

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de Mestrado

"ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE
TECIDOS PORCINO E BOVINO
FIXADOS COM GLUTARALDEÍDO
PARA APLICAÇÃO EM BIOPRÓTESES CARDÍACAS"

Autora: Ana Paula Viana Pereira

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur

Abril/09

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Ana Paula Viana Pereira

ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS
PORCINO E BOVINO FIXADOS COM GLUTARALDEÍDO
PARA APLICAÇÃO EM BIOPRÓTESES CARDÍACAS

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Engenharia Metalúrgica e de Minas da
Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais
Orientador: Prof. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2009

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS E RELEVÂNCIA.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	Histórico das Cirurgias de Substituição de Válvulas Cardíacas.....	4
3.2	Fixação de Tecido Biológico.....	8
3.2.1	Estrutura e Propriedades do Colágeno.....	8
3.2.2	Fixação de Tecidos.....	11
3.2.3	Mecanismo de Fixação de Tecidos com Glutaraldeído e Formaldeído.....	13
3.2.4	Calcificação de Biopróteses Fixadas com Glutaraldeído.....	16
3.3	Métodos de Análise de Tecido Biológico.....	17
3.3.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	17
3.3.2	Testes <i>in vitro</i> : Intumescimento.....	22
3.3.3	Difração de Raios X (XRD).....	23
4.	METODOLOGIA.....	24
4.1	Processamento das Amostras.....	27
4.3	Preparação das Amostras.....	27
4.3	Tabelas de Experimentos.....	29
4.3.1	Variável Tempo.....	29
4.3.2	Variável Concentração da Solução de Glutaraldeído.....	32
4.4	Metodologias de Análise.....	33
4.4.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	33
4.4.2	Testes <i>in vitro</i> : Intumescimento.....	33
4.4.3	Difração de Raios X (XRD).....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Variável Tempo.....	36
5.1.1	Cúspides Porcinas.....	36
5.1.1.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	36
5.1.1.2	Testes de Intumescimento.....	41
5.1.1.3	Difração de Raios X.....	48

5.1.1.4	Sumário da Discussão dos Resultados.....	49
5.1.2	Pericárdio Bovino.....	50
5.1.2.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	50
5.1.2.2	Testes de Intumescimento.....	52
5.1.2.3	Sumário da Discussão dos Resultados.....	57
5.2	Variável Concentração da Solução de Glutaraldeído.....	58
5.2.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	58
5.2.2	Testes de Intumescimento.....	65
5.2.3	Sumário da Discussão dos Resultados.....	69
6.	CONCLUSÃO.....	71
7.	RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS.....	72
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
10.	APÊNDICE A.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1:	Válvula de Esfera Hufnagel.....	4
Figura 3.2:	Válvula de Esfera Starr-Edwards.....	5
Figura 3.3:	Válvula Mecânica HP Series St. Jude Medical®.....	5
Figura 3.4:	Válvula Porcina SJM Biocor®.....	7
Figura 3.5:	Molécula de Colágeno.....	8
Figura 3.6:	Molécula de Poliglicina.....	9
Figura 3.7:	Arranjo em Hélice de uma Cadeia Protéica.....	9
Figura 3.8:	Estrutura Tripla Hélice do Colágeno.....	10
Figura 3.9:	Organização de Fibrilas de Colágeno em Fibras.....	11
Figura 3.10:	Preservação de Tecido por Introdução de Ligações Cruzadas.....	12
Figura 3.11:	Moléculas de Formaldeído e Glutaraldeído.....	13
Figura 3.12:	Reações de Aldeídos com Grupos Hidroxila, Amino e Sulfidril.....	13
Figura 3.13:	Reação de Formaldeído com Proteínas.....	14
Figura 3.14:	Ligações Cruzadas Introduzidas por Glutaraldeído.....	15
Figura 3.15:	Espectro FTIR de Antígeno Herpesvírus Bovino BoHV-1 Purificado e Caracterizado.....	18
Figura 3.16:	Espectro FTIR de Cúspides Porcinas Fixadas com Glutaraldeído Pré-Tratadas e Não-Tratadas com Etanol.....	19
Figura 3.17:	Esquema de Reação Base de Schiff.....	20
Figura 3.18:	Evolução da Intensidade Relativa da Banda de Imina de Quitossana Reticulada com Glutaraldeído.....	20
Figura 3.19:	Espectro FTIR de Híbrido de PVA Modificado por Tiol e Fixado com Glutaraldeído.....	21
Figura 3.20:	Esquema de Reação de Formação de Acetal.....	21
Figura 3.21:	Valores Médios de Taxa de Intumescimento de Matrizes Colágeno/Quitossana Fixadas com Glutaraldeído a Diferentes Concentrações.....	22
Figura 3.22:	Padrões de Difração de Raios X para Filmes de Quitossana Pura e Fixada com Glutaraldeído.....	24
Figura 3.23:	Padrões de Difração de Raios X para Colágeno, Hidroxiapatita e seu Compósito.....	25
Figura 3.24:	Padrões de Difração de Raios X para Pericárdio Bovino Fresco e Fixado com Glutaraldeído.....	26

Figura 4.1:	Etapas de Processamento de Tecido.....	27
Figura 5.1	Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas.....	36
Figura 5.2	Amidas Primária, Secundária e Terciária.....	37
Figura 5.3	Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas Detalhe Região 1800-1100cm ⁻¹	38
Figura 5.4	Variação da Relação -C=N / -NH ₂ para Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas.....	40
Figura 5.5	Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas Detalhe Região 3000-2800cm ⁻¹	41
Figura 5.6	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina.....	42
Figura 5.7	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão.....	43
Figura 5.8	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão.....	44
Figura 5.9	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão.....	44
Figura 5.10	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão.....	46
Figura 5.11	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão.....	47
Figura 5.12	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão.....	47
Figura 5.13	Padrões de Difração de Raios X.....	49
Figura 5.14	Espectro de Pericárdio Bovino Não Reticulado e Fixado.....	50
Figura 5.15	Espectro de Pericárdio Bovino Não Reticulado e Fixado Detalhe Região 1800-1100cm ⁻¹	51
Figura 5.16	Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino.....	52
Figura 5.17	Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão.....	53
Figura 5.18	Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão.....	54
Figura 5.19	Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão.....	54
Figura 5.20	Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão.....	55

Figura 5.21	Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão.....	56
Figura 5.22	Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão.....	56
Figura 5.23	Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas.....	58
Figura 5.24	Amidas Primária, Secundária e Terciária.....	59
Figura 5.25	Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas Detalhe Região 1800-1100cm ⁻¹	60
Figura 5.26	Variação da Relação -C=N / -NH ₂ para Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas.....	62
Figura 5.27	Variação da Intensidade da Banda de Carbonila para Cúspides Fixadas.....	63
Figura 5.28	Variação da Intensidade da Banda de Acetal para Cúspides Fixadas.....	64
Figura 5.29	Espectro de Cúspides Porcinas Fixadas Detalhe Região 3000-2700cm ⁻¹	65
Figura 5.30	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina.....	66
Figura 5.31	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão.....	67
Figura 5.32	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão.....	67
Figura 5.33	Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão.....	68
Figura 5.34	Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1:	Comparativo entre Formaldeído e Glutaraldeído.....	15
Tabela 4.1:	Tabela de Experimento: Variável Tempo Cúspides Porcinas.....	30
Tabela 4.2:	Tabela de Experimento: Variável Tempo Pericárdio Bovino.....	31
Tabela 4.3:	Identificação de Amostras: Variável Tempo Cúspides Porcinas.....	31
Tabela 4.4:	Identificação de Amostras: Variável Tempo Pericárdio Bovino.....	32
Tabela 4.5:	Tabela de Experimento: Variável Concentração de Glutaraldeído Cúspides Porcinas.....	32
Tabela 4.6:	Identificação de Amostras: Variável Concentração de Glutaraldeído Cúspides Porcinas.....	33
Tabela 5.1	Absorbância das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	39
Tabela 5.2	Absorbância Relativa das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	39
Tabela 5.3	Absorbância Relativa das Bandas Amida I e Amida II dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	39
Tabela 5.4	Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 1 hora de Imersão.....	45
Tabela 5.5	Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 6 horas de Imersão.....	47
Tabela 5.6	Sumário de Resultados de Intumescimento para Pericárdio Bovino após 1 hora de Imersão.....	54
Tabela 5.7	Sumário de Resultados de Intumescimento para Pericárdio Bovino após 6 horas de Imersão.....	57
Tabela 5.8	Absorbância das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	61
Tabela 5.9	Absorbância Relativa das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	61
Tabela 5.10	Absorbância Relativa das Bandas Amida I e Amida II dos Espectros de Cúspides Porcinas.....	62
Tabela 5.11	Absorbância Relativa da Banda de Carbonila dos Espectros de Cúspides Porcinas Fixadas.....	63
Tabela 5.12	Absorbância Relativa da Banda de Acetal dos Espectros de Cúspides Porcinas Fixadas.....	64
Tabela 5.13	Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 1 hora de Imersão.....	67

Tabela 5.14	Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 6 horas de Imersão.....	69
-------------	--	----

LISTA DE DEFINIÇÕES

Autoenxerto = Enxerto de tecido proveniente do próprio indivíduo

Enxerto Autólogo = Autoenxerto

Estenose = Estreitamento anormal de um vaso sanguíneo ou outro órgão de estrutura tubular

Homoenxerto = Enxerto de tecido proveniente de outro indivíduo da mesma espécie

Imunogenicidade = Reação provocada por uma substância que, ao entrar em contato com determinadas células, induz um estado de sensibilidade e/ou resposta imune após um determinado período e que reage com anticorpos e/ou células imune do organismo *in vivo* ou *in vitro*

Regurgitação = Retorno de sangue por uma válvula incompetente

Trombo = Coágulo de sangue formado dentro do sistema circulatório de indivíduo vivo

Tromboembolia = Obstrução de vaso provocada por um trombo que se desprendeu de seu local original

Trombogenicidade = Tendência de um material, em contato com o sangue, produzir um trombo

Xenoenxerto = Enxerto de tecido proveniente de outra espécie

LISTA DE ABREVIATURAS

FTIR = Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

PBS = Solução Tamponada de Fosfato (*Phosphate Buffered Solution*)

PVA = Poli (Álcool Vinílico)

p/p = Peso por peso

u.a. = Unidade arbitrária

XRD = Difração de Raios X (*X Ray Diffraction*)

δ = Modo de Vibração Dobramento

ν = Modo de Vibração Estiramento

RESUMO

Biopróteses de pericárdio bovino e tecido porcino fixados com glutaraldeído tem sido amplamente utilizadas desde a década de 70. Vários dos produtos disponíveis atualmente no mercado foram desenvolvidos de maneira empírica, sendo os mecanismos de processamento e degradação dos tecidos ainda não completamente entendidos. O presente trabalho consistiu na análise e caracterização de tecidos porcino e bovino fixados com glutaraldeído utilizados na produção de biopróteses. As estruturas e propriedades dos tecidos processados foram avaliadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (XRD) e Testes de Intumescimento.

Os resultados obtidos para cúspides porcinas não reticuladas, reticuladas e armazenadas por diferentes tempos após a reticulação mostraram que o método proposto promoveu a reticulação do colágeno, alterando as características estruturais e comportamento de intumescimento quando comparados ao tecido não reticulado. Os resultados sugerem, ainda, que o armazenamento em soluções de estocagem de glutaraldeído continua a promover alterações nas cadeias de colágeno, mesmo após finalizado o tempo necessário para que se considere o material reticulado. Além disso, acredita-se que as cadeias de colágeno sofrem alterações de conformação com o tempo, tendendo a se conformar de maneira estereoquimicamente mais favorável.

Os resultados obtidos para pericárdio bovino não reticulado, reticulado e armazenado por diferentes tempos mostraram que o método proposto promoveu a reticulação do colágeno, alterando as características estruturais e comportamento de intumescimento quando comparados ao tecido não reticulado. Apesar de demonstrado que todas as amostras citadas foram reticuladas, o intumescimento mostrou que há alterações no comportamento do tecido com o tempo de processamento. Essas alterações podem ser atribuídas à alterações nas cadeias de colágeno, buscando conformações de maior estabilidade e de menor energia.

Os resultados obtidos para cúspides porcinas reticuladas com soluções de glutaraldeído de diferentes concentrações mostraram que os métodos de reticulação propostos promoveram a fixação do colágeno levando a estruturas moleculares com algumas diferenças. Essas diferenças sugerem que as reações de reticulação dos

grupos podem ter ocorrido preferencialmente por mecanismos diferentes. Apesar das diferenças estruturais, os comportamentos de intumescimento foram os mesmos após 1 hora de imersão e ligeiramente diferentes após 6 horas de imersão. Os resultados comprovam que houve reticulação de todas as amostras, independente da concentração do agente reticulante utilizado.

ABSTRACT

Bioprosthesis made of bovine pericardium and porcine tissue fixed with glutaraldehyde have been used since the 70's. Many of currently marketed products were empirically developed and, due to that, processing and degradation mechanisms are still not completely understood. This work consisted of analyzing and characterizing glutaraldehyde fixed porcine and bovine tissue, used in bioprosthesis manufacturing. Processed tissue structure and properties were evaluated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD) and Swelling Test.

Results of fresh cusps, crosslinked and stored for different times after crosslinking have showed that proposed method led to collagen crosslinking, changing structural characteristics and swelling behavior when compared to fresh tissue. Results suggest that the storage in glutaraldehyde solutions continues leading to changes in collagen chains, even after the time needed for considering tissue crosslinked. Besides that, it is believed that collagen chains undergo conformation changes with time, tending to conform in a more favorable way.

Results of fresh bovine pericardium, crosslinked and stored for different times after crosslinking have showed that proposed method led to collagen crosslinking, changing structural characteristics and swelling behavior when compared to fresh tissue. Even though all samples crosslinking have been confirmed, swelling showed that there are changes in tissue behaviour with processing time. These changes may be due to collagen chains conformation changes, tending to conform in a more favorable way and with less energy.

Results of porcine cusps crosslinked with different glutaraldehyde solution concentrations have showed that proposed crosslinking methods led to collagen fixation and slightly different molecular structures. These differences suggest that groups crosslinking reactions may have been preferentially occurred by distinct mechanisms. Despite structural differences, swelling behaviors were the same after 1 hour immersion and slightly different after 6 hours immersion. Results confirm samples crosslinking, regardless crosslinking agent used.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o mercado mundial para válvulas cardíacas biológicas seja de aproximadamente US\$1 bilhão ao final do ano de 2010. Somente nos EUA, esse mercado cresce cerca de 5% ao ano com o aumento da expectativa de vida da população. Para os fabricantes de válvulas cardíacas, esse é um mercado extremamente atraente e a competição entre eles tem sido acirrada (VESELY, 2003).

No início do desenvolvimento desse tipo de produto, os pioneiros na fabricação de válvulas apresentaram novos modelos, projetos inovadores e estabeleceram sua reputação baseada nesses modelos. Nos últimos anos, porém, os fabricantes têm trabalhado, principalmente, na documentação da durabilidade a longo prazo de seus produtos e o aumento da mesma se tornou seu principal objetivo (ST JUDE MEDICAL, 1995).

Os mecanismos de processamento dos tecidos e degradação das biopróteses são complexos e, em alguns casos, não completamente entendidos. Vários desses produtos foram desenvolvidos de forma empírica, quando o controle por órgãos reguladores era menos eficiente. Por isso, a busca pelo conhecimento dos processos e materiais utilizados na fabricação dos mesmos torna-se extremamente importante para suportar sua melhoria contínua. Somente com o domínio das técnicas de processamento atuais será possível desenvolver e implementar alterações e melhorias em processos e produtos.

Esse trabalho consiste na análise e caracterização de tecidos porcino e bovino fixados com glutaraldeído para o processo de produção de biopróteses. Serão avaliadas as estruturas e propriedades dos tecidos processados conforme os procedimentos atuais, bem como as alterações promovidas nas estruturas ao longo do processamento. Será avaliado, também, o efeito do armazenamento do tecido em glutaraldeído após a fixação do mesmo na estrutura e propriedades mecânicas do material.

O alcance dos objetivos deste trabalho auxiliará melhorias nos métodos de processamento de material biológico e fabricação de biopróteses na medida em que o entendimento do *statu quo* permitirá a comparação com a situação modificada. Além disso, esse estudo auxiliará adequações no processo de montagem de biopróteses

caso sejam constatadas variações nas propriedades mecânicas e estruturais do material biológico armazenado após a fixação.

2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

Este trabalho tem como principais objetivos:

- Caracterizar os tecidos de cúspides de válvulas aórticas porcinas e de pericárdio bovino com ênfase na estrutura e capacidade de intumescimento ao longo das etapas de seu processamento e fixação.
- Analisar alterações estruturais de tecidos de cúspides de válvulas aórticas porcinas e de pericárdio bovino ao longo de diferentes tempos de fixação e armazenamento em soluções de glutaraldeído em diferentes concentrações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico das Cirurgias de Substituição de Válvulas Cardíacas

No final dos anos 40, pioneiros na área de cirurgia cardíaca iniciaram os procedimentos de reparo de válvulas mitrais com tecido de pericárdio. Porém, os primeiros dispositivos prostéticos apresentaram graves alterações estruturais, incluindo enrijecimento, fibrose, contração e perda de elasticidade (ST JUDE MEDICAL, 1995).

O foco mudou para próteses mecânicas quando, em 1952, a primeira foi desenvolvida e implantada por Charles Hufnagel. A Válvula de Esfera Hufnagel, mostrada na Figura 3.1, possuía um desenho de uma esfera em uma “gaiola” (*“Ball-in-cage”*) (ST JUDE MEDICAL, 1995).



Figura 3.1 – Válvula de Esfera Hufnagel

Com o desenvolvimento de sistemas de circulação extra corpórea nos anos 50, o escopo das cirurgias de válvulas cardíacas pôde ser ampliado, permitindo-se reverter ou minimizar a deterioração nas funções cardíacas causadas por doenças de válvulas. Nesse momento, as substituições de válvulas utilizando homoenxerto e válvulas mecânicas na posição aórtica se tornaram possíveis (VON OPPELL e ZILLA, 2001). Nos anos 60, as cirurgias de substituição de válvulas aórticas haviam se tornado mais comuns.

Em 1960, a válvula de esfera Starr-Edwards, mostrada da Figura 3.2, foi utilizada pela primeira vez. Apesar de possuir limitações de desempenho, ela se tornou a primeira válvula prostética utilizada em larga escala e com sucesso (ST JUDE MEDICAL, 1995).



Figura 3.2 – Válvula de Esfera Starr-Edwards

Todos os modelos iniciais de válvulas mecânicas apresentaram alta incidência de formação de trombos, eventos tromboembólicos e, com exceção da válvula Starr-Edwards, problemas de integridade estrutural. Altos níveis de anticoagulantes foram necessários para reduzir a formação de trombos. Além disso, o desempenho hemodinâmico dessas válvulas era fraco (ST JUDE MEDICAL, 1995).

Apesar das limitações das primeiras válvulas mecânicas, seu uso cresceu e outros modelos de próteses, tais como válvulas de disco, válvulas de duas cúspides, válvulas de oclusores planos, entre outras, passaram a ser usadas. A Figura 3.3 mostra a Válvula Mecânica HP Series da St. Jude Medical®. Pesquisadores e cirurgiões continuaram a buscar melhores resultados clínicos, menor trombogenicidade e melhorias na hemodinâmica e durabilidade. Com isso, houve uma grande evolução com novos desenhos de válvulas mecânicas e a utilização de materiais mais resistentes e menos trombogênicos (ST JUDE MEDICAL, 1995).



Figura 3.3 – Válvula Mecânica HP Series St. Jude Medical®

Paralelamente ao desenvolvimento das válvulas mecânicas ocorreu o desenvolvimento das biopróteses. Essas próteses podem ser desenvolvidas com válvulas naturais ou fabricadas com tecidos biológicos (ST JUDE MEDICAL, 1995).

As biopróteses de válvulas naturais podem ser classificadas pela origem do tecido da válvula:

- auto-enxerto ou autóloga;
- homoenxerto;
- xenoenxerto.

A dificuldade de se obter válvulas naturais e as complicações decorrentes de seu uso, tais como infecções, levaram os pesquisadores a desenvolver técnicas que permitissem o uso de tecidos biológicos. O implante de tecidos frescos (não-fixados) leva a ataques inflamatórios e digestão parcial do tecido (Levy *et al*, 1983 e 1986 *apud* GOLOMB *et al*, 1987), portanto, técnicas que promovam a estabilização do tecido por meio da introdução de ligações cruzadas no material biológico (processo de *fixação*) com o objetivo de reduzir a imunogenicidade e prevenir a rejeição e falha das próteses (HUMAN e ZILLA, 2001) tornam-se necessárias. Elas podem ser divididas em tratamentos físicos, como irradiação ultravioleta (Weadock 1995 *apud* YUNORI *et al*, 2003), e tratamentos com agentes químicos, entre eles, o glutaraldeído (WOODROOF, 1978; NIMNI, 2001).

O uso bem sucedido de tecido de origem animal na substituição de válvulas humanas depende da possibilidade de se preservar adequadamente esses tecidos (NIMNI, 2001). No início de seu desenvolvimento, válvulas biológicas falharam devido a processos inadequados de fixação de tecidos. O formaldeído, o produto mais utilizado para a preservação de tecidos, foi utilizado, mas, levou à falha das próteses pelo fato de as ligações cruzadas introduzidas na rede de colágeno serem instáveis e reversíveis (BUCH, 1970; LITWAK *et al*, 1972; WOODROOF, 1978). Por esse motivo, o uso de formaldeído para o processamento de válvulas biológicas é recomendado somente para a manutenção da esterilidade após a estabilização preliminar do tecido.

O uso de glutaraldeído para a fixação de tecidos biológicos se iniciou no final dos anos 60 (NIMNI, 2001). Observou-se que esse reagente é capaz de introduzir ligações

cruzadas na rede de colágeno, sendo essas ligações estáveis química e termicamente (NIMNI, 1988).

O desenvolvimento de um método eficaz de estabilização do tecido biológico levou ao desenvolvimento de próteses de pericárdio bovino e tecido porcino, que passaram a ser utilizadas em larga escala a partir da década de 70. A Figura 3.4 mostra a Válvula Porcina SJM Biocor®, que utiliza tecido de cúspides porcinas e pericárdio bovino reticulados com solução de glutaraldeído.



Figura 3.4 – Válvula Porcina SJM Biocor®

A história da cirurgia de substituição de válvulas cardíacas continua em franca evolução. Os atuais modelos de válvulas cardíacas são o resultado dos esforços de inúmeros pesquisadores, engenheiros e cirurgiões que, alternando sucessos e insucessos, vêm trabalhando para a melhoria desses dispositivos.

As válvulas mecânicas atuais apresentam excelente desempenho hemodinâmico e durabilidade, mas, ainda há problemas de tromboembolismo e hemorragias ligadas a tratamentos anticoagulantes (MYKEN *et al*, 2000). Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar o projeto destes dispositivos visando, com isso, uma melhoria no perfil do fluxo sanguíneo e a conseqüente diminuição de problemas trombogênicos. Uma vantagem das válvulas mecânicas é o fato de elas não apresentarem degradação, como acontece com as válvulas biológicas (ST JUDE MEDICAL, 1995).

As válvulas biológicas, ao contrário das mecânicas, normalmente não são trombogênicas. Isso representa uma enorme vantagem em relação às válvulas mecânicas, uma vez que o paciente não precisa ser submetido a terapias de longo prazo com administração de anticoagulantes. Mas, essas válvulas podem falhar

devido à calcificação e degradação do tecido. A degradação e falha de válvulas biológicas, quando ocorrem, são graduais, permitindo que uma nova cirurgia de substituição seja realizada, mas, a re-operação será invariavelmente necessária em 10 a 15 anos após o implante. (MYKEN *et al*, 2000).

3.2 Fixação de Tecido Biológico

3.2.1 Estrutura e Propriedades do Colágeno

O colágeno é uma família de proteínas multifuncionais com características estruturais únicas. É a proteína mais abundante do corpo e suas funções variam desde funções biomecânicas cruciais em ossos, pele, tendões e ligamentos ao controle de expressões genéticas celulares em desenvolvimento (SHU-TUNG LI, 2000). Assim como todas as proteínas, as moléculas de colágeno são formadas *in vivo* por reações de polimerização enzimáticas entre grupos amina e carboxil de aminoácidos, onde o R é um grupo lateral de um resíduo de aminoácido, conforme representado na Figura 3.5 (ST JUDE MEDICAL, 1995).

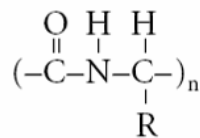


Figura 3.5 – Molécula de Colágeno (ST JUDE MEDICAL, 1995)

O aminoácido mais simples é a glicina (Gli) (R=H), para a qual uma hipotética organização linear de moléculas de poliglicina pode se formar e ser estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares (Figura 3.6).

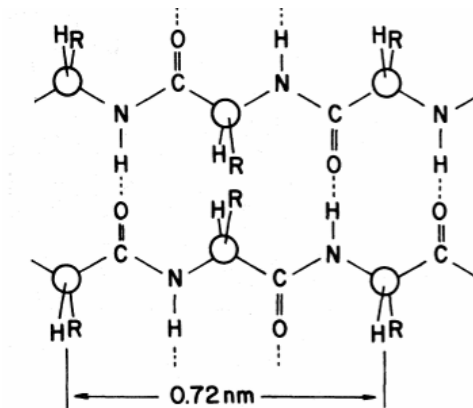


Figura 3.6 – Molécula de Poliglicina (ST JUDE MEDICAL, 1995)

Porém, quando R é um grupo maior, que é o que acontece com a maioria dos aminoácidos, restrições estereoquímicas normalmente forçam a cadeia polipeptídica a se adaptar em uma conformação mais favorável. Isso acontece pela rotação dos volumosos grupos R com o objetivo de se afastar das interações mais povoadas, formando uma hélice com os grupos R voltados para sua superfície externa (Figura 3.7). Ligações de hidrogênio podem se formar dentro da hélice entre o hidrogênio que está ligado ao nitrogênio de um resíduo de aminoácido e o oxigênio ligado a outro resíduo de aminoácido. Então, a conformação final de uma proteína, que está diretamente relacionada à sua função, é ditada primeiramente pela seqüência de aminoácidos da proteína em questão.

