

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES HEMOSTÁTICAS À BASE
DE COLÁGENO

CLAUDIO FERNANDES GARCIA

São Carlos
2017

Claudio Fernandes Garcia

Desenvolvimento de matrizes hemostáticas à base de colágeno

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2017

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai, que me deram apoio e suporte para poder cursar o curso de Química pela Universidade de São Paulo e me ajudaram nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, incentivo, oportunidade e aprendizado durante a realização deste trabalho.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pelo apoio, incentivo, dedicação e momentos de descontração durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcio de Paula, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos do Grupo de Bioquímica e Biomateriais, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a elaboração desse trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida.

Imagine todas as pessoas
Partilhando todo o mundo
...
E o mundo viverá como um só

John Lennon

Resumo

Biomateriais absorvíveis tópicos podem ser utilizados para reter o sangramento, iniciando a agregação de plaquetas, permitindo a coagulação sanguínea e reduzindo a perda de sangue. O colágeno é a proteína mais abundante encontrada no corpo humano, sendo responsável pelas características físicas dos tecidos que formam a pele, tendões, vasos sanguíneos, intestinos, ossos e cartilagens. Além de não ser carcinogênico e citotóxico, o colágeno possui propriedades hemostáticas, capacidade de estimular e orientar a formação de tecidos e biodegradabilidade, tendo grande representatividade como biomaterial. Esse trabalho tem como objetivo a obtenção de matrizes de colágeno com e sem a presença de extrato de semente de uva, com potencial de uso como agente hemostático. O principal produto do extrato é a proantocianidina que apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, bactericidas, anti-inflamatórias, antitumorais e antialérgicas, além de ser um possível agente de reticulação do colágeno. Para a obtenção dessas matrizes, tendão bovino foi hidrolisado em meio básico. Uma parte desse tendão foi liofilizada, processada e hidratada para a obtenção de uma pasta de tendão, e a outra parte foi hidrolisada em ácido acético pH 3,5 para a obtenção de gel de colágeno. As matrizes foram feitas misturando as duas partes na proporção 2:1, respectivamente, e adicionando-se extrato em concentrações distintas, formando assim as matrizes TC (sem extrato), TCP003 (com 0,03% de extrato) e TCP05 (com 0,5% de extrato). Estas matrizes foram neutralizadas e caracterizadas por DSC (calorimetria exploratória diferencial), por cinética de absorção em tampão fosfato salino, por MEV (microscopia eletrônica de varredura) e por estabilidade biológica *in vitro*. Por DSC, observou-se que a matriz TCP05 teve um aumento de aproximadamente 14°C em sua temperatura de desnaturação quando comparada as demais, indicando que nessa concentração, a proantocianidina atua como agente reticulante. As fotomicrografias mostram matrizes com poros desorganizados na superfície, e canais internos heterogêneos. Os ensaios de absorção em tampão PBS mostram que as matrizes com extrato tiveram uma maior absorção do que a matriz TC. Isso ocorre devido aos grupos hidroxilas da proantocianidina que tornam a matriz mais hidrofílica, sendo que a matriz TCP003 absorveu 2804% e a matriz TCP05 absorveu 2575%, ambas em 120 min. O ensaio de degradação em collagenase indica que, quando maior a concentração de extrato, menor é a porcentagem de degradação nas matrizes. A proantocianidina na matriz TCP003, apesar de não aumentar sua resistência térmica, ela aumenta a resistência à degradação enzimática, indicando que nessa concentração o extrato também atua como reticulante.

Palavras chave: colágeno, reticulação, biomaterial, extrato de semente de uva

Abstract

Topic absorbable biomaterials may be used to stop bleeding initiating the aggregation of platelets, which allows blood coagulation and hence reduces blood loss. Collagen is the most abundant protein in the human body. It is responsible for physical characteristics of the tissues forming skin, tendons, blood vessels, intestine, bones and cartilage. Besides its non-carcinogenic and non-cytotoxic nature, collagen has hemostatic properties, is able to stimulate and orient tissue development and is biodegradable, being a great representative of biomaterials. The present work aims to obtain collagen matrices with and without grape seed extract, with possibility to be used as hemostatic agent. The main component of the extract is proanthocyanidin that shows antioxidant, antimicrobial, bactericidal, anti-inflammatory, antitumoral and antiallergic properties, as well as being a possible collagen crosslinking agent. In order to obtain the matrices, bovine tendon was hydrolyzed in alkaline media. Part of the tendon was freeze-dried, processed and hydrated, generating a tendon paste and the other part was hydrolyzed in acetic acid pH 3.6 to obtain a collagen gel. Matrices were made by mixing these two parts in 2:1 ratio (paste:gel). Grape seed extract was added in different concentrations, resulting in matrices TC (no extract added), TCP003 (0.03% extract added) and TCP05 (0.5% extract added). These were neutralized and characterized by DSC (differential scanning calorimetry), absorption kinetics in phosphate-buffered saline, SEM (scanning electron microscopy) and in vitro biological stability. By DSC, it was observed that TCP05 denaturation temperature raised in approximately 14°C when compared to the other two. This indicates that in this concentration, proanthocyanidin acts as a crosslinking agent. Micrographs showed matrices with disorganized pores on the surface and heterogenic internal canals. The absorption kinetics in PBS showed that matrices with extract added absorbed more than TC matrix. This happens due to hydroxyl groups of proanthocyanidin that turn the matrix more hydrophilic. TCP003 matrix absorbed 2804% and TCP05 matrix absorbed 2575%, both in 120 minutes. Collagenase assay indicate that the higher the extract concentration the lower is the matrix degradation percentage. Proanthocyanidin content in TCP003 did not increased thermal denaturation however, it increased the matrix resistance to enzymatic degradation, showing that also in this concentration, the extract acts as a crosslinking agent.

Key-words: collagen, crosslink, biomaterial, grape seed extract

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática a) cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do tropocolágeno; b) tropocolágeno representado pela hélice tripla; c) representação da organização estrutural das moléculas de acordo com o modelo de Smith; d) união de microfibrilas formando uma fibrila.	16
Figura 2: Representação da formação da fibra de colágeno a partir das cadeias de aminoácidos	16
Figura 3 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln. ..	18
Figura 4: Imagem da videira <i>Vitis</i> sp.	19
Figura 5: Representação da estrutura química: a) núcleo flavan-3-ol e b) oligômero proantocianidina	19
Figura 6: Esquema mostrando a possível interação entre o colágeno e a proantocianidina.	21
Figura 7: Fluxograma da preparação das matrizes	25
Figura 8: Inflexão da curva DSC	26
Figura 9: Fotografias digitais das matrizes (A) TC, (B) TCP003 e (C) TCP05	28
Figura 10: Curvas DSC para as matrizes (—) TC; (—) TCP003; (—) TCP05.....	29
Figura 11: Representação do diâmetro de Martin	30
Figura 12: Fotomicrografias da matriz TC (A) superfície com aumento de 500X; (B) superfícies com aumento de 1000X; (C) transversal com aumento de 500X	31
Figura 13: Fotomicrografias da matriz TCP003 (D) superfície com aumento de 500X; (E) superfície com aumento de 1000X; (F) transversal com aumento de 500X.....	32
Figura 14: Fotomicrografias da matriz TCP05 (G) superfície com aumento de 500X; (H) superfície com aumento de 1000X; (I) transversal com aumento de 500X.....	33
Figura 15: Fotografias das matrizes: (A) secas; (B) hidratadas com tampão	34
Figura 16: Percentual de absorção em PBS em função do tempo pelas matrizes: (■) TC, (■) TCP003, (■) TCP05.....	35
Figura 17: Representação da degradação do colágeno pela ação da colagenase. (▲) colagenase livre, (▲) colagenase adsorvida.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipos de agentes hemostáticos formas de ação e efeitos colaterais.....	13
Tabela 2: Temperaturas de desnaturação das matrizes neutras.	29
Tabela 3: Tamanho dos poros das matrizes.....	30
Tabela 4: Porcentagem de absorção de PBS em diferentes tempos.	35
Tabela 5: Porcentagem de degradação enzimática \pm DP.....	36

Lista de Abreviaturas

Asn - Asparagina

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

Gln - Glutamina

ICTAC - Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PBS – Tampão fosfato salino

DP - Desvio padrão

TC – Matriz de colágeno

TCP003 – Matriz de colágeno + 0,03% de extrato de semente de uva

TCP05 - Matriz de colágeno + 0,5% de extrato de semente de uva

Td – Temperatura de desnaturação

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Biomateriais	14
1.2 Colágeno	15
1.3 Extrato da semente de uva	18
1.4 Reticulação	20
2 OBJETIVO	22
3 EXPERIMENTAL	23
3.1 Materiais	23
3.2 Obtenção do colágeno	23
3.3 Preparação do gel de colágeno	23
3.3.1 Determinação da concentração do gel de colágeno	23
3.4 Preparação do colágeno em flocos	24
3.5 Preparação das matrizes	24
3.6 Caracterização	25
3.6.1 Análise Térmica	25
3.6.1.1 DSC (calorimetria exploratória diferencial)	25
3.6.2 MEV (microscopia eletrônica de varredura).....	26
3.6.3 Cinética de absorção em PBS.....	27
3.6.4 Estabilidade biológica <i>in vitro</i> (colagenase)	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Determinação da concentração do gel de colágeno.....	28
4.2 Obtenção das matrizes	28
4.3 DSC (calorimetria exploratória diferencial)	28
4.4 MEV (microscopia eletrônica de varredura).....	29
4.5 Cinética de absorção em PBS	33
4.6 Estabilidade biológica <i>in vitro</i> (colagenase).....	35
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Hemorragia pode ser definida pela perda de sangue em decorrência de um ferimento interno ou externo. Ela pode advir de causas variadas e podem ir desde um pequeno corte até um traumatismo. Quando a hemorragia ocorre, o corpo do paciente começa uma série de mecanismos visando a contenção do sangramento na parede do vaso, o que recebe o nome de hemostasia.

