

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de Mestrado

**“SOLDAGEM TÉRMICA DE TECIDO BIOLÓGICO RICO EM COLÁGENO (AORTA  
PORCINA)”**

Autor: Rubem Lucas Pena de Figueiredo

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréface

Fevereiro/ 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Rubem Lucas Pena de Figueiredo

**SOLDAGEM TÉRMICA DE TECIDO BIOLÓGICO RICO EM COLÁGENO (AORTA  
PORCINA)**

Dissertação de Mestrado 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. Rodrigo Lambert Oréfice

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
2009

À minha esposa, Gesieni,  
minha filha, Gabriela,  
meus pais, Cida e Rubens  
e minha irmã, Raíssa

## **AGRADECIMENTOS:**

O autor agradece a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na preparação deste trabalho e, em particular:

Ao Prof. Rodrigo Oréfica

Ao Prof. Vicente Tadeu Lopes Buono

Ao Prof. Paulo José Modenesi

À Maria Sylvia Silva Dantas

Ao Luiz Martins Pinheiro

Ao José Barone Rosa

À Izabela Caiafa

Ao Zhengrong Zhou

À Dory Chretin

Ao Dr. Marcelo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
3.1	Válvulas cardíacas e biopróteses de válvulas cardíacas.....	6
3.2	Tecido conjuntivo e colágeno.....	8
3.3	Soldagem de tecidos.....	11
3.4	Vantagens e desvantagens da solda em relação à sutura. ....	13
3.5	Hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na soldagem de tecidos. ....	17
3.6	Fixação química do tecido e sua importância após o processo de soldagem. 22	
3.7	Metodologia e resultados obtidos com as soldas.....	24
4	METODOLOGIA .....	30
4.1	Preparação da amostra.....	30
4.1.1	Preparação da amostra para o processo de solda térmica em estufa.....	31
4.1.2	Preparação da amostra para exposição à temperatura por imersão em líquido aquecido.....	35
4.2	Parâmetros de temperatura, tempo, re-hidratação e fixação dos experimentos.....	36

4.2.1	Variação da temperatura e umidade .....	36
4.2.2	Efeito da fixação com glutaraldeído do tecido soldado .....	36
4.2.3	Avaliação da re-hidratação do tecido soldado.....	37
4.2.4	Variação do tempo de exposição ao calor na estufa.....	37
4.2.5	Comparação da resistência mecânica do tecido soldado com o tecido suturado e com o tecido íntegro .....	37
4.2.6	Experimentos preliminares .....	37
4.3	Análise das soldas .....	40
4.3.1	Análise visual .....	40
4.3.2	Ensaio de Tração .....	41
4.3.3	Análise no Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental.....	42
4.3.4	Análise com Microscopia Raman .....	43
4.3.5	Encurtamento e Análise Histológica.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1	Análise visual das soldas .....	44
5.2	Ensaio de tração.....	46
5.2.1	Variação de temperatura e umidade .....	46
5.2.2	Efeito da fixação química com glutaraldeído da peça soldada .....	48
5.2.3	Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica .....	49

5.2.4	Efeito da re-hidratação do tecido soldado.....	50
5.2.5	Efeito do tempo de exposição ao calor na estufa.....	51
5.2.6	Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica.....	53
5.2.7	Comparação da resistência mecânica da tecido soldado e do tecido suturado.....	54
5.2.8	Comparação da resistência mecânica da solda e do tecido íntegro.....	55
5.2.9	Comparação da resistência mecânica da solda e do tecido íntegro após alta desidratação das amostras.....	56
5.3	Análise de curvas Tensão x Deformação obtidas nos ensaios de tração.....	58
5.4	Análise no Microscópio Eletrônico de Varredura.....	62
5.5	Análise com Microscopia Raman.....	65
6	CONCLUSÕES.....	71
7	RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS.....	74
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
10	APÊNDICES.....	81
10.1	Apêndice A: Análises de Variância dos dados de Tensão Média de Resistência.....	81
10.1.1	Análise de Variância para os dados da Tabela 5-1 - Resistência mecânica x Umidade Relativa.....	81

10.1.2	Análise de Variância para os dados da Tabela 5-2 - Resistência mecânica x Temperatura .....	82
10.1.3	Análise de Variância para os dados da Tabela 5-3 - Resistência mecânica: Tecido não-fixado x tecido fixado .....	84
10.1.4	Análise de variância para os dados da Tabela 5-4 - Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica .....	85
10.1.5	Análise de Variância dos dados da Tabela 5-7 - Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica .....	87
10.1.6	Análise de Variância dos dados da Tabela 5-8 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido suturado .....	87
10.1.7	Análise de Variância dos dados da Tabela 5-9 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro .....	88
10.1.8	Análise de Variância dos dados da Tabela 5-10 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro após alta desidratação.....	90

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 - Corte do coração mostrando as válvulas abrindo e fechando durante a diástole e a sístole. ....	6
Figura 3-2 - Foto de uma bioprótese de válvula porcina, produzida pela St. Jude Medical.....	8
Figura 3-3 - Fibras, fibrilas e microfibrilas do colágeno. (CAMPBELL, 1995).....	9
Figura 4-1 - Processo de limpeza do segmento aórtico para o processo de soldagem térmica .....	31
Figura 4-2 - Preparação da amostra para exposição ao calor.....	33
Figura 4-3 - Opção de fixação do tecido biológico à placa de silicone com linha.....	34
Figura 4-4 - Aspecto do conjunto após a fixação do tecido com alfinetes e fixação das tiras de papel-toalha.....	34
Figura 4-5 - Preparação da amostra para solda com aposição forçada.....	39
Figura 4-6 - Corte na amostra para o ensaio de tração.....	41
Figura 4-7 - Configuração do ensaio de tração da amostra soldada.....	42
Figura 4-8 - Sub-seção a-b da amostra original para observação no MEV .....	43
Figura 5-1 - Aspecto do tecido na região da solda. Tecido com grau médio de desidratação. ....	45
Figura 5-2 - Aspecto da região da solda em uma amostra com alto grau de desidratação. ....	45

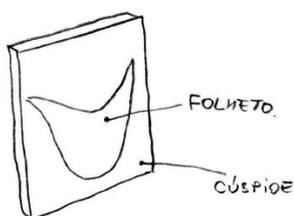
Figura 5-3 - Resistência mecânica elevada em parte de uma das amostras soldadas	53
Figura 5-4 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido fresco.....	58
Figura 5-5 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido soldado e com alto grau de desidratação. ....	59
Figura 5-6 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido parcialmente desidratado na estufa .....	60
Figura 5-7 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido fixado quimicamente com glutaraldeído. ....	61
Figura 5-8 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido soldado e fixado quimicamente em glutaraldeído.....	62
Figura 5-9 - Imagem gerada no MEV da região da solda térmica (100x).....	64
Figura 5-10 - Imagem gerada no MEV da região da solda térmica (400x).....	64
Figura 5-11 – Desenho esquemático mostrando as regiões do tecido analisadas na espectroscopia Raman. ....	65
Figura 5-12 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 400 a 700 $\text{cm}^{-1}$ . ....	68
Figura 5-13 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 700 a 1250 $\text{cm}^{-1}$ . ....	69
Figura 5-14 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 1200 a 1700 $\text{cm}^{-1}$ . ....	69
Figura 5-15 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 2800 a 3800 $\text{cm}^{-1}$ . ....	70

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3-1 - Resumo dos resultados de tensão de resistência obtidos por alguns pesquisadores.....	29
Tabela 5-1 - Resistência mecânica x Umidade Relativa para $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $t = 24\text{ h}$ .....	46
Tabela 5-2 - Resistência mecânica x Temperatura para $\%H_2O = 35\%$ e $t = 24\text{ h}$ .....	47
Tabela 5-3 - Resistência mecânica: Tecido não-fixado x tecido fixado .....	48
Tabela 5-4 - Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica.....	49
Tabela 5-5 - Efeito da re-hidratação na resistência mecânica.....	50
Tabela 5-6 - Efeito do tempo de exposição ao calor na resistência mecânica .....	51
Tabela 5-7 - Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica .....	53
Tabela 5-8 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido suturado .....	54
Tabela 5-9 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro.....	55
Tabela 5-10 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro após alta desidratação .....	57

## DEFINIÇÕES

**Cúspide e Folheto:** A cúspide é parte da válvula cardíaca, que tem a função de permitir que o sangue flua em somente um sentido. Normalmente há três cúspides para cada válvula, com exceção da válvula mitral, que possui duas cúspides. O folheto é o tecido em forma de bolsa, que faz parte da cúspide da válvula cardíaca.



**Anastomose:** Uma união natural ou cirúrgica de duas partes ou ramais de estruturas tubulares de forma a torná-los contínuos. Um exemplo é a reconexão cirúrgica de duas extremidades de uma artéria.

**Desnaturação:** Um processo no qual a estrutura de uma proteína é alterada, fazendo com que a proteína torne-se biologicamente inativa. É a destruição de sua estrutura tridimensional natural, causada por um agente externo (calor, por exemplo).

## **SIGLAS**

**AEO:** Área Efetiva do Orifício. Área da válvula que abre efetivamente durante o ciclo cardíaco sob fluxo e pressão constantes.

**ANOVA:** Acrônimo para "Analysis of Variance", ou Análise de Variância. É um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias de dois grupos de dados.

**DSC:** "Differential Scanning Calorimetry", ou Calorimetria Exploratória Diferencial. Técnica termoanalítica na qual a diferença na quantidade de calor requerida para aumentar a temperatura de uma amostra e uma referência são medidas em função da temperatura. A principal aplicação é estudar transição de fases, tais como fusão, transição vítrea e decomposições térmicas.

**MEV:** Microscópio Eletrônico de Varredura.

## RESUMO

Biopróteses de válvulas cardíacas são fabricadas com suturas, que trazem desvantagens como a dificuldade de automatizar o processo e concentração de tensão na região de união do tecido. A soldagem de tecido é uma técnica que pode ser um substituto à sutura.

Estudos foram realizados com o intuito de avaliar a viabilidade da solda térmica para o tecido biológico utilizado na bioprótese, avaliar sua resistência mecânica e procurar entender os mecanismos envolvidos no processo.

Os experimentos envolveram aplicação direta de calor no tecido a ser soldado. Na busca dos melhores resultados, foram investigadas variações nos seguintes parâmetros: temperatura, umidade, tempo de exposição, método de aplicação do calor e fixação química. O melhor método consistiu em fazer um incisão numa amostra do tecido e expô-lo à temperatura e umidade controladas numa estufa. A resistência mecânica da solda foi avaliada num ensaio de tração.

A maior resistência mecânica média foi obtida com a solda feita na estufa a 40 °C, com umidade controlada entre 30 e 40%. O tempo de exposição ao calor também aumentou a resistência mecânica, mas esta diferença desapareceu após a fixação química. Por sua vez, a fixação química mostrou-se indispensável na estabilidade da solda, já que esta se desfaz após a re-hidratação em solução salina, caso não seja fixada. Os melhores resultados foram obtidos com glutaraldeído a 2,50% por 15 dias. Os resultados correspondem a cerca da metade da resistência mecânica média obtida com suturas, mas alguns valores isolados mostraram que há o potencial de se obter soldas com resistência comparável à sutura. A espectroscopia Raman e a análise no MEV mostraram que a solda está mais relacionada à ligação química entre fibras de colágeno do que propriamente uma fusão do material.

## ABSTRACT

Cardiac valve bioprosthesis are manufactured by means of sutures, which brings some disadvantages, as the difficulty of creating an automated process and the stress concentration in the tissue suturing region. Tissue welding is a technique that can replace the suture.

Studies were carried out with the purpose to assess the feasibility of applying the thermal welding in the biological tissue used in the bioprosthesis, evaluating its mechanical strength and understanding the mechanisms involved in the process.

The experiments involved the direct application of heat in the tissue to be welded. In order to pursue the best results, the following parameters were assessed: temperature, humidity, exposure time, heat application method and chemical fixation. The best method consisted of making an incision in the tissue sample and exposing it to the controlled temperature and humidity in an incubator. The mechanical strength of the weld was evaluated in a tensile test machine.

The highest average mechanical strength was obtained from the weld made within the incubator at 40 °C, with a controlled humidity between 30% and 40%. The heat exposure time also increased the mechanical strength, but this difference disappeared after the chemical fixation. The chemical fixation in turn was demonstrated to be essential for the stability of the weld, which disappears after re-hydration in saline solution, if it was not fixed. The best results were obtained with 2.50% glutaraldehyde for 15 days. The results correspond to about half of the average mechanical strength obtained with sutures, but some isolated values showed that the potential to obtain welds with the strength as the suture. Raman spectroscopy and analysis at the SEM showed that the weld is more associated with chemical bonds between collagen fibers than material fusion.

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa aqui apresentada sobre a soldagem de tecidos biológicos foi realizada objetivando uma potencial aplicação na fabricação de biopróteses de válvulas cardíacas.

Próteses de válvulas cardíacas são utilizadas para substituir, cirurgicamente, válvulas do coração, principalmente as válvulas aórtica e mitral. A válvula nativa pode apresentar alguma anomalia ou problema que impeça o seu funcionamento normal, afetando desta forma a circulação adequada de sangue pelo corpo que leva a diversas complicações na vida normal de uma pessoa. Em alguns casos há a possibilidade de reparar a válvula nativa, mas em outros há a necessidade de substituir a válvula doente por uma prótese, que pode ser mecânica ou biológica. O alvo desta investigação é a do tipo biológica.