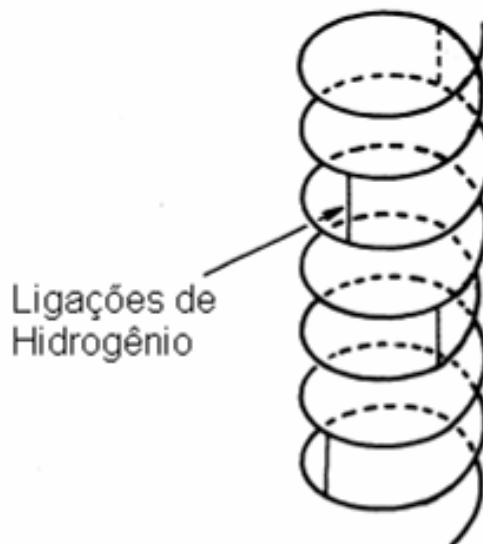


Figura 3.7 – Arranjo em Hélice de uma Cadeia Protéica
(Adaptado de ST JUDE MEDICAL, 1995)

Dentro os vários tipos de colágeno existentes, o tipo I é o mais abundante e o principal constituinte de ossos, pele, ligamentos, tendões. É essa a principal proteína estrutural de válvulas cardíacas biológicas porcina e de pericárdio.

O colágeno tipo I é uma proteína fibrosa constituída de três moléculas longas que se envolvem de forma a formar uma tripla hélice (Figura 3.8). Essa estrutura de tripla hélice permite que esse colágeno seja, ao mesmo tempo, extremamente forte e flexível.

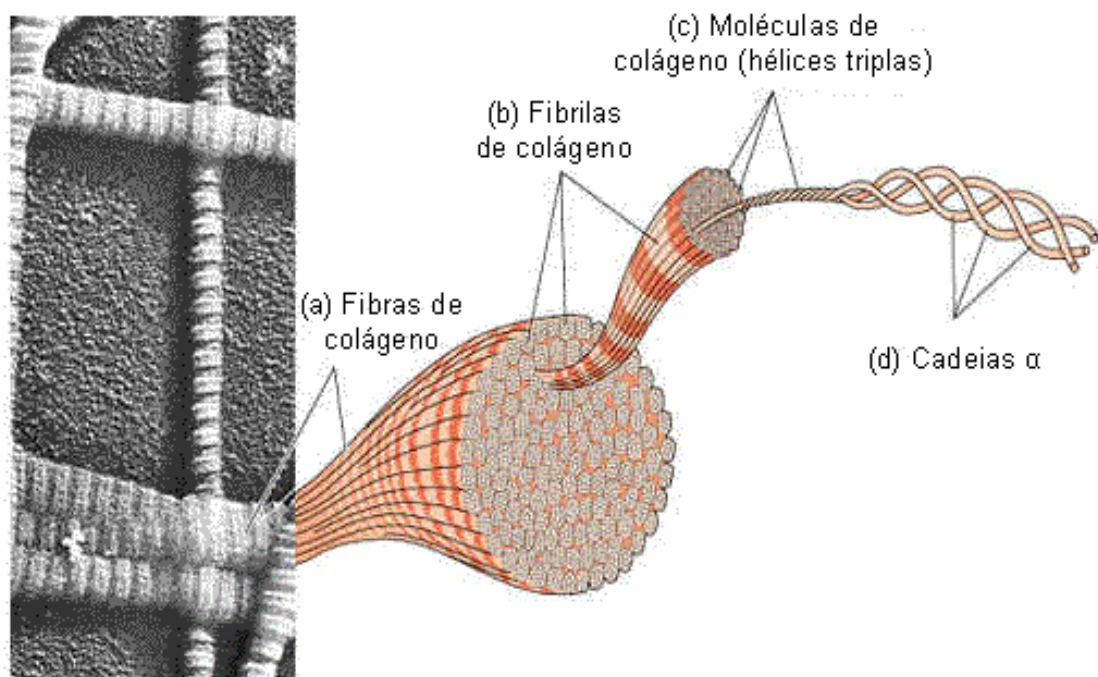


Figura 3.8 – Estrutura Tripla Hélice do Colágeno
(Adaptado de ST JUDE MEDICAL, 1995)

O colágeno não existe em forma de moléculas isoladas no espaço extracelular no corpo. Ao invés disso, as moléculas de colágeno se agregam em fibrilas. O diâmetro dessas fibrilas podem variar de acordo com o tecido e sua idade e seu comprimento é indeterminado (SHU-TUNG LI, 2000). (Figura 3.9)

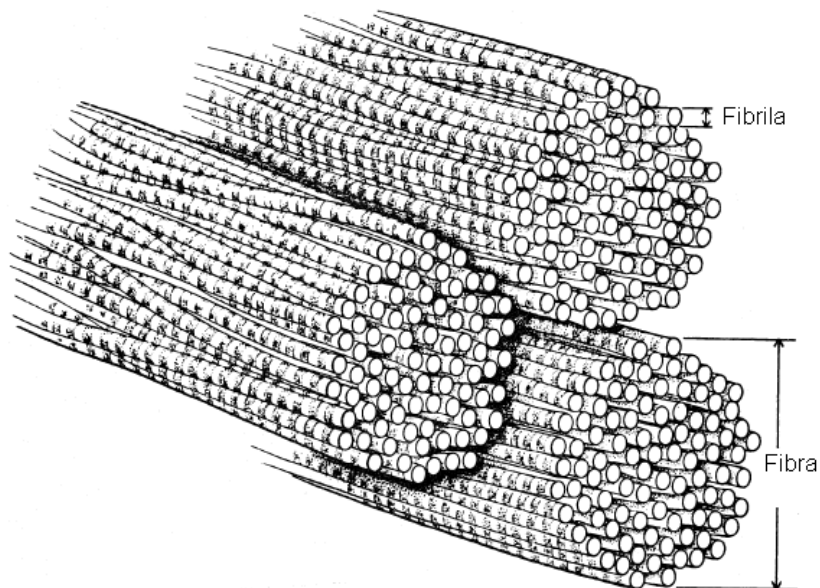


Figura 3.9 – Organização de Fibrilas de Colágeno em Fibras
(Adaptado de ST JUDE MEDICAL, 1995)

3.2.2 Fixação de Tecidos

Válvulas biológicas precisam ser “fixadas” antes de serem implantadas de maneira a prevenir rejeição e degradação da prótese valvar pelo corpo. A fixação de uma válvula biológica afeta não só a preservação do tecido, mas, também, uma série de outros fatores que podem levar ao sucesso ou insucesso da válvula, entre eles a calcificação, que será abordada no item 3.2.4 desse documento.

A tendência natural do colágeno é retornar a aminoácidos. Células vivas constantemente estão produzindo novo colágeno, mas, em células mortas, isso não acontece. O processo de fixação de tecidos consiste na introdução de ligações cruzadas que permitem a manutenção da estrutura de colágeno do tecido mesmo que ligações existentes no tecido não reticulado se rompam (Figura 3.10) (BOWES e CATER, 1965).

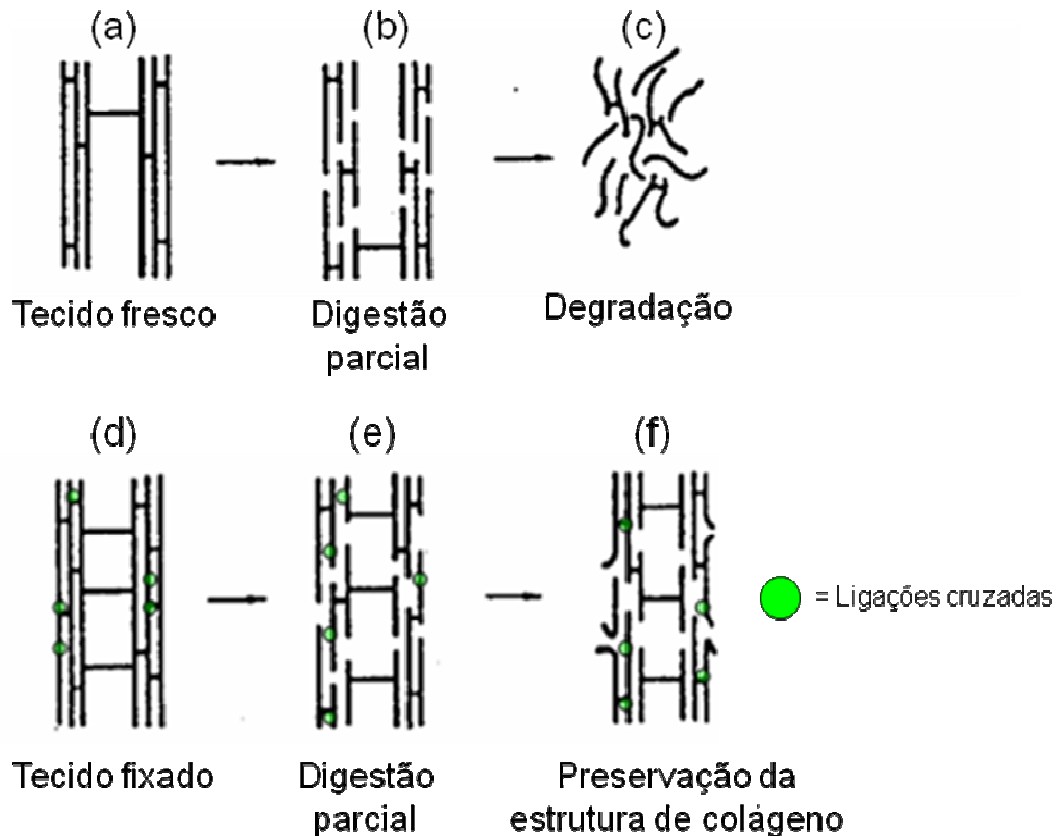


Figura 3.10 – Preservação de Tecido por Introdução de Ligações Cruzadas
(Adaptado de BOWES e CATER, 1965)

A macromolécula de colágeno, mostrada na Figura 3.10 (a), possui poucas ligações cruzadas intramoleculares que estabilizam a macromolécula e o número de ligações cruzadas intermoleculares também é baixo. A digestão e quebra das ligações peptídicas leva rapidamente à degradação da estrutura molecular, mostrado na Figura 3.10 (c). No tecido fixado, Figura 3.10 (d), a introdução de ligações cruzadas pelo processo de reticulação estabilizou a estrutura, retardando a degradação, conforme mostrado na Figura 3.10 (f).

Diversos agentes químicos são utilizados para promover a fixação de tecidos, entre eles formaldeído, glutaraldeído e triglicidilamina (TGA). Biopróteses fabricadas com tecido porcino ou pericárdio bovino fixados com glutaraldeído vêm sendo utilizadas há mais de 30 anos (WOODROOF, 1979). Apesar disso, pesquisas vêm sendo feitas para o desenvolvimento de métodos de fixação alternativos ao glutaraldeído, pois seu uso tem sido relacionado à calcificação de cúspides, além do fato de esse agente ser

tóxico (CONNOLLY *et al*, 2005). Apesar disso, biopróteses fixadas com glutaraldeído ainda são utilizadas em mais de 40% dos procedimentos de substituição de válvulas cardíacas em todo mundo (NIMNI, 2001).

3.2.3 Mecanismo de Fixação de Tecidos com Glutaraldeído e Formaldeído

Formaldeído (HCHO) e glutaraldeído (HCO-(CH₂)₃-CHO) são aldeídos e contêm o grupo funcional carbonila (C=O). Uma vez que o átomo de oxigênio da carbonila é mais eletronegativo do que o átomo de carbono desse grupo, ele atrai elétrons do carbono, adquirindo uma carga negativa parcial. O carbono, por sua vez, adquire uma carga positiva parcial, se tornando deficiente em elétrons. (Figura 3.11) Formaldeído e glutaraldeído reagem com moléculas com grupos hidroxila, amino e sulfidrina, que possuem elétrons livres. (Figura 3.12) Uma das principais reações de aldeídos envolve a adição de um elemento químico rico em elétrons (como o grupo amino de proteínas) ao carbono com carga positiva parcial.

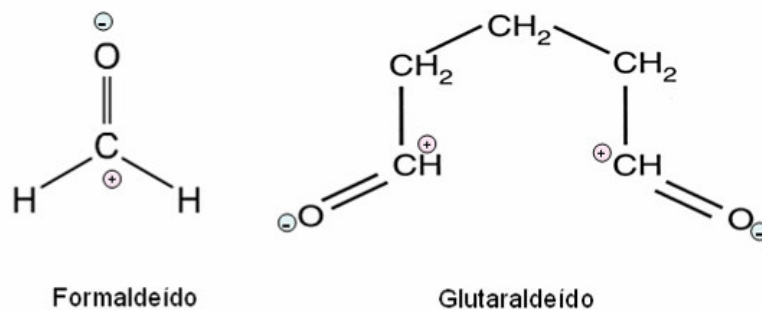


Figura 3.11 – Moléculas de Formaldeído e Glutaraldeído

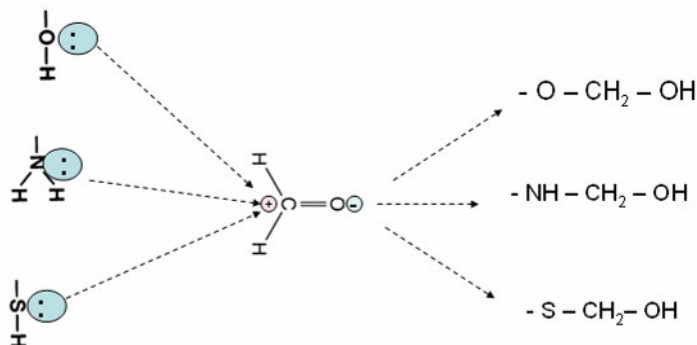


Figura 3.12 – Reações de Aldeídos com Grupos Hidroxila, Amino e Sulfidrina
(Adaptado de ST JUDE MEDICAL, 1995)

A reação do formaldeído com proteínas está resumidamente representada na Figura 3.13.

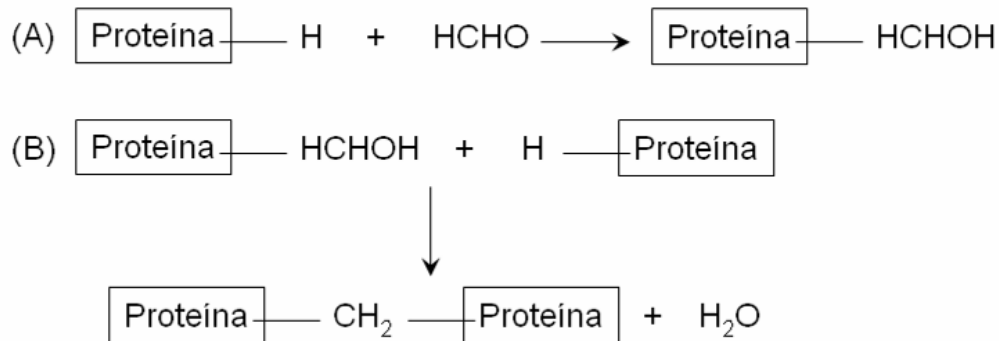


Figura 3.13 – Reação de Formaldeído com Proteínas (Adaptado de KIERNAN, 2000)

Em (A) ocorre a adição de formaldeído à proteína, reação que ocorre rapidamente. Em (B), o formaldeído ligado se liga à outra proteína, formando uma ligação cruzada de metileno, também chamada de ponte de metileno. Estudos mostram que a ligação mais freqüente que ocorre no processo de fixação do colágeno com formaldeído é com o átomo de nitrogênio de grupos amino (Gustavson 1956 *apud* KIERNAN, 2000). Uma importante característica do processo de fixação com formaldeído é que, devido ao pequeno tamanho da molécula, o formaldeído penetra rapidamente no tecido, porém, a formação das pontes de metileno ocorre lentamente e uma adequada fixação levará dias. Outra característica importante é que as ligações cruzadas introduzidas pela fixação com formaldeído são instáveis. Portanto, o formaldeído não deve ser utilizado para a fixação de tecidos para biopróteses valvares (WOODROOF, 1978; BUCH, 1970).

A fixação de tecidos com glutaraldeído ocorre por mecanismos diferentes. A molécula de glutaraldeído, maior do que a de formaldeído penetra mais lentamente no tecido. Porém, o glutaraldeído normalmente se rearranja de maneira a formar uma estrutura permanente e introduz ligações cruzadas intramoleculares, intermoleculares e, até mesmo, intrafibrilares que são estáveis e irreversíveis, conforme mostrado na Figura 3.14 (NIMNI, 2001).

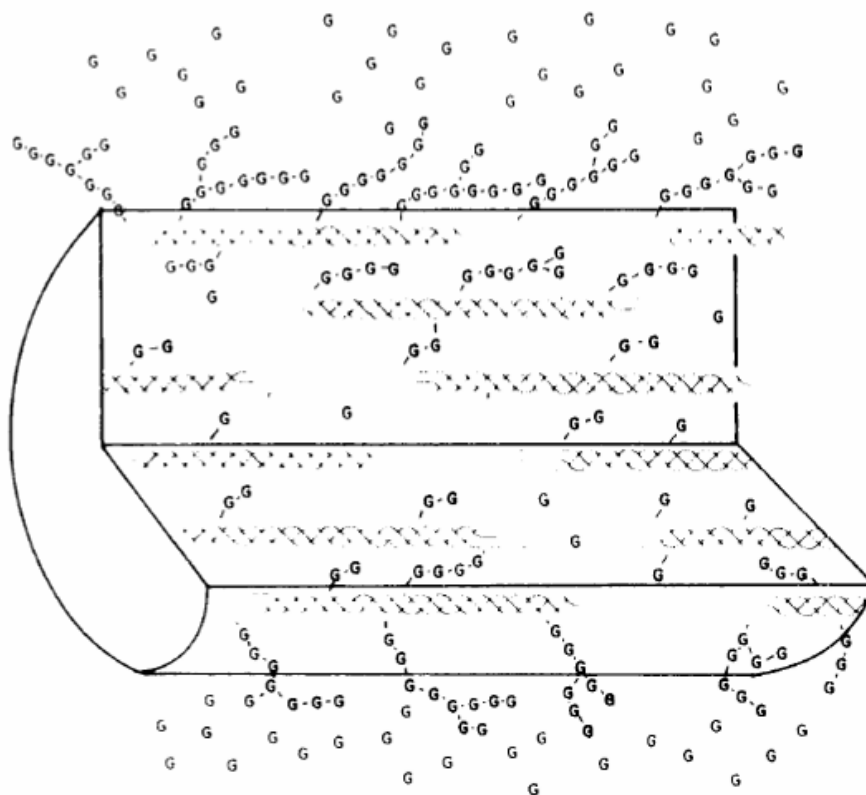


Figura 3.14 – Ligações Cruzadas Introduzidas por Glutaraldeído (NIMNI, 1988)

A Tabela 3.1 mostra um comparativo entre Formaldeído e Glutaraldeído como agentes para fixação de tecidos.

Tabela 3.1 – Comparativo entre Formaldeído e Glutaraldeído

FORMALDEÍDO	GLUTARALDEÍDO
<ul style="list-style-type: none"> • Ligações cruzadas se formam lentamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Ligações cruzadas se formam rapidamente
<ul style="list-style-type: none"> • Penetra rapidamente no tecido 	<ul style="list-style-type: none"> • Penetra lentamente no tecido
<ul style="list-style-type: none"> • Maioria das ligações cruzadas é reversível 	<ul style="list-style-type: none"> • Maioria das ligações cruzadas é irreversível
<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente para esterilização de tecidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente para estabilização da estrutura de tecidos

Dentre os vários agentes de fixação estudados e utilizados, o glutaraldeído ainda é o mais utilizado (NIMNI, 2001). Essa larga utilização pode ser explicada devido à sua disponibilidade comercial e baixo custo, além de alta reatividade (MIGNEAULT, 2004) e maior eficiência na introdução de ligações cruzadas, quando comparado a outros

aldeídos (BOWES e CATER, 1965). Apesar de ser largamente utilizado, a química do glutaraldeído tem sido controversa e sua estrutura simples não é indicativa da sua reatividade e da complexidade de seu comportamento em soluções aquosas (MIGNEAULT, 2004).

O glutaraldeído em soluções aquosas forma uma complexa mistura de sua forma monomérica, já mostrada na Figura 3.11, formas mono e dihidratadas, hemiacetais cíclicos (monoméricos e poliméricos) e polímeros α,β -insaturados. (WOODROOF, 1978; GOISSIS, 2006). A existência de todas essas espécies em equilíbrio faz com que, apesar de toda a literatura tratando de uso de glutaraldeído para preservação de tecidos, ainda não se tenha chegado a um consenso sobre as principais espécies reativas e o mecanismo de reação exato. Por isso, procedimentos de fixação utilizando glutaraldeído são largamente desenvolvidos empiricamente (MIGNEAULT, 2004).

3.2.4 Calcificação de Biopróteses Fixadas com Glutaraldeído

A calcificação é a principal causa de falhas estruturais de biopróteses (GOISSIS, 2006). Estudos mostram que aproximadamente 20-30% das biopróteses tornam-se incompetentes em 10 anos e mais de 50% falham devido à degradação do tecido em até 12 anos após o implante (Schoen e Levy, 1999 *apud* MERCURI *et al*, 2006).

A calcificação é o processo no qual são formados depósitos de fosfatos de cálcio e outros minerais associados no tecido biológico. Esse processo é normalmente seguido de estenose ou rompimento da cúspide com regurgitação, podendo levar à falha da válvula (LEE *et al*, 1998). Os fatores determinantes para a calcificação de biopróteses e outros biomateriais incluem fatores relacionados a metabolismo do indivíduo, estrutura e química do implante e fatores mecânicos. Calcificação acelerada está associada a indivíduos jovens, fixação com glutaraldeído e stress mecânico (SCHOEN e LEVY, 2005).

O processo de calcificação é um evento de múltiplas etapas e possui características semelhantes às de formação de tecido ósseo. Este possui duas fases importantes: a nucleação e a propagação de cristais. A nucleação, evento crítico deste processo, é provavelmente originada pela reação do cálcio plasmático com fosfato orgânico presente no tecido natural reticulado. A propagação do cristal depende essencialmente

das concentrações de cálcio e fosfato disponíveis no tecido, associadas á presença de inibidores ou aceleradores.

Métodos para a redução de calcificação de biopróteses fixadas com glutaraldeído vêm sendo propostos e utilizados. Entre eles, o enxágüe do tecido para remoção do glutaraldeído residual (NIMNI, 2000) e o tratamento com etanol, que mostrou-se eficiente na redução de calcificação e atua pela alteração da estrutura do colágeno tipo I e remoção de lipídios (LEE, 1998 e VYAVAHARE, 2000).

3.3 Métodos de Análise de Tecido Biológico

3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia utiliza atualmente toda a extensão do espectro de radiação eletromagnética, que vai desde os raios gama e raios X, passando pela luz ultravioleta, visível e infravermelha, até as microondas e ondas de rádio. A interação da radiação com a matéria pode levar a seu redirecionamento e/ou a transições entre níveis de energia de átomos e moléculas (MANSUR, 2006).

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier monitora o espectro da radiação eletromagnética após passar por uma amostra. A energia da radiação é variada na faixa desejada e a resposta é plotada em forma de espectro como uma função da energia de radiação ou freqüência. A região do Infravermelho no espectro eletromagnético engloba radiações com números de onda de 12.800cm^{-1} a 10cm^{-1} , podendo ser dividida em radiação do infravermelho próximo (12.800cm^{-1} a 4.000cm^{-1}), médio (4.000cm^{-1} a 200cm^{-1}) ou distante (200cm^{-1} a 10cm^{-1}) (MANSUR, 2006).

Estudos prévios utilizaram o FTIR para a caracterização de tecidos biológicos fixados com glutaraldeído destinados a aplicações em biopróteses cardíacas. Uma vez que o colágeno tipo I é o principal constituinte do tecido de cúspides porcinas e pericárdio bovino, o espectro na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ foi examinado com o objetivo de analisar as diferenças na conformação do colágeno promovidas pelo tratamento com glutaraldeído (VYAVAHARE *et al*, 1997; CONNOLLY *et al*, 2005).

Conforme a literatura (Chittur 1998, Lu *et al* 1994 e Malmsten 1998 *apud* ANDRADE *et al*, 2006 e 2007), o grupo peptídico, a unidade de repetição de proteínas, possui 9 bandas características identificadas como amidas (A, B, I, II, ... VII). As Amidas tipos I e II são as duas principais bandas do espectro FTIR de proteínas. A banda da Amida tipo I varia de 1600 a 1700 cm^{-1} , conforme mostrado na Figura 3.15, em espectros obtidos para proteínas. A banda da Amida tipo II pode ser encontrada na faixa entre 1500 e 1600 cm^{-1} e a banda da Amida tipo III, geralmente fraca no espectro FTIR, pode ser encontrada na faixa entre 1250 e 1350 cm^{-1} (VYAVAHARE *et al*, 1995; ANDRADE *et al*, 2006 e 2007).

