovascular e como materiais suporte ou estimuladores de crescimento do tecido ósseo. Estudos preliminares de propriedades elétricas mostraram que os coeficientes piroelétricos de membranas são cerca de 100 vezes superiores àqueles determinados para PVDF polarizado²¹. Como biomaterial, sua eficiência vem sendo demonstrada na aplicação na técnica de regeneração tecidual dirigida para reconstrução de ligamentos periodontais²².

Agradecimentos

Os autores agradecem a Ezer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica. Este trabalho foi financiado pela FNM/PADCT/CNPq, contratos nº 620.228/91 e 620001/96-8 e o projeto CYTED "Obtención y caracterización de biomateriales de compuestos con carga de hidróxi-apatitos", desenvolvido em colaboração com o Instituto de Ciencias de Materiales de Barcelona, dentro do programa "Programa Iberoamericano de Ciencias e Tecnología para el Desarrollo".

Referências bibliográficas

1. Gould, B., "Treatise on Collagen: The Biology of Collagen", London, Academic Press, v. 2 (1968).
2. Hirt, S.W., Aki, M., Demertzis, S., Siclari, F., Haverich, A. Borst, H.G., - J. Vasc. Surg., 17, 538-545 (1993).
3. Sissen, B.F., Walker, J., Orgel, M., - J. of Cell. Biochem., 52, 404-409 (1993).
4. Scherrer, S.A., "Viscoelastic solution for ophthalmic use and methods of preparation", EP0214853 (1986).
5. Viidik, A., Vuust, J. - "Biology of Collagen", London, Academic Press, v. 1 (1980).
6. Chapman, J.A., Tzaphlidou, M., Meek, K.M., Kadler, K.E., - Electron Microsc. Rev., 3, 143-182 (1990).
7. Brighon, C.T. "Symposium on Electrically Induced Osteogenesis", Pennsylvania, W.B. Saunders Company, v. 15, (1984).
8. Nimni, M. E., "Collagen", Florida, CRC Press, v. 1 (1988).
9. Goissis, G., Plepis, A.M.G. e Rocha, J.L. "Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino", BR PI 9.405.043-0 (1994).
10. Stegemann, H. H., Stalder, K. - Clin. Chim. Acta, 18, 267-273 (1967).
11. Moore, S., Stein, W. H. - Meth. Enzymol., 6, 819-821, (1963).
12. Laemmli, U. K., - Nature, 227, 680-684 (1970).
13. Silvester, M. F., Yannas, I. V. - Thromb. Res., 55, 135-148 (1989).
14. Hayat, M.A., "Positive staining for Electron Microscopy", Van Nostrand Reinhold, New York (1975).
15. Neurath, H., Hill, R. L., "The Proteins", New York, Academic Press, v. 4 (1979).
16. Mahler, H.R., Cordes, E.H., "Biological Chemistry", New York, Harper and Row Publishers (1996).
17. Ramachandran, G. N., "Treatise on Collagen: The Chemistry of Collagen", London, Academic Press, v. 1 (1967).
18. Huc, A. - J. Am. Leather Chem. Assoc., 80, 195-203 (1985).
19. Renugopalakrishnan, V., Chandrakasan, G., Moore, S., Hutson, T.B., Berney, C.V., Bhatnagar, R.S., - Macromolecules, 22, 4121-4124 (1989).
20. Flandin, F., Buffevant, C., Herbage, D. - Biochim. Biophys. Acta, 791, 205-213 (1984).
21. Plepis, A.M.G., Goissis, G., Das Gupta, D.K. - "Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen". Aceito para publicação no Polymer Engineering and Science, julho 1996.
22. Rego, D.M., Marcantonio Jr., E., Lia, R.C.C., Goissis, G. - J. Dent. Res., 73, 764 (1994).