As próteses de válvulas cardíacas biológicas são também denominadas biopróteses de válvulas cardíacas. O termo "bioprótese" foi criado por Carpentier, renomado pesquisador da área cardiovascular, que também introduziu, em 1968, o glutaraldeído como agente para fixação de tecidos biológicos. Este composto químico é utilizado até os dias de hoje como o mais indicado para o processo de fixação química.

Biopróteses de válvulas cardíacas biológicas são hoje produzidas através da utilização de folhetos de válvulas porcinas ou de folhetos produzidos com o pericárdio bovino. Em ambos os casos, os folhetos são presos, através de suturas, a um anel de material polimérico. A pesquisa será focada na bioprótese de material porcino.

A produção destas válvulas é um trabalho manual, que consiste essencialmente na execução de suturas que unem os três folhetos e os prendem ao anel de suporte. Algumas destas suturas são de difícil execução, especialmente na execução da comissura – que une as paredes de dois folhetos adjacentes – e, ao mesmo tempo, os fixa ao anel. A dificuldade está no acesso à região de sutura e à técnica exigida para se ter um bom acabamento.

Devido à irregularidade do material biológico, que apresenta as mais diversas variações de forma e tamanho, por ser um material muito flexível e pela complexidade da técnica utilizada para suturar os folhetos, torna-se muito difícil inserir etapas automatizadas no processo. Em outras palavras, a produção fica muito dependente de uma mão-de-obra muito especializada. E é praticamente impossível encontrar profissionais prontos para a produção de uma bioprótese de válvula cardíaca, exigindo um treinamento muito longo. Em um certo fabricante local o treinamento pode durar cerca de 6 meses.

Talvez a solução para a questão da automação de algumas etapas esteja numa tecnologia que tem sido desenvolvida na área cirúrgica, e a qual percebeu-se que poderia ter uma potencial aplicação na fabricação de biopróteses de válvulas cardíacas: a soldagem de tecido biológico.

No campo da cirurgia de reparo de alguns órgãos como rim, vasos sanguíneos (anastomose) e fígado, a soldagem como alternativa à sutura vem sendo bastante estudada. Várias técnicas vêm sendo estudadas, inclusive utilizando-se laser como fonte de energia para o processo. Esta técnica ainda está em fase de pesquisa, ainda que já tenha sido aplicada algumas vezes em campo, mas os resultados têm empolgado os pesquisadores.

As pesquisas citam dois termos quando falam de soldagem de tecidos: "tissue welding" e "tissue soldering". "Tissue welding" pode ser traduzido como soldagem de tecido, pela semelhança ao processo utilizado com outros materiais, principalmente o metal. Na soldagem, a união ocorre por aquecimento das bordas apostas e consequente união, sem a necessidade de qualquer outro agente estranho ao próprio material. Já para "tissue soldering", a melhor tradução que podemos encontrar é brasagem. Na metalurgia ou ciências dos materiais, brasagem é o processo de união de dois materiais, pela adição de um material diferente cuja temperatura de fusão é menor que a do material de base.

Nas pesquisas de união de tecidos biológicos, começou-se a utilizar o termo "soldering" quando descobriu-se que a adição de algumas proteínas, como a albumina, aumentavam a resistência da solda. Porém, é importante destacar logo aqui na introdução que a brasagem não é um método interessante para o objetivo deste

trabalho. Na cirurgia ele é útil, pois aumenta a resistência da solda e o agente soldante é absorvido gradativamente pelo corpo humano, à medida que o processo natural de recuperação ou cicatrização do tecido vai ocorrendo. Em outras palavras, numa cirurgia em um tecido vivo, a solda só é importante mesmo nos primeiros momentos, até que a regeneração do tecido retome a resistência normal do mesmo. Mas como o alvo deste trabalho é um bioprótese de válvula porcina, cujo tecido está "morto" e não tem condições de se regenerar, a solda tem que ser definitiva. Portanto, descarta-se a opção da brasagem neste trabalho. Além disso, a solda pura, sem um material estranho, é também mais interessante simplesmente pela não necessidade de se adicionar um material estranho na prótese.

No processo de montagem de uma válvula cardíaca, a união por soldagem traz vantagens potenciais em relação ao método atual com suturas:

- Possibilidade de desenvolver etapas automatizadas de fabricação.
- Melhor acabamento na região de união, que pode se traduzir também em melhor comportamento hemodinâmico da bioprótese.
- Ganho de produtividade, ou seja, o tempo gasto com soldagem do tecido menor que a aplicação de uma sutura.

A investigação sobre os efeitos da soldagem térmica no tecido biológico ajudarão a entender o potencial desta técnica para futuras aplicações na manufatura de biopróteses de válvulas cardíacas.

## 2 OBJETIVOS

Nas fontes pesquisadas, vê-se que há muitas pesquisas no campo cirúrgico, mas nada com relação a biopróteses. A intenção é então demonstrar que existe um potencial de aplicação da solda térmica em próteses que utilizam material biológico, mais especificamente, biopróteses de válvulas cardíacas.

De forma bem sucinta, os principais objetivos deste trabalho são:

- Verificar a viabilidade do uso da solda térmica para o tecido da cúspide porcina - que é o tecido utilizado na fabricação da bioprótese de válvula porcina.
- Definir parâmetros importantes que possam auxiliar, em um trabalho posterior, no desenvolvimento de uma técnica de soldagem a laser deste tecido.
- Verificar a possibilidade de executar a soldagem sem a necessidade de se utilizar material exógeno ou cromóforos para auxiliar na soldagem. A soldagem deve ser realizada tão somente com a ação do calor sobre o material.
- Investigar a resistência mecânica do tecido soldado, comparando-o com a resistência natural do tecido e também com o tecido unido por suturas.
- Procurar entender os mecanismos envolvidos na soldagem térmica do tecido.

### ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para alcançar estes objetivos, foram feitos experimentos com aplicação direta de calor no tecido a ser soldado. Estes experimentos envolveram variações nos seguintes parâmetros, na busca da combinação que trouxesse os melhores resultados para a soldagem do tecido:

- Temperatura.

- Umidade relativa.
- Tempo de exposição à temperatura.
- Método de aplicação do calor (aplicação direta de calor com metal aquecido, estufa com temperatura e umidade controladas, imersão em solução com temperatura controlada)
- Fixação química do tecido biológico com glutaraldeído após o processo de soldagem (com variação também nos parâmetros do processo de fixação química, como concentração do agente fixador e tempo).

A resistência da solda foi investigada através de ensaios de tração, para quantificação da resistência mecânica do material soldado. Foi também avaliada através de comparação com o tecido íntegro e com o tecido suturado.

Para buscar um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de soldagem, além de avaliar os resultados obtidos com os experimentos acima descritos, foram também realizadas análises em microscópio eletrônico de varredura e espectroscopia Raman.

O MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) foi utilizado para se analisar a estrutura física na região da solda, onde foi observado se a solda ocorreu por uma simples fusão do material, um entrelaçamento das fibras de colágeno, alguma ligação entre as fibras de colágeno ou qualquer outro aspecto que traga uma informação útil no entendimento do processo de soldagem.

A espectroscopia Raman foi útil para se analisar ligações químicas que porventura tenha surgido (ou desaparecido) com o processo de aquecimento do tecido, e que, portanto tenham contribuído para o processo de soldagem.

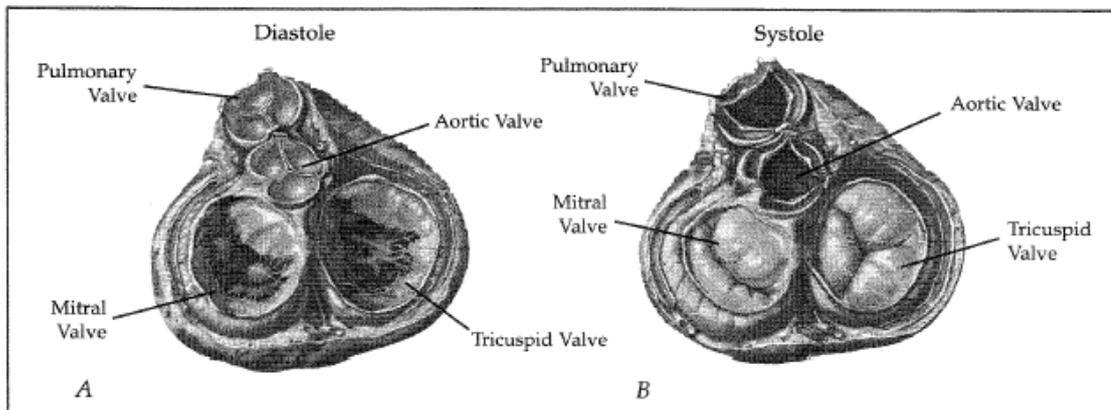
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Válvulas cardíacas e biopróteses de válvulas cardíacas.

As válvulas cardíacas são as responsáveis por regular o fluxo de sangue através do coração, através da abertura e fechamento de seus folhetos.

Quatro válvulas principais mantêm o sangue fluindo em uma só direção através do coração. O fluxo de sangue entre o átrio e ventrículo é controlado pela válvula tricúspide no lado direito e pela válvula mitral no lado esquerdo. As válvulas aórtica e pulmonar controlam a passagem de sangue que sai do coração.

As mudanças que ocorrem com a pressão no coração, causadas pela contração (sístole) e relaxamento (diástole), fazem as válvulas abrirem e fecharem (Figura 3-1).



**Figura 3-1 - Corte do coração mostrando as válvulas abrindo e fechando durante a diástole e a sístole.**

Há, basicamente, dois tipos de próteses de válvulas no mercado: válvulas mecânicas e válvulas biológicas – com material de origem porcina ou bovina. Há válvulas biológicas com material oriundo de outros animais, mas não em escala industrial.

Entre as válvulas biológicas, há modelos fabricadas com ou sem anel de suporte. As válvulas biológicas citadas neste trabalho referem-se às válvulas fabricadas com anel do fabricante St. Jude Medical.

As válvulas biológicas apresentam as seguintes vantagens, quando comparadas às mecânicas:

- Melhor hemodinâmica.
- Baixa trombogenicidade, ou seja, não há necessidade de anticoagulantes.
- Melhor qualidade de vida.

As válvulas biológicas porcina são construídas a partir da válvula de porcos, da qual extraem-se as cúspides. Estas cúspides são selecionadas, fixadas e preparadas para o processo de fabricação. As cúspides preparadas são, então, selecionadas pelo operador num processo chamado de “casamento”, na qual ele escolhe três cúspides cujas características e tamanho são as mais próximas possíveis. Estas três cúspides são então posicionadas e fixadas a um anel de plástico revestido com um pano de poliéster, formando a válvula, como a da foto na Figura 3-2



**Figura 3-2 - Foto de uma bioprótese de válvula porcina, produzida pela St. Jude Medical**

Após a fabricação, a bioprótese é submetida ao Teste de Fluxo Uniforme, no qual é verificado o gradiente de pressão através da válvula quando um fluido a atravessa. Este valor é importante, pois está diretamente relacionado com o esforço que o coração deverá fazer quando bombear o sangue através das válvulas. Valores de gradiente são aceitos somente até um limite superior. Caso a bioprótese apresente um valor acima deste limite, ela não poderá ser aceita para uso clínico. Para que a válvula apresente baixos valores de gradiente de pressão, é importante, além de vários fatores como bom casamento entre os folhetos, que ela tenha um bom acabamento. O gradiente está inversamente associado à Área Efetiva de Orifício (AEO), que é a área efetiva que o sangue encontra para atravessar a válvula quando está com os folhetos totalmente abertos.

Além de manter os gradientes de pressão abaixo dos limites pré-definidos, é importante também que a válvula apresente os valores mais baixos possíveis por uma questão de competitividade no mercado de válvulas cardíacas, além de apresentar uma melhor performance para o paciente.

**3.2 Tecido conjuntivo e colágeno**

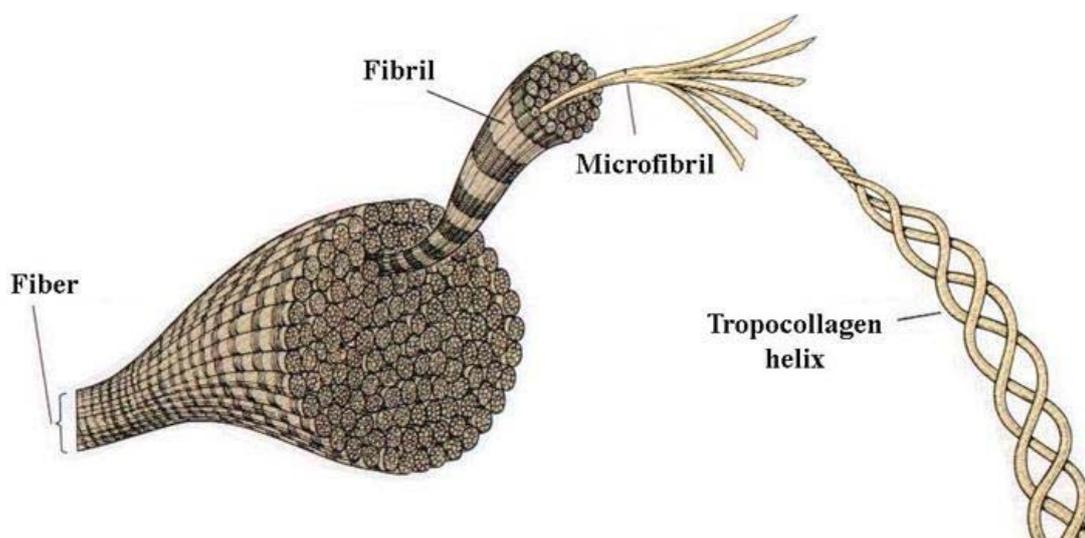
Ao estudar o potencial de uma solda na cúspide, é importante entender a composição básica do seu material constituinte. A cúspide é formada por um tecido mais espesso, que corresponde à parede da aorta, e uma bolsa de tecido mais fino, que é o folheto e é o responsável pelo abrir e fechar da válvula. Nosso interesse volta-se para a parede da aorta, que é a parte da cúspide que deve ficar fixa às cúspides vizinhas e ao anel de suporte, na bioprótese. O folheto deve ficar livre para movimentar-se, mantendo somente a ligação natural à cúspide.