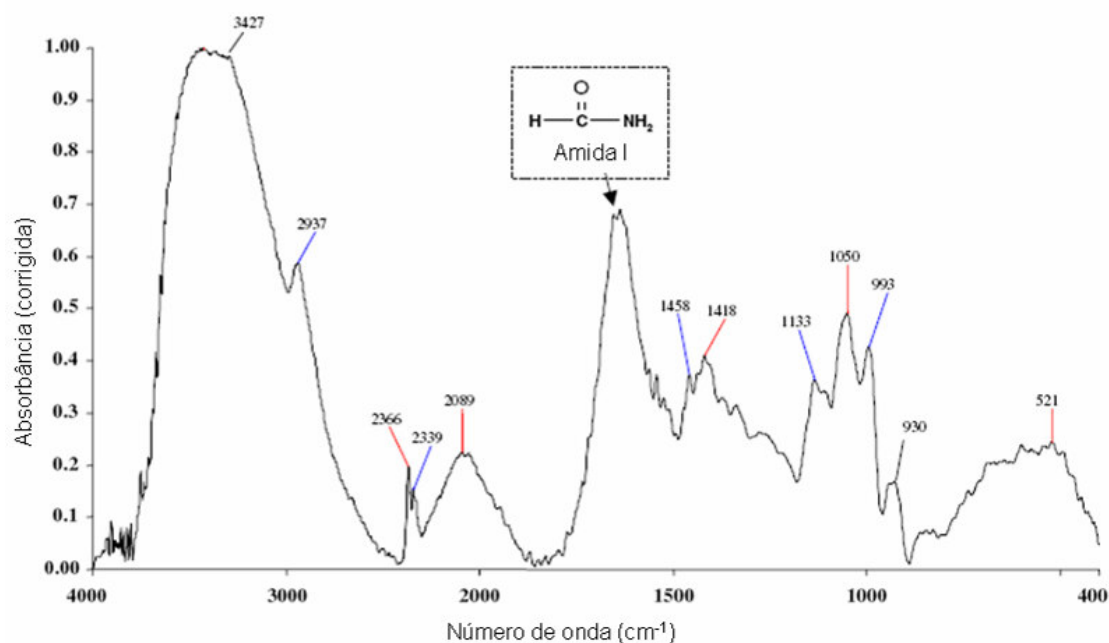


Figura 3.15 – Espectro FTIR de Antígeno Herpesvírus Bovino BoHV-1 Purificado e Caracterizado (Adaptado de ANDRADE *et al*, 2006)

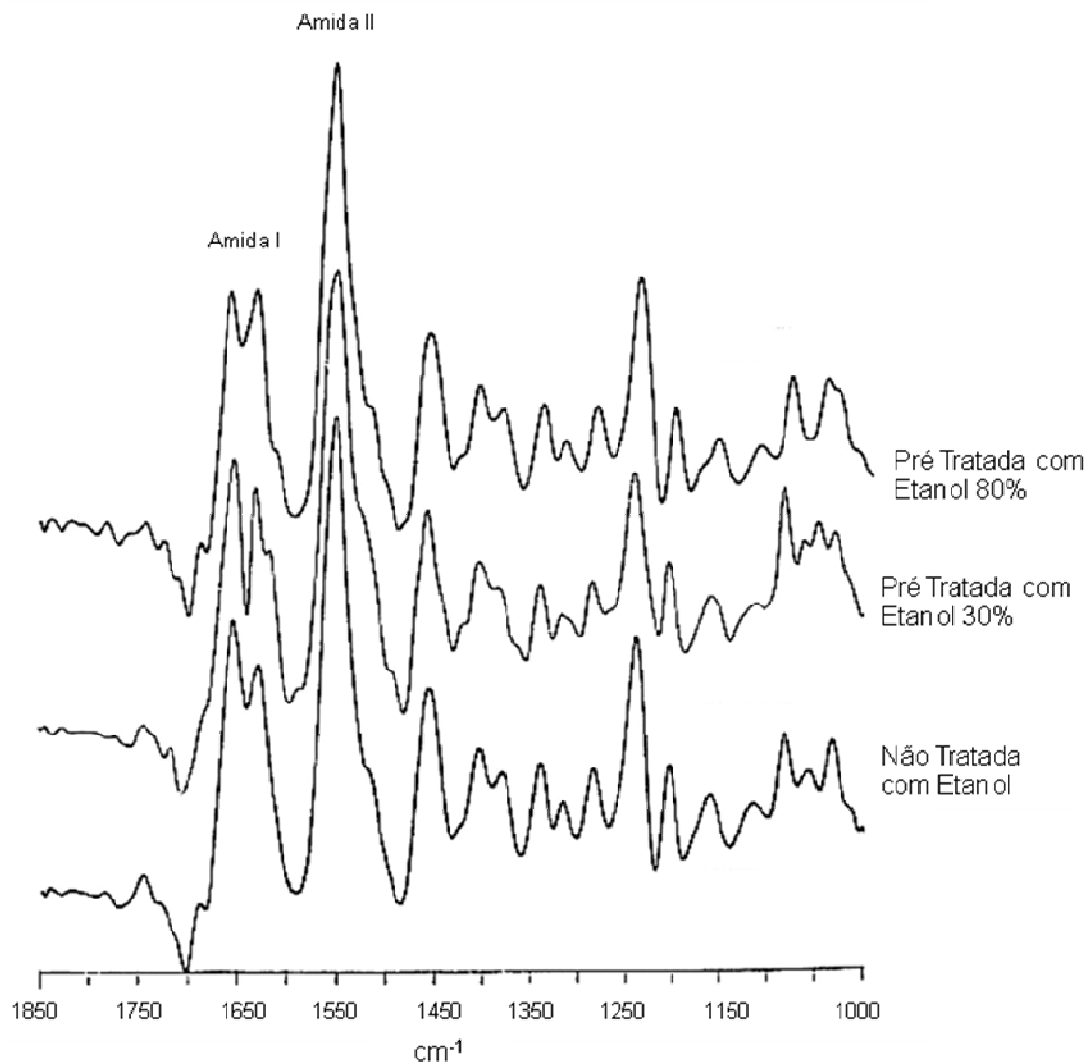


Figura 3.16 – Espectro FTIR de Cúspides Porcinas Fixadas com Glutaraldeído Pré-Tratadas e Não-Tratadas com Etanol (Adaptado de VYAVAHARE *et al*, 1997)

Trabalhos prévios (VYAVAHARE *et al*, 1995; Chittur, 1998, Lu *et al*, 1994 e Malmsten 1998 *apud* ANDRADE *et al*, 2006 e 2007) estudaram as bandas de Amida Tipo I, que é associada principalmente com a vibração de estiramento (*stretching*) da ligação C-O, e Amida Tipo II, que é resultado das vibrações de deformação angular (*bending*) da ligação N-H e de estiramento da ligação C-N, conforme mostrado na Figura 3.16.

A reação de reticulação química de colágeno tipo I ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amina ($-\text{NH}_2$) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando a

ligação C=N da imina, conforme mostrado na Figura 3.17. Essa reação, a base de Schiff, pode ser verificada pelas bandas 1630 e 1550 cm^{-1} associadas aos grupos C=N e NH₂, respectivamente (Costa e Mansur, 2008; Rokhade *et al* 2007; Wang *et al* 2004 *apud* COSTA-JÚNIOR *et al*, 2008).

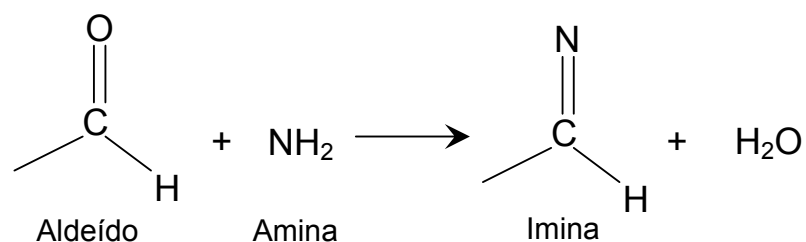


Figura 3.17 – Esquema de Reação Base de Schiff

Uma análise quantitativa para comparação das intensidades observadas para bandas em diferentes espectros pode ser feita obtendo-se os valores relativos de tais bandas. Para tal, divide-se a absorvância dos picos analisados pela absorvância de um pico que não sofrerá alteração devido ao processo sendo investigado. COSTA-JÚNIOR *et al*, 2008, investigaram a variação da intensidade relativa da banda de imina para amostras de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído a diferentes concentrações, conforme mostrado na Figura 3.18. O trabalho mostrou o aumento da intensidade relativa dessa banda com a exposição ao glutaraldeído, comprovando a reação do grupo amina da quitosana com o aldeído e, conseqüentemente, o aumento do grau de reticulação do material (COSTA-JÚNIOR *et al*, 2008)..

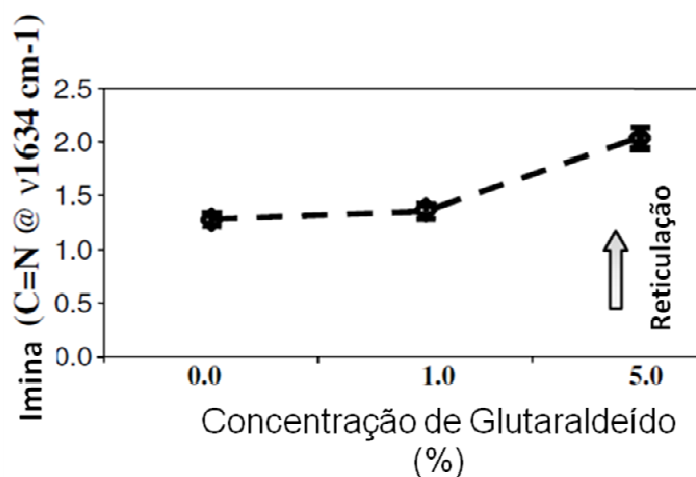


Figura 3.18 – Evolução da Intensidade Relativa da Banda de Imina de Quitosana Reticulada com Glutaraldeído (Adaptado de COSTA-JÚNIOR *et al*, 2008)

Outros picos importantes a serem examinados nos espectros FTIR são aqueles relacionados à vibração de estiramento da ligação C-H de aldeídos, conforme mostrado na Figura 3.19. Esses picos surgem na faixa de 2860 e 2730 cm^{-1} e podem ser utilizados para analisar a reação de fixação promovida pelo glutaraldeído (ANDRADE *et al*, 2006 e 2007).

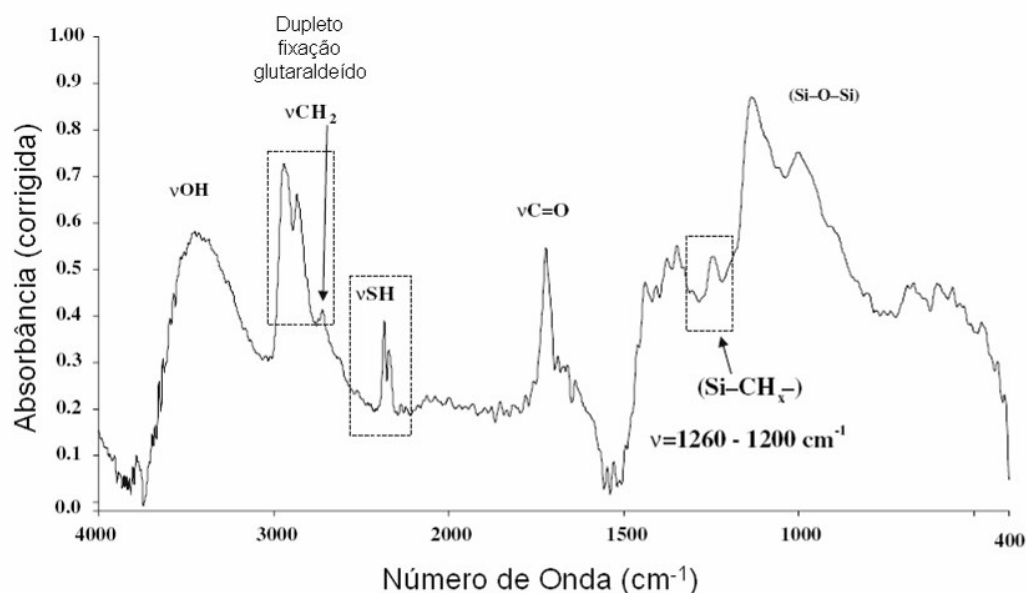


Figura 3.19 – Espectro FTIR de Híbrido de PVA Modificado por Tiol e Fixado com Glutaraldeído (Adaptado de ANDRADE *et al*, 2007)

Outro pico a ser avaliado nos espectros FTIR é pico encontrado a 1150 cm^{-1} . O glutaraldeído pode reagir com os grupos OH do colágeno formando o acetal, conforme mostrado na Figura 3.20. Essa reação é evidenciada pelo aumento significativo da banda associada ao grupo O-C-O, que aparece em 1150 cm^{-1} .

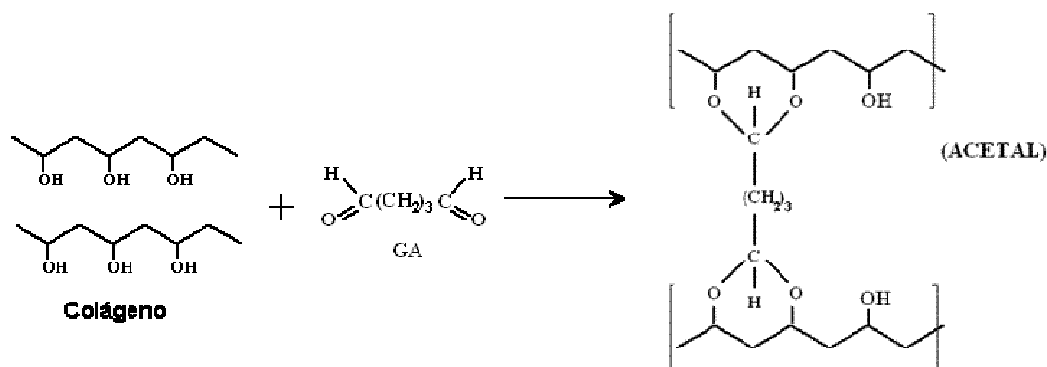


Figura 3.20 – Esquema de Reação de Formação de Acetal (Adaptado de MANSUR *et al*, 2008)

3.3.2 Testes *in vitro*: Intumescimento

O teste de intumescimento (*swelling*) é utilizado para avaliar a capacidade de um material de preservar água e consiste na imersão da amostra em água ou solução tamponada seguida do cálculo da “Taxa de intumescimento”, conforme mostrado a seguir:

$$\text{Taxa de intumescimento} = \frac{w - w_0}{w_0} \times 100$$

sendo w o peso final e
 w_0 o peso inicial da amostra

Estudos prévios utilizaram o teste de intumescimento em filmes e matrizes de colágeno para avaliar a densidade de ligações cruzadas (CHARULATHA e RAJARAM, 2003; MA *et al*, 2003; ROUSSEAU e GAGNIEU, 2002). Foi demonstrado que a capacidade de intumescimento do material decresce com a introdução de ligações cruzadas e, no caso de colágeno fixado com glutaraldeído, a concentração da solução não afeta significativamente o comportamento da amostra, conforme mostrado na Figura 3.21 (MA *et al*, 2003).

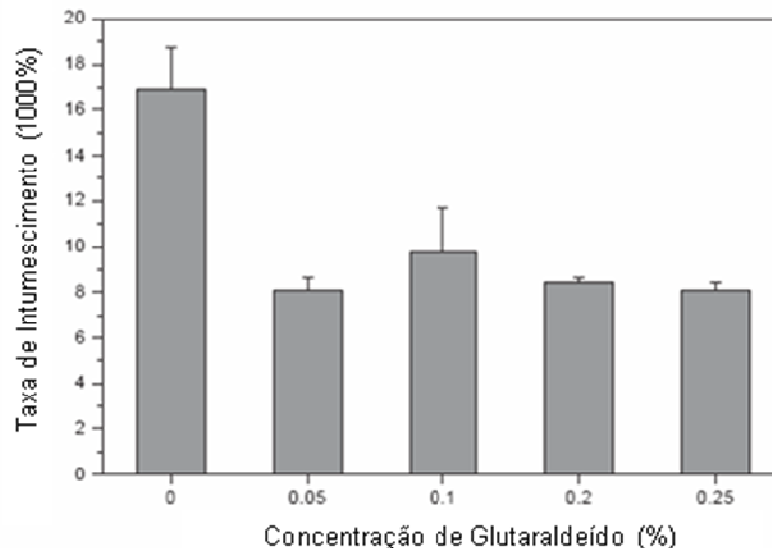


Figura 3.21 – Valores Médios de Taxa de Intumescimento de Matrizes Colágeno/Quitosana Fixadas com Glutaraldeído a Diferentes Concentrações (Adaptado de MA *et al*, 2003)

3.3.3 Difração de Raios X (XRD)

Raios X são radiações eletromagnéticas de curto comprimento de onda produzidas pela desaceleração de elétrons de alta energia ou pela transição eletrônica envolvendo elétrons nos orbitais internos dos átomos. A difração acontece quando um feixe paralelo de radiação passa por uma fenda ou orifício e corresponde à mudança de direção de uma onda por centros de espalhamento cujos espaçamentos são aproximadamente do mesmo tamanho do comprimento de onda da radiação eletromagnética. Considerando que os cristais apresentam um reticulado ordenado com os espaçamentos conhecidos como d_{hkl} entre os planos de átomos (hkl), é possível a ocorrência de difração nestes planos cristalinos desde que o comprimento de onda da radiação seja da ordem de 0,1nm. Desta forma, é possível a caracterização da estrutura cristalina de um material através da difração de raios X (MANSUR, 2006).

O XRD é uma técnica usada para identificar as fases cristalinas presentes em um material pois cada sólido cristalino tem seu padrão único de difração de raios X que pode ser usado como uma “impressão digital” para sua identificação. A técnica permite, ainda, a medida de propriedades estruturais dessas fases, tais como tamanho do grão e composição da fase.

Estudos prévios utilizaram a XRD para a caracterização de quitosana fixada com glutaraldeído para possível uso em aplicações biomédicas. A cristalinidade dos materiais foi estimada pelo cálculo da razão entre as áreas sob os halos (COSTA-JUNIOR *et al*, 2009), conforme mostrado na Figura 3.22.

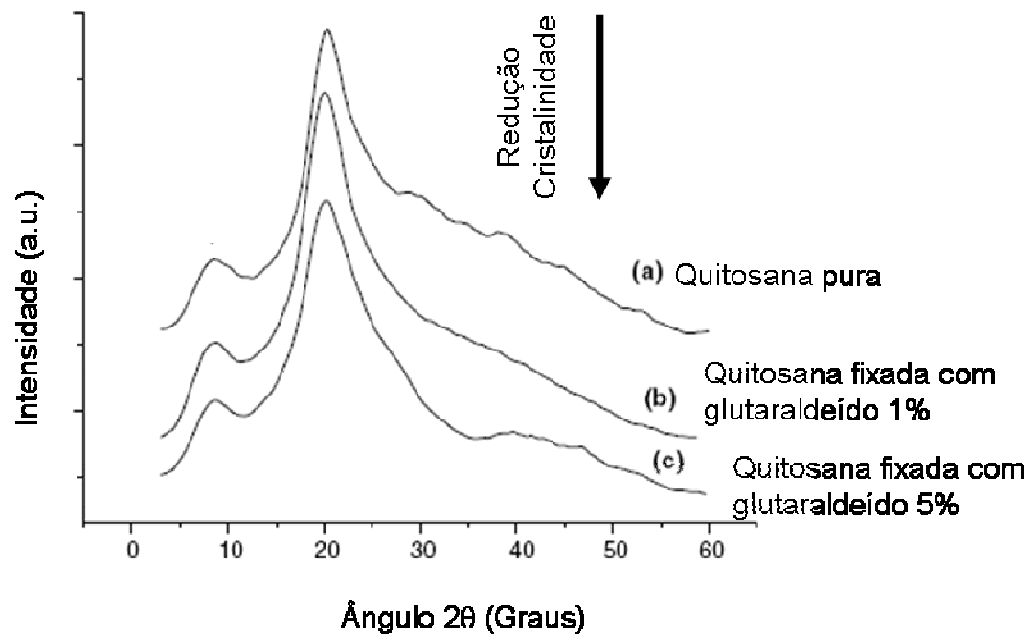


Figura 3.22 – Padrões de Difração de Raios X para Filmes de Quitosana Pura e Fixada com Glutaraldeído

(Adaptado de COSTA-JUNIOR *et al*, 2009)

A difração de raios X também já foi utilizada para avaliar a formação de composto entre componentes inorgânico e orgânico, conforme mostrado na Figura 3.23.

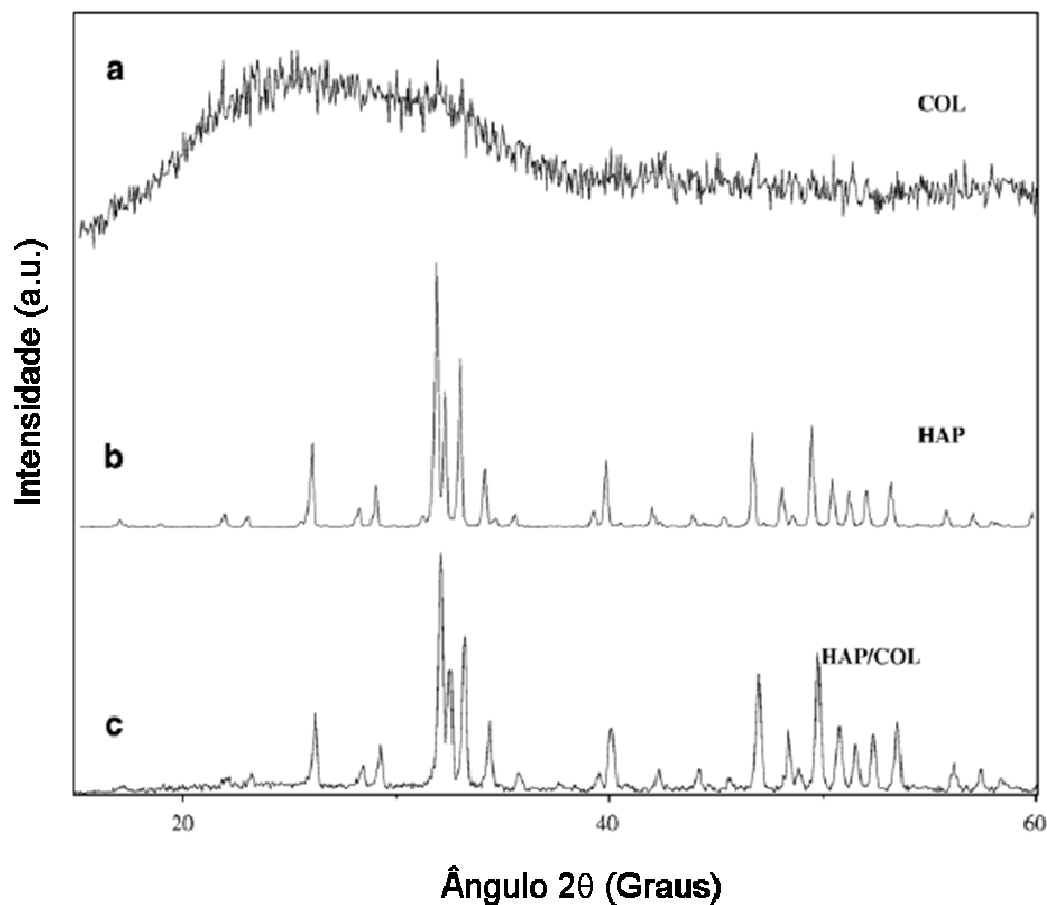


Figura 3.23 – Padrões de Difração de Raios X para Colágeno, Hidroxiapatita e seu Compósito (Adaptado de SANTOS *et al*, 2008)

O padrão mostrado na Figura 3.23(c) demonstra a interação na formação do compósito de hidroxiapatita, a fase inorgânica cristalina, e colágeno, a fase orgânica amorfa. O padrão do compósito apresenta halos com menor definição e com presença de fase amorfa, quando comparado ao padrão de hidroxiapatita pura, padrão 3.23(b) (SANTOS *et al*, 2008).

Outros estudos utilizaram a difração de raios X para caracterizar as microestruturas de pericárdio bovino fresco e fixado à diferentes concentrações de glutaraldeído, conforme mostrado na Figura 3.24. Na escala de 2θ , os picos de maiores intensidades para as amostras testadas foram os picos em 7° , entre 21° e 23° e em aproximadamente 30° . Entretanto, somente no pico em torno de 7° é possível perceber

algumas mudanças significativas entre material fresco e os fixados. Foi observada uma diminuição desse pico com o aumento da concentração de glutaraldeído, atribuída ao aumento das ligações cruzadas e, conseqüentemente, da desorganização das moléculas de colágeno (JARDIM et al, 2008).

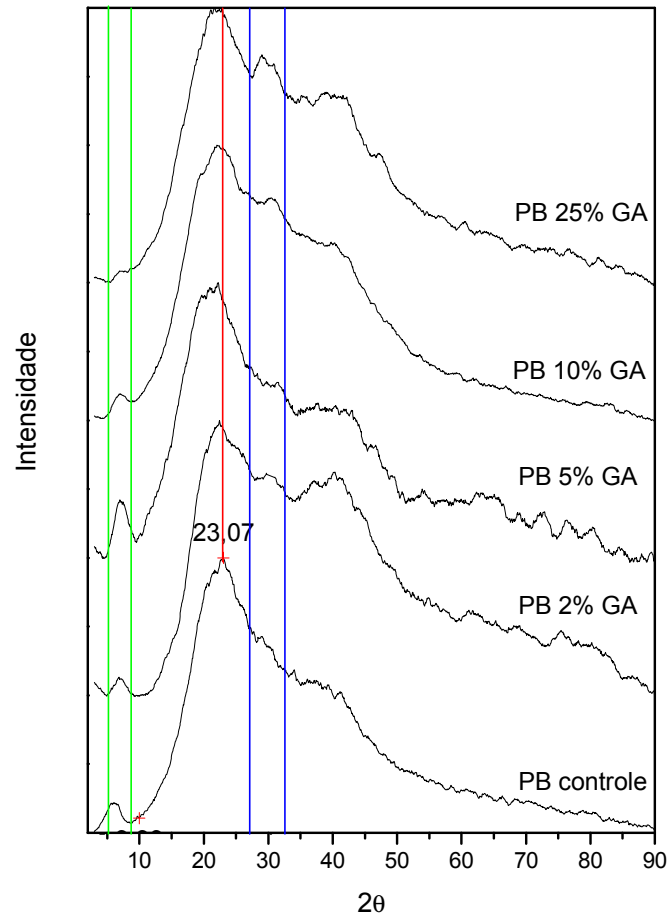


Figura 3.24 – Padrões de Difração de Raios X para Pericárdio Bovino Fresco e Fixado com Glutaraldeído (JARDIM et al, 2008)

4. METODOLOGIA

Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram analisadas na Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1 Processamento das Amostras

As principais etapas do processamento de tecidos porcino e de pericárdio bovino estão mostradas no fluxograma a seguir.