A hemostasia pode ser dividida em primária e secundária. A hemostasia primária é o processo inicial desencadeado pela lesão endotelial (Hess et al, 2008; Sundaram, Keenan, 2010). Imediatamente após a lesão, mecanismos locais produzem vasoconstrição, reduzindo a perda de sangue. A hemostasia secundária é o processo de coagulação, na qual a trombina converte uma proteína solúvel do plasma, denominada fibrinogênio, em um polímero insolúvel chamado de fibrina. Esse processo ocorre graças à exposição de colágeno que estimula a agregação plaquetária na presença do fator de von Willebrand. (Hess et al, 2008; Sundaram, Keenan, 2010).

A contenção da hemorragia tem sido um grande campo de estudos na comunidade cirúrgica mundial. Diversos estudos visam sua contenção a partir de medicamentos sistêmicos, materiais tópicos e ligaduras cirúrgicas (Carvalho et al., 2013; Dorneles et al, 2003).

Agentes hemostáticos absorvíveis tópicos podem ser utilizados para interromper o sangramento e reter exsudados de feridas, já que iniciam a agregação de plaquetas, permitindo a coagulação sanguínea (Tomizawa, 2005). As características que exaltam um agente hemostático e o consideram melhor, dependem de várias considerações como a fácil aplicação e remoção, a antigenicidade, o potencial de reabsorção, a área em que estará sendo empregado e o efeito da reação tecidual (Wagner, 1996; Chvapil, 1983).

Atualmente, diversos agentes hemostáticos (Tabela 1) têm sido desenvolvidos e estão disponíveis para auxiliar os cirurgiões no tratamento de hemorragias. Dentre os diversos materiais utilizados tem-se o colágeno microfibrilar, esponjas de gelatina bovina ou porcina, celulose oxidada, matriz selante de gelatina, trombina, etc (Carvalho et al., 2013; Tomizawa, 2005; Barnard e Millner, 2009). Inúmeros biomateriais com capacidade de formar hidrogéis *in situ* têm sido estudados nessa área. Os hidrogéis são compostos por uma rede tridimensional de polímeros hidrofílicos, podendo aderir a uma superfície de tecido e formar uma barreira física ou selante. Esses apresentam diversas aplicações, como a hemostasia, cicatrização de feridas, apoio de sutura, vedação de tecido e carreamento de drogas (Xie et al., 2013).

Tabela 1: Tipos de agentes hemostáticos formas de ação e efeitos colaterais.

Agente Hemostático	Formas e mecanismo de ação	Efeitos colaterais
Gelatina	Derivado porcino em pó ou esponja estéril, capaz de absorver mais de 45x o seu peso, fornecendo uma matriz para a cascata de coagulação, além de proporcionar uma barreira física.	Pode interferir na cicatrização de bordas de feridas. Pode facilitar o crescimento bacteriano conduzindo a infecção ou a reações de corpo estranho. O aumento de tamanho pode levar à compressão de estruturas adjacentes como nervos. Quando combinado com trombina pode levar a reações alérgicas.
Hidrogel de polietilenoglicol	Líquido composto de dois polímeros de PEG que polimerizam e reticulam no tecido. Aumenta a adesão de plaquetas, proporcionando hemostasia rápida.	Intumesce até 4x seu tamanho pode causar compressão de estruturas adjacentes.
Esferas microporosas de polissacarídeos	Pó branco 100% vegetal. Formado por ligação cruzada do amido da planta. Desidrata o sangue, concentrando plaquetas e proteínas promovendo a adesão, além de fazer uma barreira física no tecido.	Intumescimento imediato potencializa a compressão de estruturas adjacentes. Uso em diabéticos deve ser cauteloso, pois pode aumentar a carga de glicose.
Colágeno microfibrilar	Colágeno bovino em forma de pó, folhas ou esponjas. O colágeno promove a agregação de plaquetas e a cascata da coagulação.	Os efeitos colaterais são raros, mas podem ocorrer reações alérgicas de corpo estranho.
Celulose	Celulose oxidada em forma de folhas, gaze ou tiras menores. Atua tamponando os vasos e proporcionando uma malha para a cascata de coagulação.	Pode causar reações granulomatosas e deve ser usado com cuidado em espaços fechados, devido ao intumescimento pode causar compressão de estruturas adjacentes.
Trombina	Pode ser derivado de trombina bovina ou de trombina recombinante humana e vem na forma de pó ou solução. Promove cascata de coagulação através da conversão de fibrinogênio em fibrina.	Trombina bovina tem mostrado provocar coagulopatia semanas após a sua utilização. A trombina humana purificada, ainda pode transmitir vírus. Não deve ser usado em pacientes com baixos níveis de fibrinogênio.
Selante de Fibrina	Pode ser formado a partir de plasma autólogo ou reunido de doadores ou ainda de plasma bovino. Vem em forma de aerossol podendo ser pulverizada diretamente no local. Vem em uma seringa com dois compartimentos que quando combinados ativam a cascata de	Selante de plasma reunido de doadores e selantes mais velhos contendo aprotinina derivada de bovino aumentam o potencial para reações de hipersensibilidade e transmissão de doenças infecciosas.

coagulação.

Colágeno tem grande representatividade como biomaterial e sua extração a partir de constituintes animais tem se tornado crescente (Albuquerque-Júnior et al, 2009; Sionkowska et al, 2006). O colágeno e seus derivados são quimicamente atrativos na cicatrização de feridas, apresentando boas propriedades biológicas e hemostáticas. Além disso, apresentam características de polímero biocompatível, atóxico, imunogênico e biodegradável. Entretanto, materiais à base de colágeno mostram-se com pobres propriedades mecânicas, porém suas moléculas são suscetíveis de modificações, podendo torná-lo mais adaptável a várias aplicações clínicas (Fathima et al., 2011).

O colágeno e seus derivados podem ser submetidos a reações de reticulação, aumentando a resistência à degradação *in vitro* e alterando suas propriedades mecânicas (Chen et al. 2013). As proantocianidinas são compostos polifenólicos pertencentes à categoria conhecida como taninos condensados que podem ser utilizados como agentes de reticulação graças aos grupos hidroxila presentes em sua estrutura, dando estabilidade a ligações de hidrogênio e assim gerando estruturas de colágeno com menor biodegradabilidade (Han, 2013).

1.1 Biomateriais

Biomateriais são qualquer tipo de material com a função de interagir ou estabelecer interface com um sistema biológico (ISO 10993-1:2009). Eles podem ser naturais, sintéticos ou naturais modificados (também conhecidos como artificiais) e precisam apresentar características como biocompatibilidade e biofuncionalidade, que corresponde à habilidade do material de induzir uma resposta apropriada a uma aplicação específica, quando este está em contato com um organismo (VERT, 2007).

Os biomateriais naturais mais conhecidos são os poliméricos, como o colágeno, gelatina, quitosana, celulose, dentre outros. Entre os sintéticos, encontram-se os metais e ligas, polímeros sintéticos, cerâmicas e compósitos (SCHECHTMAN; ZAVAGLIA, 2000). Os diversos tipos de biomateriais precisam ter comportamentos distintos de acordo com cada tipo de interação tecidual, e com isso, podem ser classificados em bioinertes, bioativos e biorreabsorvíveis.

O uso de biomateriais é amplo, sendo utilizados em próteses ortopédicas e oculares, curativos de reparação tecidual, cirurgias cardiovasculares e sistemas de liberação de fármacos (RATNER; BRYANT, 2004).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido realizadas na área da regeneração tecidual visando se obter biomateriais que atuem como suporte e

preenchem temporariamente a região lesada, até que a regeneração tecidual esteja completa, ou ainda estimule e direcione o processo regenerativo. O colágeno tem grande destaque como biomaterial por apresentar biocompatibilidade, baixa toxicidade e capacidade de ser formulado em diversas formas, mostrando-se promissor no uso como curativos para cicatrização e regeneração tecidual (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

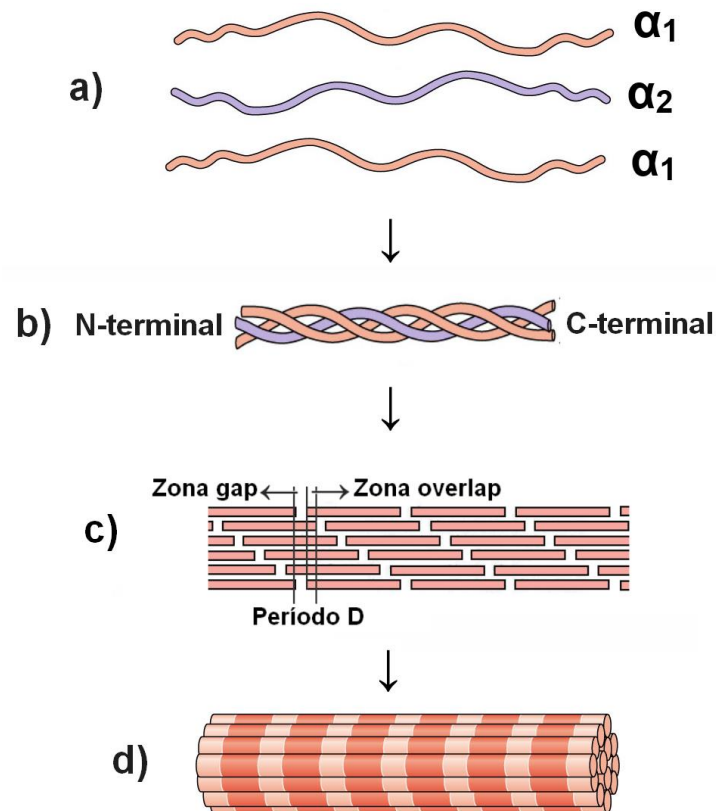
1.2 Colágeno

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no corpo humano, correspondendo a 30% das proteínas totais. Esta proteína é responsável pelas principais características físicas dos tecidos que formam pele, tendões, vasos sanguíneos, intestino grosso e delgado, ossos, cartilagens e dentes. Atualmente, existem em torno de 29 tipos de colágeno conhecidos, sendo o colágeno tipo I o mais abundante. Esses tipos podem ser diferenciados por suas estruturas primárias, definida pela ordem dos resíduos de aminoácidos que a formam (Yu et al, 2015). A estrutura primária do colágeno tipo I é constituída por duas cadeias polipeptídicas iguais denominadas $\alpha 1$ e uma outra cadeia polipeptídica denominada $\alpha 2$ (Figura 1 a). A $\alpha 1$ contém 1055 resíduos de aminoácidos enquanto a $\alpha 2$ apresenta 1029 resíduos, sendo esses resíduos formados em grande parte por glicina, prolina e hidroxiprolina. Essa estrutura primária do colágeno tipo I é composta pelo monômero chamado de tropocolágeno