A parede da aorta, assim como os demais vasos sanguíneos, é constituída de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo é caracterizado por ter uma quantidade relativamente pequena de células e uma matriz extracelular rica em fibras (ORÉFICE *et al.*,2006). A matriz extracelular é toda a massa que preenche os espaços entre as células, e é constituído de proteínas e outros materiais fabricados pelas próprias células. As propriedades do tecido conjuntivo estão relacionadas à concentração ou densidades daquelas fibras, sua posição na matriz e eventualmente sua mineralização (ORÉFICE

*et al.*,2006). Estas fibras podem ser de vários tipos, sendo que a que mais se destaca é o colágeno. O colágeno é normalmente o principal responsável pela resistência do tecido (ORÉFICE *et al.*,2006).

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos (NIMNI,1988) e representa aproximadamente 1/3 de todas as proteínas, sendo composto de 33% de glicina, 13% de prolina e 9% de hidroxiprolina. Diferentes proporções entre carboidratos e peptídeos e diferentes sequências de aminoácidos determinam características especiais para tipos diferentes de colágeno. No caso dos vasos sanguíneos, onde incluímos a aorta, as principais fibras presentes na matriz extracelular são de colágeno do tipo III.

O colágeno do tipo III pertence ao grupo de colágenos que formam fibrilas. As moléculas desses colágenos se agregam para formar fibrilas (Figura 3-3) bem visíveis no microscópio eletrônico. (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999)



**Figura 3-3 - Fibras, fibrilas e microfibrilas do colágeno. (CAMPBELL, 1995)**

A unidade protéica que se polimeriza para formar fibrilas colágenas é uma molécula alongada denominada tropocolágeno, que mede 280 nm de comprimento por 1,5 nm de espessura. A molécula de tropocolágeno consiste em três cadeias polipeptídicas

dispostas em hélice (Figura 3-3). As diferenças na estrutura química dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágeno. (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999)

No colágeno tipo III (assim como no tipo I e II), as moléculas de tropocolágeno se agregam em unidades microfibrilares que se juntam para formar fibrilas (Figura 3-3). Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas são importantes para a união dessas unidades que, posteriormente, são reforçadas por ligações covalentes. (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999)

As fibrilas colágenas são estruturas delgadas e alongadas, com diâmetro variável, geralmente entre 20 e 90 nm. No colágeno tipo III (assim como no tipo I também), as fibrilas formam fibras. Na microscopia óptica, podem-se observar estas finas fibras (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999).

As fibras colágenas mais frequentes são as do tipo I. No estado fresco são brancas, conferindo essa cor aos tecidos nos quais predominam. A cor branca dos tendões deve-se à sua riqueza em colágeno.

Por serem longas e de trajeto tortuoso, a morfologia das fibras não é fácil de ser estudada nos cortes histológicos. Para essa finalidade, um preparado por distensão, que não precisa ser cortado ao micrótomo, é mais conveniente. Num preparado por distensão as fibras colágenas aparecem como estruturas cilíndricas alongadas e flexuosas, com diâmetro de 1 a 20  $\mu\text{m}$  e cujas extremidades se perdem entre os outros elementos do tecido, por isso não é possível medir o comprimento dessas fibras.

Quanto à temperatura de transição vítrea do colágeno, encontramos algumas informações em DONG *et al.* (2003), que menciona os trabalhos de Mrevlishvili *et al.* (1998) e Belopolskaya *et al.* (2000). O primeiro utilizou um microcalorímetro de varredura adiabática diferencial e o segundo utilizou o DSC (Calorímetro de Varredura Diferencial). Ambos encontraram uma temperatura de 40 °C como sendo o ponto de transição vítrea do colágeno.

DONG *et al.* (2003) fez um estudo através de espectroscopia Raman. Ele obteve colágeno tipo I e preparou a amostra para análise. Ele obteve espectros do colágeno em diferentes temperaturas.

A banda a  $1263\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à vibração característica da Amida III, a qual é utilizada para estimar características de conformação da estrutura básica da proteína. Esta banda desaparece quando a temperatura alcança  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O desaparecimento desta banda significa que as ligações de hidrogênio entre as três hélices do colágeno quebraram e a desordem da estrutura das proteínas aumenta.

A banda em  $1443\text{ cm}^{-1}$  é associada ao metil e metileno. Ela denota a desnaturação do colágeno. A intensidade desta banda é baixa na faixa de temperatura do corpo humano, o que indica que o colágeno é muito estável nesta faixa. Já a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  a banda atinge um pico de intensidade, indicando que a estrutura do colágeno mudará e a desnaturação ocorrerá uma vez que a temperatura esteja acima na faixa normal de temperatura fisiológica.

### **3.3 Soldagem de tecidos.**

A busca por uma alternativa à sutura nos procedimentos cirúrgicos de união de tecidos já tem um histórico de várias décadas. Desde os estudos de Young em 1940, estudando as possibilidades da fibrina como um material de adesão para reatar um nervo rompido, várias tentativas tem sido feitas para unir tecidos biológicos com técnicas diferentes à da sutura. Uma destas tentativas é a técnica de soldagem de tecido com laser (MENOVSKY *et al.*, 1995).

A união de tecidos sem uso de suturas já foi possível através de "colagem" dos segmentos, utilizando seja uma substância estranha tal como cianocrilatos, ou compostos naturais tais como trombina e fibrina. Potencialmente pode-se também obter uma solda através do aquecimento do tecido, que pode ser alcançado por resistência elétrica, fluido circulante, corrente de rádio frequência, microondas, ultrassom, radiação óptica infra-vermelha ou laser (ANDERSON, 1999; 1999).

Entre as opções de soldagem com calor, pode-se citar o método "Thermal Welding System", descrito por KARATZIAS *et al.* (2005) como um novo instrumento cirúrgico que utiliza calor e pressão para selar e dividir tecidos. Os desenvolvedores deste novo instrumento térmico acreditam que os efeitos desejados de desnaturação de proteína poderiam ser alcançados mais eficientemente através do uso de aquecimento direto do tecido do que uma forma intermediária de energia – elétrica, ultrasônica, laser, radiofrequência, etc.

A soldagem de tecidos já vem sendo estudada a cerca de mais de 30 anos. A principal forma de soldagem utilizada até o momento tem sido o laser. A soldagem a laser de tecido tem sido investigada para aplicações cirúrgicas durante estas mais de três décadas (CONSTANTINESCU *et al.*, 2007) e tem sido estudada nos mais diferentes sistemas (BARRIERA *et al.*, 2000).

As primeiras estruturas que foram unidas por laser foram vasos sanguíneos, e maior parte do conhecimento e experiência na união de tecidos por soldagem é baseada em experimentos com soldagem de tecidos vasculares. Outras estruturas tubulares tais como intestino, uretra, e estruturas não-tubulares tais como pele e membrana do tímpano tem sido unidas por vários sistemas de lasers (MENOVSKY *et al.*, 1995).

O primeiro uso com sucesso de uma soldagem de tecido a laser de um pequenos vasos sanguíneos foi em 1979, quando Jain and Gorisch fizeram um reparo em incisões feitas em vasos sanguíneos de ratos com um laser Nd:YAG. Nos anos seguintes, vários pesquisadores tiveram sucesso na utilização de diferentes comprimentos de ondas e configurações do laser para utilização em anastomose vascular (TALMOR *et al.*, 2001).

As pesquisas realizadas até então envolveram os mais diversos tecidos – como seção de raiz aórtica de ovelha (FENNER *et al.*, 1994), artérias e veias porcinas (OTT *et al.*, 2001), intestino porcino (PRAHL e PEARSON, 1997), aorta bovina (MCNALLY *et al.*, 1999), colágeno tipo I de coelho e equinos (CONSTANTINESCU *et al.*, 2007), tendão de aquiles de bovino e pele de porcino (ANDERSON, 1999; 1999), nervos, apêndice atrial esquerdo (JAYAKAR *et al.*, 2005), veia femoral de cachorro (SMALL *et al.*, 1998) – e também aplicações em procedimentos cirúrgicos – como tonsilectomia (KARATZIAS *et al.*, 2005), pieloplastia (BARRIERA *et al.*, 2000).

Melhorias na qualidade da solda de tecido forma obtidas através da adição de um soldante, usualmente contendo um cromóforo tal como indocianina verde, para absorção de luz, e proteínas, na maior parte das vezes, serum albumina (CONSTANTINESCU *et al.*, 2007). A aplicação de cromóforos específicos para o comprimento de onda do laser propicia uma absorção diferente entre a região tingida e o tecido adjacente (MCNALLY *et al.*, 1999), reduzindo os efeitos indesejados de dano ao tecido adjacente à região de solda.

Nos experimentos realizados por OTT *et al.* (2001), os vasos soldados com laser de diodo e albumina tiveram resistência bem maior que o uso exclusivo do laser Ho:YAG. Os vasos soldados com laser de diodo de 808 nm utilizando albumina tiveram uma resistência de 1 N comparado a 0,3 N do uso exclusivo do laser.

Porém, não há ainda uma explicação sobre como a soldagem do tecido ocorre. Uma discussão mais detalhada sobre este assunto será feita na seção 3.5.

É crescente o número de pesquisas no sentido de desenvolver uma metodologia de soldagem térmica do tecido biológico. E o que vem motivando o desenvolvimento da soldagem do tecido em substituição à sutura são as várias vantagens potenciais que ela pode oferecer quando se há a necessidade de unir ou reparar tecidos biológicos. Estas vantagens e desvantagens são descritas com detalhes na próxima seção.

A maioria absoluta destas pesquisas é feita com o emprego do laser, que traz vantagens adicionais na obtenção de uma boa solda.

### **3.4 Vantagens e desvantagens da solda em relação à sutura.**

Várias são as vantagens do uso da solda apresentadas pelos pesquisadores, muitas das quais são especificamente benéficas para os procedimentos cirúrgicos – possibilidade de serem feitas endoscopicamente (OTT *et al.*, 2001; TALMOR *et al.*, 2001), reduzem a possibilidade de aneurismas (OTT *et al.*, 2001), desenvolvem menos tecido cicatrizante (MENOVSKY *et al.*, 1995; LA JOIE *et al.*, 1996), melhor recuperação no reparo de nervos (MENOVSKY *et al.*, 1995). Estas vantagens não serão discutidas em detalhes aqui, pois não teriam uma aplicação direta para o foco deste trabalho, que é a bioprótese de válvula cardíaca. Portanto, seguem as demais vantagens citadas pelos pesquisadores e que são interessantes para a bioprótese.

- **A solda é menos traumática ao tecido.** A sutura e agulha produzem um trauma no tecido, pois a agulha tem que romper o tecido em vários pontos para a passagem da sutura (BARRIERA *et al.*,2000; MCNALLY *et al.*,1999). Além disso, depois de finalizada a sutura, os furos tornam-se concentradores de tensão quando o tecido é solicitado, lembrando-se que a linha é praticamente inelástica e tem que manter unido o tecido, que por sua vez é elástico.
- **A solda produz um acabamento mais estanque,** quando comparado à sutura. Em aplicações como anastomose de vasos sanguíneos, por exemplo, pesquisadores mostraram a grande vantagem da soldagem criar um fechamento imediatamente estanque contra vazamentos, ou seja, reduz o sangramento logo após a cirurgia (BARRIERA *et al.*,2000; MCNALLY *et al.*,1999). Suturas podem vazar, o que pode causar complicações tais como vazamento de fluido gástrico após cirurgia do intestino (ANDERSON,1999).
- **Tempos menores de operação.** Uma vez dominada a técnica de soldagem, pode-se obter tempos muito menores de operação, quando comparadas à sutura (FENNER *et al.*,1994; BARRIERA *et al.*,2000; ANDERSON,1999).
- **Menor reação imunológica.** Uma sutura é mais um corpo estranho que se adiciona ao tecido operado, o que aumenta o risco de infecção ou reação imunológica adversa (ANDERSON,1999; BARRIERA *et al.*,2000; MCNALLY *et al.*,1999; FENNER *et al.*,1992). A solda utiliza o próprio material do tecido a ser unido para promover a ligação das duas bordas.
- **Potencial para desenvolver um processo automatizado.** Nos casos de fabricação de biopróteses que utilizam tecido animal, como é o caso das biopróteses de válvulas cardíacas, a união dos tecidos é sempre feita através de suturas. Este tipo de união demanda uma grande habilidade humana, o que dificulta muito o desenvolvimento de um sistema automatizado. O desenvolvimento de uma soldagem térmica pode tornar mais próxima a possibilidade de se criar um processo automatizado, pelo menos em alguns passos do processo de fabricação.

- **Melhor acabamento e melhor precisão.** FENNER *et al.* (1994) observou que, seja pela técnica de desidratação ou laser, seja acima da temperatura de desnaturação ou abaixo dela, a soldagem térmica do tecido pode criar uniões de topo de alta qualidade, ao ponto de ser difícil de identificar a área que foi soldada.