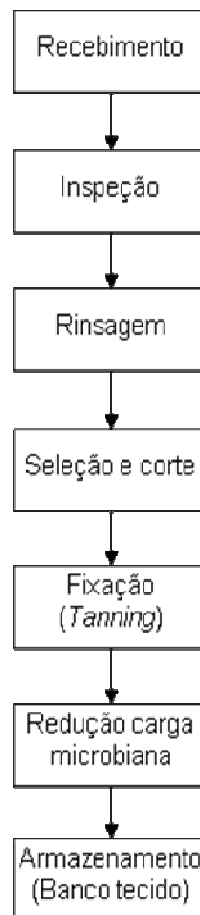


Figura 4.1 – Etapas de Processamento de Tecido

Recebimento e Inspeção

As cúspides porcinas e o pericárdio bovino foram coletados e imediatamente lavados com água para remover vestígios de sangue. O material coletado foi armazenado, transportado e recebido em Solução Salina com 0,2% de Álcool Benzílico, preparada com Álcool Benzílico 99% da JT Baker.

Enxague

O material biológico recebido foi enxaguado duas vezes em solução salina por um período de 30 minutos por enxague.

Seleção e Corte

O tecido recebido foi inspecionado e quanto à homogeneidade do tecido, uniformidade, zonas gelatinosas, bolhas de fluido, depósitos de calcificação, furos, fenestrações e descolorações.

Fixação

Os tecidos porcino e bovino foram imersos em solução de Glutaraldeído preparada a partir de Glutaraldeído 25% p/p da Sigma-Aldrich. A concentração das soluções de reticulação utilizadas, bem como o tempo de imersão, variaram em cada experimento e estão especificadas na descrição de cada um deles.

Redução de Carga Microbiana

Os tecidos porcino e bovino foram imersos por 24 horas em solução de Formaldeído 10% p/p preparada a partir de Formaldeído 37% p/p da F. Maia.

Armazenamento

Os tecidos porcino e bovino removidos da redução de carga microbiana foram enxaguados e armazenados em solução de Glutaraldeído 0,2% p/p preparada a partir

de Glutaraldeído 25% p/p da Sigma-Aldrich. O tempo de armazenamento variou em cada experimento e está especificado na descrição de cada um deles.

4.2 Preparação das Amostras

As amostras coletadas nas diversas etapas dos processos foram enxaguadas com solução de Cloreto de Sódio 0,9% p/p para a remoção de toda a solução de glutaraldeído. Após o enxágue, as amostras foram armazenadas em solução fresca de Cloreto de Sódio 0,9% p/p por, no máximo, 2 dias.

As amostras foram, então, secas em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com umidade de 30% por 4 horas.

4.3 Tabelas de Experimentos

As amostras para caracterização foram coletadas nas Etapas de Fixação e Armazenamento.

As amostras foram produzidas considerando-se 2 variáveis:

1. Tempo
2. Concentração da solução de glutaraldeído

As amostras foram coletadas conforme descrito nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.5.

4.3.1 Variável *Tempo*

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito do tempo de processamento em amostras fixadas e armazenadas em soluções de Glutaraldeído. Para o tecido porcino, a solução de fixação foi Glutaraldeído 0,4% p/p. Para o pericárdio bovino, a solução de fixação foi Glutaraldeído 0,65% p/p.

As amostras da categoria “Não Reticulado” não foram expostas a Solução de Glutaraldeído. Após serem coletadas, foram armazenadas em Solução de Cloreto de Sódio 0,9% p/p até o momento de seu processamento para teste.

As amostras da categoria “Fixação” passaram por processo de fixação durante um período de tempo de até 22 dias. Após serem removidas de sua respectiva solução de fixação, foram armazenadas em Solução de Cloreto de Sódio 0,9% p/p até o momento de seu processamento para teste.

As amostras da categoria “Armazenamento” passaram por processo de fixação e, após serem removidas de sua respectiva solução de fixação, foram armazenadas em Solução de Glutaraldeído 0,2% p/p pelo período de tempo indicado nas Tabelas 4.1 e 4.2. Para amostras armazenadas por períodos superiores a 180 dias, a solução de armazenamento foi substituída por solução fresca de Glutaraldeído 0,2% p/p a cada 6 meses, aproximadamente. Após esse período, as amostras foram armazenadas em Solução de Cloreto de Sódio 0,9% p/p e secas em estufa.

Os períodos de tempo de Fixação e Armazenamento foram escolhidos aleatoriamente.

As amostras das categorias “Fixação” e “Armazenamento” foram produzidas conforme descrito nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 – Tabela de Experimento: Variável **Tempo**
Cúspides Porcinas

TEMPO DE PROCESSAMENTO		FTIR	INTUMESCIMENTO	XRD
FIXAÇÃO	0 dias (não reticulado)	3	3	0
	2 dias	0	3	0
	15 dias	3	3	3
ARMAZENAMENTO	16 dias	0	3	0
	60 dias	0	3	0
	90 dias	3	3	3
	180 dias	0	3	0
	240 dias	0	3	0
	360 dias	0	3	0
	900 dias	3	3	3
TOTAL:		9 amostras	30 amostras	9 amostras

Tabela 4.2 – Tabela de Experimento: Variável **Tempo**
Pericárdio Bovino

TEMPO DE PROCESSAMENTO		INTUMESCIMENTO	FTIR
FIXAÇÃO	0 dias (não reticulado)	3	3
	5 dias	3	0
	15 dias	3	0
	22 dias	3	0
ARMAZENAMENTO	16 dias	3	3
TOTAL:		15 amostras	6 amostras

As amostras das categorias “Fixação” e “Armazenamento” foram identificadas conforme descrito nas Tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3 – Identificação de Amostras: Variável **Tempo**
Cúspides Porcinas

CATEGORIA	TEMPO REAL DE PROCESSAMENTO	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS
NÃO RETICULADO	0 dias	PF1
FIXAÇÃO	2 dias	PT1
	15 dias	PT2
ARMAZENAMENTO	16 dias	PB1
	60 dias	PB2
	90 dias	PB3
	180 dias	PB4
	240 dias	PB5
	360 dias	PB6
	900 dias	PB7

Tabela 4.4 – Identificação de Amostras: Variável **Tempo**
Pericárdio Bovino

	TEMPO REAL DE PROCESSAMENTO	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS
NÃO RETICULADO	0 dias	BF1
FIXAÇÃO	5 dias	BT1
	15 dias	BT2
	22 dias	BT3
ARMAZENAMENTO	16 dias	BB1

4.3.2 Variável **Concentração da Solução de Glutaraldeído**

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da concentração da Solução de Glutaraldeído utilizada para a fixação do material biológico.

Cúspides porcinas foram fixadas com soluções de Glutaraldeído a 0,2%, 0,4% e 0,65% p/p por 26 dias, conforme mostrado na Tabela 4.5. O período de tempo de Fixação foi escolhido aleatoriamente. Após serem removidas de sua respectiva solução de fixação, as amostras foram armazenadas em Solução de Cloreto de Sódio 0,9% p/p por e secas em estufa.

Tabela 4.5 – Tabela de Experimento: Variável **Concentração de Glutaraldeído**
Cúspides Porcinas

CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO	FTIR	INTUMESCIMENTO
Glutaraldeído 0,2%	3	6
Glutaraldeído 0,4%	3	6
Glutaraldeído 0,65%	3	6
TOTAL:	9 amostras	18 amostras

As amostras fixadas com as diferentes soluções de Glutaraldeído foram identificadas conforme descrito na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Identificação de Amostras: Variável **Concentração**
Cúspides Porcinas

SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS
GLUTARALDEÍDO 0,2%	PG02
GLUTARALDEÍDO 0,4%	PG04
GLUTARALDEÍDO 0,65%	PG065

4.4 Metodologias de Análise

As amostras coletadas foram analisadas conforme as metodologias apresentadas a seguir.

4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada para avaliar alterações de grupos químicos do tecido causadas pelo processamento e fixação. Os espectros FTIR foram obtidos na faixa entre 4000 e 650 cm^{-1} (Perkin-Elmer, Paragon, 1000) utilizando o Método de Reflectância Total Atenuada (cristal ZnSe, ATR-FTIR).

Foram observadas, principalmente, alterações nos picos das Amidas tipo I (1600 a 1700 cm^{-1}) e II (1500 a 1600 cm^{-1}) e no duplete de fixação com glutaraldeído (2860 a 2730 cm^{-1}).

4.4.2 Testes in vitro: Intumescimento

Os testes de intumescimento analisaram a variação da capacidade dos tecidos absorverem solução tamponada com o processo de fixação.

Amostras de tecido porcino e pericárdio bovino foram secas em estufa, pesadas e colocadas em frascos, a temperatura ambiente (20-25°C). Solução tamponada de fosfato (PBS) com 4,3 mM de Fosfato de Sódio Monohidratado Monobásico, 137 mM de Cloreto de Sódio, 2,7 mM de Cloreto de Potássio e 1,4 mM de Fosfato de Potássio Monobásico foi preparada conforme descrito a seguir:

1. Foram medidos 800mL de água purificada por Osmose Reversa com uma proveta e transferidos para um Erlenmeyer
2. Uma barra magnética foi adicionada ao Erlenmeyer e o frasco foi colocado no agitador magnético.
3. Foram transferidos para o frasco:
 - a. 8,0g de NaCl (Cloreto de Sódio)
 - b. 0,2g de KCl (Cloreto de Potássio)
 - c. 1,44g de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Monohidratado Monobásico)
 - d. 0,25g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de Potássio Monobásico)
4. Os sais foram misturados até que não houvesse partículas não-dissolvidas de sais na solução.
5. Após a completa dissolução dos sais, o pH foi medido com pHmetro calibrado. O pH da solução ficou entre 7,2 e 7,4. Quando necessário, foram adicionados gota a gota soluções 1M de HCl ou NaOH até que o pH atingisse a faixa desejada.
11. A solução foi transferida para um balão volumétrico limpo e completado o volume para 1 litro com água purificada por Osmose Reversa.

Um volume fixo de 50mL de solução tamponada de fosfato foi colocado em cada um dos frascos de amostras. As amostras foram removidas após 60 minutos, retirou-se o excesso de solução da superfície com pano de baixa fibra e aguardou-se 5 minutos até que a massa estabilizasse. As amostras foram, então, pesadas novamente. Após a pesagem, as amostras retornaram para o frasco com solução. Após decorridos totais

360 minutos, o processo de pesagem foi repetido. A taxa de intumescimento foi calculada para cada amostra, para cada tempo de imersão.

4.4.3 Difração de Raios X (XRD)

As análises de Difração de Raios X foram feitas em Difratorômetro Philips Modelo PW1710, utilizando radiação monocromatizada K_{α} Cu e tubo operacional com tensão e corrente de 40kV e 55mA, respectivamente. A análise foi conduzida com 2θ variando de 3,01 a 90,00° com passo de 0,06°.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variável Tempo

5.1.1 Cúspides Porcinas

As amostras de cúspides porcinas foram analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (XRD) e Teste de Intumescimento.

5.1.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados obtidos por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) estão apresentados a seguir.

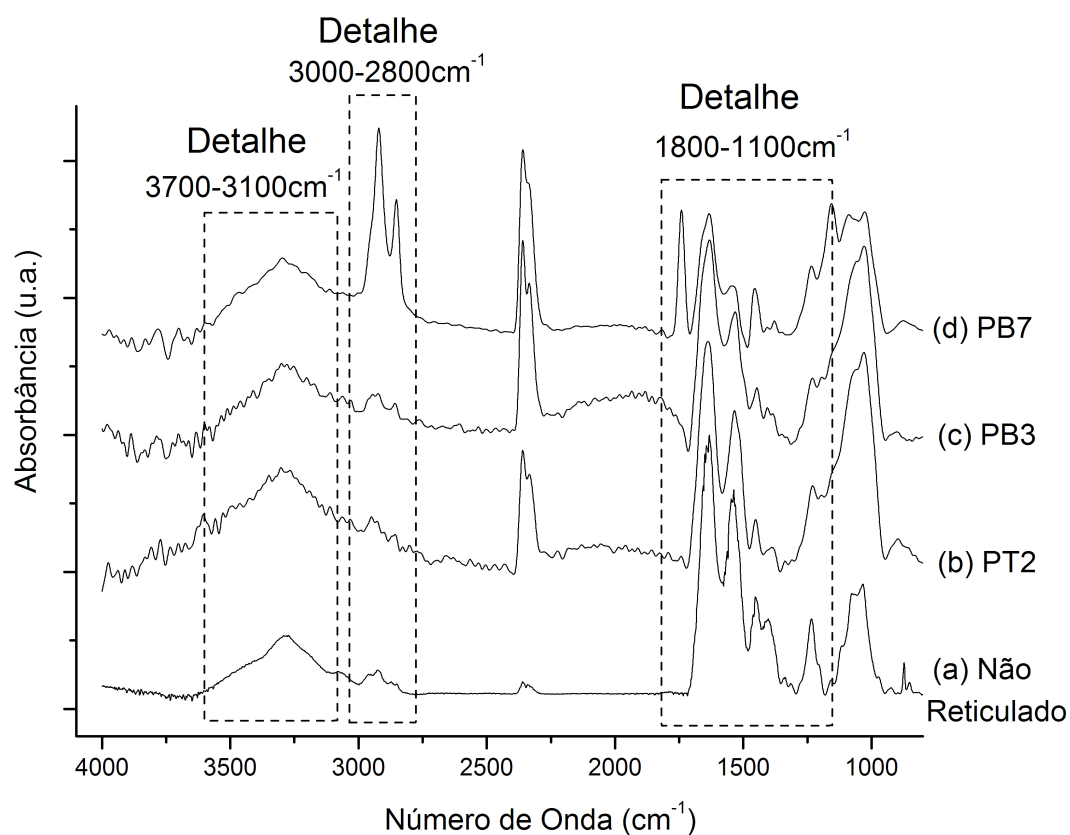


Figura 5.1 – Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas

A figura 5.1 apresenta os espectros de cúspide não reticulada, fixada (PT2), fixada e armazenada por adicionais 90 dias (PB3) e fixada e armazenada por adicionais 900 dias (PB7).

Observa-se um alargamento da banda entre 3200 e 3400cm^{-1} , normalmente atribuída ao estiramento do OH e do NH_2 , com o aumento da exposição ao glutaraldeído. O aumento da exposição ao glutaraldeído e o conseqüente aumento da reticulação provocou um grande aumento na banda a 1730cm^{-1} , associada à carbonila, e no duplete entre as frequências de 2920 a 2850cm^{-1} , associado ao estiramento dos grupos C-H.

Com a reticulação, observa-se alargamento das bandas associadas às amidas I, II e III a 1630 , 1550 e 1253cm^{-1} , respectivamente, e aumento da banda associada ao grupo acetal, a 1150cm^{-1} .

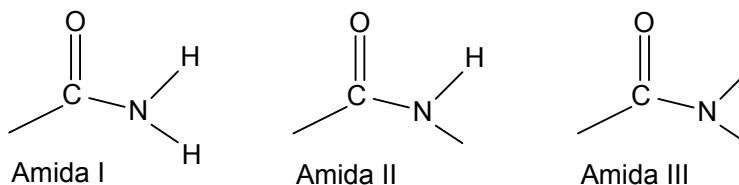


Figura 5.2 – Amidas Primária, Secundária e Terciária

As Figuras 5.3 e 5.5 mostram detalhes das regiões 1800 - 1100 e 3000 - 2800cm^{-1} , respectivamente.

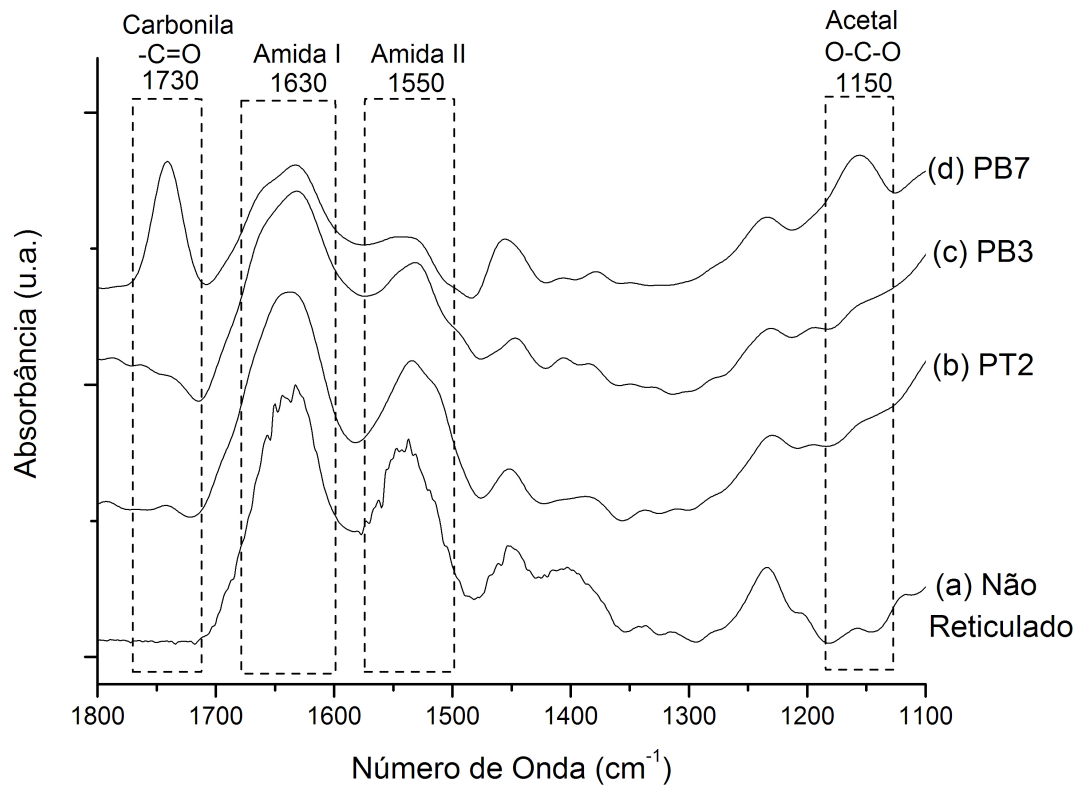


Figura 5.3 – Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas
 Detalhe Região 1800-1100 cm^{-1}

Uma análise quantitativa para comparação das intensidades observadas para as bandas nos diferentes espectros foi feita obtendo-se os valores relativos das mesmas. Os valores de absorbância obtidos para diferentes picos após normalização dos espectros são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Absorbância das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas

	PICO	AMOSTRA			
		Não reticulado	PT2	PB3	PB7
INTENSIDADE DOS PICOS ABSORBANCE (a.u.)	Acetal O-C-O 1150cm ⁻¹	<0,10	<0,10	<0,10	0,64
	δ CH ₂ 1440-1460cm ⁻¹	0,41	0,29	0,37	0,33
	-C=N 1630cm ⁻¹	1,00	0,94	0,91	0,61
	-NH ₂ 1550cm ⁻¹	0,77	0,69	0,65	0,34
	Carbonila -C=O 1730cm ⁻¹	<0,10	<0,10	<0,10	0,62
	Dupleto (1 de 2) 2850cm ⁻¹	<0,10	<0,10	<0,10	0,66
	Dupleto (2 de 2) 2920cm ⁻¹	<0,10	<0,10	<0,10	0,92

Dividindo a absorbância dos picos de -C=N e -NH₂ pela absorbância do pico de dobramento de CH₂ (δ CH₂), selecionado por ser abundante na cadeia e não sofrer reticulação com glutaraldeído, obtém-se os valores apresentados na Tabela 5.2:

Tabela 5.2 – Absorbância Relativa das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas

	PICO	Não reticulado	PT2	PB3	PB7
I / I _{δCH₂}	-C=N 1630cm ⁻¹	2,45	3,23	2,45	0,20
	-NH ₂ 1550cm ⁻¹	1,87	2,37	1,75	0,12

Dividindo o valor relativo de -C=N pelo valor de -NH₂ para cada amostra, tem-se os valores apresentados na Tabela 5.3:

Tabela 5.3 – Absorbância Relativa das Bandas C=N e -NH₂ dos Espectros de Cúspides Porcinas

VALOR	Não reticulado	PT2	PB3	PB7
-C=N / -NH ₂	1,30	1,37	1,40	1,77

As amostras analisadas demonstraram um aumento relativo da banda de grupos imina ($-C=N$), em 1630cm^{-1} , e queda simultânea da banda de amina ($-NH_2$) com a reticulação com glutaraldeído e, também, com o aumento do tempo de exposição à solução de estocagem de glutaraldeído. Isso comprova a reticulação e mostra a continuidade da reação mesmo após o final do processo de reticulação e estocagem em solução de glutaraldeído, conforme mostrado na Figura 5.4.

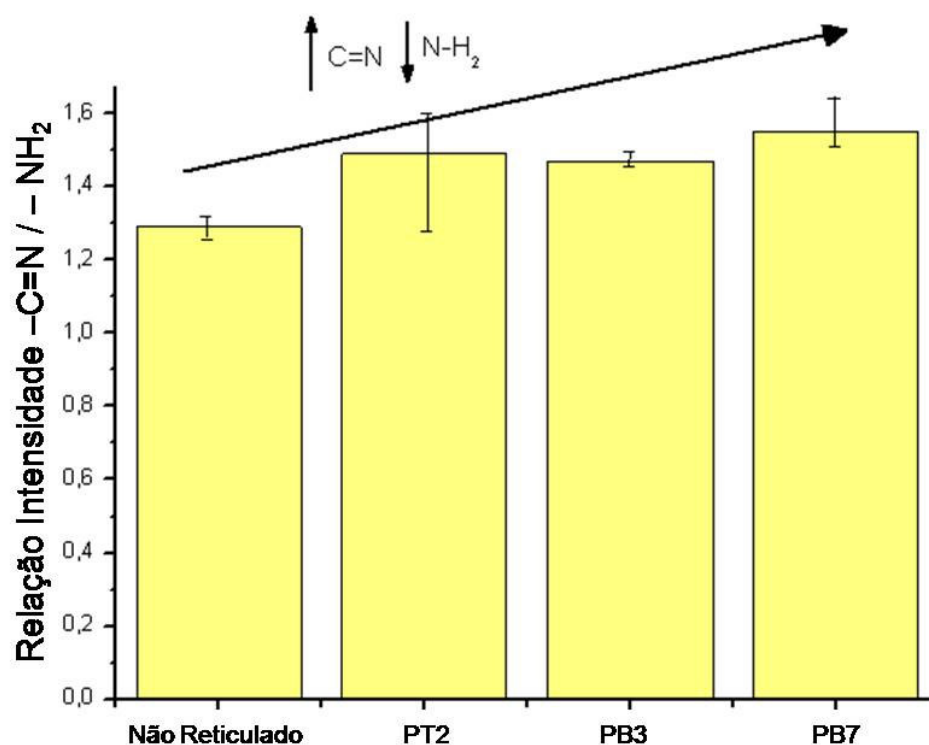


Figura 5.4 – Variação da Relação $-C=N / -NH_2$ para Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas

A partir dos espectros foi observada a banda de 1750cm^{-1} , atribuída ao grupo carbonila. O significativo aumento da intensidade dessa banda para amostras reticuladas e estocadas por longo tempo em solução de glutaraldeído (PB7) sugere que, neste caso, nem todo o glutaraldeído se ligou ao colágeno, permanecendo na forma de aldeídos livres. A comparação dessa mesma região do espectro das amostras PT2 e PB3 sugere que, para esses materiais, todo o glutaraldeído se ligou ao colágeno.

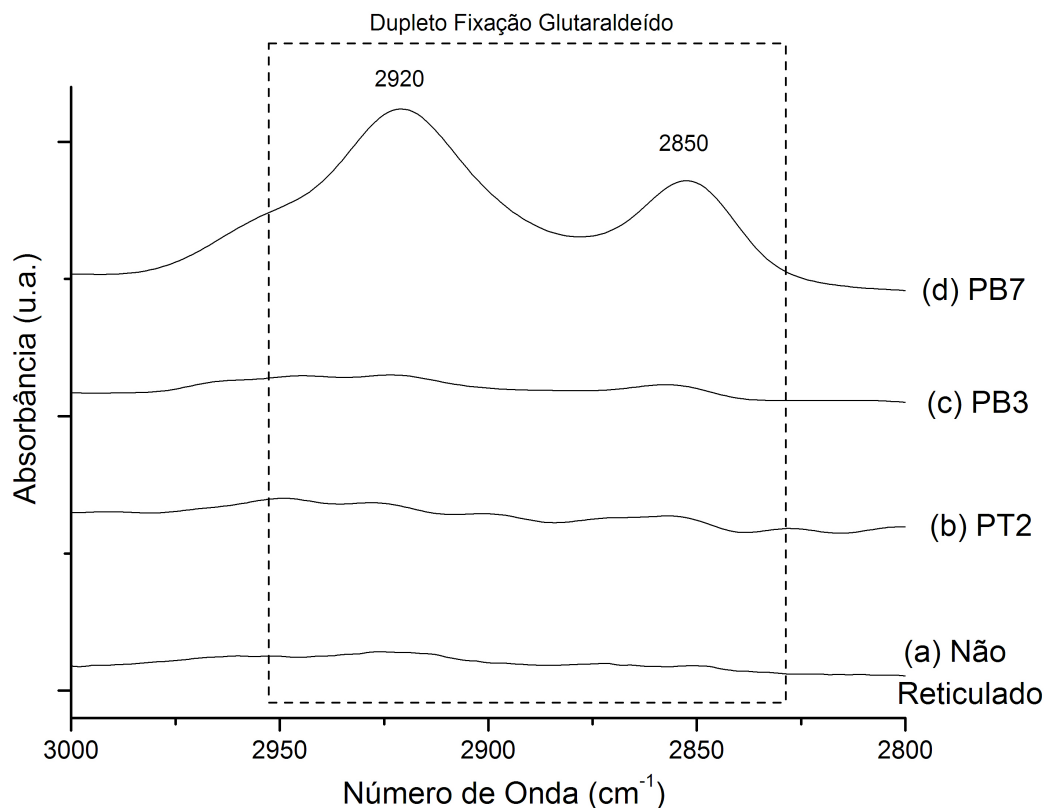


Figura 5.5 – Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas
Detalhe Região 3000-2800 cm^{-1}

A Figura 5.5 mostra o aumento da intensidade das bandas do duplete associado ao estiramento dos grupos C-H, relacionado à reticulação com glutaraldeído, entre as frequências de 2920 a 2850 cm^{-1} . O aumento significativo da intensidade desta banda para a amostra com longo período de armazenamento em glutaraldeído sugere que o mesmo ainda promove reticulações na cadeia de colágeno, mesmo após passado o período de reticulação inicial.