Essas três cadeias se enrolam uma sobre as outras no sentido horário, oposto ao das hélices anti-horárias das cadeias α . A Figura 1 b mostra a estrutura resultante que é denominada de hélice tripla, que só é possível graças as ligações de hidrogênio entre as três cadeias, sendo que a agregação longitudinal entre tropocolágeno formam as microfibrilas, que quando agregadas lateralmente com outras microfibrilas formam as fibrilas e depois a fibra de colágeno, como mostra a Figura 2 (Okuyama, 2008).

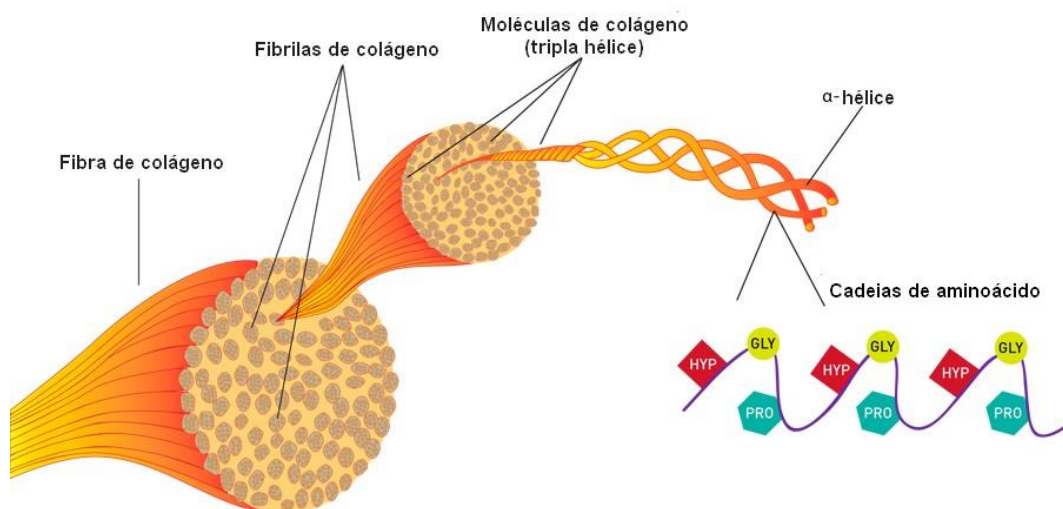
O modelo mais aceito para se explicar o modo em que o tropocolágeno se organiza em microfibrilas foi proposto por Smith (Yu et al, 2015; Shoulders, Raines, 2009) no qual as moléculas de tropocolágeno apresentam uma periodicidade denominada **D**. Essa periodicidade é originada quando cadeias de tropocolágeno encontram-se interagindo em justaposição paralela, sendo que uma cadeia se apresenta deslocada a um quarto de seu comprimento da outra.

Figura 1: Representação esquemática **a)** cadeias α_1 e α_2 do tropocolágeno; **b)** tropocolágeno representado pela hélice tripla; **c)** representação da organização estrutural das moléculas de acordo com o modelo de Smith; **d)** união de microfibrilas formando uma fibrila.



Fonte: Autoria própria

Figura 2: Representação da formação da fibra de colágeno a partir das cadeias de aminoácidos



Fonte: (Adaptado de Proto-Col World 2014)

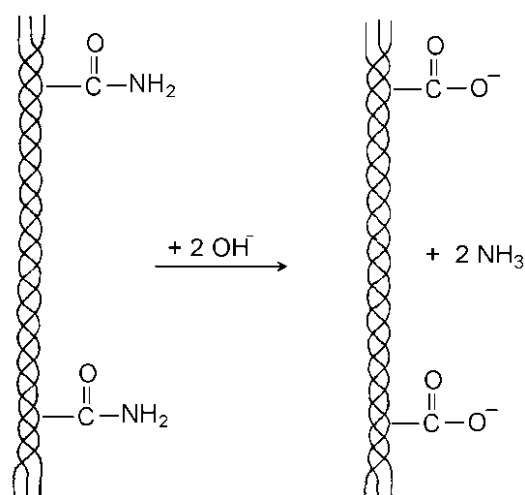
No caso, essa agregação ocorre entre cinco cadeias paralelas umas às outras, com deslocamento de um quarto cada, denominando esse modelo como 'quarto alternado pentafibrilar'. Cada período **D** é composto por duas zonas distintas, uma contendo mais moléculas na seção transversal que a outra. A zona com cinco moléculas de tropocolágeno é denominada de zona "Overlap", e a zona onde há quatro moléculas é denominada de zona "Gap" como mostrado na Figura 1 c. Na Figura 1 d, observa-se a agregação lateral e longitudinal dessas cinco cadeias paralelas, formando a microfibrila.

O colágeno, além de não ser carcinogênico e não apresentar citotoxicidade e nem antigenicidade, possui propriedades hemostáticas, capacidade de estimular e orientar a formação de tecidos, biodegradabilidade e capacidade de ser absorvido pelo organismo. Também é passível de ser formulado em diferentes formas, como filmes, membranas, hidrogéis e esponjas (Nair et al., 2010).

Essa proteína pode ser utilizada na sua forma nativa de tecido conjuntivo ou pode ser modificada quimicamente por esterificação, acilação e desaminação dos grupos ϵ -amino da lisina ou proteção de grupos guanidino dos resíduos de arginina, para dar origem a materiais biocompatíveis e com propriedades físicas bastante diferenciadas daquelas do colágeno nativo. Os materiais resultantes podem ser matrizes colagênicas carregadas positiva ou negativamente.

No colágeno do tipo I, as fibras se formam em pH próximo de 7,0, ocasionando máxima interação eletrostática entre as unidades de tropocolágeno e assim, tornando a estrutura com cargas neutras.

Uma modificação química que pode ser realizada com o colágeno presente em tecidos é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) (Figura 3) presentes nas moléculas de colágeno, o que conduz a um aumento de até 134 cargas negativas por molécula (Bet et al., 2001). Esta modificação permite a obtenção de matrizes de colágeno carregadas negativamente a pH 7,4 com alta biocompatibilidade e com ausência quase completa de resposta inflamatória crônica, como mostrado em experimentos em subcutâneo (Goissis et al., 2000) e tibia de rato (Rocha et al., 2002), ainda que introduza algumas alterações na estrutura básica da molécula de colágeno (Forti et al., 2006).

Figura 3 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Fonte: (Giglioti, 2005)

A adição de cargas sobre estas matrizes modifica sua energia de superfície e suas propriedades estruturais, que estão intimamente relacionadas com a adsorção de proteínas, fatores de crescimento, fatores de coagulação já que a via intrínseca é desencadeada pelo fator de coagulação XII ativado quando do contato com substância carregada negativamente.

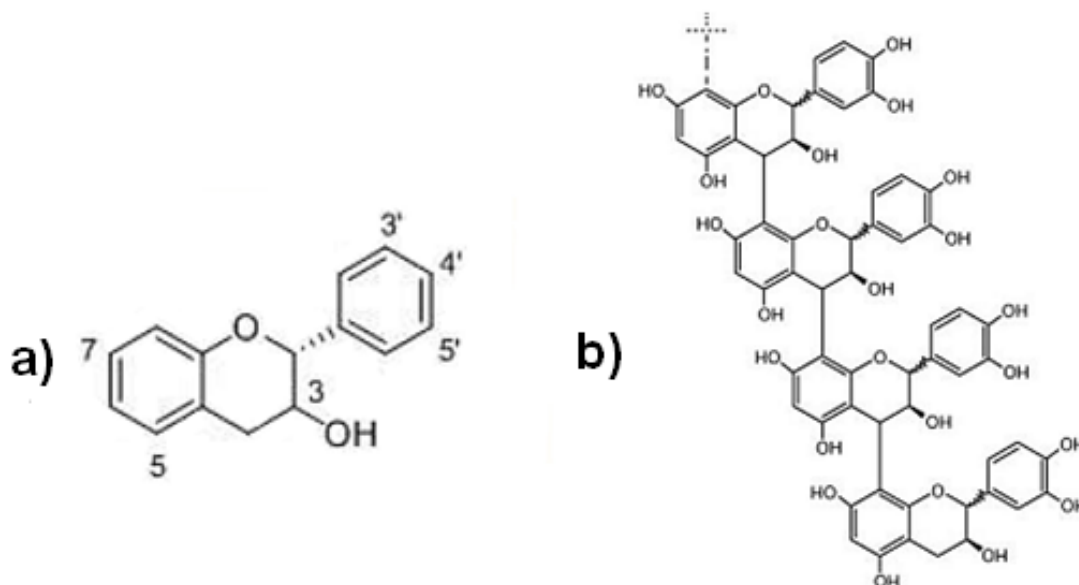
1.3 Extrato da semente de uva

A uva é uma fruta obtida da Videira (*Vitis* sp.) (Figura 4), uma trepadeira de caule espesso e resistente, também conhecida como parreira ou vinha e podendo ser encontrada principalmente em regiões de clima temperado. No Brasil, a produção de uva é diferenciada pela região do plantio, sendo que no sul do país, a viticultura é direcionada para a produção de vinhos e sucos, e em outras regiões como no interior do sudeste, centro-oeste e até mesmo no nordeste, a viticultura é feita para a distribuição e exportação de uvas, sendo que a produção total de uva no Brasil chegou a aproximadamente 1,5 milhões de toneladas em 2015 (Mello, 2016).