O procedimento de soldagem abre uma gama de possibilidades para pequenas estruturas (por exemplo, pequenos vasos sanguíneos), cujo tamanho está abaixo daquele acessível para técnicas comuns de sutura (OTT *et al.*,2001; FENNER *et al.*,1994; TALMOR *et al.*,2001).

Há também, no entanto, efeitos indesejados da soldagem face aos bem estabelecidos métodos de sutura. Estas desvantagens estão mais relacionadas ao fato de a soldagem térmica do tecido ainda estar em fase de desenvolvimento. Estas incluem:

- **Baixa resistência.** Muitos estudiosos observaram que a solda resultante é fraca quando comparada com a sutura. MCNALLY *et al.* (1999) e BARRIERA *et al.* (2000) observaram que a anastomose feita através de solda a laser era fraca, principalmente nos primeiros dias de recuperação. ANDERSON (1999) e MENOVSKY *et al.* (1995) também observaram, em outras aplicações, que a união resultante é fraca.
- **Dificuldade técnica.** Esta característica levantada por vários autores está mais relacionado ao uso do laser. As dificuldades técnicas encontradas referem-se ao difícil alinhamento do tecido (MCNALLY *et al.*,1999; BARRIERA *et al.*,2000), falta de uma definição de um "ponto de finalização" (MCNALLY *et al.*,1999; OTT *et al.*,2001), baixa reproducibilidade (MCNALLY *et al.*,1999; BARRIERA *et al.*,2000; SCHERR *et al.*,1998), técnica muito dependente da habilidade do cirurgião (LA JOIE *et al.*,1996).

No caso do alinhamento do tecido, uma solução seria colocar alguns poucos pontos de sutura na região, mas adicionaria à união algumas das desvantagens das suturas já discutidas anteriormente. A falta de definição de um "ponto de finalização" está relacionada à dificuldade de saber o momento ideal de interromper o fornecimento de calor à região de solda. Se o tempo for muito curto, pode-se ter uma solda muito fraca. Se o tempo for muito longo, pode-se causar maiores danos térmicos ao tecido.

Esta dificuldade técnica de alinhamento das bordas a serem soldadas tem grande influência na resistência final da solda. Em OTT *et al.* (2001), por exemplo, a soldagem a laser resultou em valores bem menores para veias – cerca da metade – do que para artérias, exatamente porque o manuseio de artérias é muito mais fácil do que o manuseio de veias devido à maior firmeza da estrutura.

- **Baixa reprodutibilidade.** A baixa reprodutibilidade ainda é um problema para esta nova técnica (MCNALLY *et al.*,1999; BARRIERA *et al.*,2000; SCHERR *et al.*,1998). Porém a técnica de sutura, ainda que tenha melhor reprodutibilidade, também sofre com variações causadas por fatores como posição da agulha em relação ao tecido, ajustes feitos durante a sutura, espaçamento das suturas, tensão dos nós, que são variantes dependentes do operador.
- **Dano térmico ao tecido.** Este é outro ponto discutido, principalmente quando fala-se de soldagem a laser. O calor gerado pode danificar o tecido adjacente à região da solda (MCNALLY *et al.*,1999; BARRIERA *et al.*,2000). A melhor solução encontrada até agora para minizar este efeito, pelo menos quando a solda térmica é feita através de um laser, é a utilização de cromóforos na região da solda. Um cromóforo é uma substância que possui uma grande absorção de calor para o comprimento de onda específico do laser utilizado. Isto significa que o cromóforo concentra a maior parte da energia térmica na região em que ele está presente, reduzindo consideravelmente a energia térmica difundida para a região do tecido não tingida por ele.
- **Mecanismo da solda ainda é desconhecido.** Há ainda muita discussão sobre o exato mecanismo que ocorre na solda por laser ou outras fontes de calor (LA JOIE *et al.*,1996; FENNER *et al.*,1994; PRAHL e PEARSON,1997; CONSTANTINESCU *et al.*,2007). Constantinescu cita que ainda que a solda térmica de tecido tenha sido descrita pela primeira vez em 1964, e tem sido investigada intensamente desde então, o mecanismo exato ainda permanece não esclarecido.

### 3.5 Hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na soldagem de tecidos.

Como já comentado na seção 3.2, o mecanismo envolvido na soldagem de tecidos ainda não está completamente desvendado (FENNER *et al.*,1994; REISER *et al.*,1997; SCHERR *et al.*,1998; PRAHL e PEARSON,1997; CONSTANTINESCU *et al.*,2007; SMALL *et al.*,1998), ainda que várias hipóteses e estudos tenham surgido. Como o mecanismo fundamental ainda permanece sem elucidação, chama-se a união de tecidos biológicos de “soldagem”, “fusão”, “adesão” ou “colagem” (PRAHL e PEARSON, 1997). Mas entre estes, o termo “soldagem” é o mais utilizado, por analogia ao processo de união de materiais como aço, em que a união é feita através da fusão do metal na interface e conseqüente resfriamento e solidificação deste.

Ainda que não esteja totalmente conhecido, avanços têm levado a um entendimento melhor destes mecanismos (TALMOR *et al.*, 2001).

Grande parte das pesquisas sobre a soldagem de tecido biológico foi feita utilizando-se o laser com instrumento. Muitos dos autores acreditam que a soldagem ocorre por um efeito térmico da irradiação do laser sobre o tecido, ou seja, a energia luminosa do laser é convertida em calor quando absorvida pelo tecido, ou que o efeito térmico é um dos fatores importantes para a ocorrência da união soldada (FENNER *et al.*,1994; FENNER *et al.*,1992; PRAHL e PEARSON,1997; MCNALLY *et al.*,1999; LA JOIE *et al.*,1996). As mudanças térmicas na estrutura molecular dos tecidos permitem que eles seja unidos.

MENOVSKY *et al.* (1995) faz, em seu trabalho, um apanhado das várias hipóteses já postuladas para explicar o mecanismo de soldagem do tecido através do laser. Estes mecanismos propostos incluem desnaturação das proteínas estruturais, aceleração da polimerização natural do fibrinogênio, fusão colágeno-colágeno, ligações cruzadas entre proteínas, formação de ligações não-covalentes entre moléculas de colágeno, e interdigitação de fibras de colágeno. Porém, ele ressalta que estes estudos tenham sido realizados em diferentes tipos de tecidos com diferentes lasers e consideráveis variações em doses de irradiação e luz. Além disso, a irradiação de laser no tecido causa diversos efeitos e portanto uma teoria não exclui a outra.

SCHERR *et al.* (1998) menciona que durante uma investigação maior dos mecanismos da soldagem a laser, tornou-se também aparente que diferentes tipos de tecido, como por exemplo pele e vasos sanguíneos, são alterados de formas diferentes. As alterações bioquímicas em um tecido podem não ser reproduzidas em outro tipo de tecido. Isso pode ser explicado pelo fato do laser ter diferentes características de penetração em diferentes tipos de tecidos, portanto diferentes graus de energia térmica são aplicados. Ou seja, o mecanismo da soldagem de tecidos por laser envolve alterações da sub-estrutura do colágeno através da energia térmica gerada, seguida de ligações covalentes e eletrostáticas durante a "re-naturação" das proteínas do tecido.

A natureza exata das ligações covalentes e eletrostáticas que conferem resistência à solda ainda está pouco esclarecida. Há hipóteses, porém, de que as alterações histológicas encontradas na matriz extra-celular ocorrem primeiro, seguidas das ligações, tanto covalentes como eletrostáticas, entre as proteínas dos tecidos. A presença de ligações covalentes e de dissulfeto em tecidos soldados termicamente foi demonstrada por vários investigadores. Porém, ainda não foi esclarecido qual confere a maior contribuição para a soldagem do tecido (SCHERR *et al.*, 1998).

Além do maior consenso estar no efeito térmico da irradiação do laser na formação da solda, há também um certo nível de consenso de que o elemento principal do tecido envolvido nesta união seja o colágeno. CONSTANTINESCU *et al.* (2007) acredita que o efeito principal da irradiação de laser nos tecidos seja alterações conformacionais das moléculas de colágeno. Dois mecanismos foram discutidos: interdigitação de fibrilas de colágeno, como já visto em estudo com microscopia eletrônica, sugerindo mudanças na conformação 3-D das moléculas, e a indução de novas ligações covalentes entre moléculas de colágeno. CONSTANTINESCU *et al.* (2007) ainda cita que diferentes grupos analisaram a conformação 3-D de tecidos irradiados com laser, reportando um afrouxamento e certa interação entre feixes de colágenos ou um "desfiamento" de feixes de colágeno e subsequente interdigitação parcial.

Somente tecidos conectivos podem ser soldados, incluindo paredes vasos de sangue, tendões, alguns músculos, pele, epineurium, nervos, uretra e intestino. Gordura e tecidos com alto teor celular não podem ser soldados. Portanto, acredita-se que algum tipo de colágeno esteja envolvido na formação da solda. (ANDERSON, 1999)

WHITE *et al.* (1988) citam que soldagem a laser resulta na formação de ligações colágeno-colágeno e colágeno-elastina. Estudos anteriores associam o colágeno ao processo de soldagem, onde fibras individuais desenrolam-se a temperaturas acima da de desnaturação, e re-ligam-se com fibras de colágeno da superfície do tecido aposto (PRAHL e PEARSON, 1997)

SCHERR *et al.* (1998) citam o trabalho de outros pesquisadores, que investigaram o mecanismo de soldagem através de estudos histológicos e da composição ultraestrutural em uma anastomose da artéria carótida e também da reconexão do epineurium a um nervo. Eles encontraram várias alterações na matriz extracelular e na sub-estrutura do colágeno que ocorreram como resultado da energia térmica liberada pelo laser. Houve uma interdigitação das fibrilas colágenas, o que acredita-se ser a base para o efeito de soldagem do tecido. Vários outros estudos confirmaram as mesmas mudanças ultra-estruturais em diferentes tecidos. SCHERR *et al.* (1998) completam que as mudanças histológicas envolvem ainda desnaturação da proteína, o que leva ao desenrolamento das estruturas secundária e terciária do colágeno. Em consequência desta desnaturação induzida pelo calor, acredita-se que ligações disulfeto eletrostáticas e covalentes promovem a resistência final na solda. SMALL *et al.* (1998) também citam que mecanismos de ligações covalentes têm um importante papel na soldagem com laser de argônio de estruturas vasculares.

ANDERSON (1999) também demonstra um mecanismo semelhante ocorrido através da interdigitação das moléculas de colágeno. Ele entra em mais detalhes na questão interfacial da solda. Em seu estudo ele utilizou tendão de aquiles de bovino e pele de porcino. Ele juntou dois discos de 2 mm de espessura e colocou-os em um banho maria a diferentes temperaturas e tempos. O melhor resultado ocorreu pelo aquecimento a 60 °C por 30 minutos. Apenas 1 a 2 micrômetros das extremidades livres das fibrilas fundiram-se no seu estudo. As demais fibrilas não desnaturaram-se. Uma solda a 60°C leva a um entrelaçamento das extremidades livres das fibrilas fundidas e desenroladas através do espaço entre as duas superfícies a serem soldadas. Somente uma região de 2 micrômetros foi desnaturada, ainda que o tendão tenha sido completamente aquecido uniformemente.

ANDERSON (1999) observou ainda que a temperaturas mais baixas (menor que 60 °C) não houve nenhuma mudança na estrutura fibrilar, e a temperaturas mais altas,

todo o disco do tendão foi afetado e encurtou resultando em soldas fracas e/ou destruição do tecido.

Teorias propõem que o processo de ligação é principalmente térmico, mas trabalho de FENNER *et al.* (1992) mostrou que a desidratação é um fator importante.

FENNER *et al.* (1994) fez um estudo interessante, que trouxe mais um elemento para a busca pela compreensão do mecanismo de solda do tecido. Ele citou pesquisas de outros autores que demonstraram que algumas uniões foram criadas com laser abaixo da temperatura de desnaturação, o que leva a crer que a desnaturação não é o único fator necessário na realização da solda. Em sua pesquisa ele postulou que, com o efeito do calor, os sítios polarizados de moléculas de colágeno hidratadas, normalmente ocupadas por água, são liberadas pela desidratação e promovem ligação polarizada intercolágeno através dos novos sítios de ligação livres. Mesmo assim, quando o tecido é sujeito a desnaturação, as ligações cruzadas moleculares da triple hélice são quebradas e revelam ainda mais sítios de ligação, o que aumenta a força de ligação.

CONSTANTINESCU *et al.* (2007) mostram porém que a solda não acontece com colágeno puro. Eles realizaram testes com colágenos provenientes de coelhos e eqüinos. Irradiação de laser em colágeno puro, com configurações de potência e tempo de exposição geralmente utilizadas em soldagem de tecido por laser, não induz ligações covalente entre moléculas de colágeno. Virtualmente nenhuma aderência das camadas de colágeno puro foi observada após irradiação a laser. A tensão máxima do colágeno equino puro soldado por laser foi praticamente nula independente das potências de laser e irradiação aplicadas. Até o momento, permanece não esclarecido até que ponto as moléculas de colágeno estão envolvidas na resistência mecânica, e se alterações nas ligações covalentes são os únicos responsáveis pela solda a laser. Soldagem a laser com tecidos com alta razão celular/matriz tais como pele, vasos sanguíneos, submucosa intestinal e rim demonstraram uma tensão máxima superior após a soldagem. Estas observações levantam a questão se componentes do citoplasma intracelular talvez sejam os que trazem os "ingredientes" necessários para a conexão do tecido.