5.1.1.2 Testes de Intumescimento

Os resultados obtidos para os testes de intumescimento estão apresentados a seguir.

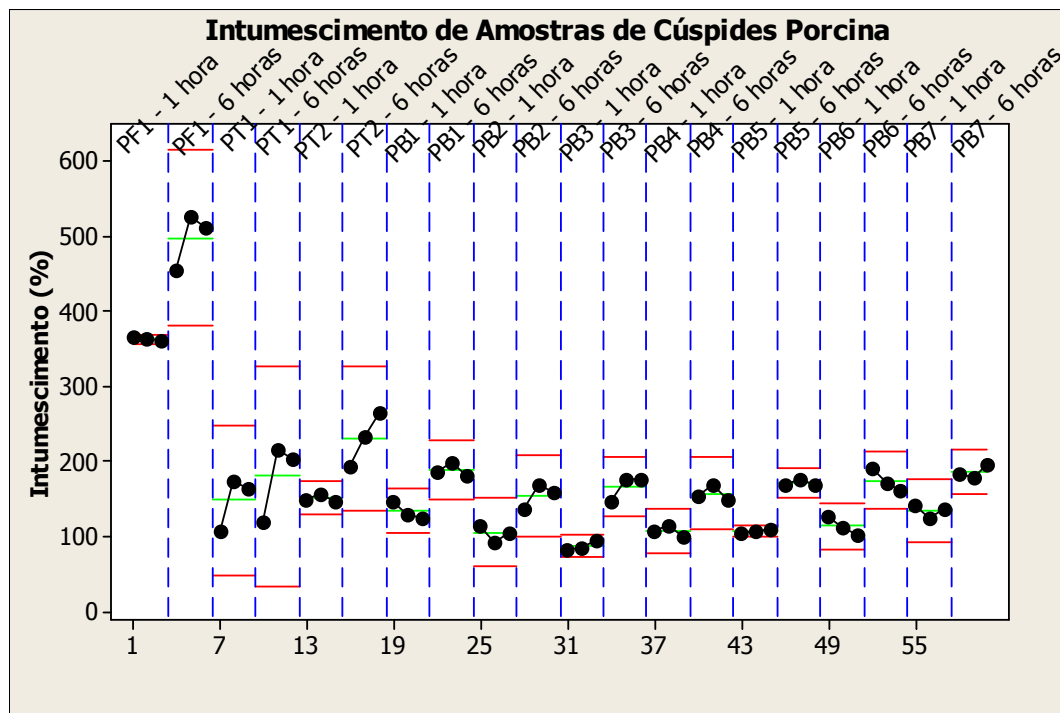


Figura 5.6 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina

A capacidade de absorção de água pelo colágeno não reticulado e reticulado pode ser atribuída tanto à sua hidrofiliicidade, quanto à manutenção de sua estrutura tridimensional. Em geral, a taxa de intumescimento diminui com a reticulação devido à redução de grupos hidrofílicos disponíveis e ao aumento da rigidez da estrutura, que leva ao aumento da dificuldade de penetração das moléculas de água (MA *et al*, 2003).

Todas as amostras apresentaram capacidade de preservação de água após serem imersas por 1 hora e 6 horas em solução PBS. As “Taxas de intumescimento” estão mostradas nas figuras 5.6, 5.7 e 5.10. Todas as amostras apresentaram taxa de intumescimento média após 6 horas superior àquelas observadas após 1 hora de imersão.

As amostras de cúspides porcinas não reticuladas apresentaram taxas de intumescimento bastante superiores às de cúspides porcinas fixadas, com média de 363,5% após 1 hora e 498,2% após 6 horas, comprovando a reticulação das cadeias provocada pelo glutaraldeído.

É importante salientar que os resultados mostram que mesmo a amostra submetida ao menor tempo de fixação (PT1, exposta à solução de glutaraldeído 0,4% por 2 dias) comprova sua reticulação. Isso confirma resultados reportados em literatura (WOODROOF EA, 1978), que mostraram que a reação de fixação ocorre rapidamente para tecidos expostos a soluções de glutaraldeído com concentrações entre 0,1 e 5%. Estudos prévios mostraram que no pH 7,4 e à temperatura ambiente, a reação de reticulação se mostrou quase completa após 1 hora de exposição ao glutaraldeído e finalizada antes de 24 horas nos resultados reportados.

Os valores médios de taxa de intumescimento de cúspides porcinas após 1 hora de imersão estão apresentados na Figura 5.7.

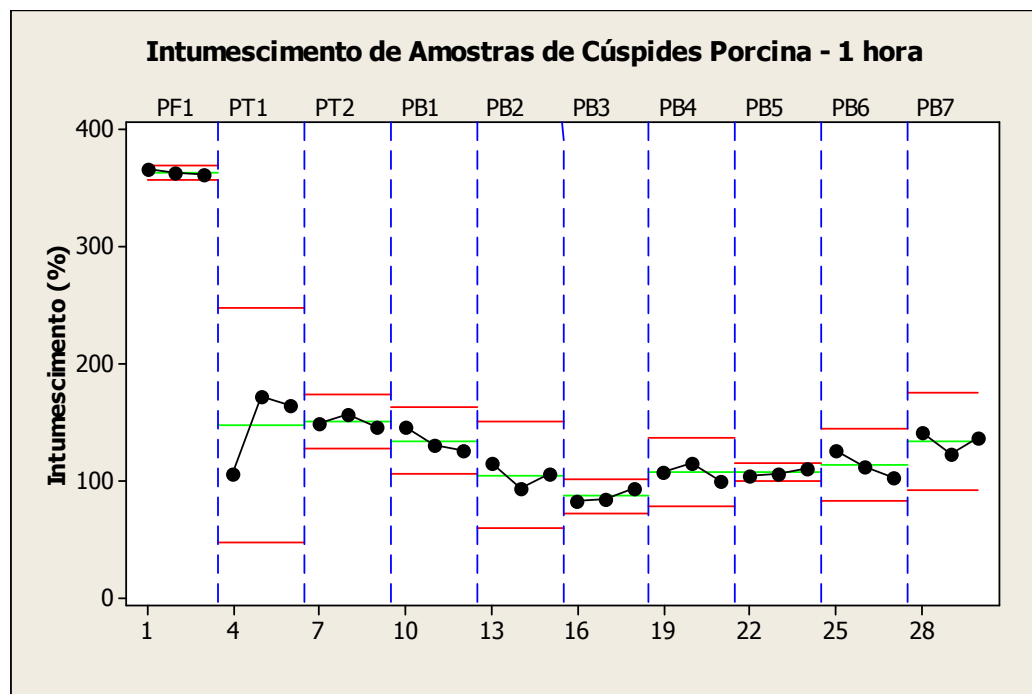


Figura 5.7 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado nas Figuras 5.8 e 5.9 e sintetizado na Tabela 5.4. A Figura 5.8 traz a análise completa de todos os grupos testados. A Figura 5.9 traz a análise removendo os resultados do grupo de amostras de cúspides porcinas não reticuladas, por serem estes claramente diferentes dos resultados para cúspides fixadas.

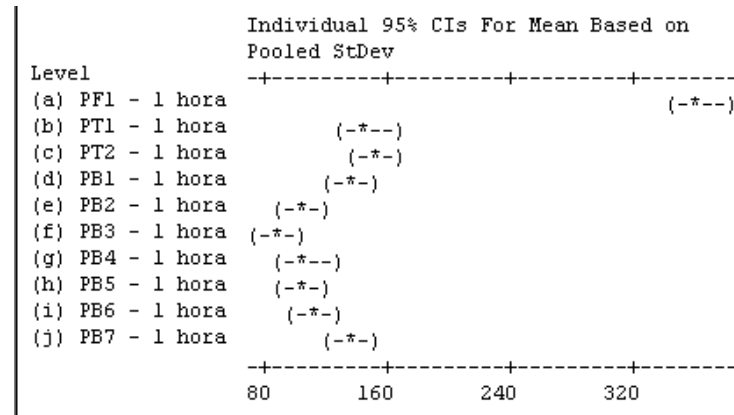


Figura 5.8 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

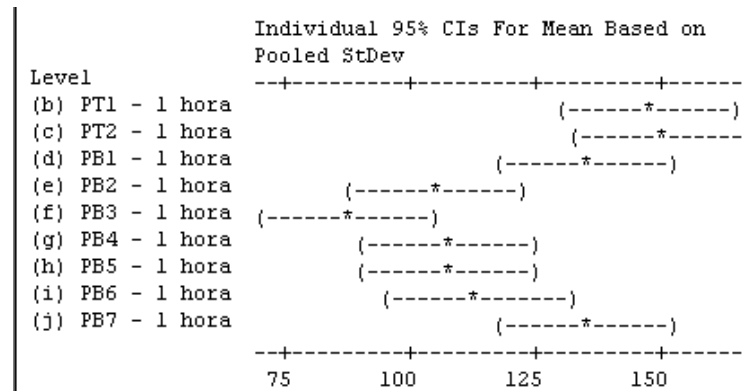


Figura 5.9 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

Tabela 5.4 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 1 hora de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (inclui tecido não reticulado)	p VALUE (somente tecido fixado)
PF1	363,5	2,3	0,0	
PT1	147,8	36,1		
PT2	150,9	5,1		
PB1	134,1	11,3		
PB2	104,7	11,1		
PB3	87,2	5,9		
PB4	107,4	7,2		
PB5	107,0	3,0		
PB6	113,7	11,7		
PB7	133,9	9,3		
			↓ Estatisticamente diferentes	↓ Estatisticamente diferentes

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente diferentes, com valor de $p < 0,5$. Essa diferença ocorre quando o tecido não reticulado é comparado com o tecido fixado e, também, entre os diferentes grupos de tecido fixado.

Estudos prévios mostraram que a capacidade de intumescimento do colágeno decresce com a introdução de ligações cruzadas (MA *et al*, 2003). A análise dos resultados de intumescimento após 1 hora de amostras fixadas estocadas em solução de glutaraldeído mostraram tendência inicial de queda de intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante para amostras armazenadas por até 90 dias. Em seguida, houve aumento no intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante. A queda inicial pode ser explicada pelo aumento da rigidez das cadeias provocado pela reticulação e a redução de grupos hidrofílicos disponíveis, diminuindo, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água. O aumento do intumescimento após longos períodos de estocagem em glutaraldeído, por sua vez, pode ser explicado pelo maior tempo dado para movimento e conformação das cadeias, possibilitando um arranjo mais favorável, com cadeias mais abertas, sendo, conseqüentemente, mais propício à absorção de água.

Estudos prévios analisaram o intumescimento de serosa intestinal suína fresca e fixada com glutaraldeído (JARDIM *et al*, 2008). Os resultados obtidos mostraram valores de intumescimento da ordem de 180% para o material não reticulado e entre 110 e 130% para material reticulado. Apesar de os valores de intumescimento relatados serem significativamente menores do que os relatados nesse trabalho, provavelmente por terem sido obtidos para apenas 15 minutos de imersão e para um tecido diferente, estes podem ser utilizados para se comparar a tendência de queda de intumescimento após a reticulação.

Os valores médios de taxa de intumescimento de cúspides porcinas após 6 horas de imersão estão apresentados na Figura 5.10.

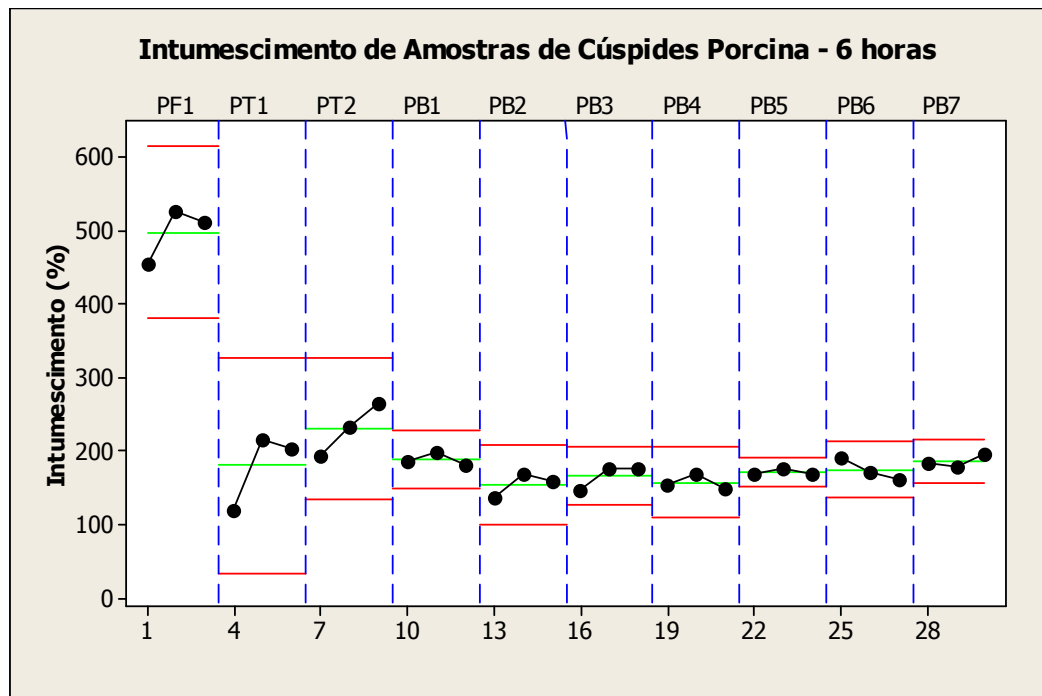


Figura 5.10 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado nas Figuras 5.11 e 5.12 e sintetizados na Tabela 5.5. A Figura 5.13 traz a análise completa de todos os grupos testados. A Figura 5.14 traz a análise removendo os resultados do grupo de amostras de cúspides porcinas não reticuladas, por serem estes claramente diferentes dos resultados para cúspides fixadas.

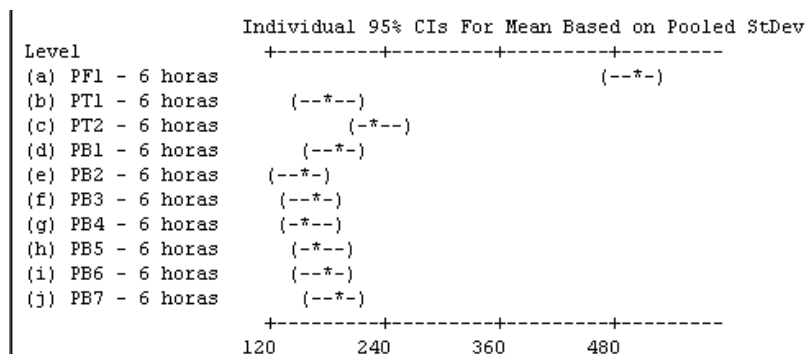


Figura 5.11 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

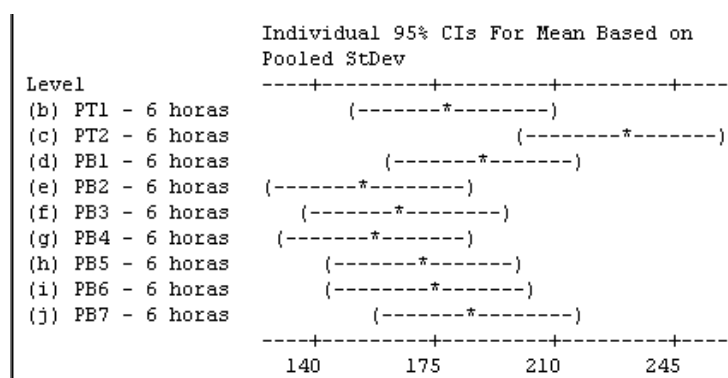


Figura 5.12 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

Tabela 5.5 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 6 horas de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (inclui tecido não reticulado)	p VALUE (somente tecido fixado)
PF1	498,2	38,0	0,0	0,04
PT1	179,9	53,0		
PT2	230,2	36,2		
PB1	188,7	8,6		
PB2	154,7	15,6		
PB3	166,2	17,0		
PB4	157,6	11,0		
PB5	171,3	4,5		
PB6	174,3	14,5		
PB7	186,3	9,0		
			↓	↓
			Estatisticamente diferentes	Estatisticamente diferentes

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente diferentes, com valor de $p < 0,5$. Essa diferença ocorre quando o tecido não reticulado é comparado com o tecido fixado e, também, entre os diferentes grupos de tecido fixado.

A análise dos resultados de intumescimento após 6 horas de amostras fixadas estocadas em solução de glutaraldeído confirmaram a tendência observada após 1 hora de imersão: queda inicial de intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante para amostras armazenadas por até 60 dias. Em seguida, houve aumento no intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante. Da mesma maneira, a queda inicial pode ser explicada pelo aumento da rigidez das cadeias provocado pela reticulação e a diminuição de grupos hidrofílicos disponíveis, diminuindo, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água. O aumento do intumescimento após longos períodos de estocagem em glutaraldeído, por sua vez, pode ser explicado pelo maior tempo dado para movimento e conformação das cadeias, possibilitando um arranjo mais favorável, com cadeias mais abertas, sendo, conseqüentemente, mais propício à absorção de água.

5.1.1.3 Difração de Raios X

Os resultados obtidos por Difração de Raios X (XRD) estão apresentados na Figura 5.13.

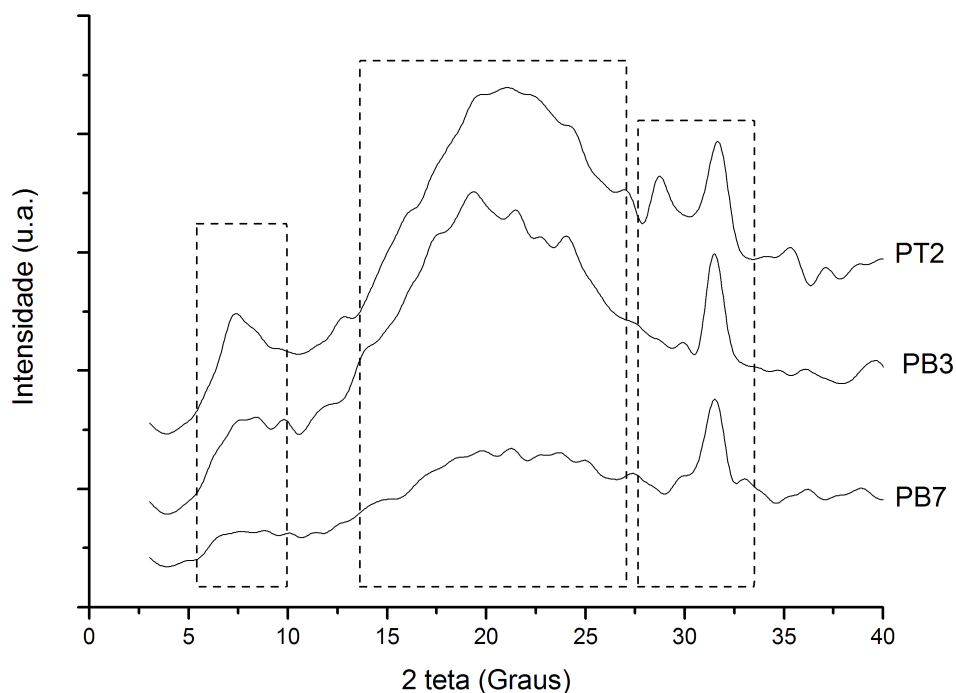


Figura 5.13 – Padrões de Difração de Raios X

Na escala de 2θ , os halos de maior intensidade para o material reticulado foram em, aproximadamente, 7° , 23° e 32° , coerentes com valores reportados em literatura para colágeno reticulado com glutaraldeído (JARDIM *et al*, 2008).

Principalmente em torno de 7° , observa-se a diminuição do halo com o aumento do tempo de exposição ao glutaraldeído. O halo para a amostra PT2, a com menor grau de reticulação, é bem mais intenso do que nos outros espectros. Entende-se por essa variação que o aumento das ligações cruzadas diminuiu o índice de cristalinidade dos materiais devido ao aumento da rigidez das cadeias e diminuição dos graus de liberdade na conformação tridimensional.

5.1.1.4 Sumário da Discussão dos Resultados

Os resultados obtidos com as análises de FTIR, Intumescimento e Difração de Raios X para as cúspides porcinas comprovam a reticulação de todas as amostras expostas à reticulação com solução de glutaraldeído a 0,4% (PT1 e PT2) e todas aquelas expostas à reticulação com solução de glutaraldeído a 0,4% e posteriormente

armazenadas em solução de glutaraldeído a 0,2% (PB1 a PB7). Apesar de demonstrado que todas as amostras citadas foram reticuladas, todos os métodos de análise mostraram que há alterações nas cadeias de colágeno com o aumento do tempo, resultando em diferentes comportamentos de intumescimento. Essas alterações podem ser atribuídas à alterações nas cadeias de colágeno, buscando conformações de maior estabilidade e de menor energia.

5.1.2 Pericárdio Bovino

As amostras de pericárdio bovino foram analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Teste de Intumescimento.

5.1.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados obtidos por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) estão apresentados a seguir.

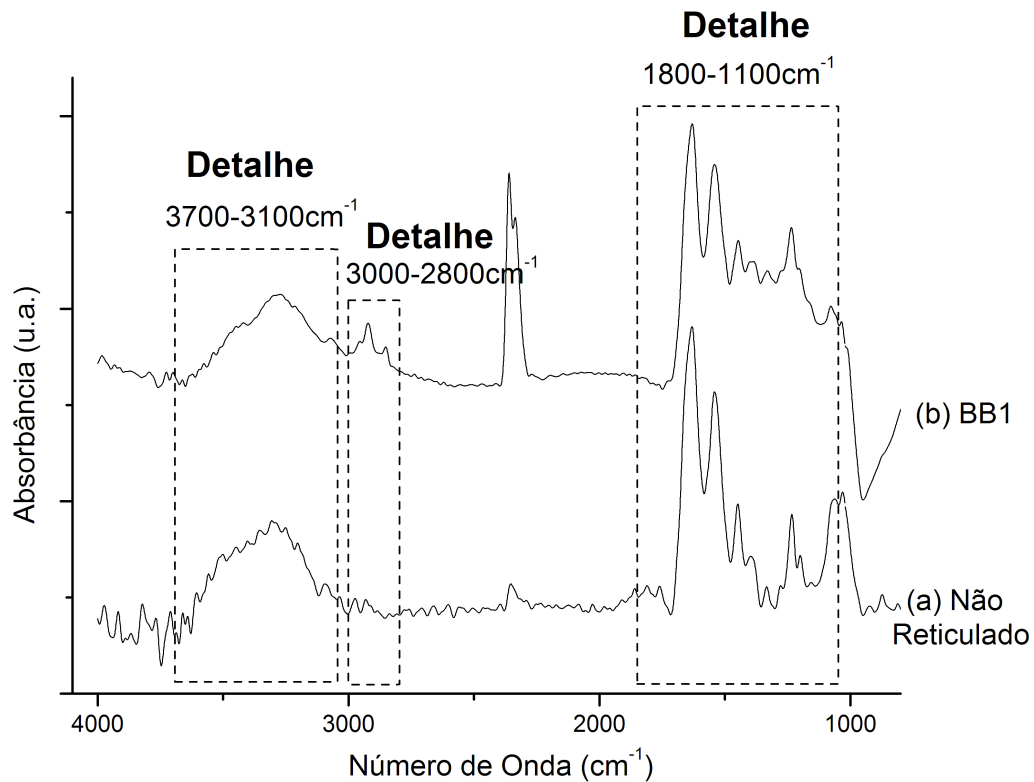


Figura 5.14 – Espectro de Pericárdio Bovino Não Reticulado e Fixado

A figura 5.14 apresenta os espectros de pericárdio bovino não reticulado e fixado e armazenado por adicionais 16 dias (BB1).

Pela visualização dos espectros não foi percebida diferença significativa na banda entre 3200 e 3400cm^{-1} , normalmente atribuída ao estiramento do OH e do NH_2 , na banda a 1730cm^{-1} , associada à carbonila, e nas bandas associadas às amidas, após a reticulação. Porém, o aumento no duplete entre as frequências de 2920 a 2850cm^{-1} , associado ao estiramento dos grupos C-H, é um forte indicativo de ocorrência da reticulação.

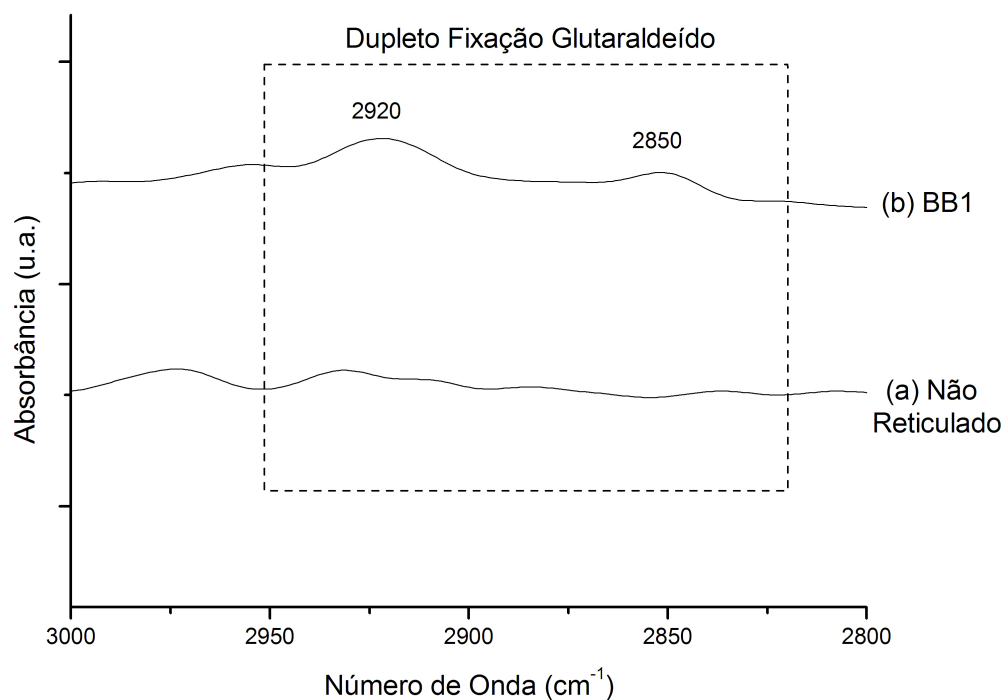


Figura 5.15 – Espectro de Pericárdio Bovino Não Reticulado e Fixado
Detalhe Região $3000\text{-}2800\text{cm}^{-1}$

A Figura 5.15 mostra o aumento da intensidade das bandas do duplete associado ao estiramento dos grupos C-H, relacionado à reticulação com glutaraldeído, entre as frequências de 2920 a 2850cm^{-1} . O aumento da intensidade desta banda para a amostra fixada comprova que houve reticulação.