Figura 4: Imagem da videira *Vitis* sp.

Fonte: EMBRAPA, 2014

O extrato de semente de uva é um subproduto da produção de vinhos e espumantes, apresentando como produtos os flavonóis, ácidos fenólicos, antocianinas, catequinas e proantocianidinas. Dentre esses, o principal produto é a proantocianidina, um oligômero cujo monômero é a flavan-3-ol (Figura 5). A proantocianidina faz parte de um grupo específico de compostos polifenólicos e pertence à categoria conhecida como taninos condensados.

Figura 5: Representação da estrutura química: a) núcleo flavan-3-ol e b) oligômero proantocianidina

Fonte: (Locilento, 2012)

A proantocianidina pode ser separada em diversas classes em decorrência das hidroxilações (ou substituições) na molécula de flavan-3-ol (SUN; SPRANGER, 2005). Suas estruturas são variadas e não dependem apenas do tipo do núcleo flavan-3-ol, mas também do grau de polimerização, tipo de radical substituído e a posição onde a substituição ocorre.

O extrato de semente de uva apresenta capacidade de eliminação de radicais livres, tendo capacidade antioxidante superior a outros oxidantes como a vitamina C, vitamina E, β -caroteno. Além disso, a proantocianidina apresenta diversas propriedades farmacológicas e biológicas, sendo: cardioprotetora, antitumoral, bactericida e anti-inflamatória (CHO *et al.*, 2009).

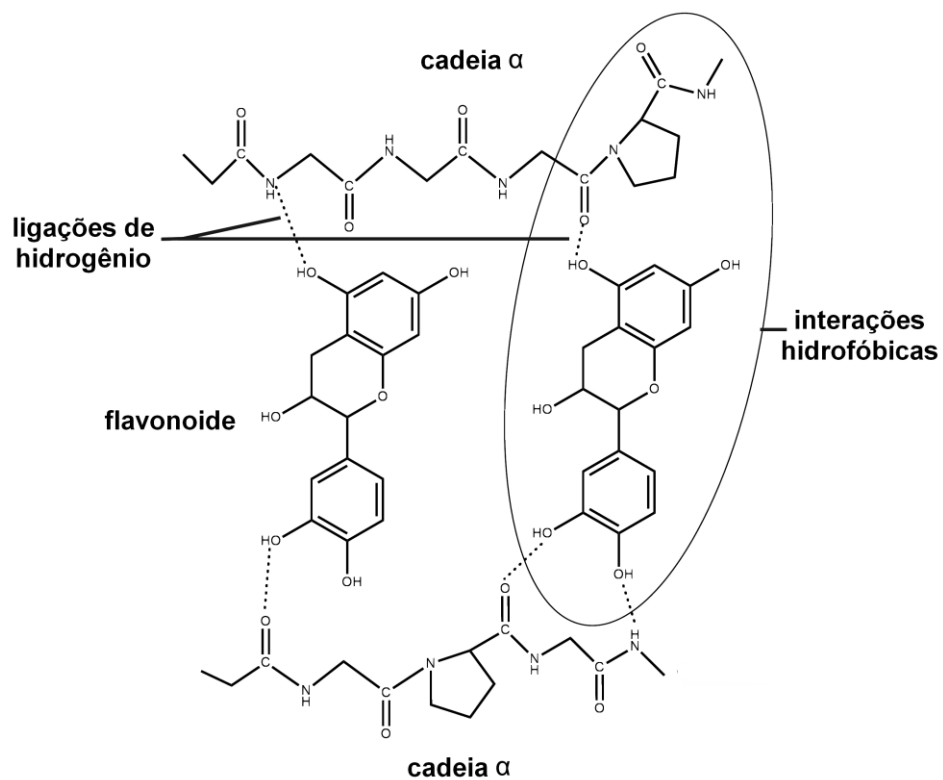
1.4 Reticulação

As técnicas químicas utilizadas na reticulação do colágeno são diversificadas e utilizam tipicamente agentes químicos minimamente bifuncionais para fazer o heterocruzamento, que interagem com as moléculas de colágeno por meio de grupos funcionais reativos. Os agentes de reticulação mais comuns são os dialdeídos e dentre eles o glutaraldeído que têm sido o mais utilizado e estudado. Outros agentes reticulantes são as carbodiimidas, os diisocianatos, os éteres glicidílicos, a azida e a genipina, um agente de reticulação química derivada de uma fonte vegetal.

O uso de proantocianidinas como agente reticulante, atribui algumas vantagens se comparado com outros agentes como, por exemplo, o glutaraldeído. Han *et al* (2003) verificou que o aumento na temperatura de desnaturação do colágeno com a adição de proantocianidina e glutaraldeído foi semelhante, melhorando significativamente as propriedades material. Mas os resultados de citotoxicidade, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, obtidos pela adição de proantocianidina foram expressivamente melhores se comparados aos do glutaraldeído.

As interações entre as proantocianidinas e o colágeno podem ocorrer de quatro maneiras: interações covalentes, iônicas, hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio ocorrem entre as hidroxilas, presentes nas proantocianidinas, com os grupamentos amida do aminoácido prolina (Figura 6), presentes na constituição da hélice tripla do colágeno, promovendo a estabilidade da interação das proantocianidinas com o colágeno (He *et al.*, 2011).

Figura 6: Esquema mostrando a possível interação entre o colágeno e a proantocianidina.



Fonte: (Adaptado de Carvalho, 2007).

2 OBJETIVO

Preparação e caracterização de matrizes neutras de colágeno, visando a obtenção de um material poroso, com potencialidade de uso como agente hemostático.

Objetivos específicos:

- Desenvolvimento e caracterização de matrizes de colágeno derivado do tendão bovino, com diferentes concentrações de extrato de semente de uva.
- Avaliação do extrato de semente de uva na estabilidade térmica e enzimática do colágeno aniônico.
- Estudo da absorção de PBS pH 7,4, pelas matrizes.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

O tendão bovino foi comprado em casa de carnes local, o extrato de semente de uva foi adquirido em farmácia de manipulação local (req.643528-1) e a collagenase da marca Sigma® (Lot. 42H6838). Todos os demais reagentes e solventes foram de grau PA.

3.2 Obtenção do colágeno

O tendão foi cortado lavado adequadamente com solução de 0,9% de NaCl para remoção de sangue e outros contaminantes. Em seguida, suas partes foram retalhadas em um processador. Posteriormente, passou por hidrólise alcalina (Horn et al., 2009) permanecendo numa solução contendo hidróxidos, cloretos e sulfatos de K^+ , Ca^{2+} e Na^+ por um período de 72 horas. Depois, essa solução de hidróxidos e sais foi removida e o tendão passou por uma solução aquosa com os sais de K^+ , Ca^{2+} e Na^+ .

Após o tratamento nessas soluções, todos os sais foram removidos do tendão através de banhos em soluções de ácido bórico 3%, água desionizada e EDTA 0,3%. Depois passou por diversos banhos com água desionizada até aproximadamente pH 6,0.

3.3 Preparação do gel de colágeno

Uma parte do tendão tratado foi solubilizado em ácido acético pH 3,5 e depois foi homogeneizado para a obtenção do gel de colágeno. Esse gel foi peneirado para se assegurar a uniformidade das fibras de colágeno.

3.3.1 Determinação da concentração do gel de colágeno

A concentração do gel de colágeno foi determinada pesando-se amostras desse gel em formas de teflon®. Depois, essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas em um equipamento da Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK), até a obtenção de uma massa constante. A concentração determinada foi a média aritmética das concentrações das amostras.

3.4 Preparação do colágeno em flocos

A outra parte do tendão tratado foi congelada e liofilizada por tempo determinado. Posteriormente, foi triturado em um liquidificador, para a obtenção de flocos esponjosos.

3.5 Preparação das matrizes

Os flocos de colágeno foram hidratados com água deionizada e colocados em um liquidificador, para a obtenção de uma pasta de colágeno com concentração de 4%.

O gel de colágeno foi diluído para 1%, utilizando-se a solução de ácido acético pH 3,5.