OTT *et al.* (2001), que estudaram a soldagem de tecidos através do laser, acreditam que o tecido irradiado pelo laser é termicamente coagulado e o coágulo forma uma massa adesiva. Este coágulo mantém as duas bordas unidas. Estudos feitos na estrutura do colágeno após a soldagem mostraram que a organização estrutural normal é perdida, com um certo inchamento e desorganização das fibrilas do colágeno, formando um coágulo de proteínas desnaturadas. Os experimentos revelaram que o colágeno termicamente coagulado é um importante componente na fusão térmica do tecido.

Nota-se também uma divergência sobre a importância ou não da desnaturação da proteína colágeno sobre a solda. SCHOBER *et al.* (1986), por exemplo, reportam uma alteração na estrutura do colágeno após a soldagem, o que leva a crer que a desnaturação é necessária para a solda. Por outro lado, KOPCHOK *et al.* (1988) e WHITE *et al.* (1988) citam que algumas uniões foram criadas laser de argônio abaixo da temperatura de desnaturação, o que leva a crer que a desnaturação não é necessária.

KARATZIAS *et al.* (2005) também citam a desnaturação como fator importante para ocorrer a soldagem quando utilizando o método TWS (Thermal Welding System). O TWS utiliza um elemento aquecedor na ponta do instrumento combinado com pressão para desnaturar as moléculas de proteína dentro do tecido. O tecido é espremido entre os mordentes isolados e calor concentrado é aplicado na região local. As moléculas de proteína no tecido são desnaturadas e fundidas umas às outras, formando um selo estanque. Calor mais altamente focado é aplicado no centro do tecido entre os mordentes do instrumento, de forma a minimizar o efeito nas estruturas próximas.

MENOVSKY *et al.* (1995) reforçam ainda que as temperaturas nas quais a soldagem a laser teve maior sucesso foram na faixa de 60 a 120 °C. Estas temperaturas estão acima da temperatura de desnaturação do colágeno, que é em torno de 65°C e na qual 50% da estrutura é perdida e as moléculas alcançam sua transição para a fusão fibrilar.

### **3.6 Fixação química do tecido e sua importância após o processo de soldagem.**

O assunto "Fixação de Tecido" está incluso neste estudo pois ele será um fator importante na estabilização da solda realizada no tecido biológico.

A fixação química é, basicamente, sujeitar o tecido a um agente que promove ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno presente no tecido. Isso é importante quando trabalha-se com tecidos biológicos na produção de biopróteses e deseja-se que o tecido não se degrade com o tempo. As ligações cruzadas promovem uma estabilização da estrutura interna do tecido e aumentam a sua resistência.

A ligação cruzada com glutaraldeído de fibrilas de colágenos reconstituídas ou nativas de tecidos ricos em colágeno reduz significativamente a biodegradação (NIMNI,1988).

ANDERSON (1999) menciona em seu trabalho que criar ligações cruzadas no colágeno na solda, após aquecimento, propicia um efeito que leva a resistências à ruptura muito aumentadas, porque ligações covalentes são adicionadas às ligações fracas não-covalentes envolvidas. Ele ainda observa em seu trabalho que ligações cruzadas aumentam a tensão à ruptura da solda por um fator adicional de 5 após a soldagem térmica. Por outro lado, criar ligações cruzadas antes do aquecimento reduz ou realmente evita a soldagem, porque as fibrilas do colágeno ficam impossibilitadas de fundir-se após a ligação cruzada.

ANDERSON (1999) ainda cita que estudos preliminares mostraram que a soldagem térmica simples está sujeita à ação de enzimas como a tripsina, a qual hidrolisa colágeno desnaturado, mas não colágeno helicoidal ou nativo. Com a ligação cruzada química, porém, as soldas ficam mais resistentes a proteases, incluindo colagenase.

A forma mais empregada atualmente para promoção de ligações cruzadas é a utilização de soluções de glutaraldeído. Há outras formas de se promover ligações cruzadas, como através da aplicação de radiação ultra-violeta na área de contato (ANDERSON,1999) ou outros agentes, como o formaldeído. Mas o glutaraldeído é o que promove ligações cruzadas mais estáveis.

Como já havia sido constatado que o formaldeído não poderia ser um bom agente formador de ligações cruzadas, iniciaram-se estudos com vários outros agentes para se encontrar um que pudesse estabilizar a estrutura de colágeno com sucesso. Válvulas aórticas porcinas com músculo e tecido conectivo foram tratadas com vários aldeídos, incluindo formaldeído, acetaldeído e glutaraldeído, sob diversas condições e temperatura e pH. Ao serem submetidas a água corrente em temperatura ambiente, os tecidos tratados apresentaram degeneração estrutural microscópica e macroscópica, com exceção daquelas tratadas com glutaraldeído sob pH neutro. O efeito do glutaraldeído na fixação do tecido é comparado à do formaldeído, porém este representa uma classe de agentes formadores de ligações cruzadas que não geram ligações intermoleculares estáveis (NIMNI,1988).

A ligação cruzada com glutaraldeído de fibrilas de colágenos reconstituídas ou nativas e tecidos ricos em colágeno reduz significativamente a biodegradação. Outros aldeídos são menos eficientes que o glutaraldeído em gerar ligações cruzadas estáveis termicamente, biologicamente e quimicamente. (NIMNI,1988)

A resistência da solda após a fixação química vai também depender de fatores como concentração do glutaraldeído e tempo de exposição.

NIMNI (1988) fornece várias e importantes pistas sobre a utilização deste agente fixador. Segundo este pesquisador o tempo de fixação e concentração de glutaraldeído são importantes na determinação da natureza da rede de ligações cruzadas criada:

- O glutaraldeído a 2% penetra o tecido a uma profundidade de 0,7 mm em 3h à temperatura ambiente, e a fixação adequada ocorre somente a 0,5 mm no mesmo período de tempo. Após 24 h, o glutaraldeído penetra a uma profundidade de 1,5 mm, enquanto a fixação adequada ocorre a somente 1 mm de profundidade.
- A penetração à temperatura ambiente (25°C) é mais rápida do que em temperaturas mais baixas.

- Altas concentrações devem criar as ligações cruzadas somente na superfície das fibras de colágeno. Isso deve ocorrer por causa da rápida polimerização que atrapalha a molécula de glutaraldeído de acessar os sítios internos das fibras de colágeno mais largas ou por criar sítios de nucleações nos quais moléculas adicionais de glutaraldeído podem se ligar. Estudos utilizando pericárdio indicam que a fixação inicial do colágeno por glutaraldeído ocorre na superfície das fibras.

### **3.7 Metodologia e resultados obtidos com as soldas.**

Nesta seção foram relacionados os resultados obtidos e as metodologias utilizadas por alguns pesquisadores na obtenção de soldas térmicas de tecidos biológicos. Os resultados estão resumidos e organizados na Tabela 3-1, onde todos os resultados foram convertidos para uma só unidade (MPa). Esta tabela será útil para a comparação dos diversos dados entre si e com os resultados obtidos durante os experimentos realizados neste trabalho.

ANDERSON (1999) soldou materiais contendo colágeno, como tecido conectivo biológico contendo colágeno tipo I. Mais especificamente, ele soldou tendão de aquiles de bovino, fresco e pele de porcino, fresca. Os dois tecidos foram cortados em discos transversais de 2 mm de espessura, os quais foram colocados entre duas lâminas de microscópio seladas e ligeiramente clampeadas e imersas em um banho maria a diferentes temperaturas e diferentes tempos. O melhor resultado ocorreu pelo aquecimento a 60 °C por 30 minutos. Depois da remoção do banho maria, algumas amostras foram bruscamente resfriadas ("quench") por imersão em um segundo banho a diferentes temperaturas, abaixo de 0 °C. As soldas mais fortes foram obtidas após o resfriamento brusco.

Aquecendo o tecido na temperatura entre 60 e 62 °C, a resistência à tensão da solda é cerca de 4 a 5 vezes mais forte que com outras técnicas de soldagem. O método produz consistentemente soldas com resistência maior que 1 kgf/cm<sup>2</sup> (0,1 MPa), quando soldas feitas a, por exemplo, acima de 70 °C, tem resistência menor que 0,2 kg/cm<sup>2</sup>.

ANDERSON (1999) faz também uma interessante observação sobre as variações no tempo e temperatura. Em geral, a temperatura necessária vai diminuir apenas

ligeiramente, por exemplo, um ou dois graus, para um aumento de 10 vezes no tempo de solda, para se obter resultados semelhantes. Por exemplo, se a temperatura por 30 minutos para aquecer um certo material é 60 °C, será 61 ou 62 °C para um aquecimento de 3 minutos do mesmo material.

Num outro teste feito ainda durante os experimentos de ANDERSON (1999), oito discos de tendão bovinos foram aquecidos a 62 °C por 10 minutos. As soldas obtidas tiveram uma tensão de ruptura de 200 ( $\pm$  50) g/cm<sup>2</sup> (0,02 MPa). Outra oito amostras aquecidas na mesma temperatura foram tratadas com glutaraldeído a 1% por 12 horas e então rinsadas. As soldas obtidas tiveram uma tensão de ruptura de 950 ( $\pm$  300) g/cm<sup>2</sup> (0,95 MPa).

Para aumentar ainda mais a tensão de ruptura da solda, esta pode ser uniformemente e rapidamente resfriada, ou "quenched", imediatamente após o aquecimento. Um método é a perfusão ou aspersão no sítio da solda com solução salina fisiológica gelada imediatamente após a solda está completa. Este "quenching" força interações maiores na solda para aumentar a resistência da solda por um fator de aproximadamente 2.

FENNER *et al.* (1994) também obtiveram alguns resultados com solda térmica de tecido. Porém, ao invés de mergulhar o tecido a ser soldado em uma solução numa temperatura definida, o tecido foi exposto ao calor de uma estufa. O objetivo era investigar, através de comparação das propriedades das ligações criadas, a solda criada através de um processo de desidratação com a solda feita por laser. FENNER *et al.* (1994) concluiu que as anastomoses criadas por desidratação eram equivalentes àquelas criadas por laser, com poucas diferenças em resistência, histologia e resposta à reidratação. A única diferença significativa foi a média da resistência mecânica das soldas criadas acima da temperatura de desnaturação do tecido.

FENNER *et al.* (1994) utilizou uma seção de raiz aórtica de aproximadamente 2 cm de comprimento, retirada de coração fresco de ovelha. A seção da raiz foi aberta e congelada. Com a utilização de um micrótomo, seções de aproximadamente 140 micrômetros foram cortadas. Estas seções finas foram então cortadas em amostras retangulares. Uma incisão de 15 mm foi feita no centro da amostra com uma lâmina afiada.

A amostra foi então posicionada sobre uma lâmina de vidro e as faces da incisão foram apostas com o auxílio de um microscópio, para garantir uma boa aposição ao longo da extensão da incisão. Amostras cuja aposição das bordas não era perfeita eram descartadas.

Tiras de papel toalha foram afixadas cobrindo a amostra a até 1 a 2 mm de distância da linha da incisão no tecido. As outras extremidades destas tiras de papel toalhas eram então imersas numa solução salina para manter o restante do tecido hidratado. A solução migrava para o tecido por capilaridade.

O primeiro grupo de dados obtidos por FENNER *et al.* (1994) comparava a resistência da ligação em soldas criadas à temperaturas abaixo da de desnaturação por ambos os métodos (laser e estufa). O coeficiente de variação nos valores é alto, e eles atribuíram uma parte deste erro à dificuldade de calcular a espessura correta para medição da área de soldagem. O grupo soldado com laser teve uma resistência de  $234 \text{ g/cm}^2$  (0,023 MPa) e o grupo soldado na estufa uma resistência média de  $288 \text{ g/cm}^2$  (0,029 MPa).

O próximo grupo foi soldado à temperatura acima da de desnaturação. O grupo soldado na estufa apresentou uma resistência média de  $994 \text{ g/cm}^2$  (~0,1 MPa) e o grupo soldado a laser apresentou uma média mais baixa, de  $548 \text{ g/cm}^2$  (0,055 MPa). Isoladamente, uma das amostras soldadas na estufa conseguiu um resultado bem maior que as médias, cerca de  $2400 \text{ g/cm}^2$  (~0,24 MPa). Em temperaturas acima da de desnaturação uma ligação mais forte ocorre – é cerca de 2 vezes mais forte –, mas o dano ao tecido é considerável – desnaturação.

FENNER *et al.* (1994) também investigou o efeito da re-hidratação do tecido soldado. O tecido soldado a laser na temperatura abaixo da de desnaturação foi re-hidratado por 23 min, e gerou tensões de resistência de  $234 \text{ g/cm}^2$  (0,023 MPa), enquanto o grupo re-hidratado por 5 h gerou tensões bem menores, resultando numa média de  $101 \text{ g/cm}^2$  (0,01 MPa). A influência da re-hidratação na resistência da solda foi também observada por OTT *et al.* (2001). Ele notou que os vasos soldados com o laser de diodo e albumina mostraram valores de resistência à tração menores para as amostras hidratadas por 24 horas – cerca de metade do valor. Uma possível razão pode ser o destacamento parcial do soldante do tecido, como já havia sido

domonstrado em outros estudos. Para determinar a influência da hidratação na resistência da solda a laser, as amostras foram mantidas por um dia em solução salina à temperatura ambiente antes de serem submetidas ao ensaio de tração.

Como controle, FENNER *et al.* (1994) mediu a tensão de ruptura do tecido íntegro, sem solda. Ele encontrou uma média de  $2350 \text{ g/cm}^2$  (0,24 MPa). O tecido original é cerca de 10 vezes mais resistente que aquele unido por desidratação abaixo da temperatura de desnaturação, e 5 vezes mais que o unido acima da temperatura de desnaturação.

CHIVERS *et al.* (2000) utilizou aorta de porcinos, exatamente o tecido que é o foco deste trabalho.