5.1.2.2 Testes de Intumescimento

As amostras de pericárdio bovino foram, também, analisadas por Teste de Intumescimento. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

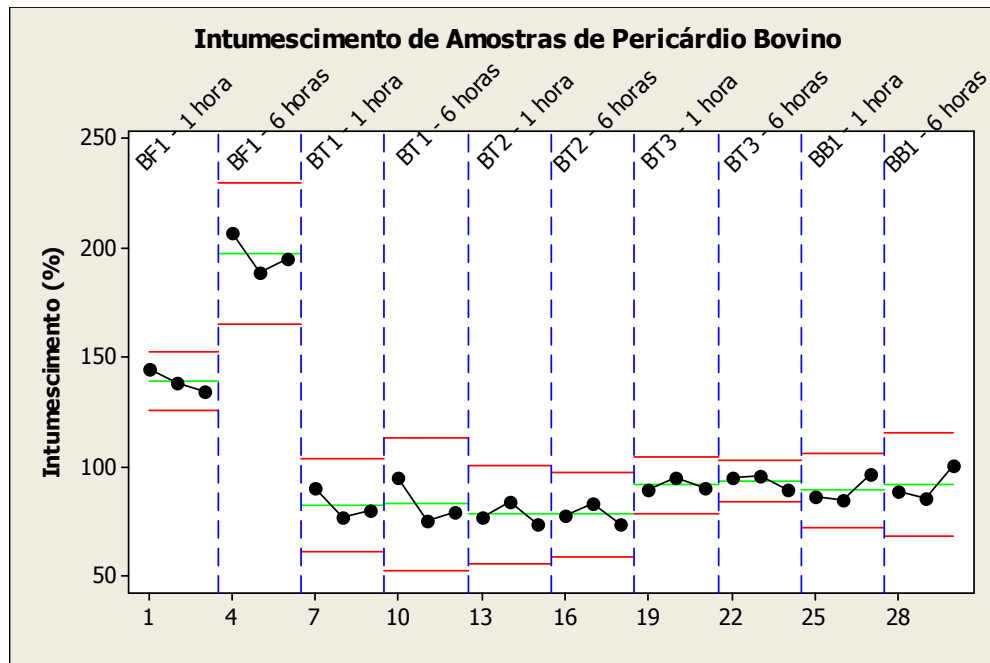


Figura 5.16 – Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino

Todas as amostras apresentaram capacidade de preservação de água após serem imersas por 1 hora e 6 horas em solução PBS, sendo que, para o tecido fixado, os valores médios obtidos após 1 e 6 horas foram praticamente os mesmos. As “Taxas de intumescimento” estão mostradas nas figuras 5.16, 5.17 e 5.20.

As amostras de pericárdio bovino não reticulado apresentaram taxas de intumescimento bastante superiores às de pericárdio bovino fixados, com média de 139,2% após 1 hora e 197,3% após 6 horas.

É importante salientar que os resultados mostram que mesmo a amostra submetida ao menor tempo de fixação (BT1, exposta à solução de glutaraldeído 0,65% por 5 dias) comprova sua reticulação. Isso confirma os resultados da literatura (WOODROOF EA, 1978), que mostraram que a reação de fixação ocorre rapidamente para tecidos

expostos a soluções de glutaraldeído com concentrações entre 0,1 e 5%. Segundo estudos prévios, a pH 7,4 e temperatura ambiente a reação de reticulação se mostra quase completa após 1 hora de exposição e finalizada antes de 24 horas.

Os valores médios de taxa de intumescimento de pericárdio bovino após 1 hora de imersão estão apresentados na Figura 5.17.

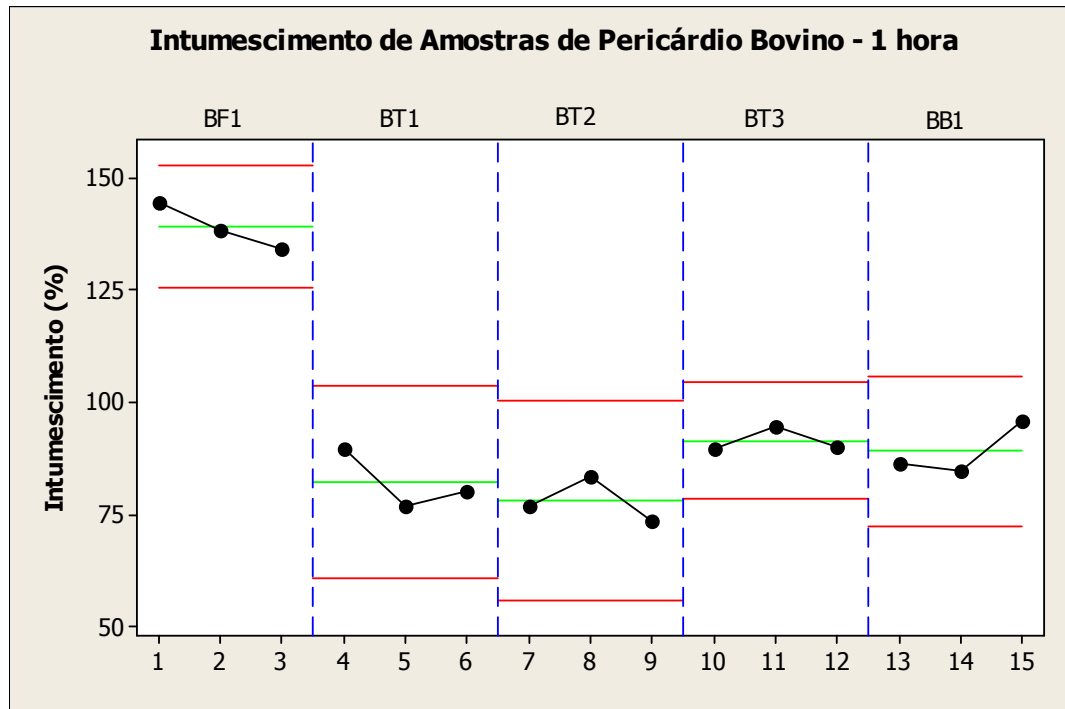


Figura 5.17 – Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado nas Figuras 5.18 e 5.19 e sintetizado na Tabela 5.6. A Figura 5.18 traz a análise completa de todos os grupos testados. A Figura 5.19 traz a análise removendo os resultados do grupo de amostras de pericárdio bovino não reticuladas, por serem estes claramente diferentes dos resultados para fixadas.

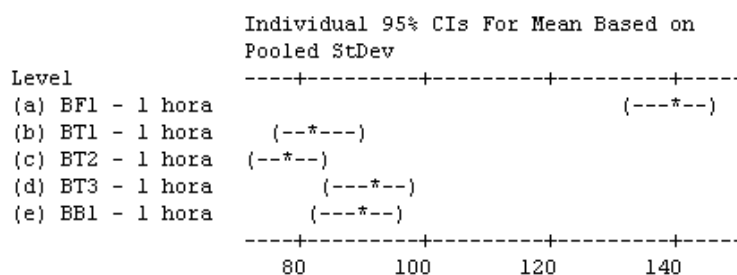


Figura 5.18 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão

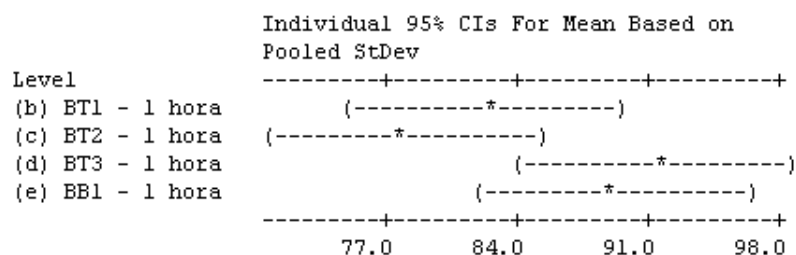


Figura 5.19 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão

Tabela 5.6 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Pericárdio Bovino após 1 hora de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (inclui tecido não reticulado)	p VALUE (somente tecido fixado)
BF1	139,2	5,2	0,0	0,05
BT1	82,3	6,7		
BT2	78,0	5,1		
BT3	91,5	2,8		
BB1	89,2	6,0		
			↓ Estatisticamente diferentes	↓ Estatisticamente diferentes

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente diferentes, com valor de $p < 0,5$. Essa diferença ocorre quando o tecido não reticulado é comparado com o tecido fixado e, também, entre os diferentes grupos de tecido fixado.

Estudos prévios mostraram que a capacidade de intumescimento do colágeno decresce com a introdução de ligações cruzadas (MA *et al*, 2003). A análise dos

resultados de intumescimento após 1 hora de amostras fixadas estocadas em solução de glutaraldeído mostraram tendência inicial de queda de intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante para amostras reticuladas por até 15 dias. Em seguida, houve aumento no intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante. A queda inicial pode ser explicada pelo aumento da rigidez das cadeias provocado pela reticulação e a redução de grupos hidrofílicos disponíveis, diminuindo, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água. O aumento do intumescimento após algum período de estocagem em glutaraldeído, por sua vez, pode ser explicado pelo maior tempo dado para movimento e conformação das cadeias, possibilitando um arranjo mais favorável, com cadeias mais abertas, sendo, conseqüentemente, mais propício à absorção de água.

Estudos prévios analisaram o intumescimento de compósitos colágeno e quitosana fixados com glutaraldeído (MA *et al*, 2003). Os resultados obtidos mostraram valores de intumescimento aproximadamente 2 vezes menores para o material reticulado, proporção repetida neste estudo.

Os valores médios de taxa de intumescimento de pericárdio bovino após 6 horas de imersão estão apresentados na Figura 5.20.

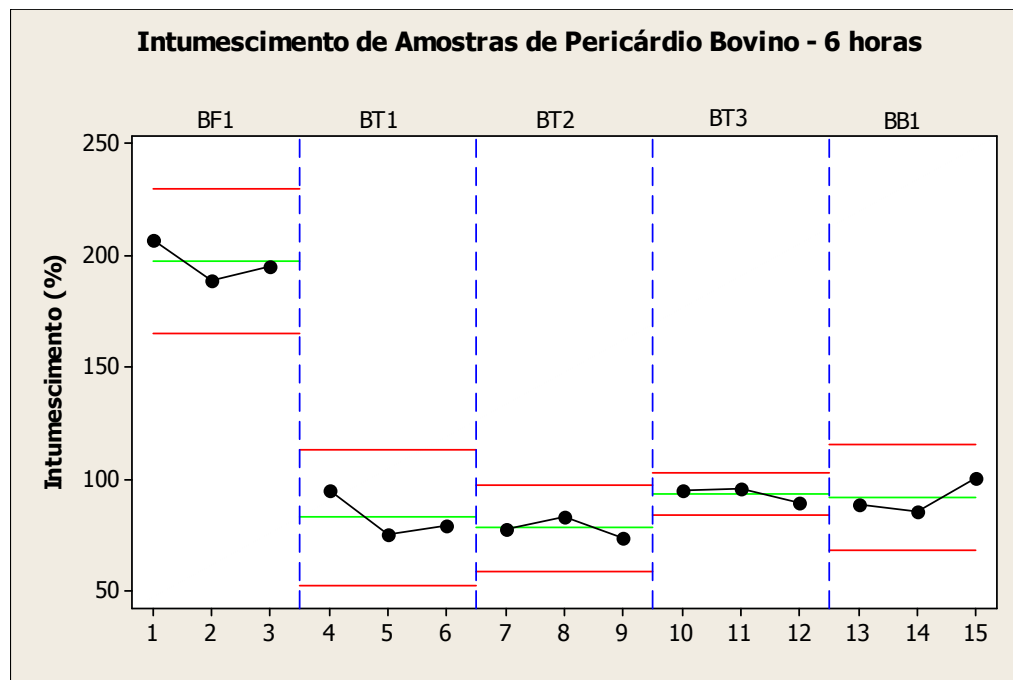


Figura 5.20 – Intumescimento de Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado nas Figuras 5.21 e 5.22 e sintetizado na Tabela 5.7. A Figura 5.21 traz a análise completa de todos os grupos testados. A Figura 5.22 traz a análise removendo os resultados do grupo de amostras de pericárdio bovino não reticuladas, por serem estes claramente diferentes dos resultados para as fixadas.

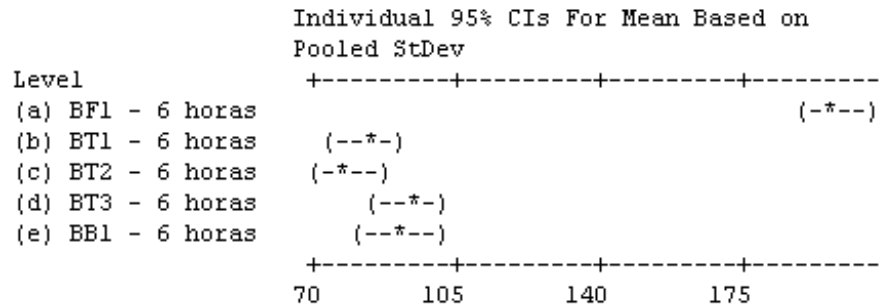


Figura 5.21– Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão

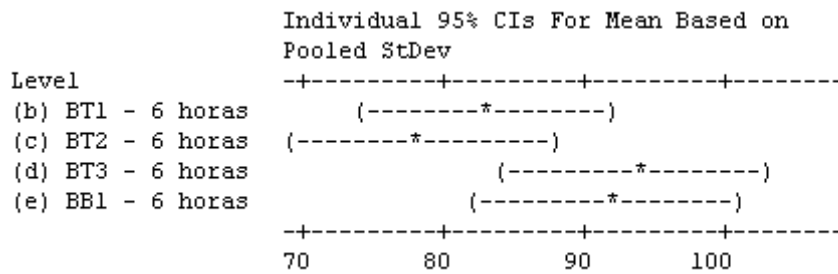


Figura 5.22 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão

Tabela 5.7 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Pericárdio Bovino após 6 horas de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (inclui tecido não reticulado)	p VALUE (somente tecido fixado)
BF1	197,3	9,1	0,0 ↓ Estatisticamente diferentes	0,09 ↓ Estatisticamente diferentes
BT1	83,0	10,2		
BT2	78,1	4,8		
BT3	93,5	3,6		
BB1	91,6	7,7		

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente diferentes, com valor de $p < 0,5$. Essa diferença ocorre quando o tecido não reticulado é comparado com o tecido fixado e, também, entre os diferentes grupos de tecido fixado.

A análise dos resultados de intumescimento após 6 horas de amostras fixadas estocadas em solução de glutaraldeído confirmaram a tendência observada após 1 hora de imersão: queda inicial de intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante para amostras reticuladas por até 15 dias. Em seguida, houve leve aumento no intumescimento com o aumento do tempo de exposição ao agente reticulante. Da mesma maneira, a queda inicial pode ser explicada pelo aumento da rigidez das cadeias provocado pela reticulação e a diminuição de grupos hidrofílicos disponíveis, diminuindo, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água. O aumento do intumescimento após certo período de estocagem em glutaraldeído, por sua vez, pode ser explicado pelo maior tempo dado para movimento e conformação das cadeias, possibilitando um arranjo estereoquimicamente mais favorável, com cadeias mais abertas, sendo, conseqüentemente, mais propício à absorção de água.

5.1.2.3 Sumário da Discussão dos Resultados

Os resultados obtidos com as análises de FTIR e Intumescimento para o pericárdio bovino comprovam a reticulação de todas as amostras expostas a reticulação com

solução de glutaraldeído a 0,65% (BT1, BT2 e BT3) e expostas a reticulação com solução de glutaraldeído a 0,65% e posteriormente armazenadas em solução de glutaraldeído a 0,2% (BB1). Apesar de demonstrado que todas as amostras citadas foram reticuladas, o intumescimento mostrou que há diferenças nas cadeias de colágeno para diferentes tempos de processamento. Essas alterações podem ser atribuídas à alterações nas cadeias de colágeno, buscando conformações de maior estabilidade e de menor energia.

5.2 Variável Concentração da Solução de Glutaraldeído

As amostras de cúspides porcinas foram analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Teste de Intumescimento.

5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados obtidos por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) estão apresentados a seguir.

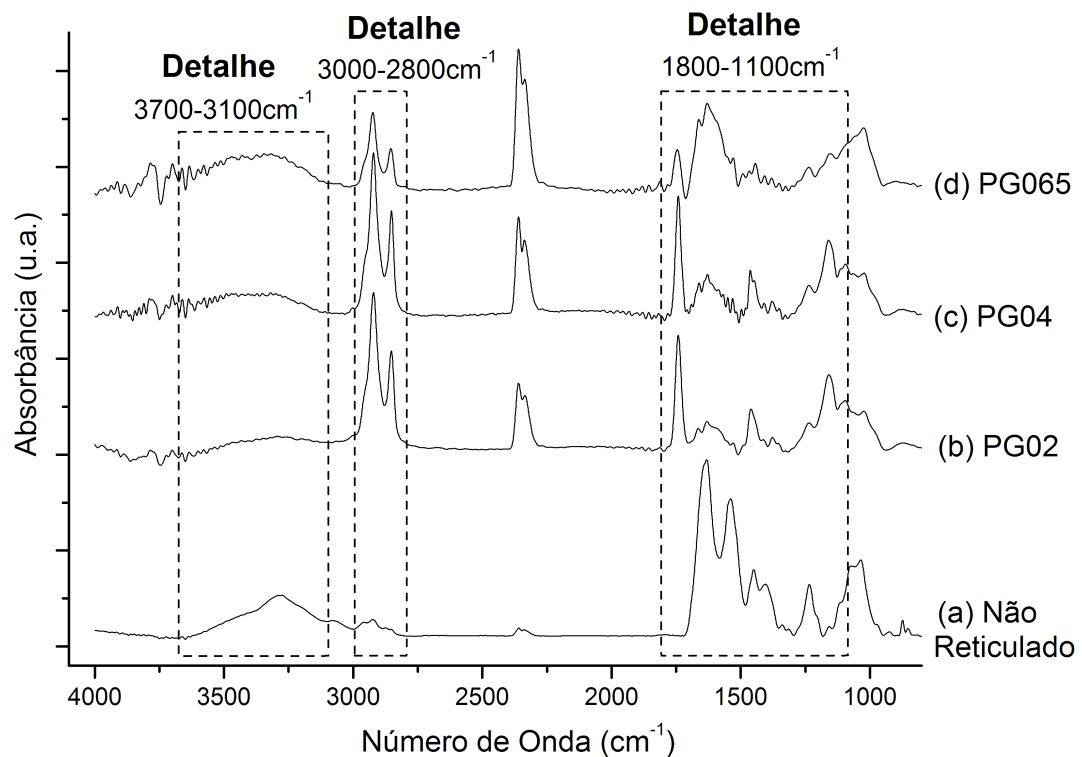


Figura 5.23 – Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticuladas e Fixadas

A figura 5.23 apresenta os espectros de cúspides não reticuladas e fixadas com soluções de glutaraldeído 0,2% (PG02), 0,4% (PG04) e 0,65% (PG065).

Observa-se um alargamento da banda entre 3200 e 3400cm^{-1} , normalmente atribuída ao estiramento do OH e do NH_2 , com o aumento da exposição ao glutaraldeído. A exposição ao glutaraldeído e a conseqüente reticulação provocou um grande aumento na banda a 1730cm^{-1} , associada à carbonila, e no duplete entre as freqüências de 2920 a 2850cm^{-1} , associado ao estiramento dos grupos C-H.

Com a reticulação, observa-se um significativo alargamento das bandas associadas às amidas I, II e III a 1630 , 1550 e 1253cm^{-1} , respectivamente, e aumento da banda associada ao grupo acetal, a 1150cm^{-1} .

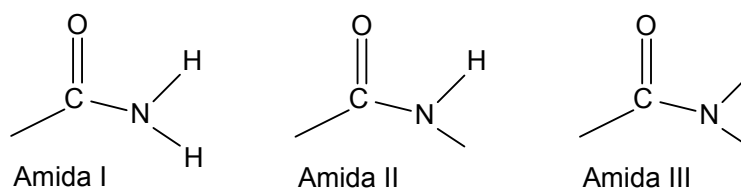


Figura 5.24 - Amidas Primária, Secundária e Terciária

As Figuras 5.25 e 5.29 mostram detalhes das regiões $1800-1100$ e $3000-2800\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

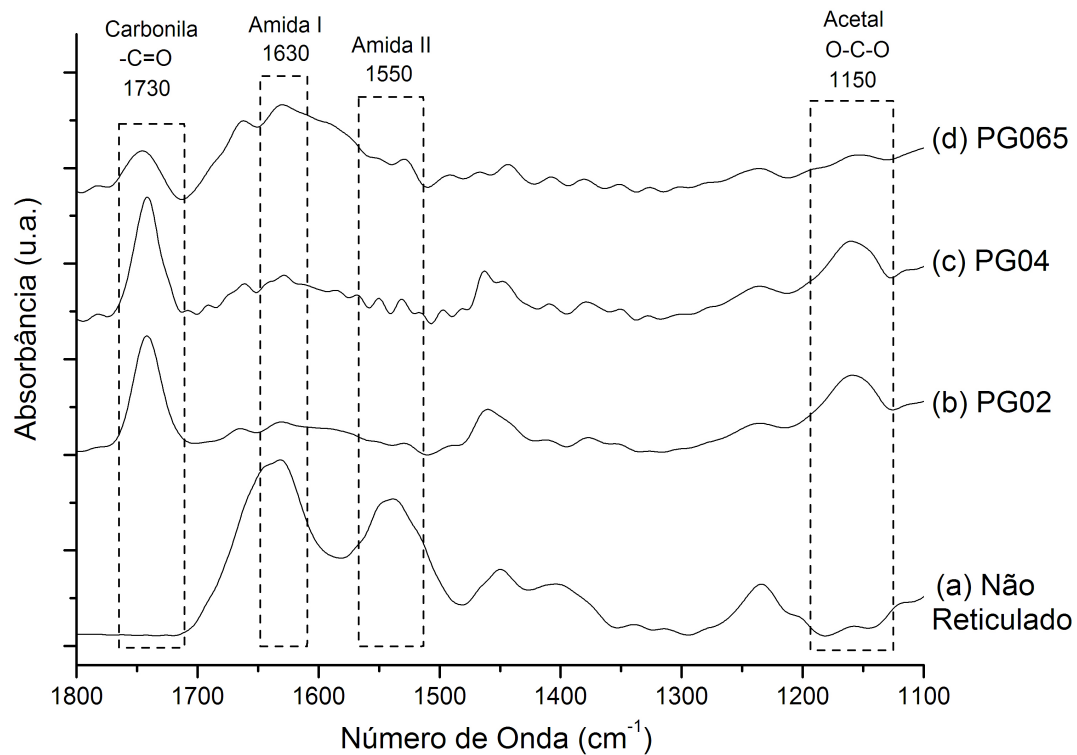


Figura 5.25 – Espectro de Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas
Detalhe Região 1800-1100 cm^{-1}

Uma análise quantitativa para comparação das intensidades observadas para as bandas nos diferentes espectros pode ser feita obtendo-se os valores relativos de tais bandas. Os valores de absorvância obtidos para diferentes picos após normalização dos espectros são apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Absorbância das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas

	PICO	AMOSTRA			
		Não Reticulado	PG02	PG04	PG065
INTENSIDADE DOS PICOS ABSORBANCE (a.u.)	Acetal O-C-O 1150cm ⁻¹	<0,10	0,52	0,52	0,37
	δ CH ₂ 1440-1460cm ⁻¹	0,41	0,32	0,33	0,36
	-C=N 1630cm ⁻¹	1,0	0,30	0,36	0,69
	-NH ₂ 1550cm ⁻¹	0,80	0,21	0,24	0,45
	Carbonila -C=O 1730cm ⁻¹	<0,10	0,79	0,78	0,43
	Dupleto (1/2) 2850cm ⁻¹	<0,10	0,72	0,71	0,42
	Dupleto (2/2) 2920cm ⁻¹	<0,10	1,0	1,0	0,62

Dividindo a absorbância dos picos de -C=N e -NH₂ pela absorbância do pico de dobramento de CH₂ (δ CH₂), selecionado por ser abundante na cadeia e não sofrer reticulação com glutaraldeído, obtém-se os valores apresentados na Tabela 5.9:

Tabela 5.9 – Absorbância Relativa das Bandas dos Espectros de Cúspides Porcinas

	PICO	Não Reticulado	PG02	PG04	PG065
$I_{\nu} / I_{\delta\text{CH}_2}$	-C=N 1630cm ⁻¹	2,44	0,94	1,09	1,92
	-NH ₂ 1550cm ⁻¹	1,95	0,66	0,73	1,25

Dividindo o valor relativo de -C=N pelo valor de -NH₂ para cada amostra, tem-se os valores apresentados na Tabela 5.10:

Tabela 5.10 - Absorbância Relativa das Bandas -C=N e -NH₂ dos Espectros de Cúspides Porcinas

VALOR	Não Reticulado	PG02	PG04	PG065
-C=N / -NH ₂	1,25	1,42	1,49	1,53

As amostras analisadas demonstraram um aumento relativo da banda de grupos imina (-C=N), em 1630cm⁻¹, e queda simultânea da banda de amina (-NH₂) com a reticulação com glutaraldeído e, também, com o tempo de exposição à solução de estocagem de glutaraldeído. Isso comprova a reticulação e mostra a continuidade da reação mesmo após o final do processo de reticulação e estocagem em solução de glutaraldeído, conforme mostrado na Figura 5.26.