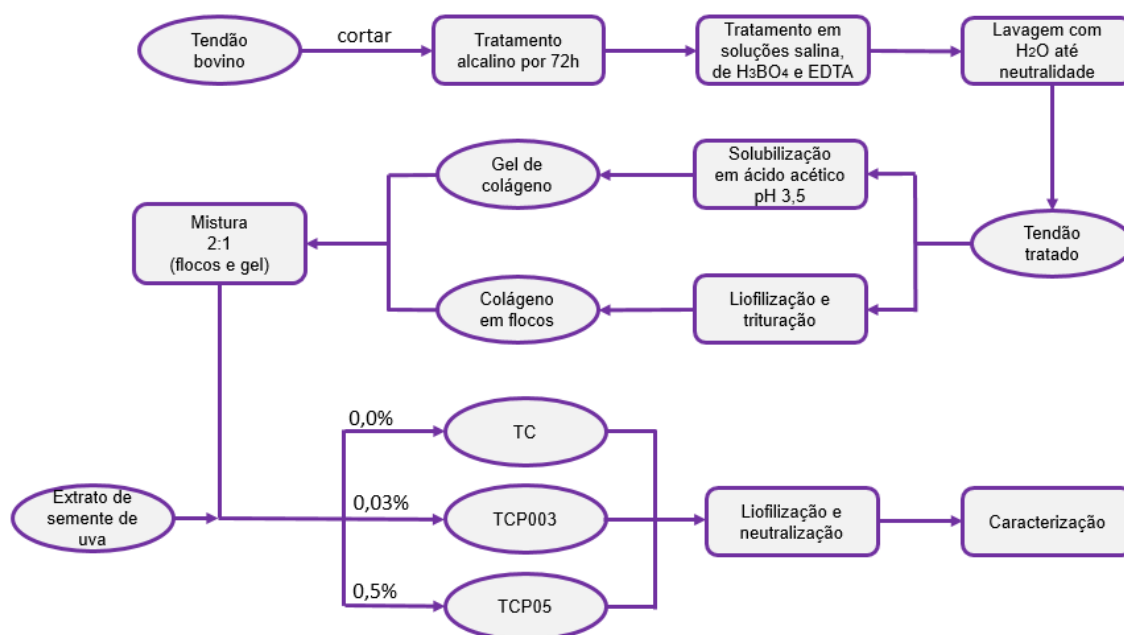
O extrato de semente de uva foi pesado e solubilizado em 20 mL de uma solução de água desionizada e etanol na proporção (1:1).

As matrizes foram obtidas misturando-se a pasta de colágeno com o colágeno solubilizado em ácido acético, adicionando-se diferentes concentrações de extrato de semente de uva por gotejamento durante o processamento, como descrito a seguir:

1. A pasta de colágeno foi homogeneizada juntamente com o gel de colágeno na proporção 2:1, sem a adição de extrato, denominando-se a amostra de TC.
2. A pasta de colágeno foi homogeneizada juntamente com o gel de colágeno na proporção 2:1 com adição de extrato de semente de uva na concentração de 0,03% (massa/massa), denominando-se a amostra de TCP003.
3. A pasta de colágeno foi homogeneizada juntamente com o gel de colágeno na proporção 2:1 com adição de extrato de semente de uva na concentração de 0,5% (massa/massa), denominando-se a amostra de TCP05.

Os géis formados foram colocados em formas de Teflon® e depois liofilizados até peso constante. Depois, foram neutralizadas utilizando-se vapor de amônia por um período de 24h e posteriormente, passaram por fluxo de ar constante para a remoção do excesso de amônia, por um período de 72h.

A Figura 7 mostra o resumo do processo de obtenção das matrizes, na forma de um fluxograma.

Figura 7: Fluxograma da preparação das matrizes

3.6 Caracterização

3.6.1 Análise Térmica

A definição atualmente aceita pela Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) para o termo ‘análise térmica’ foi apresentada por Mackenzie, 1979.

”Um grupo de técnicas, nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação, é medida enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura.”

Para que uma técnica seja considerada termoanalítica é necessário envolver a medição de uma propriedade física, expressa direta ou indiretamente, em função da temperatura e executada sob uma programação controlada de aquecimento ou resfriamento (Wendlandt, 1986).

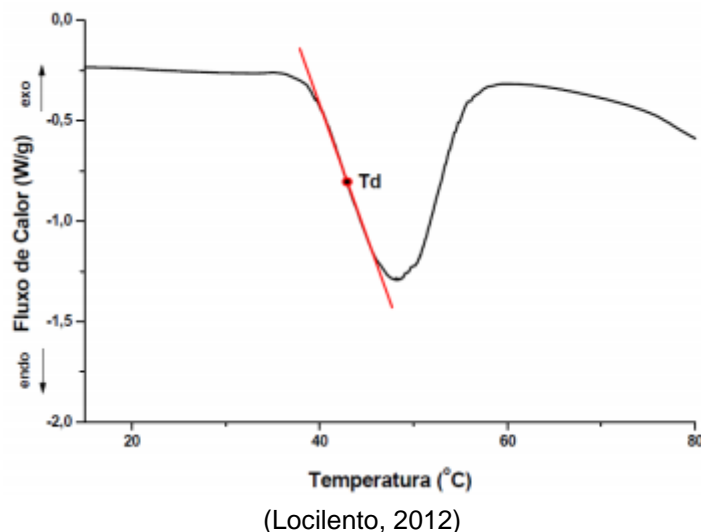
3.5.1.1 DSC (calorimetria exploratória diferencial)

As análises foram feitas em equipamento DSC Mod 2010 (TA Instruments). Foram utilizados aproximadamente 20 mg de amostra em um suporte de alumínio hermético, sob fluxo de nitrogênio de 80 mL min⁻¹, com razão de aquecimento de

10°C min⁻¹, com variação de temperatura de 5 – 120°C. A temperatura foi calibrada com padrão de índio e um suporte vazio foi usado como referência.

A temperatura de desnaturação do colágeno (Td) foi calculada a partir do ponto médio da inflexão da curva DSC (Figura 8).

Figura 8: Inflexão da curva DSC



3.6.2 MEV (microscopia eletrônica de varredura)

As análises por MEV da superfície e da seção transversal das matrizes foram feitas com amostras fixadas com fita adesiva de carbono em porta-amostras de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro (6 nm) com um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) a pressão de 0,02 mbar na câmara, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s. Para as fotomicrografias foi utilizado um feixe de elétrons entre 10 e 20 keV em um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda, Cambridge, England), com um detector Oxford modelo 7060 (Oxford Instruments Inc.). Estes equipamentos estão alocados na Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP.

Para a análise da seção transversal, as matrizes foram congeladas em nitrogênio líquido, fraturadas e liofilizadas. Para medir o tamanho dos poros das matrizes foi utilizado o *software* ImageJ. Foram feitas 15 determinações para cada matriz com a imagem ampliada 500 vezes, foi utilizada a aproximação do diâmetro de Martin (Allen, T.1997).

3.6.3 Cinética de absorção em PBS

Devido às dificuldades em se precisar os valores de absorção das esponjas é proposto um procedimento a fim de padronizar os dados.

As matrizes foram colocadas em frascos contendo tampão fosfato salino e, em intervalos de tempo específicos, foram retiradas com o excesso de solução das esponjas sendo retirado utilizando-se um papel filtro com dimensões de 2 cm X 2 cm. Após, as esponjas foram pesadas e retornadas aos frascos para novas tomadas de tempo.

Em cada uma das três amostras, o processo foi feito em quintuplicata. A quantidade de tampão absorvido pela matriz foi calculada pela média dos resultados encontrados usando a equação (1).

$$\%sol. = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

Sendo, %sol. = percentual de solução absorvida pela esponja; m_u = massa úmida e m_s = massa seca.

3.6.4 Estabilidade biológica *in vitro* (colagenase)

Para a determinação da estabilidade biológica *in vitro* foi preparada uma solução de colagenase em tampão tris-HCl 10 mmol L⁻¹ a pH 7,4 contendo 25 mmol L⁻¹ de CaCl₂. A solução de colagenase (10 U mg⁻¹ de colágeno) em tampão tris-HCl pH 7,4, foi adicionada a massas conhecidas de esponja que posteriormente, foram colocadas em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C durante 2 h.

Após este período, as amostras foram lavadas com água desionizada, congeladas e liofilizadas até peso constante.

A porcentagem de massa de colágeno degradada (%degradação) foi determinada pela diferença de massa de colágeno antes ($m_{inicial}$) e depois da degradação enzimática (m_{final}), pela equação (2):

$$(\%) \text{ degradação} = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Foram feitas 5 determinações independentes para cada tipo de matriz a fim de se obter uma média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

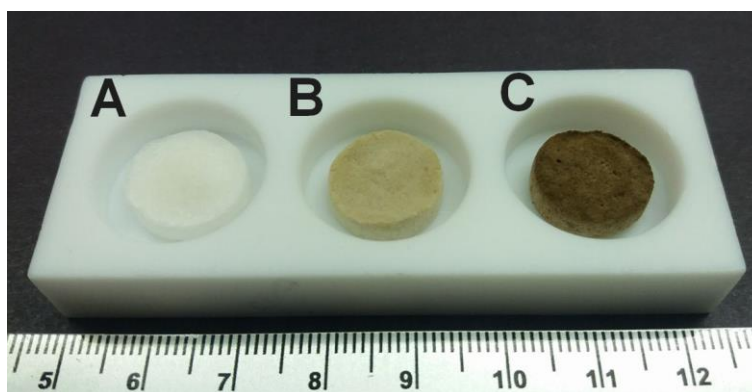
4.1 Determinação da concentração do gel de colágeno.

Pelo do processo de liofilização, determinou-se a concentração do gel de colágeno como sendo $2,51\% \pm 0,04$ (em massa). A partir disso, esse gel foi diluído com ácido acético pH 3,5 até que fosse obtida uma concentração de 1% (em massa).

4.2 Obtenção das matrizes

As matrizes obtidas são apresentadas na Figura 9 na qual se identifica a presença do extrato de semente de uva por sua coloração bege na matriz TCP003 e marrom na matriz TCP05. As três matrizes apresentaram aspecto resistente ao toque e reversibilidade a pequenas deformações, sendo que a matriz TCP05 é a que apresenta maior resistência, além de apresentar aspereza em sua superfície.