As aortas, removidas de corações de porcinos, foram abertas e cortadas em tiras de 40 a 50 mm de comprimento por 10 mm de largura. O tecido recebeu um corte, no qual foi adicionado 10 microlitros de soldante, composto do cromóforo indocianina verde e de albumina bovina. A solda foi realizada com a irradiação de um laser de diodo. Após a soldagem, o tecido foi colocado entre duas folhas de papel-toalha por uma hora, antes do ensaio de tração. Foram testadas várias potência diferentes do laser.

Em sua pesquisa PRAHL e PEARSON (1997) executaram a soldagem de intestino de porcino por imersão em um banho maria em temperaturas em torno de 60 a 80 °C por sete minutos. Também realizou soldas com laser. As duas partes eram unidas por superposição, tal que a área superposta tinha  $25 \text{ mm}^2$ . Para o tecido soldado em banho-maria, obtiveram-se forças de ruptura que variaram entre cerca de 20 e 180 gf, o que equivale a valores entre 0,008 e 0,071 MPa. Os experimentos com laser levaram a valores ainda menores, entre 10 e 60 gf, correspondendo a 0,004 e 0,024 MPa.

BARRIERA *et al.* (2000) obtiveram alguns valores de resistência nas soldas associadas à pressão anastomótica de ruptura – a pressão com a qual o vaso soldado começaria a vazar – o que não pode ser comparado com os dados de resistência mecânica, obtidos pelos outros pesquisadores e também que serão analisados neste trabalho. O mesmo se aplica a SCHERR *et al.* (1998)

OTT *et al.* (2001) obteve valores de resistência mecânica em N para suas artérias e veias soldadas. Como não se sabe a área de solda, não é possível calcular a tensão em MPa e, portanto, estes valores não serão úteis como referência para o trabalho. O mesmo se aplica para MENOVSKY *et al.* (1995), com valores em g para o reparo de nervos com laser de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 3-1 - Resumo dos resultados de tensão de resistência obtidos por alguns pesquisadores**

Referência	Tecido utilizado	Método	Temp. (oc)	Tempo (min.)	Resistência mecânica média (MPa)
ANDERSON (1999)	Tendão de aquiles de bovino e pele de porcino	Imersão em solução.	60	30	> 0,1 MPa
		Imersão em solução.	62	10	0,02 MPa
		Imersão em solução. Depois fixado com glutaraldeído a 1% durante 12 horas.	62	10	0,95 MPa
FENNER <i>et al.</i> (1994)	Seção de raiz aórtica de ovelha	Laser de argônio	36	7,5 min	0,023 MPa
		Exposição ao calor em uma estufa	36	24 h	0,029 MPa
		Laser de argônio	70	7,5 min	0,055 MPa
		Exposição ao calor em uma estufa	70	24 h	0,1 MPa
		Laser de argônio, com re-hidratação por 23 min.	36	7,5 min	0,023 MPa
		Laser de argônio, com re-hidratação por 5 h	36	7,5 min	0,01 MPa
		Tecido íntegro, sem solda	NA	NA	0,24 MPa
CHIVERS <i>et al.</i> (2000)	Aorta de porcino	Laser de diodo, 225 Joules	Não medido	~ 1 min	0,11 MPa
PRAHL e PEARSON (1997)	Intestino de porcino	Banho-maria	60-80 °C	7 min	0,008 a 0,071 MPa
		Laser de diodo	Não medido	Não informado	0,004 a 0,024 MPa

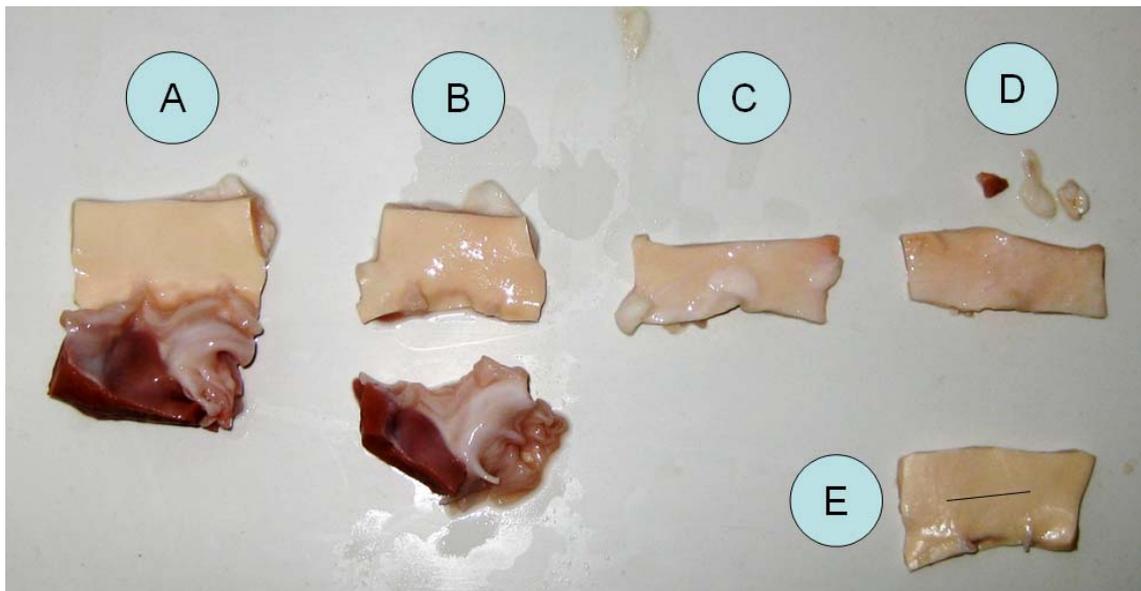
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Preparação da amostra.

O material utilizado para os experimentos, conforme já citado, foi a parede do segmento aórtico de porcinos, matéria-prima utilizada na fabricação de biopróteses de válvulas porcinas.

O segmento aórtico é fornecido por frigoríficos – que são certificados pelo Ministério da Agricultura e são os mesmos que fornecem carnes para alimentação – para a empresa que fabrica as biopróteses, que faz a coleta do material, conserva-o em solução de álcool benzílico a 0,5% e o encaminha com até 6 dias para a linha de processamento. Na fábrica, estes segmentos aórticos são abertos (ficam com a aparência da foto "A" na Figura 4-1) e os folhetos deste segmento aórtico são avaliados quanto à qualidade, tamanho, presença de defeitos, etc. Aqueles segmentos cujos folhetos não podem ser aproveitados são descartados. A parede da aorta destes segmentos, porém, está em sua maioria em bom estado, servindo perfeitamente para o propósito deste trabalho.

O segmento aórtico é então cortado e limpo, para ser preparado para a exposição à temperatura na câmara climática (Figura 4-1). Primeiro, separa-se a região do segmento que possui os folhetos, que é descartada ("B" na Figura 4-1). A amostra fica então com um formato retangular de aproximadamente 40 x 15 mm (Pode variar bastante de acordo com o tamanho do segmento aórtico ou da forma como o segmento foi cortado no frigorífico ou no recebimento de materiais da empresa). A superfície externa da parede aórtica normalmente possui uma certa quantidade de gordura aderida ("C" na Figura 4-1), cujo excesso é retirado ("D" na Figura 4-1). O tecido é invertido de tal forma que a superfície interna da parede aórtica fique virada para cima (e portanto será a camada em contato mais direto com o ar aquecido da câmara climática). Um corte de aproximadamente 15 mm é feito no centro do tecido (representado em "E" pela linha preta desenhada sobre a foto do tecido, na Figura 4-1. Veja também desenhos 2 e 3 na Figura 4-2). Este corte deve ser feito com um bisturi com lâmina nova.



**Figura 4-1 - Processo de limpeza do segmento aórtico para o processo de soldagem térmica**

#### **4.1.1 Preparação da amostra para o processo de solda térmica em estufa.**

A principal forma de preparação das amostras, descrita nesta seção, é baseada naquela desenvolvida por FENNER *et al.* (1994), com algumas alterações.

Após o corte, a amostra foi presa a uma placa de silicone com agulhas. As agulhas foram posicionados a cerca de 2 mm da linha do corte (Desenho 4 da Figura 4-2). O objetivo das agulhas era manter as bordas do tecidos em contatos durante à exposição ao calor. Se o tecido com o corte é simplesmente exposto ao calor, as bordas afastam-se uma da outra devido ao encolhimento do tecido, e a soldagem portanto não acontece. Esta é uma diferença importante com relação ao experimento de FENNER *et al.* (1994), que não utilizou nenhum método para manter as bordas criadas com a incisão unidas. Como no estudo de FENNER *et al.* (1994) a espessura do tecido estudado era bem menor, talvez não houvesse a necessidade de ancorar as bordas. No caso deste estudo, em que o tecido fresco tem entre 1 e 2 mm de espessura, a ancoragem foi necessária. Testes preliminares mostraram que o tecido encolhe e afasta as bordas criadas com a incisão. Esta opção de ancoragem das bordas será denominada neste trabalho por "ancoragem com agulha".

Uma opção, também testada, de união das bordas do tecido biológico foi posicionar a amostra com a incisão sobre a placa de silicone e enrolar uma linha em torno do conjunto, o que manteve as bordas unidas (Figura 4-3). Esta segunda opção de estabilização da posição das bordas será denominada "ancoragem com linha".

Duas tiras de papel toalha foram fixadas com uma fita adesiva à placa de silicone onde se encontrava o tecido. Esta tira de papel toalha cobriu o tecido biológico até a linha dos alfinetes e tinha o aspecto da Figura 4-4.

O conjunto foi então colocado sobre a boca de um frasco plástico ou outro recipiente cheio de água, de tal forma que as extremidades livres das tiras dos papéis-toalha ficassem mergulhadas na água (Desenho 5 na Figura 4-2). Por capilaridade, a água migrava para a região do tecido biológico coberto com o papel toalha. O objetivo era que somente a região do corte fosse desidratada pela ação do calor, mas que a região vizinha não sofresse um impacto tão grande.

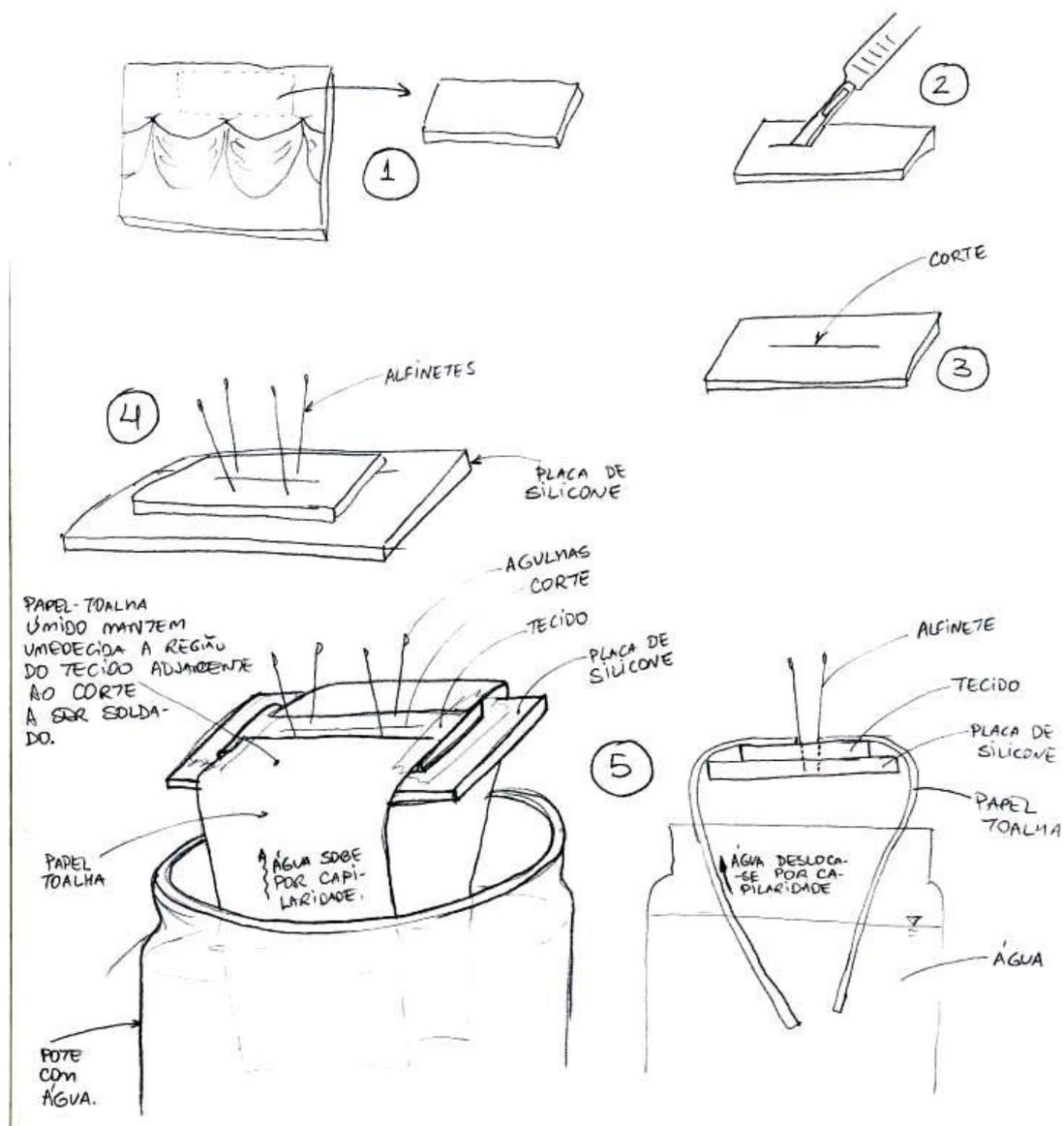
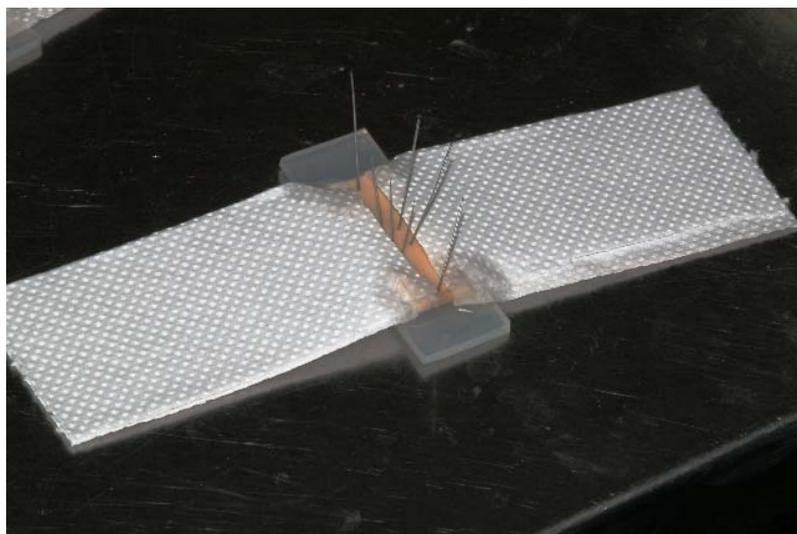