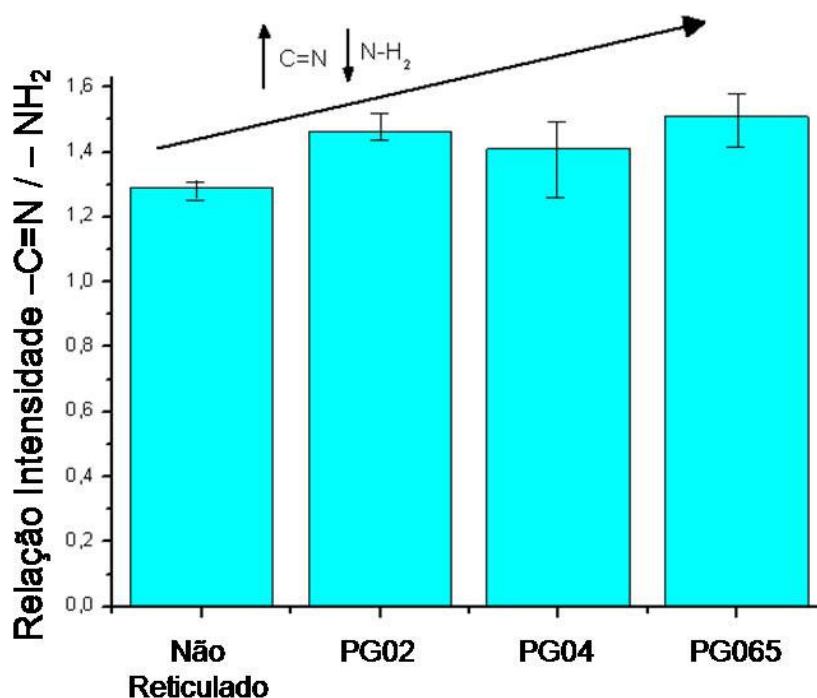


Figura 5.26 – Variação da Relação -C=N / -NH₂ para Cúspides Porcinas Não Reticulada e Fixadas

A partir dos espectros foi observada a banda de 1750cm⁻¹, atribuída ao grupo carbonila. O significativo aumento da intensidade dessa banda para amostras reticuladas sugere que, neste caso, nem todo o glutaraldeído se ligou ao colágeno, permanecendo na forma de aldeídos livres. Dividindo a absorbância dos picos da carbonila pela absorbância do pico de dobramento de CH₂ (δCH₂), selecionado por ser

abundante na cadeia e não sofrer reticulação com glutaraldeído, obtém-se os seguintes valores, mostrados na Tabela 5.13 e ilustrados na Figura 5.27:

Tabela 5.11 – Absorbância Relativa da Banda de Carbonila dos Espectros de Cúspides Porcinas Fixadas

PG02	PG04	PG065
2,46	2,40	1,19

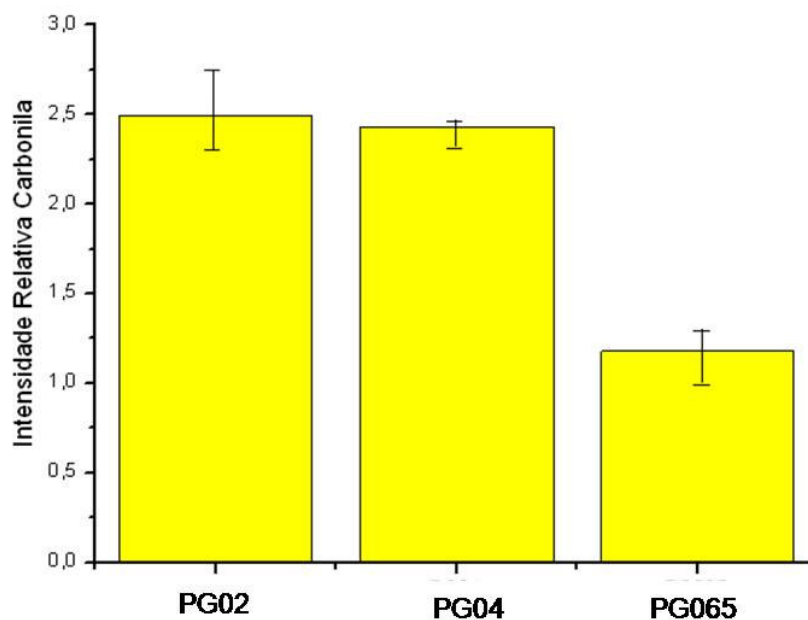


Figura 5.27 – Variação da Intensidade da Banda de Carbonila para Cúspides Fixadas

A análise dos valores de intensidade da banda de carbonila mostra valores bem próximos para os grupos fixados com solução de glutaraldeído 0,2% e 0,4% e valores aproximadamente 50% menores para o grupo fixado com solução de glutaraldeído 0,65%. A diferença entre as intensidades da banda de carbonila dos grupos PG2 e PG04 para o grupo PG065 sugere que, para esse último, a reticulação aconteceu de maneira mais completa, com maior quantidade de glutaraldeído se ligando à cadeia de colágeno.

Dividindo a absorbância dos picos de acetal pela absorbância do pico de dobramento de CH_2 (δCH_2), selecionado por ser abundante na cadeia e não sofrer reticulação com

glutaraldeído, obtêm-se os seguintes valores, mostrados na Tabela 5.14 e ilustrados na Figura 5.28:

Tabela 5.12 – Absorbância Relativa da Banda de Acetal dos Espectros de Cúspides Porcinas Fixadas

PG02	PG04	PG065
1,62	1,60	1,03

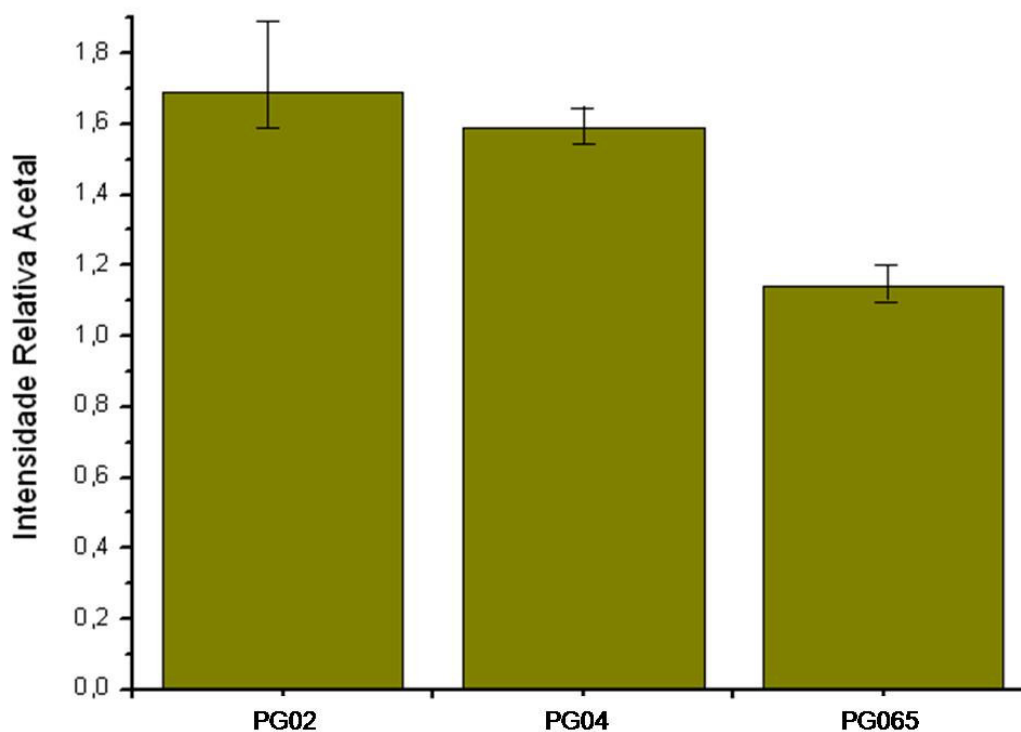


Figura 5.28 – Variação da Intensidade da Banda de Acetal para Cúspides Fixadas

A análise dos valores de intensidade da banda de acetal mostra valores bem próximos para os grupos fixados com solução de glutaraldeído 0,2% e 0,4% e valores aproximadamente 40% menores para o grupo fixado com solução de glutaraldeído 0,65%. A diferença entre as intensidades da banda de acetal dos grupos PG02 e PG04 para o grupo PG065 sugere que, para os dois primeiros, a reticulação via formação de acetal ocorreu de forma mais intensa do que para o grupo PG065. Uma vez que a análise das intensidades do grupo carbonila para esses grupos mostrou valores mais baixos para o grupo PG065, há indicação de que, para esse grupo, a

reticulação ocorreu preferencialmente por base de Schiff, enquanto que, para os grupos PG02 e PG04, a ocorrência da formação de acetal foi mais intensa.

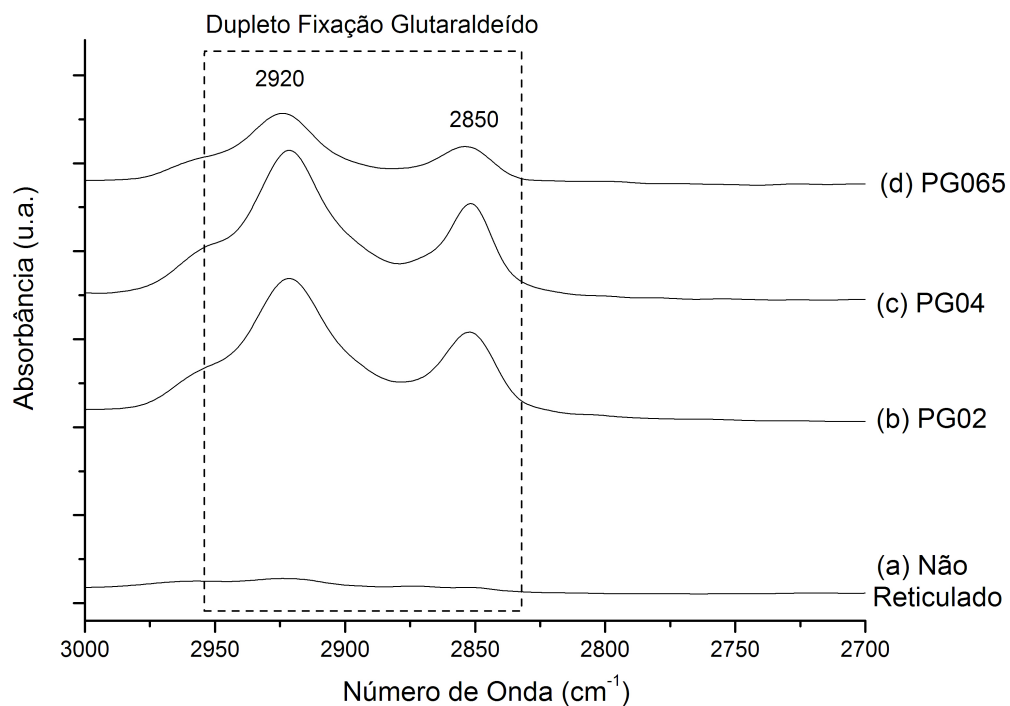


Figura 5.29 – Espectro de Cúspides Porcinas Fixadas
Detalhe Região 3000-2700 cm^{-1}

A Figura 5.29 mostra o aumento da intensidade das bandas do duplete associado ao estiramento dos grupos C-H, relacionado à reticulação com glutaraldeído, entre as frequências de 2920 a 2850 cm^{-1} . O aumento significativo da intensidade desta banda para as amostras fixadas comprova a reticulação, independente da concentração de solução de glutaraldeído utilizada.

5.2.2 Testes de Intumescimento

Os resultados obtidos para os testes de intumescimento estão descritos a seguir.

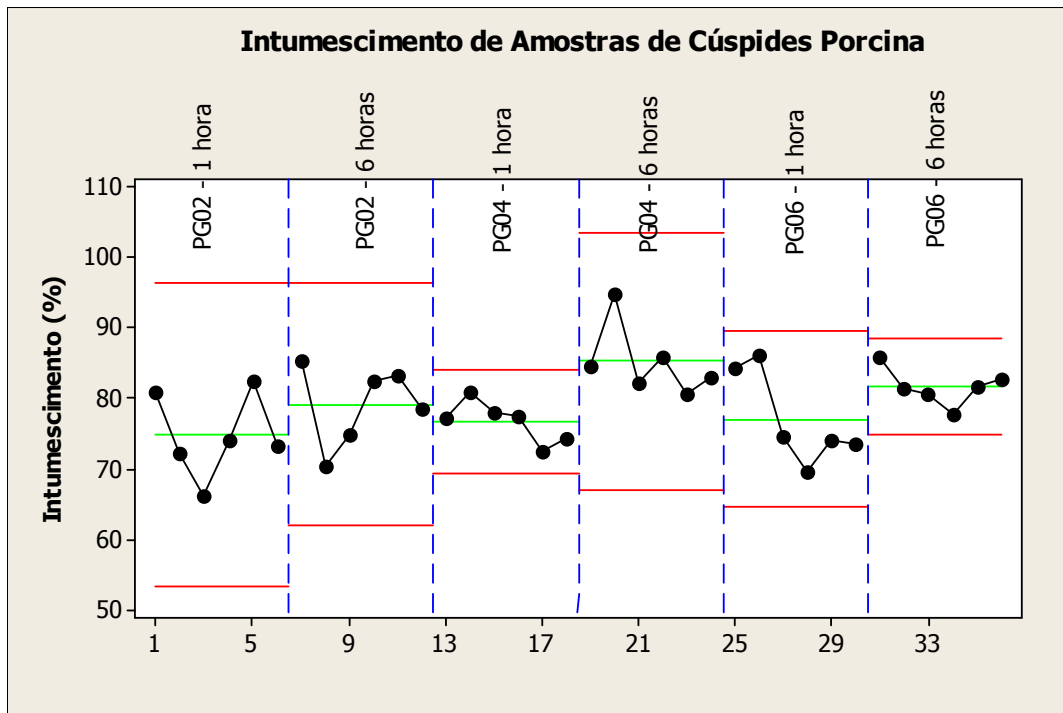


Figura 5.30 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina

Todas as amostras apresentaram capacidade de preservação de água após serem imersas por 1 hora e 6 horas em solução PBS. As “Taxas de intumescimento” estão mostradas nas figuras 5.30, 5.31 e 5.33. Todas as amostras apresentaram taxa de intumescimento média após 6 horas superior àquelas observadas após 1 hora de imersão.

Os valores médios de taxa de intumescimento de cúspides porcinas após 1 hora de imersão estão apresentados na Figura 5.31.

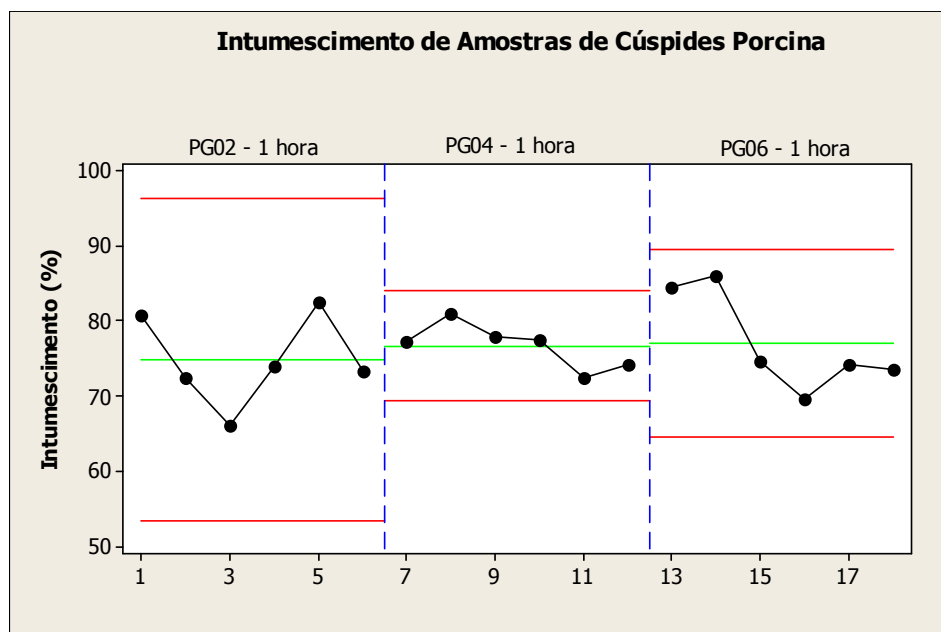


Figura 5.31 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado na Figura 5.32 e sintetizado na Tabela 5.13.

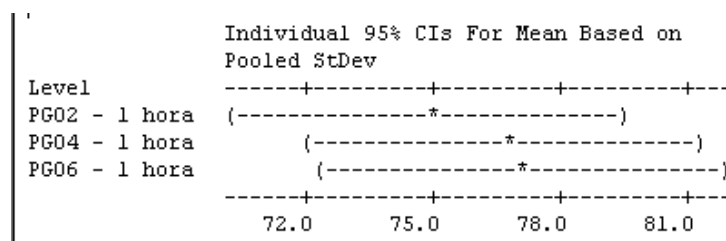


Figura 5.32 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

Tabela 5.13 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 1 hora de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (somente tecido fixado)
PG02	74,9	6,0	0,76 ↓ Estatisticamente iguais
PG04	76,7	3,0	
PG065	77,1	6,6	

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente iguais, com valor de $p > 0,5$.

Estudos prévios mostraram que a capacidade de intumescimento do colágeno decresce com a introdução de ligações cruzadas (MA *et al*, 2003). A análise dos resultados de intumescimento após 1 hora de amostras fixadas estocadas em solução de glutaraldeído não evidenciou diferença entre os grupos fixados com soluções de glutaraldeído de concentrações diferentes, sugerindo que as estruturas dos materiais dos diferentes grupos possuem semelhante capacidade de absorção de água.

Os valores médios de taxa de intumescimento de cúspides porcinas após 6 horas de imersão estão apresentados na Figura 5.33.

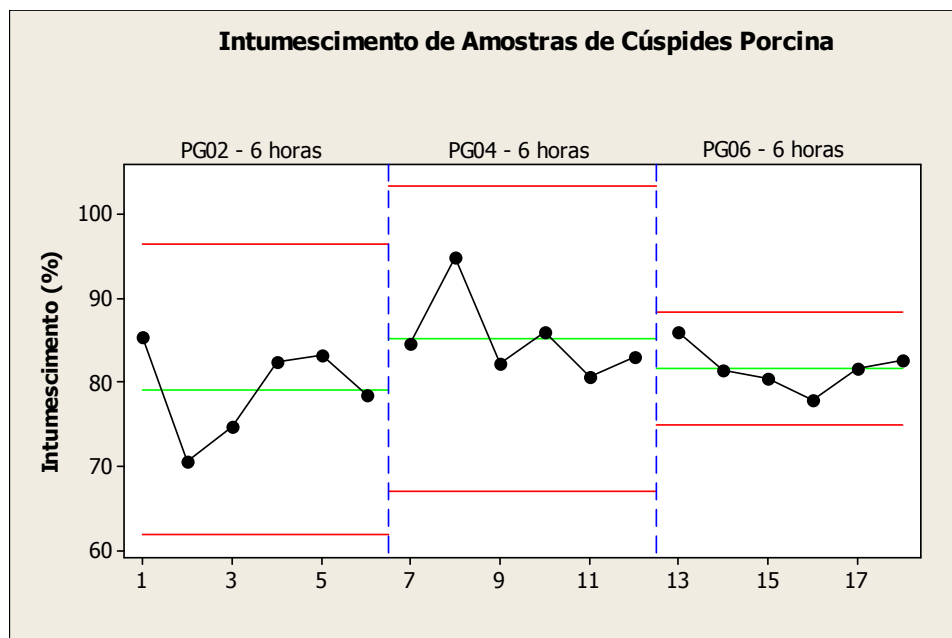


Figura 5.33 – Intumescimento de Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

Foi realizada uma análise ANOVA, usada para analisar a diferença da média para três ou mais grupos, conforme mostrado na Figura 5.34 e sintetizado na Tabela 5.14.

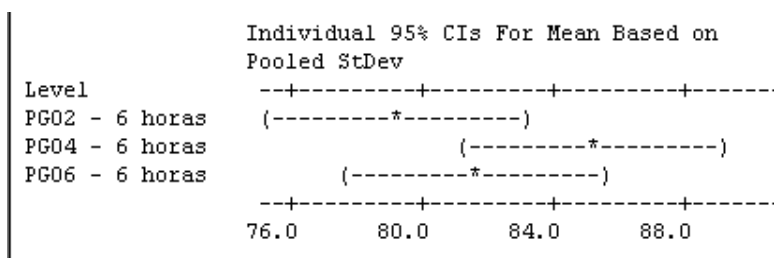


Figura 5.34 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

Tabela 5.14 – Sumário de Resultados de Intumescimento para Cúspides Porcinas após 6 horas de imersão

GRUPO	INTUMESCIMENTO MÉDIO (%)	DESVIO PADRÃO	p VALUE (somente tecido fixado)
PG02	79,2	5,7	0,1 ↓ Estatisticamente diferentes
PG04	85,2	5,1	
PG065	81,7	2,6	

A análise ANOVA mostrou que os valores médios obtidos para taxas de intumescimento dos diferentes grupos testados são estatisticamente diferentes, com valor de $p < 0,5$.

A análise dos resultados de intumescimento após 6 horas de amostras fixadas em solução de glutaraldeído evidenciam pequena diferença entre os grupos fixados com soluções de glutaraldeído de concentrações diferentes, porém, com valores próximos, em torno de 80 a 85% de intumescimento.

5.2.3 Sumário da Discussão dos Resultados

Os resultados obtidos com as análises de FTIR e Intumescimento comprovam a fixação de todas as amostras expostas à reticulação com solução de glutaraldeído, independentemente da concentração da solução de fixação. As diferenças verificadas nas estruturas analisadas em FTIR não foram evidenciadas no ensaio de intumescimento, ou seja, não foi possível verificar diferenças de comportamento de absorção de água entre o grupo PG065 e os demais. Isso sugere que, apesar de a reticulação poder ter ocorrido preferencialmente por mecanismos diferentes, o grau de

introdução de ligações cruzadas e a disponibilidade de grupos hidrofílicos ou a combinação desses fatores não se mostrou diferente.

6. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos para cúspides porcinas não reticuladas, reticuladas e armazenadas por diferentes tempos após a reticulação mostrou que o método proposto promoveu a reticulação do colágeno, alterando as características estruturais e comportamento de intumescimento quando comparados ao tecido não reticulado. Os resultados sugerem, ainda, que o armazenamento em soluções de estocagem de glutaraldeído continua a promover alterações nas cadeias de colágeno, mesmo após finalizado o tempo necessário para que se considere o material reticulado. Além disso, acredita-se que as cadeias de colágeno sofrem alterações de conformação com o tempo, tendendo a se conformar de maneira mais favorável.

A análise dos resultados obtidos para pericárdio bovino não reticulado, reticulado e armazenado após a reticulação mostrou que o método proposto promoveu a reticulação do colágeno, alterando as características estruturais e comportamento de intumescimento quando comparados ao tecido não reticulado. Apesar de demonstrado que todas as amostras citadas foram reticuladas, o intumescimento mostrou que há alterações nas cadeias de colágeno com o tempo de processamento. Essas alterações podem ser atribuídas à alterações nas cadeias de colágeno, buscando conformações de maior estabilidade e de menor energia.

A análise dos resultados obtidos para cúspides porcinas reticuladas com soluções de glutaraldeído de diferentes concentrações mostrou que os métodos de reticulação propostos promoveram a reticulação do colágeno levando a estruturas moleculares com algumas diferenças. Essas diferenças sugerem que as reações de reticulação dos grupos podem ter ocorrido preferencialmente por mecanismos diferentes. Apesar das diferenças estruturais, os comportamentos de intumescimento foram os mesmos após 1 hora de imersão e ligeiramente diferentes após 6 horas de imersão. Os resultados comprovam a reticulação de todas as amostras, independente da concentração do agente reticulante utilizado.

7. RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS

O empirismo no desenvolvimento de biopróteses pode representar um fator dificultador de melhorias de processos e produtos devido à falta de conhecimento dos efeitos de variações de processamento na estrutura e propriedades dos tecidos de pericárdio bovino e cúspides porcinas e, conseqüentemente, no desempenho e durabilidade de biopróteses.

Este estudo avaliou o efeito de 2 variáveis: tempo de exposição ao glutaraldeído e concentração da solução reticulante. Os resultados obtidos são importantes para o entendimento de características observadas na prática, mas, ainda não avaliadas com profundidade. Com isso, processos poderão ser reavaliados para que, por exemplo, o tecido utilizado forneça a melhor relação entre características de trabalho (ex: facilidade de manuseio e resistência à lacerações) e propriedades do material.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ensaio mecânico não foram realizados para observar alterações de comportamento com condições diferentes de processamento. Sugere-se a realização de testes de tração para avaliar se as alterações observadas nas estruturas dos materiais se refletem em comportamento mecânico diferenciado.