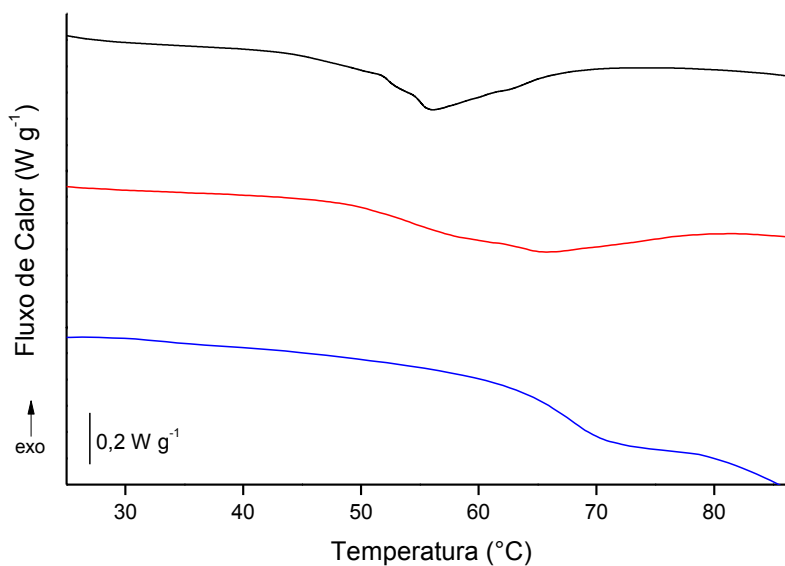
Figura 9: Fotografias digitais das matrizes (A) TC, (B) TCP003 e (C) TCP05



4.3 DSC (calorimetria exploratória diferencial)

As curvas DSC (Figura 10) mostram uma transição que aparece na forma de uma descontinuidade na linha de base, fornecendo a temperatura de desnaturação (Td) do colágeno. Essa desnaturação ocorre devido ao aquecimento e pode ser definida como a transição da hélice tripla do colágeno para uma forma em que as ligações intramoleculares são quebradas passando de uma estrutura altamente organizada a um estado desorganizado, denominado de gelatina (Parenteau-Bareil et al., 2010).

Os valores das temperaturas de desnaturação do colágeno das esponjas neutras estão dispostos na Tabela 2.

Figura 10: Curvas DSC para as matrizes (—) TC; (—) TCP003; (—) TCP05**Tabela 2:** Temperaturas de desnaturação das matrizes neutras.

Matriz	Td (°C)
TC	53,3
TCP003	53,7
TCP05	68,0

As matrizes TC e TCP003 apresentaram temperaturas de desnaturação muito próximas, sugerindo que o extrato de semente de uva não atua como agente reticulante do colágeno na concentração de 0,03%.

Já a matriz TCP05 teve um aumento de 14,7°C em sua temperatura de desnaturação, em relação a matriz TC, sugerindo que o colágeno atua como agente reticulante nessa concentração.

4.4 MEV (microscopia eletrônica de varredura)

A microscopia eletrônica de varredura permite definir a morfologia das microestruturas das matrizes, tais como tamanho dos poros, distribuição, porosidade e interconectividade que são fatores preponderantes na interação das matrizes com meio fisiológico, promovendo ou não a absorção de líquidos fisiológicos. Os diâmetros

foram medidos utilizando uma aproximação do diâmetro de Martin para as matrizes com a imagem ampliada 500 vezes (Figura 11).

Figura 11: Representação do diâmetro de Martin



Fonte: Autoria própria.

As fotomicrografias (Figuras 12, 13 e 14) indicam matrizes porosas na superfície, com poros de tamanho irregular e desorganizados. Na secção transversal, observa-se canais desorganizados.

A Tabela 3 mostra que o tamanho dos poros diminui conforme aumenta a concentração de extrato nas matrizes, indicando que este atua como agente reticulante do colágeno. Essa redução no tamanho de poro ocorre devido a aproximação das cadeias poliméricas graças as ligações cruzadas entre a proantocianidina e a hélice tripla do colágeno. Essa ligação ocorre principalmente entre as hidroxilas da proantocianidina e os grupamentos amida do resíduo de prolina presente no colágeno (He et al.,2011).

A irregularidade nos tamanhos dos poros é refletida no alto valor de desvio padrão, sendo que a matriz TC apresentou a maior irregularidade entre os tamanhos dos poros, mostrando maior valor de desvio padrão dentre as três matrizes.

Tabela 3: Tamanho dos poros das matrizes.

Matriz	Média ± DP (µm)
TC	55,7 ± 36,1
TCP003	48,0 ± 15,2
TCP05	36,9 ± 15,2

Figura 12: Fotomicrografias da matriz TC (A) superfície com aumento de 500X; (B) superfícies com aumento de 1000X; (C) transversal com aumento de 500X

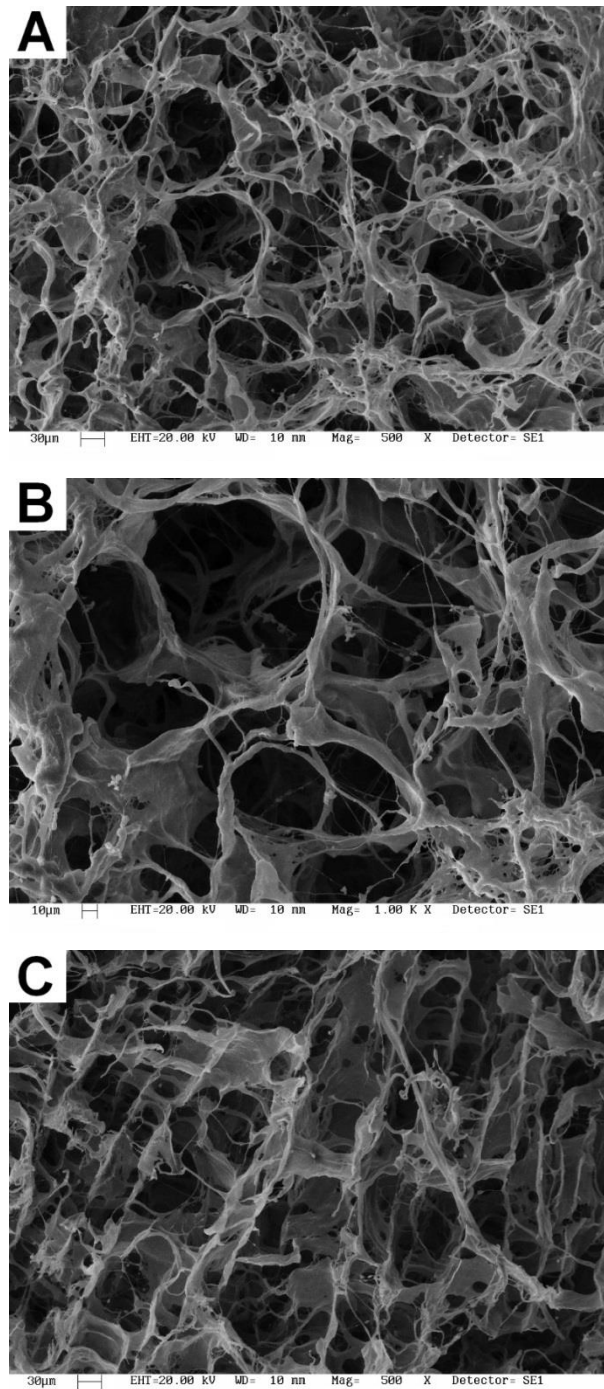


Figura 13: Fotomicrografias da matriz TCP003 (D) superfície com aumento de 500X; (E) superfície com aumento de 1000X; (F) transversal com aumento de 500X