Figura 4-2 - Preparação da amostra para exposição ao calor



**Figura 4-3 - Opção de fixação do tecido biológico à placa de silicone com linha**



**Figura 4-4 - Aspecto do conjunto após a fixação do tecido com alfinetes e fixação das tiras de papel-toalha**

Finalmente, a amostra preparada foi colocada na estufa, submetida à temperatura, umidade e tempo definidos na seção 4.2.

A estufa utilizada no experimento foi a seguinte:

- Tipo: Câmara climática.
- Fabricante: Visome
- Modelo: Plus
- Faixa de temperatura: 10°C a 60°C
- Faixa de umidade: 10% a 100%

Ainda conforme definido na seção 4.2, algumas amostras foram imersas em diversas concentrações de glutaraldeído e formaldeído, que são agentes fixadores do tecido biológico, para avaliação do efeito da fixação por ligação cruzada na resistência mecânica da solda. Algumas amostras também foram mergulhadas em solução salina, para avaliação da re-hidratação da amostra sobre a solda criada na estufa.

Para avaliação dos resultados por comparação, foram avaliados também um tecido íntegro (ou seja, sem solda) e um outro unido por suturas.

#### **4.1.2 Preparação da amostra para exposição à temperatura por imersão em líquido aquecido.**

Algumas amostras foram imersas em água aquecida. Como referência para o teste, foram utilizados os mesmos parâmetros definidos no trabalho de ANDERSON (1999), no qual os melhores resultados foram obtidos para a temperatura de 60 °C por 30 minutos.

A preparação foi semelhante à descrita para o experimento na estufa. Ou seja, a seção da raiz aórtica recebeu um corte no centro e a amostra foi preparada tal que as bordas da região da incisão mantivessem-se em contato durante todo o experimento.

As amostras foram imersas em um béquer com água e o aquecimento ocorreu através de uma placa de aquecimento. A temperatura foi monitorada através da utilização de um termômetro de bulbo imerso no mesmo béquer.

## **4.2 Parâmetros de temperatura, tempo, re-hidratação e fixação dos experimentos.**

### **4.2.1 Variação da temperatura e umidade**

Testes preliminares foram feitos em uma estufa na qual a umidade não podia ser controlada. Várias temperaturas diferentes foram tentadas (entre 30 e 60 °C) sem alcançar resultados expressivos. Alguns testes foram então feitos em uma estufa com controle de umidade ("câmara climática") e observou-se que com este controle alcançavam-se resultados muito melhores. Os testes preliminares também mostraram que valores em torno de 40 °C combinados com uma umidade em torno de 35% produzem os melhores resultados.

Para analisar o efeito da temperatura e umidade na solda do tecido, os seguintes valores foram testados. Em todos os experimentos, a duração da soldagem foi de 24 horas, como feito em FENNER *et al.* (1994).

À temperatura de 40 °C, foram comparados os resultados a 30%, 35% e 40% de umidade relativa.

Mantendo fixa a umidade de 35%, foram comparados os resultados a 30°C, 40°C e 50°C.

### **4.2.2 Efeito da fixação com glutaraldeído do tecido soldado**

Os resultados obtidos no item anterior foram comparados com novas amostras soldadas nas mesmas condições, porém submetidas à fixação química por imersão da peça soldada em glutaraldeído.

Além de comparar a peça soldada sem fixação química com a amostra fixada quimicamente, também foram testadas soluções com diferentes concentrações de glutaraldeído - 0,65%, 1% e 2,5% - e dois períodos diferentes de exposição ao glutaraldeído – 24 horas e 15 dias.

A expectativa era que o glutaraldeído aumentasse a resistência da solda, assim como ocorreu com o próprio tecido e também como foi observado por ANDERSON (1999).

### **4.2.3 Avaliação da re-hidratação do tecido soldado.**

O foco do trabalho é verificar se a solda tem um potencial de aplicação em uma bioprótese cardíaca. Esta bioprótese estará em constante contato com diversas soluções aquosas durante sua fabricação e armazenamento e, depois de implantada, em contato com o sangue. Portanto, foi necessário avaliar o efeito da re-hidratação na resistência mecânica da solda criada.

Após o processo de soldagem, a amostra foi submersa em solução salina 0,9% por 1 h e por 24 h. O teste foi feito com as amostras fixadas e as não fixadas quimicamente com glutaraldeído.

### **4.2.4 Variação do tempo de exposição ao calor na estufa**

Foi realizado o processo de soldagem na estufa aumentando o tempo de exposição ao calor para 48 horas. Os resultados foram comparados com aqueles produzidos com soldas fabricadas na estufa por 24 horas. Foram comparadas também amostras não fixadas e fixadas quimicamente com glutaraldeído.

### **4.2.5 Comparação da resistência mecânica do tecido soldado com o tecido suturado e com o tecido íntegro**

Compararam-se a resistência mecânica média obtida para o tecido soldado com os valores obtidos para a amostra unida por sutura e com a amostra íntegra.

### **4.2.6 Experimentos preliminares**

Outros experimentos preliminares realizados.

#### **4.2.6.1 Soldagem com tecido já fixado.**

Antes do processo de soldagem na estufa, executou-se a fixação química do tecido em glutaraldeído 0,65%, por 24 horas. Após a fixação química, procedeu-se à soldagem na estufa a 40 °C e 35% de umidade, por 24 horas, nas mesmas condições das soldas feitas nos itens anteriores. Nenhuma das 4 amostras apresentou qualquer adesão.

A ausência de adesão se deve ao fato de que com a fixação química as fibrilas do colágeno ficam impossibilitadas de rearranjar-se após a ligação cruzada (ANDERSON,1999; 1999). Fica evidente que além da reatividade induzida pela desidratação parcial do colágeno, há a necessidade de mobilidade molecular para que as novas interações sejam efetivamente realizadas.

#### **4.2.6.2 Soldagem à temperatura ambiente**

Para responder a questão se a simples desidratação do tecido é o suficiente para gerar uma ligação nas bordas do tecido a soldar, 4 amostras foram preparadas para a soldagem tal como nos itens anteriores. Porém, ao invés de serem submetidas à desidratação numa estufa com temperatura e umidade controladas, foram deixadas numa sala, à temperatura ambiente, por 24 horas. A temperatura da sala estava em torno de 21 °C. Nenhuma adesão foi observada nas amostras.

#### **4.2.6.3 Soldagem somente com glutaraldeído**

Para investigar se o glutaraldeído é capaz de criar uma ligação entre as bordas do tecido pela simples ação de fixação química, 4 amostras preparadas para solda, tal como nos itens anteriores, foram mergulhadas diretamente em glutaraldeído 0,65%, por 48 horas. Ou seja, estas amostras não passaram pelo processo de desidratação na estufa. Após o experimento, nenhuma adesão foi observada em nenhuma das 4 amostras.

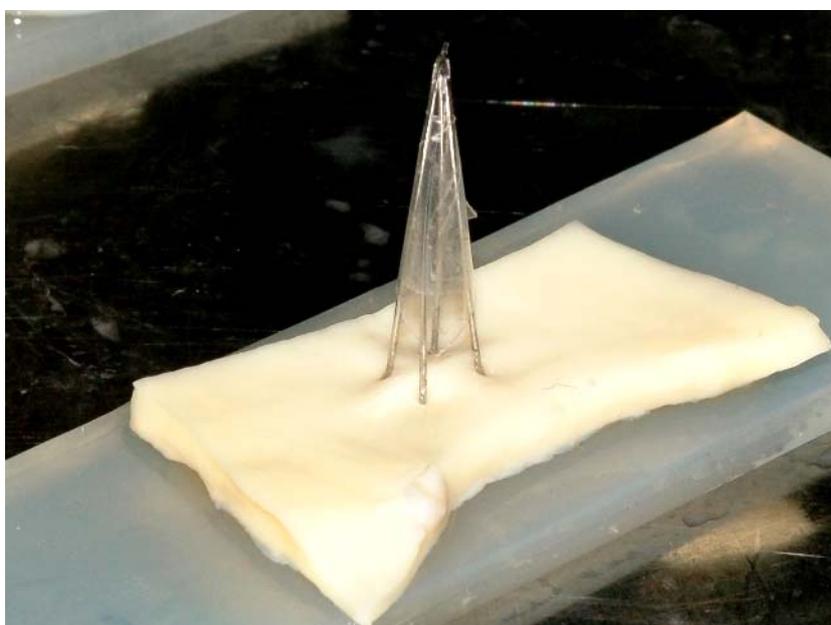
Ainda que as superfícies apostas estejam o mais próximo possível uma das outra, a nível molecular ainda haja uma distância que impeça a ligação cruzada entre moléculas de ambas as superfícies.

#### **4.2.6.4 Aposição forçada das bordas a serem soldadas**

Tentou-se uma variação da preparação da amostra, visando aumentar a pressão entre as bordas a serem soldadas no tecido. As parte de cima das quatro agulhas que ancoram o tecido na placa de silicone foram unidas com o auxílio de uma fita adesiva.

Após o processo de soldagem na estufa por 24 horas, a 40 °C e 35% de umidade relativa, tal como nos experimentos anteriores, notou-se que a adesão resultante era praticamente nula – a simples manipulação das amostras já causava a quebra da solda resultante.

A aproximação mais forçada cria uma pressão maior na interface mas desalinha as superfícies a serem soldadas (Figura 4-5), atrapalhando a ocorrência de uma boa solda.



**Figura 4-5 - Preparação da amostra para solda com aposição forçada**

#### **4.2.6.5 Solda com aplicação direta de calor no tecido através de metal aquecido**

Para testar a hipótese de que a união poderia ocorrer por fusão do material das bordas apostas, tentou-se a solda através da aplicação direta de calor na região de solda através de um metal aquecido.

No primeiro experimento, utilizou-se a ponta de um ferro de solda.

Duas tiras do parede aórtica, de aproximadamente 10 x 40 mm, foram sobrepostas por uma área de aproximadamente 10 x 10 mm. A ponta do ferro de solda foi forçada sobre a área de sobreposição, de forma a atravessar as duas tiras e foi ligada para iniciar o aquecimento. A intenção é que o material em torno da ponta do ferro de solda fundisse e criasse uma solda naquela região.

O que observou-se é que o material degradava (ficava negro) e não fundia-se, ou a fusão era pouca, e o resultado era praticamente nenhuma adesão.

O mesmo foi tentado numa prensa térmica. O material sobreposto foi colocado na prensa de tal forma que a pressão era aplicada ortogonalmente ao plano de sobreposição das duas tiras.

Tentou-se pressões entre 0,5 e 2 toneladas, e temperaturas – medidas com um termopar posicionado ao lado da amostra – variando entre 70 e 150 °C. O tempo de aquecimento e pressão variou também entre 3 e 30 minutos. Em nenhuma das diversas combinações de pressão, temperatura e tempo foi observada qualquer adesão entre as partes. A única alteração que se observava era uma deformação plástica do material na região da sobreposição.

Este experimento reforça a hipótese de que a soldagem ocorre simplesmente pela formação de ligações químicas entre moléculas e não pela fusão do material.

### **4.3 Análise das soldas**

#### **4.3.1 Análise visual**

Após a soldagem, foi verificada visualmente a região observando:

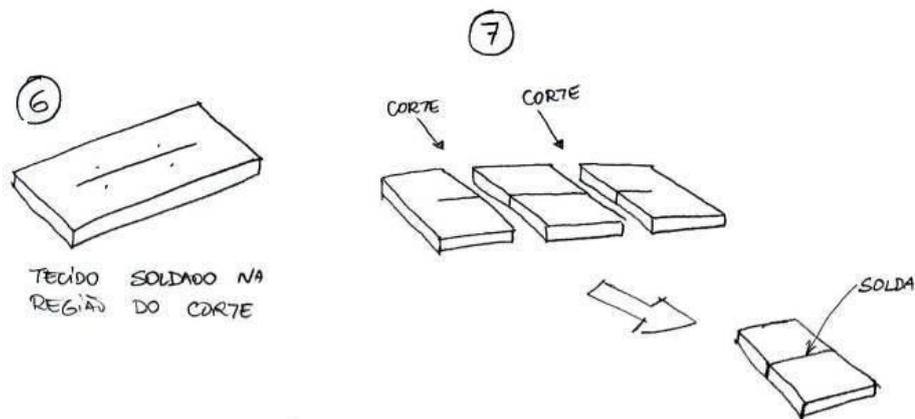
- Acabamento.
- Homogeneidade da solda.