Sugere-se, ainda, análises que avaliam se as alterações observadas nas análises FTIR dos materiais se repetem na superfície dos tecidos. O método sugerido é o XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) e os resultados obtidos podem ser úteis para avaliação de grupos livres na superfície dos tecidos e, conseqüentemente, para estudos sobre o principal método de falha destes materiais: a calcificação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE GI, BARBOSA-STANCIOLI EF, MANSUR AAP, VASCONCELOS WL, MANSUR HS. Design of Novel Hybrid Organic-Inorganic Nanostructured Biomaterials for Immunoassay Applications. *Biomed Materials*. 1:221-234, 2006
2. ANDRADE GI, BARBOSA-STANCIOLI EF, MANSUR AAP, VASCONCELOS WL, MANSUR HS. Small-Angle X-Ray Scattering and FTIR Characterization of Nanostructured Poly(Vinyl Alcohol)/Silicate Hybrids for Immunoassay Applications. *J Mater Sci*. DOI 10.1007/s10853-007-1953-7, 2007
3. BILLIAR KL, SACKS MS. Biaxial Mechanical Properties of the Natural and Glutaraldehyde Treated Aortic Valve Cusp – Part 1: Experimental Results. *J Biomech Eng*. 122:23-30, 2000
4. BOWES JH, CATER CW. Crosslinking of Collagen. *J. Appli. Chem*. 15:296-304, 1965.
5. BOWES JH, CATER CW. The Interaction of Aldehydes with Collagen. *Biochim Biophys Acta*. 168:341-352, 1968
6. BUCH WS, KOSEK JC, ANGELL WW and SHUMWAY SE. Deterioration of Formalin-Treated Aortic Valve Heterografts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 60:673-682, 1970
7. BURMAN SO. Heterologous Heart Valves: Past, Present and Future. *Ann Thorac Surg*. 48:S75-76, 1989
8. CARPENTIER A. From Valvular Xenograft to Valvular Bioprosthesis: 1965-1970. *Ann Thorac Surg*. 48:S73-74, 1989
9. CHARULATHA V, RAJARAM A. Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes. *Biomaterials*. 24:759-767, 2003
10. CHEN RN, HO HO, SHEU MT. Characterization of Collagen Matrices Crosslinked using Microbial Transglutaminase. *Biomaterials*. 26:4229-4235, 2005
11. CHRISTIE GW. Anatomy of Aortic Heart Valve Leaflets: the Influence of Glutaraldehyde Fixation on Function. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 6(1):S25-S33, 1992
12. CONNOLLY JM, ALFERIEV I, CLARK-GRUEL JN, EIDELMAN N, SACKS M, PALMATORY E, KRONSTEINER A, DEFELICE S, XU J, OHRI R, NARULA N, VYAVAHARE N, LEVY RJ. Triglycidylamine Crosslinking of Porcine Aortic Valve Cusps or Bovine Pericardium Results in Improved Biocompatibility, Biomechanics and Calcification Resistance. *Am J Pathology*, 166(1):1-13, 2005

13. COSTA-JUNIOR ES, BARBOSA-STANCIOLI EF, MANSUR AAP, VASCONCELOS WL, MANSUR HS Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers*, 2009, Em Publicação.
14. COSTA HS, ROCHA MF, ANDRADE GI, BARBOSA-STANCIOLI EF, PEREIRA MM, OREFICE RL, VASCONCELOS WL, MANSUR HS. Sol-Gel Derived Composite from Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol. *J Mater Sci*. DOI 10.1007/s10853-007-1875-4
15. COX RW, GTANT RA, KENT CM. An Electron-Microscope Study of the Reaction of Collagen with some Monoaldehydes and Bifunctional Aldehydes. *J Cell Sci*. 12:933-949, 1973
16. DECLERCQ HA, VERBEECK RMH, DE RIDDER LIFJM, SCHACHT EH, CORNELISSEN. Calcification as an Indicator of Osteoinductive Capacity of Biomaterials in Osteoblastic Cell Cultures. *Biomaterials*. 26(24):4964-4974, 2005
17. GOES AM, LOPES MTP, MAIA RMMT, SALAS CE. Testes in vitro com Biomateriais e Citotecnia. In: OREFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Capítulo 11, 285-297
18. GOISSIS G. Biomateriais para Aplicações Cardiovasculares. In: OREFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Capítulo 13, 319-341
19. GOLOMB G, SCHOEN FJ, SMITH MS, LINDEN J, DIXON M, LEVY R. The Role of Glutaraldehyde-Induced Cross-Links in Calcification of Bovine Pericardium Used in Cardiac Valve Bioprosthesis. *Am J Pathol*. 127:122-130, 1987
20. HAYAT MA. Glutaraldehyde: Role in Electron Microscopy. *Micron Microscopica Acta*. 17(2)115-135, 1986
21. HUMAN P, ZILLA P. Inflammatory and Immune Processes; The Neglected Villain of Bioprosthetic Degeneration? *J Long Term Eff Med Implants*, 11(3&4):199-220, 2001
22. JAKOBSEN RJ, BROWN LL, HUTSON TB, FINK DJ, VEIS A. Intermolecular Interactions in Collagen Self-Assembly as Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Science*. 220:1288-1290, 1983
23. JARDIM M, MANSUR AAP, MANSUR HS. Caracterização de Pericárdio Bovino e Serosa Intestinal Suína Reticulados para Aplicações Biomédicas. In: *V Congresso*

- Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB 2008), 2008, Ouro Preto. Anais de COLAOB 2008, 2008. v. 1 p. 1-9*
24. JORGE-HERRERO E, FERNÁNDEZ P, TURNAY J, OLMO N, CALERO P, GARCÍA R, FREILE I, CASTILLO-OLIVARES JL. Influence of Different Chemical Cross-Linking Treatments on the Properties of Bovine Pericardium and Collagen. *Biomaterials*. 20:539-545, 1999
 25. JULIEN M, LÉTOUNEAU DR, MAROIS Y, CARDOU A, KING MW, GUIDOIN R, CHACHRA D, LEE JM. Shelf-life of Bioprosthetic Heart Valves: a Structural and Mechanical Study. *Biomaterials*. 18(8):605-612, 1997
 26. KIERNAN JA. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde and Glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*, 1: 8-12, 2000
 27. LANGDON SE, CHERNECKY R, PEREIRA CA, ABDULLA D, LEE JM. Biaxial Mechanical/Structural Effects of Equibiaxial Strain During Crosslinking of Bovine Pericardial Xenograft Materials. *Biomaterials*. 20:137-153, 1999
 28. LEE CH, VYAVAHRE NR, ZAND R, KRUTH H, SCHOEN FJ, BIANCO R, LEVY RJ. Inhibition of Aortic Wall Calcification in Bioprosthetic Heart Valves by Ethanol Pretreatment: Biochemical and Biophysical Mechanisms. *J Biomed Mater Res*. 42:30-37, 1998
 29. LEVY RJ. Glutaraldehyde and the Calcification Mechanism of Bioprosthetic Heart Valves. *J Heart Valve Dis*. 3(1):101-104, 1994
 30. LITWAK RS, HANCOCK WB, LUKBAN SB, JURADO RS, OLSEN EGJ. Results of Mitral Valve Replacement with Formalin-Fixed Porcine Xenografts. *Adv. Cardiol*. 7:119-137, 1972
 31. LOKE WK, KHOR E. Validation of the Shrinkage Temperature of Animal Tissue for Bioprosthetic Heart Valve Application by Differential Scanning Calorimetry. *Biomaterials*, 16:251-258, 1995
 32. MA L, GAO C, MAO Z, ZHOU J, SHEN J, HU X, HAN C. Collagen/Chitosan Porous Scaffolds with Improved Biostability for Skin Tissue Engineering. *Biomaterials*, 24:4833-4841, 2003
 33. MANSUR HS. Técnicas de Caracterização de Materiais. In: ORÉFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Capítulo 7, 185-235
 34. MANSUR HS, SADAHIRA CM, MANSUR AAP. FTIR Spectroscopy Characterization of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel with Different Hydrolysis Degree

- and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde. *Materials Science & Engineering, C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, v. 28, p. 539-548, 2008
35. MERCURI JJ, LOVEKAMP JJ, SIMIONESCU DT, VYAVAHRE NR. Glycosaminoglycan-Targeted Fixation for Improved Bioprosthetic Heart Valve Stabilization. *Biomaterials*. 28:496-503, 2007
 36. MIGNEAULT I, DARTIGUENAVE C, BERTRAND MJ, WALDRON KC. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins and Application to Enzyme Crosslinking. *Biotechniques*, 37:790-802, 2004
 37. MIRNAJAFI A, RAYMER J, SCOTT MJ, SACKS MS. The Effects of Collagen Fiber Orientation on the Flexural Properties of Pericardial Heterograft Biomaterials. *Biomaterials*. 26:795-804, 2005
 38. MYKEN P, BECH-HANSSSEN O, PHIPPS B, CAIDAHL K. Fifteen Years Follow Up with the St. Jude Medical Biocor Porcine Bioprosthesis. *J Heart Valve Dis*. 9:415-422, 2000
 39. NIMNI ME. The Cross-Linking and Structure Modification of the Collagen Matrix in the Design of Cardiovascular Prosthesis. *J Card Surg*. 3:523-533, 1988
 40. NIMNI ME. Glutaraldehyde Fixation Revisited. *J Long Term Eff Med Implants*, 11(3&4):151-161, 2001
 41. OOSTHUYSEN A, ZILLA PP, HUMAN PA, SCHMIDT CAP, BEZUIDENHOUT D. Bioprosthetic Tissue Preservation by Filling with a Poly(Acrylamide) Hydrogel. *Biomaterials*. 27:2123-2130, 2006
 42. OSWAL D, KOROSSIS S, MIRSADRAEE S, WILCOX H, WATTERSON K, FISHER J, INGHAM E. Biomechanical Characterization of Decellularized and Cross-Linked Bovine Pericardium. *J Heart Valve Dis*. 16(2):165-174, 2007
 43. PETTENAZZO E, DEIWICK M, THIENE G, MOLIN G, GLASMACHER B, MARTIGNAGO F, BOTTIO T, REUL H, VALENTE M. Dynamic in vitro Calcification of Bioprosthetic Porcine Valves: Evidence of Apatite Crystallization. *J Thorac. Cardiovasc Surg*. 121(3):500—509, 2001
 44. ROSE AG. Pathology of the Formalin-Treated Heterograft Porcine Aortic Valve in the Mitral Position. *Thorax*. 27:401-409, 1972
 45. ROUSSEAU CF, GAGNIEU CH. In vitro Cytocompatibility of Porcine Type I Atecollagen Crosslinked by Oxidized Glycogen. *Biomaterials*. 23:1503-1510, 2002
 46. SANTOS MH, HENEINE LGD, MANSUR HS. Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate/Collagen Biocomposites Doped with Zn²⁺. *Materials Science and Engineering, C* 28: 563-571, 2008

47. SCHOEN FJ. Cardiac Valve Bioprosthesis: Pathological and Bioengineering Considerations. *J Card Surg.* 2(1):65-108, 1987
48. SCHOEN FJ, LEVY RJ. Calcification of Tissue Heart Valve substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *Ann Thorac Surg.* 79:1072-1080, 2005
49. SCHRYER PJ, TOMASEK ER, STARR JA, WRIGHT JTM. Anticalcification Effect of Glutaraldehyde Preserved Valve Tissue Stored for Increasing Time in Glutaraldehyde. In: BODNAR E, YACOUB M. *Biologic & Bioprosthetic Valves; Proceedings of the Third International Symposium.* 1st Edition. New York: Yorke Medical Books, 1986. 471-477
50. SHARMA CP. Blood-Compatible Materials: a Perspective. *J Biomater Appl.* 15: 359-381, 2001
51. SHU-TUNG LI. Biological Biomaterials: Tissue-derived Biomaterials (Collagen). In: BRONZINO, JD. *The Biomedical Engineering Handbook.* 2^a Edição. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000. Capítulo 42
52. ST JUDE MEDICAL INC. Bioprosthetic Heart Valves: History, Design, Performance and Selection Criteria. *Notas da Empresa. Uso restrito, cópia não disponível.* 1995
53. ST JUDE MEDICAL INC. Fixation Methods/Pressures used for Porcine Bioprosthetic Heart Valves. *Notas da Empresa. Uso restrito, cópia não disponível.* 1995
54. SUNG HW, CHANG Y, CHIU CT, CHEN CN, LIANG HC. Mechanical Properties of a Porcine Aortic Valve Fixed with a Naturally Occurring Crosslinking Agent. *Biomaterials.* 20:1759-1772, 1999
55. VESELY I. The Evolution of Bioprosthetic Heart Valve Design and its Impact on Durability. *Cardiovasc. Pathol.,* 12(5):277-286, 2003
56. VESELY I, BOUGHNER D, SONG T. Tissue Buckling as a Mechanism of Bioprosthetic Valve Failure. *Ann Thorac Surg.* 46:302-308, 1988
57. VON OPPELL UO, ZILLA P. Prosthetic Heart Valves: Why biological? *J Long Term Eff Med Implants,* 11(3&4):105-113, 2001
58. VYAVAHRE N, HIRSCH D, LERNER E, BASKIN JZ, SCHOEN FJ, BIANCO R, KRUTH HS, ZAND R, LEVY RJ. Prevention of Bioprosthetic Heart Valve Calcification by Ethanol Preincubation: Efficacy and Mechanisms. *Circulation.* 95(2):479-488, 1997
59. VYAVAHRE NR, JONES PL, HIRSCH D, SCHOEN FJ, LEVY RJ. Prevention of Glutaraldehyde-Fixed Bioprosthetic Heart Valve Calcification by Alcohol Pretreatment: Further Mechanistic Studies. *J Heart Valve Dis.* 9:561-566, 2000

60. WALDMAN SD, LEE JM. Effect of Sample Geometry on the Apparent Biaxial Mechanical Behavior of Planar Connective Tissues. *Biomaterials*. 26:7504-7513, 2005
61. WOODROOF EA. Use of Glutaraldehyde and Formaldehyde to Process Tissue Heart Valves. *J Bioeng*, 2(1-2):1-9, 1978
62. WOODROOF EA. The Chemistry and Biology of Aldehyde Treated Tissue Heart Valve Xenografts. In: IONESCU MI. *Tissue Heart Valve*. Butterworths & Co (Publishers) Ltd. 1979, p. 347-362
63. YUNORI S, SUZUKI T, TAKAI M. Stabilization of Low Denaturation Temperature Collagen from Fish by Physical Cross-Linking Methods. *J Biosci Bioeng*, 96(6):5775-5777, 2003

10. APÊNDICE A

ANÁLISE ANOVA DE VALORES DE INTUMESCIMENTO

10.1 Variável Tempo

10.1.1 Cúspides Porcinas

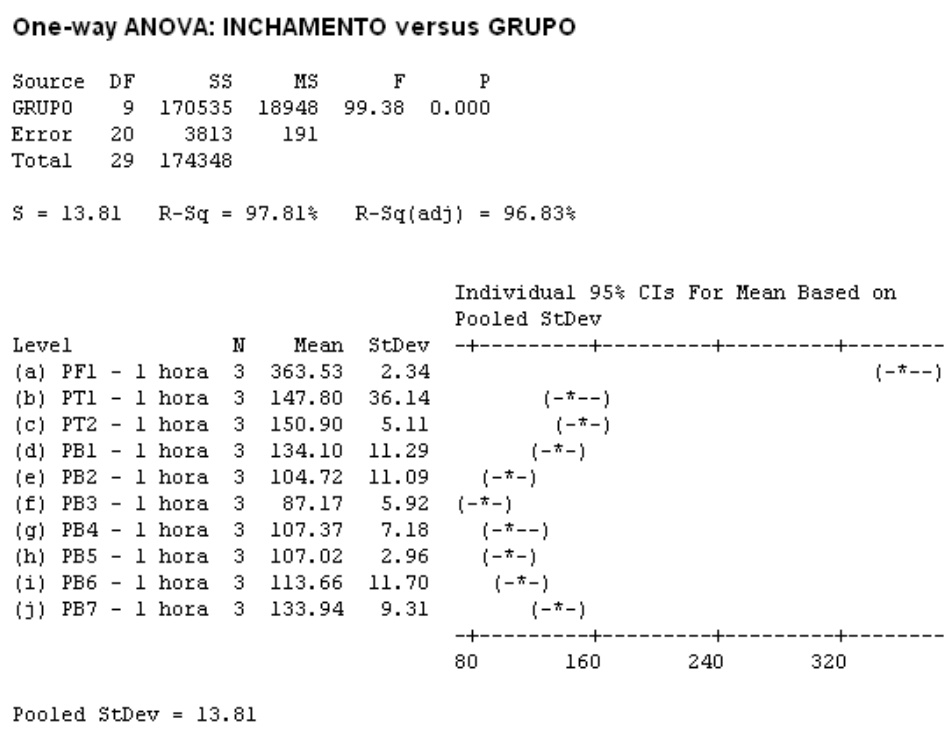


Figura 10.1 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	8	11386	1423	6.74	0.000
Error	18	3802	211		
Total	26	15188			

S = 14.53 R-Sq = 74.96% R-Sq(adj) = 63.84%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
(b) PT1 - 1 hora	3	147.80	36.14
(c) PT2 - 1 hora	3	150.90	5.11
(d) PB1 - 1 hora	3	134.10	11.29
(e) PB2 - 1 hora	3	104.72	11.09
(f) PB3 - 1 hora	3	87.17	5.92
(g) PB4 - 1 hora	3	107.37	7.18
(h) PB5 - 1 hora	3	107.02	2.96
(i) PB6 - 1 hora	3	113.66	11.70
(j) PB7 - 1 hora	3	133.94	9.31

75 100 125 150

Pooled StDev = 14.53

Figura 10.2 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

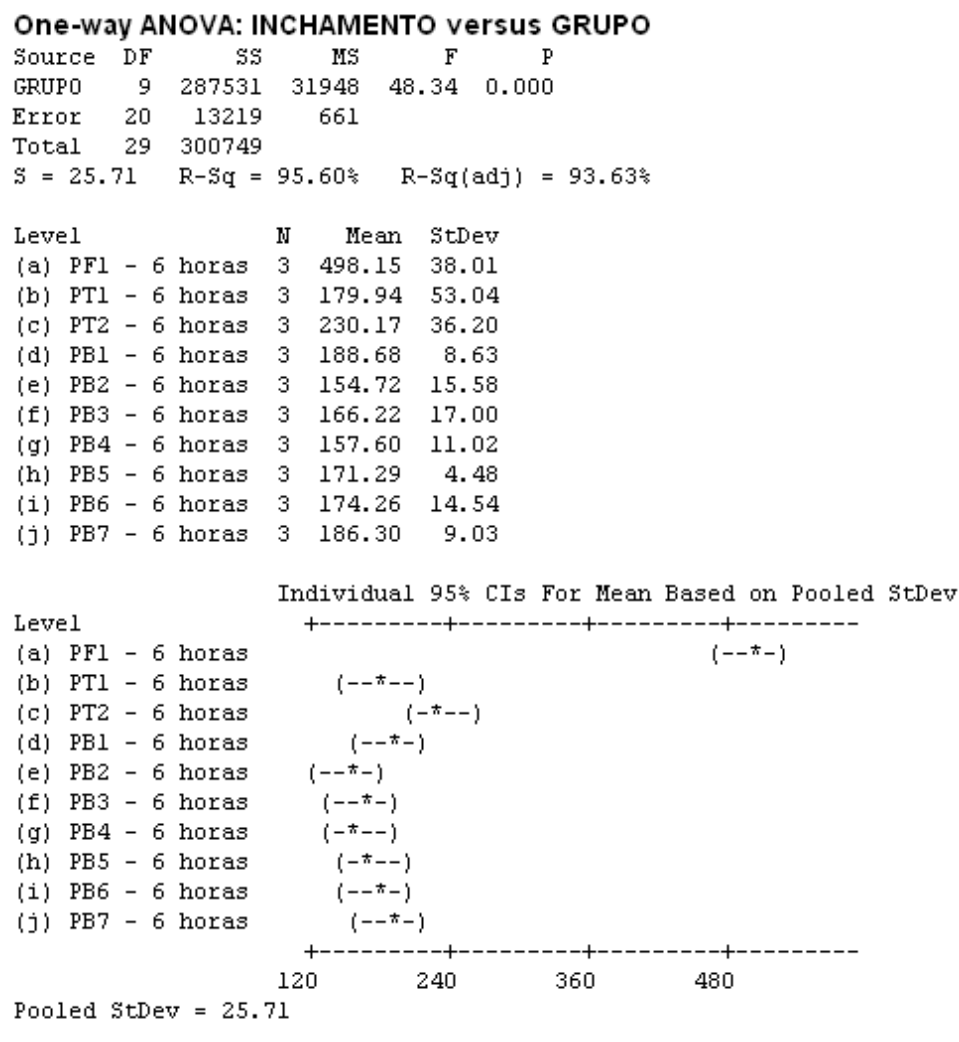
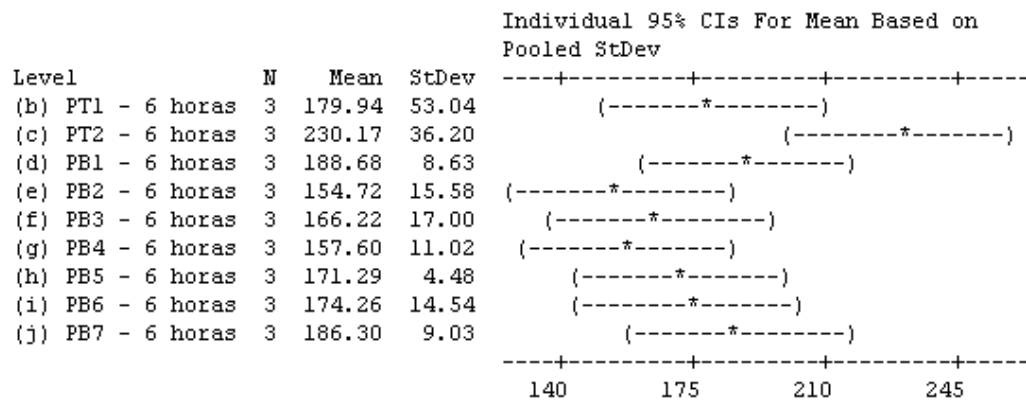


Figura 10.3 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	8	12178	1522	2.65	0.041
Error	18	10329	574		
Total	26	22506			

S = 23.95 R-Sq = 54.11% R-Sq(adj) = 33.71%



Pooled StDev = 23.95

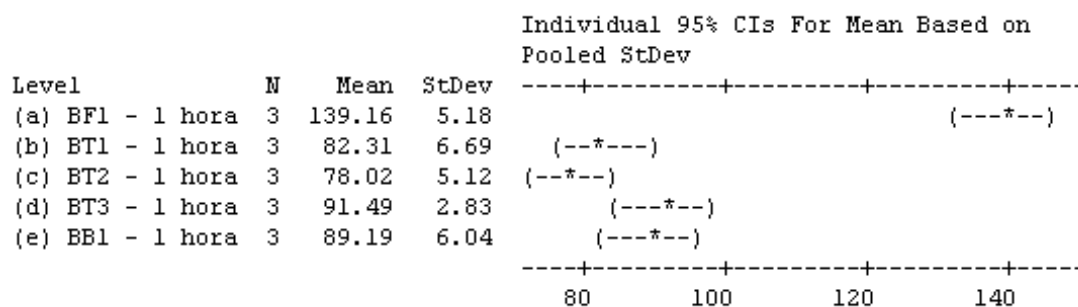
Figura 10.4 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão

10.1.2 Pericárdio Bovino

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	4	7321.4	1830.3	64.32	0.000
Error	10	284.6	28.5		
Total	14	7605.9			

S = 5.334 R-Sq = 96.26% R-Sq(adj) = 94.76%



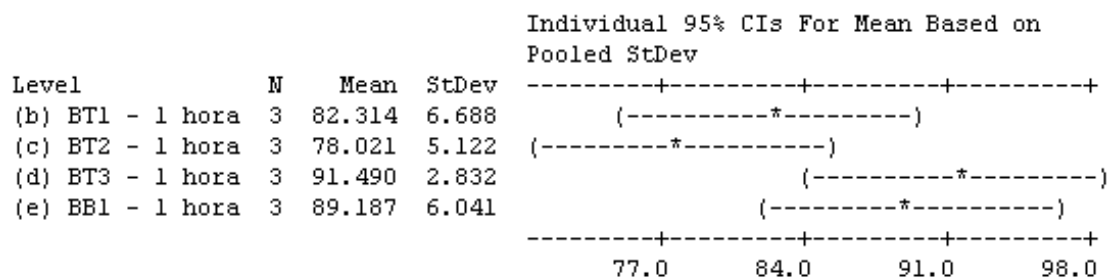
Pooled StDev = 5.33

Figura 10.5 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	3	345.9	115.3	3.99	0.052
Error	8	231.0	28.9		
Total	11	576.9			

S = 5.373 R-Sq = 59.96% R-Sq(adj) = 44.95%



Pooled StDev = 5.373

Figura 10.6 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 1h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	4	29884.9	7471.2	131.67	0.000
Error	10	567.4	56.7		
Total	14	30452.3			

S = 7.533 R-Sq = 98.14% R-Sq(adj) = 97.39%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI
(a) BF1 - 6 horas	3	197.25	9.14	(- * - -)
(b) BT1 - 6 horas	3	83.03	10.24	(- - * -)
(c) BT2 - 6 horas	3	78.09	4.75	(- * - -)
(d) BT3 - 6 horas	3	93.53	3.61	(- - * -)
(e) BB1 - 6 horas	3	91.55	7.73	(- * - -)

70 105 140 175

Pooled StDev = 7.53

Figura 10.7– Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	3	473.0	157.7	3.15	0.086
Error	8	400.4	50.1		
Total	11	873.4			

S = 7.075 R-Sq = 54.15% R-Sq(adj) = 36.96%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI
(b) BT1 - 6 horas	3	83.03	10.24	(- - - - * - - - -)
(c) BT2 - 6 horas	3	78.09	4.75	(- - - - * - - - -)
(d) BT3 - 6 horas	3	93.53	3.61	(- - - - * - - - -)
(e) BB1 - 6 horas	3	91.55	7.73	(- - - - * - - - -)

70 80 90 100

Pooled StDev = 7.07

Figura 10.8 – Análise ANOVA para Amostras de Pericárdio Bovino após 6h de Imersão

10.2 Variável Concentração da Solução de Glutaraldeído

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	2	16.6	8.3	0.28	0.758
Error	15	440.1	29.3		
Total	17	456.7			

S = 5.417 R-Sq = 3.63% R-Sq(adj) = 0.00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
PG02 - 1 hora	6	74.900	5.976	(-----*-----)
PG04 - 1 hora	6	76.731	2.950	(-----*-----)
PG06 - 1 hora	6	77.093	6.603	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
72.0 75.0 78.0 81.0

Pooled StDev = 5.417

Figura 10.9 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 1h de Imersão

One-way ANOVA: INCHAMENTO versus GRUPO

Source	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	2	111.1	55.6	2.58	0.109
Error	15	323.5	21.6		
Total	17	434.6			

S = 4.644 R-Sq = 25.57% R-Sq(adj) = 15.65%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
PG02 - 6 horas	6	79.184	5.658	(-----*-----)
PG04 - 6 horas	6	85.240	5.077	(-----*-----)
PG06 - 6 horas	6	81.690	2.630	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
76.0 80.0 84.0 88.0

Pooled StDev = 4.644

Figura 10.10 – Análise ANOVA para Amostras de Cúspide Porcina após 6h de Imersão