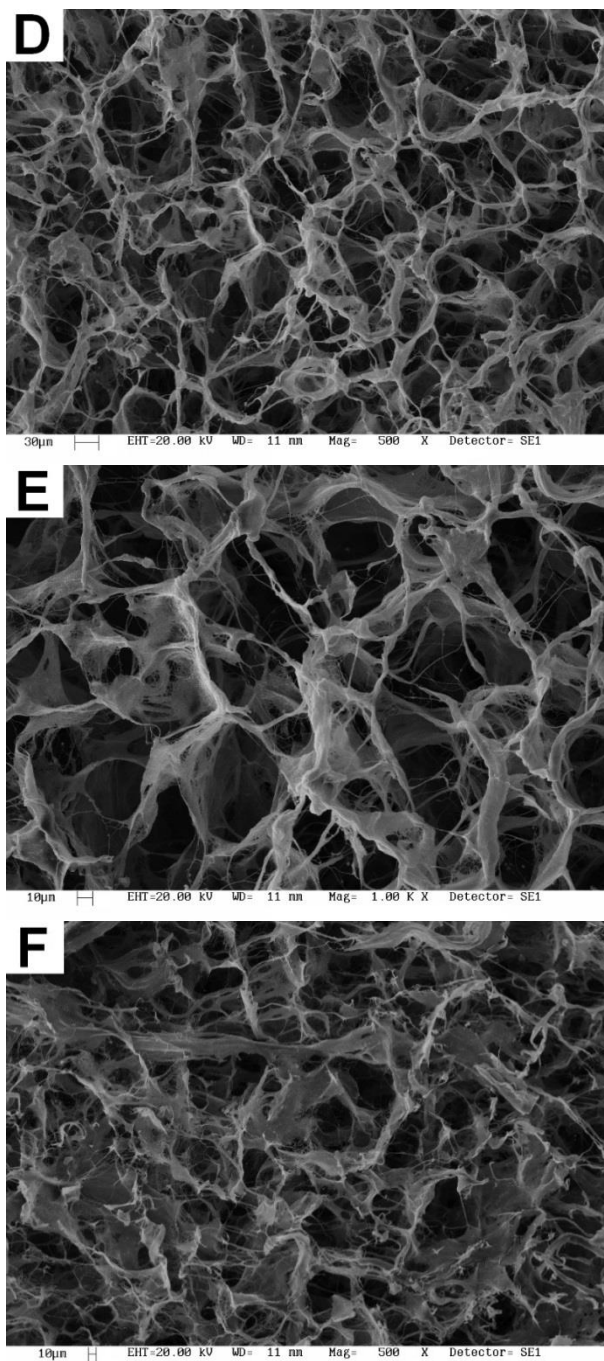
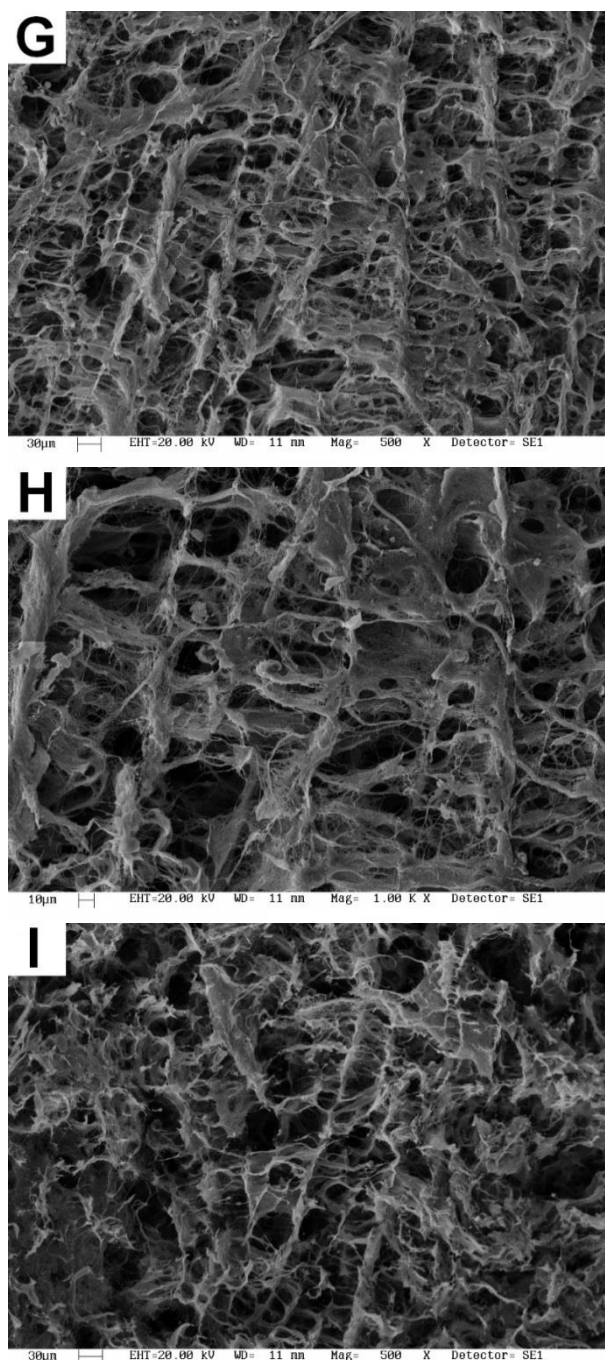


Figura 14: Fotomicrografias da matriz TCP05 (G) superfície com aumento de 500X; (H) superfície com aumento de 1000X; (I) transversal com aumento de 500X



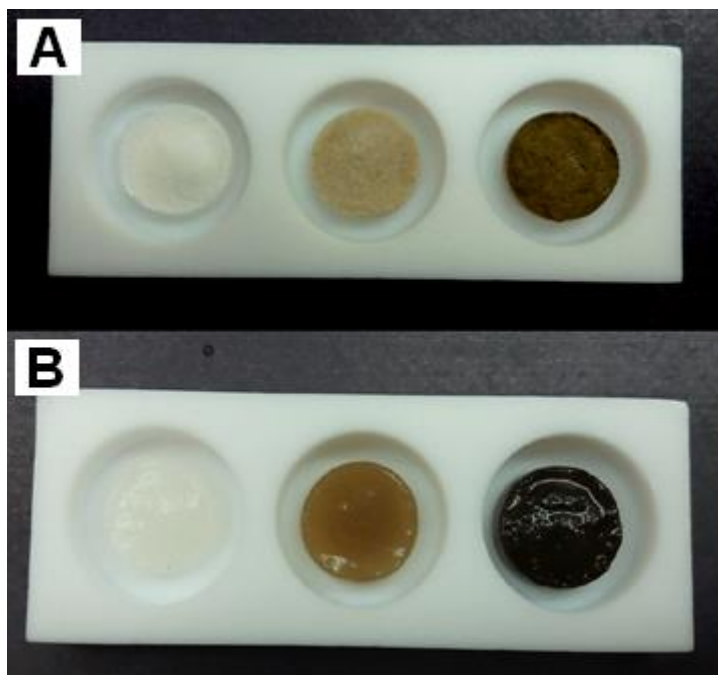
4.5 Cinética de absorção em PBS

A habilidade de uma matriz de reter água e eletrólitos é uma propriedade importante para avaliar sua eficácia como material hemostático, por isso o ensaio de absorção é imprescindível.

A absorção de tampão fosfato salino pelas matrizes de colágeno ocorrem devido a várias interações eletrostáticas. Quando as primeiras moléculas de água entram pelos poros da matriz, essas se ligam (hidratam) os grupos hidrofílicos e polares presentes na estrutura. As interações adesivas entre os diversos resíduos de aminoácidos polares presentes no colágeno e o PBS, são mais fortes do que as forças coesivas do próprio tampão. Isso faz com que o tampão seja absorvido por toda a matriz, ocasionando seu intumescimento.

Neste ensaio foi medida a absorção em PBS das matrizes TC, TCP003 e TCP05. As matrizes hidratadas (Figura 15) continuaram apresentando resistência ao toque e reversibilidade a pequenas deformações, sendo a matriz TCP05, a mais resistente dentre as três.

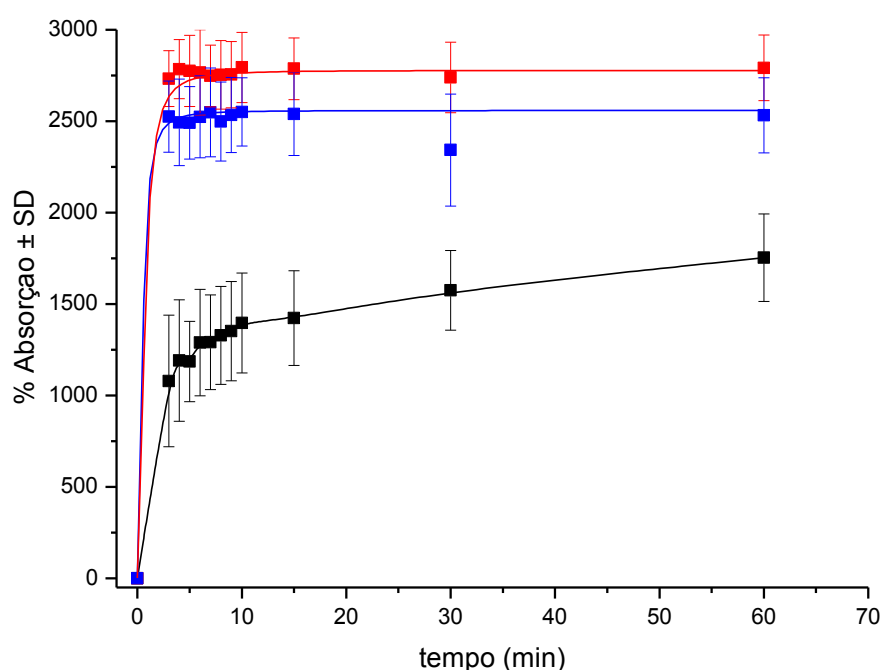
Figura 15: Fotografias das matrizes: (A) secas; (B) hidratadas com tampão



A matriz TCP05 apresentou rápido intumescimento, alcançando carga máxima de absorção de PBS em cerca de 5 minutos e absorvendo por volta de 2500%. A matriz TCP003 também apresentou rápido intumescimento, entretanto obteve carga máxima de absorção próximo a 2800%. A matriz TC apresentou absorção mais lenta e em menor quantidade do que as demais, absorvendo por volta de 1840% em 2h.

Tabela 4: Porcentagem de absorção de PBS em diferentes tempos.

Matriz	Porcentagem de absorção \pm DP		
	30 min	60 min	120 min
TC	1575 \pm 217	1753 \pm 239	1838 \pm 227
TCP003	2739 \pm 192	2791 \pm 179	2804 \pm 200
TCP05	2342 \pm 305	2531 \pm 205	2575 \pm 220

Figura 16: Percentual de absorção em PBS em função do tempo pelas matrizes: (■) TC, (■) TCP003, (■) TCP05

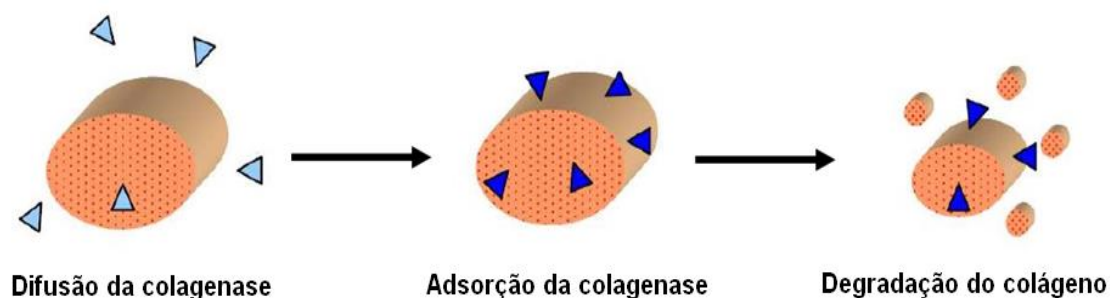
É comum que uma matriz reticulada intumesça menos que a não reticulada, já que a permeabilidade do solvente no meio é dificultada devido a maior superposição de cadeias poliméricas (WALTERS B. D., STEGEMANN J. P., 2014), entretanto, a grande quantidade de hidroxilas na molécula da proantocianidina presente nas matrizes TCP003 e TCP05 as tornam mais hidrofílicas (SIONKOWSKA A. et al., 2014), aumentando assim a porcentagem de absorção de PBS.

4.6 Estabilidade biológica *in vitro* (colagenase)

Os ensaios de estabilidade biológica por colagenase foram elaborados por serem uma indicação relativa da biodegradabilidade das matrizes em um momento após o implante. As porcentagens de degradação em colágenas das matrizes, juntamente com seus desvios padrões são apresentadas na Tabela 5.

A degradação *in vitro* do colágeno pela collagenase ocorre em três etapas (Figura 17) sendo elas a difusão, na qual a collagenase na solução se difunde pelo substrato, que no caso é o próprio colágeno, a absorção, na qual a enzima é adsorvida sobre a superfície do colágeno e a degradação, na qual a molécula é quebrada em fragmentos menores (METZMACHER, 2005).

Figura 17: Representação da degradação do colágeno pela ação da collagenase. (▲) collagenase livre, (▲) collagenase adsorvida



Fonte: Adaptado de METZMACHER, 2005

Tabela 5: Porcentagem de degradação enzimática \pm DP.

Matriz	% degradação \pm DP
TC	74,0 \pm 5,0
TCP003	43,9 \pm 1,8
TCP05	15,3 \pm 0,4

A matriz TC apresentou maior porcentagem de degradação, tendo menor estabilidade biológica *in vitro*. Apresentou também maior valor de desvio padrão que possivelmente foi decorrente da perda de algumas pequenas partes da matriz durante a lavagem pós o período de 2 h em collagenase, já que pedaços da matriz se desprenderam e ficaram dispersos em solução.

As matrizes TCP003 e TCP05 mostram uma redução na porcentagem de degradação correlacionada com o aumento da concentração de extrato de semente de uva nas matrizes. Isso pode indicar que apesar da matriz TCP003 não ter aumento em sua estabilidade térmica devido a presença de extrato, este ainda pode atuar como agente reticulante nessa concentração. A matriz TCP05 apresentou maior estabilidade biológica em collagenase, sendo que degradou apenas 15,3%.

5 CONCLUSÃO

Foi possível se obter três matrizes porosas neutras: TC, TCP003 e TCP05. O extrato de semente de uva presente nas matrizes TCP003 e TCP05 aumentou a estabilidade biológica *in vitro* de ambas, e no caso da matriz TCP05, aumentou sua estabilidade térmica, indicando que a proantocianidina atua como agente reticulante do colágeno em ambas as matrizes. Além disso, as matrizes com extrato tiveram um aumento na porcentagem de absorção de PBS, quando comparadas com a matriz TC, devido aos grupos hidroxilas presentes na proantocianidina, indicando que as matrizes TCP003 e TCP05 têm possíveis potenciais de uso como material hemostático.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque-Junior R.L.C., Barreto A.L.S., Pires J.A., Reis F.P., Lima S.O., Ribeiro M.A.G. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model, *International Journal of Morphology*, v.27(4), p. 1105-1110, 2009.
- Allen, T. Particle Size Measurement- Powder sampling and particle size measurement. 5 ed, Londres, Chapman & Hall, p. 525. 1997.
- Barnard J., Millner R. A Review of Topical Hemostatic Agents for Use in Cardiac Surgery. *Annals of Thoracic Surgery*, v.88, p.1377–1383, 2009.
- Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromolecules*, v.2(4), p.1074-1079, 2001.
- Carvalho, Elisabete Barros de. Estudo da interação entre proteínas e taninos: Influencia da presença de polissacarídeos. Tese (doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade do Porto, 2007.
- Carvalho M. V. H., Marchi E., Pantoroto, M., Rossini M., Silva D. M. S., Luiz Felipe Franco Teodoro L. F.F., Pantaroto A. Agentes hemostáticos locais e adesivos teciduais. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, v. 40(1), p.66-71, 2013.
- Chen, Q.; Liang, S.; Thouas, G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, v.38, p.584 – 671, 2013.
- Cho, M. L.; Heo, Y. J.; Park, M. k.; Oh, H. J.; Park, J. S.; Woo, Y. J.; Ju, J. H. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. *Immunology Letters*, v. 124(2), p. 102-110, 2009.
- Chvapil M., Owen J.A., DeYoung D.W. A standardized animal model for evaluation of hemostatic effectiveness of various materials. *J Trauma*, v. 23, p. 1042-1047, 1983.
- Dorneles C., Costa S. S., Laux M., Weber R. Comparative study of absorption of three kinds of collagen used in otologic surgery. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 69 (6), p. 744-751, 2003.
- Embrapa. Uva: edital oferece oportunidade de parceria com a Embrapa. 2014 . Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1696213/uva-edital-oferece-oportunidade-de-parceria-com-a-embrapa>>. Acessado em 24 mai. 2017.
- Fathima, N. N.; Rao, J. R.; Nair, B. U. Effect of UV irradiation on the physicochemical properties of iron crosslinked collagen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 105(3), p. 203-206, 2011.
- Forti F. L., Goissis G., Plepis, A. M. G. Modifications on Collagen Structures Promoted by 1,4-Dioxane Improve Thermal and Biological Properties of Bovine Pericardium as a Biomaterial. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 20, p. 267-285, 2006.
- Giglioti, A. F. Matrizes acelulares de colágeno elastina a partir da desvitalização do pericárdio bovino: caracterização química, físico-química e estrutural. 2005. 80 p. Dissertação – Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos, 2005.
- Goissis G. ; Suzigan S. ; Parreira D. R. ; Maniglia J. V. ; Braile D. M. ; Raymundo, S. R. O. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artificial Organs*, v. 24(3), p. 217-223, 2000.

- Han, B.; Jaurequi, J.; Tang, B. W.; Nimni M. E. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomedical Materials*, v. 65A, p. 118-124, 2003.
- He, L.; Mu, C.; Shi, J.; Zhang, Q.; Shi, B.; Lin, W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *International J. of Biological Macromolecules*, v. 48(2), p. 354-359, 2011.
- Horn M. M., Martins V. C. A., Plepis A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*, v. 77(2), p. 239–243, 2009.
- Hess J.R., Brohi K, Dutton R. P., Hauser C.J., Holcomb J.B., Kluger Y, The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*. v. 65, p.748–754, 2008.
- ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices. Part1: Evaluation and testing. 2009.
- Locilento, D. A. Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva. 2012. 95. Dissertação – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. 2012.
- Mello, L.M.R. Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015, disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>> . Acessado em 23 mai. 2017.
- Mackenzie, R. C. Nomenclature in thermal – analysis. *Thermochimica Acta*, v 28, p.1-6, 1979.
- Metzmacher I. Enzymatic degradation and drug release behavior of dense collagen implants. 2005. 228 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Ludwig-Maximilians University, Munich, 2005.
- Nair R, Sevukarajan M, Mohammed T, Badivaddin, CK, Kumar A. Collagen based drug delivery systems: A Review. *J Innov Trends in Pharmacological Sciences*. v.1, p.288-304. 2010.
- Okuyama, K. Revisiting the molecular structure of collagen. *Connective Tissue Research*. v. 49(5), p. 299-310, 2008.
- Parenteau-Bareil, R.; Gauvin, R.; Berthod, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, v. 3(3), p. 1863-1887, 2010.
- Proto-Col World. The collagen molecule 2014. Disponível em < <https://www.protocol.com/blog/2014/07/collagen/> >. Acessado em 24 mai. 2017.
- Ratner, B. D.; Bryant, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual review of Biomedical Engineering*, v. 6(1), p.41-75, 2004.
- Rocha, L. B., Goissis G., Ross, M. A.. Biocompatibility of Anionic Collagen Matrix as Scaffold for Bone Healing. *Biomaterials*, v. 23, p. 449-456, 2002.
- Schechtman, H.; Zavaglia, C. A. C. O estado da arte dos biomateriais no brasil. *Anais do CBEB*, p.8-14, 2000.
- Shoulders, M. D., Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. 2009. Disponível em <<http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>> acessado em 24 mai. 2017.
- Sionkowska A., Wisniewski M, Skopinska JGF, Pogg GF, Marsano IE, Maxwell CA, Wess TJ Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12): p.3026- 3032, 2006.

- Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K. Modification of collagen and chitosan mixtures by the addition of tannic acid. *Journal of Molecular Liquids*, v.199, p. 318-323, 2014.
- Sin, B.; Spranger, I. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciencia T  c. Vitiv.*, v.2, p.59-89, 2005.
- Sundaram C. P., Keenan A. C. Evolution of hemostatic agents in surgical practice. *Indian J Urol.*, v. 26(3), p. 374-78, 2010.
- Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *J. Artif. Organs*, v. 8(3), p.137-142, 2005.
- Vert, M. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Process in Polymer Science*. v. 32(8), p. 755-761, 2007.
- Xie X., Tian J.K., Lv F.Q., Wu R., Tang W.B., Luo Y.K., Huang Y.Q., Tang J. A novel hemostatic sealant composed of gelatin, transglutaminase and thrombin effectively controls liver trauma-induced bleeding in dogs. *Acta Pharmacol Sin.*, v.34, p.983-988, 2013.
- Walters B.D.; Stegemann J. P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 1488-1501, 2014.
- Wenlandt , W. W. Thermal Analysis. Toronto: John Wiley, 3^a edi  o 1986.
- Yu, X., Tang, C., Xiong, S., Yuan, Q., Gu, Z., Li, Z., Hu, Y. Modification of Collagen for Biomedical Applications: A Review of Physical and Chemical Methods, p. 1797–1812, 2015.
- Zhong, S. P.; Zhang, Y. Z.; Lim, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v 2, p. 510-525, 2010.