- Qualquer alteração no tecido, como mudança de cor, alteração na flexibilidade e alterações dimensionais.

Foi feito um corte ortogonal à linha da solda e os mesmos tipos de observações visuais foram realizadas na região da solda ao longo da espessura do tecido.

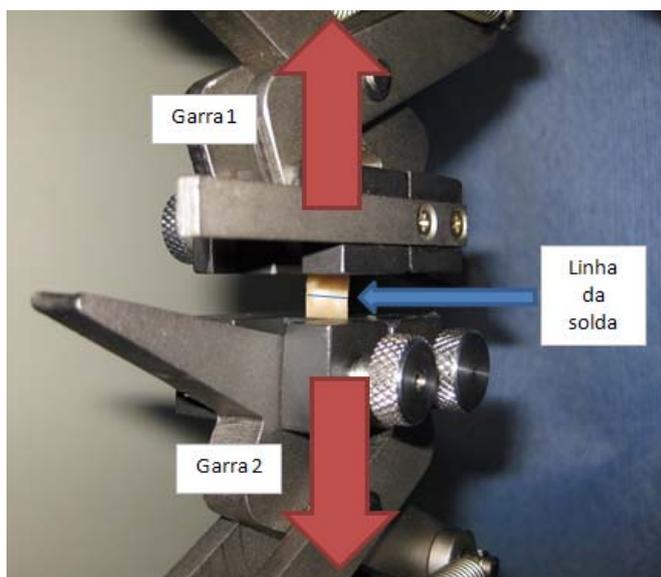
### 4.3.2 Ensaio de Tração

Após a soldagem, a amostra foi cortada nas laterais de modo que o corte fosse perpendicular ao corte feito antes da solda (Figura 4-6). Desta forma, obteve-se uma amostra tal que a linha de solda atravessava toda a largura da mesma.



**Figura 4-6 - Corte na amostra para o ensaio de tração**

A amostra foi então colocada num equipamento de ensaio de tração universal (EMIC DL3000). Garras apropriadas para o material foram usadas para segurar cada uma das duas partes soldadas, tal que a tração ocorresse na direção ortogonal à linha da solda (Figura 4-7).



**Figura 4-7 - Configuração do ensaio de tração da amostra soldada.**

### **4.3.3 Análise no Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental**

Uma amostra foi preparada para análise no MEV ambiental. Como um MEV ambiental foi utilizado, não foi necessário desidratar a amostra ou proceder com a preparação normalmente necessária para análise em um MEV convencional.

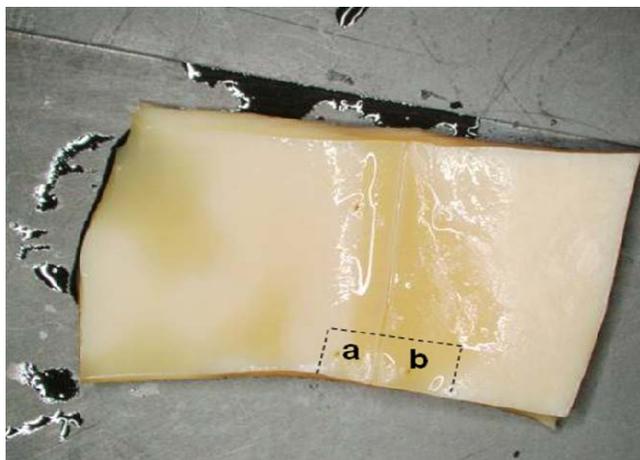
Para garantir a estabilidade da solda no envio da amostra para o laboratório onde foi feita a análise, a mesma ficou imersa em glutaraldeído 0,65%.

Uma amostra menor foi cortada da amostra original produzida conforme descrito na seção anterior, para facilitar a visualização no microscópio (Figura 4-8).

Foi utilizado o seguinte microscópio:

- Tipo: Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Ambiental
- Fabricante: FEI Company
- Modelo: Quanta 400
- Pressão da câmara:  $\sim 0,83$  Torr para baixo vácuo;  $\sim 1 \times 10^{-5}$  Torr para alto vácuo.
- Voltagem de aceleração: vários KV.

- Localização: Laboratório da St. Jude Medical, unidade de Woodridge, St. Paul, MN, Estados Unidos.



**Figura 4-8 - Sub-seção a-b da amostra original para observação no MEV**

O uso do MEV ambiental teve como objetivo a obtenção de imagens da região da solda, principalmente na interface entre as duas bordas, para observar como o tecido comporta-se fisicamente naquela região, tentando obter informações sobre o mecanismo de soldagem. Foi também analisado como as duas bordas mantiveram-se unidas.

#### **4.3.4 Análise com Microscopia Raman**

A preparação de amostra para análise em microscopia Raman exigiu que esta não fosse submetida ao processo de fixação química, pois grupos aldeídos atrapalham a análise. Tão logo a amostra foi soldada na estufa, esta foi levada para o laboratório para análise.

Uma amostra de tecido fresco também foi avaliada, para comparação com o tecido desidratado.

#### **4.3.5 Encurtamento e Análise Histológica**

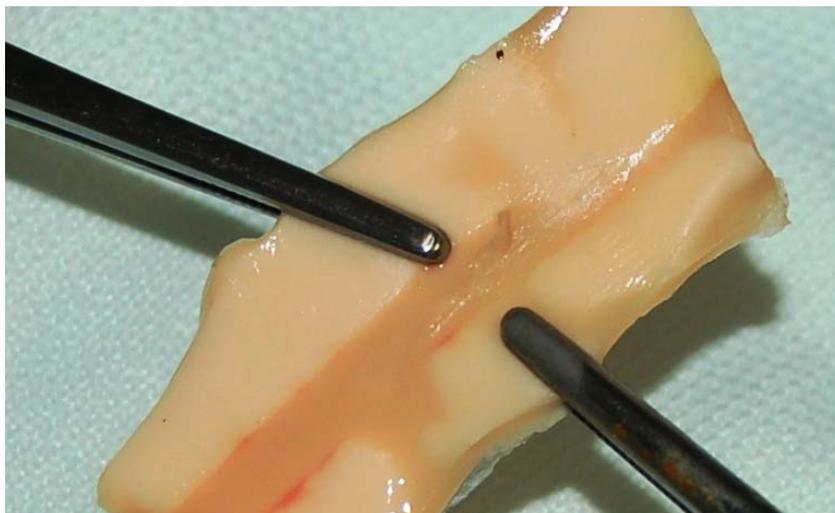
Encurtamento do tecido biológico e análise histológica também poderiam fornecer informações úteis à análise da solda, mas esta técnicas não foram utilizadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise visual das soldas

Ao fazer a análise visual das soldas, na maioria delas as seguintes observações foram feitas:

- Na região da solda o tecido tomava uma coloração mais escura (Figura 5-1) e se tornava menos flexível. Devido à desidratação e encolhimento do tecido, a espessura do mesmo reduzia-se na região da solda. A intensidade destas mudanças eram tão maiores quanto maior era o grau de desidratação na região. O grau de desidratação era avaliado visualmente. Quanto maior a desidratação, o tecido fica mais duro e, com desidratação mais acentuada, apresenta um aspecto translúcido.
- Em soldas com alto grau de desidratação a linha da solda praticamente desaparecia, ou seja, a continuidade do material através da linha da solda era quase perfeita (Figura 5-2). Já em outras soldas, onde o grau de desidratação não foi tão acentuado, notava-se que a camada interna da aorta (lado mais liso do material) não apresentava uma boa união, ficando um certo vinco na superfície do material (Figura 5-1), indicando a região onde a solda ocorreu. Esta observação fica ainda mais evidente quando observa-se a solda ao longo da espessura do tecido, após fazer o corte ortogonal à peça.
- Quando a amostra soldada era re-hidratada ou imersa em glutaraldeído para a fixação química, boa parte da flexibilidade na região da solda era recuperada.



**Figura 5-1 - Aspecto do tecido na região da solda. Tecido com grau médio de desidratação.**



**Figura 5-2 - Aspecto da região da solda em uma amostra com alto grau de desidratação.**

\*As manchas brancas na Figura acima são resquícios do papel-toalha que ficaram aderidos à amostra após o processo de soldagem.

## 5.2 Ensaio de tração

As amostras foram preparadas conforme definido na metodologia e a resistência mecânica foi obtida através do ensaio de tração.

### 5.2.1 Variação de temperatura e umidade

Mantendo fixa a temperatura de 40°C, e tempo de exposição de 24 horas, obtiveram-se os resultados para a variação da umidade descritos na Tabela 5-1:

**Tabela 5-1 - Resistência mecânica x Umidade Relativa para T = 40 °C e t = 24 h**

Umidade Relativa (%)	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
30	6	0,86	0,48	0,33	1,57
35	12	0,73	0,65	0,21	2,1
40	16	0,58	0,52	0,13	1,98

Os valores médios de resistência mecânica aparentemente diminuem com o aumento da umidade, mas uma análise de variância (ANOVA) dos dados, feito através do software MiniTAB, mostra que estatisticamente os valores de resistência para umidades relativas maiores não são significativamente menores (Vide Análise de Variância dos dados no Apêndice A). Quando se compara os valores de umidade relativa de 30% e 40%,  $p = 0,276$ .

Repetiu-se a análise retirando todos os valores menores que 0,25 MPa, que poderiam significar uma soldagem falha, mas mesmo assim a redução na tensão média ainda não era significativa.

Porém, observou-se que o controle de umidade é importante, pois estudos preliminares foram feitos em outras estufas nos quais não havia controle de umidade. Nestas estufas, a 40 °C, valores individuais dificilmente passavam dos 0,2 MPa e muitas amostras nem sequer apresentavam adesão.

Num segundo experimento, mantendo-se fixa a umidade em 35%, e tempo de exposição de 24 horas, obtiveram-se os resultados para a variação da temperatura reportados na Tabela 5-2.

**Tabela 5-2 - Resistência mecânica x Temperatura para %H<sub>2</sub>O = 35% e t = 24 h**

Temperatura (°C)	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
30	4	0,19	0,05	0,11	0,24
40	12	0,73	0,65	0,21	2,1
50	4	0,90	0,49	0,41	1,58
60	5	0,00	0,00	0	0

Nota-se que a resistência mecânica aumenta com a temperatura, até 50°C. Porém, a 50°C o encolhimento do tecido é maior, tal que as bordas apostas afastavam-se umas das outras, mesmo com a ancoragem das agulhas (desenho 4 na Figura 4-2), e a solda fica impossibilitada de ocorrer em boa parte das amostras. Porém, nas amostras nas quais era possível concluir a soldagem, o valor da resistência mecânica era razoável comparado aos outros grupos. Já a 60°C, não foi possível produzir nenhuma amostra soldada.

Acredita-se que à medida que a temperatura aumenta, maior é o grau de desidratação do tecido, o que libera um número maior de sítios de ligação. Um número maior destes sítios livres de ligação gerarão, conseqüentemente, um maior número de ligações na interface entre as duas superfícies a serem soldadas e, portanto, uma solda mais resistente.

Porém, é essencial que as duas superfícies a serem soldadas mantenham-se em contato, caso contrário não é possível que as ligações ocorram. Este é o problema de temperaturas maiores que 50°C, quando o maior encolhimento do tecido acaba por afastar as duas superfícies apostas.

A análise de variância dos dados mostra que há uma diferença quando se compara o grupo de dados a 30°C e 40°C ( $p = 0,182$ ), e também quando se compara 30°C e 50°C ( $p = 0,029$ ). Porém, quando se comparam os grupos de dados a 40°C e 50°C,

estatisticamente a diferença não é muito significativa ( $p = 0,474$ ). Portanto, pode-se inferir que a 40°C obtém-se as melhores soldagens.

### 5.2.2 Efeito da fixação química com glutaraldeído da peça soldada

A Tabela 5-3 compara os valores de resistência mecânica da solda de algumas das amostras do item anterior com outras amostras produzidas nas mesmas condições, porém imersas em glutaraldeído 0,65% por 24 horas.

**Tabela 5-3 - Resistência mecânica: Tecido não-fixado x tecido fixado**

Preparação na estufa		Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	Umidade (%)				
30	35	Não	4	0,19	0,05
30	35	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas	4	0,19	0,06
40	35	Não	14	0,64	0,64
40	35	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas	7	0,35	0,09
40	40	Não	16	0,58	0,52
40	40	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas	4	0,45	0,12

Nota-se uma redução da tensão média de resistência da amostra após imersão em glutaraldeído 0,65%, porém a análise de variância mostrou que as diferenças entre os grupos de dados não é muito significativa, quando se compara a amostra sem fixação química e com fixação química (Apêndice A). Mas a fixação química será importante para manter a estabilidade da solda em meio aquoso, como será visto à frente.

Neste caso dois mecanismos ocorrem. Primeiro, a amostra está sendo re-hidratada pela solução aquosa, que desfaz parte das ligações ocorridas durante a soldagem na estufa. Segundo, ocorre a fixação química do tecido, que também age sobre as ligações existentes na interface da solda, reforçando-a, ou seja, ao mesmo tempo em

que algumas ligações na região da solda são desfeitas, outras são reforçadas pelas ligações cruzadas criadas pela ação do glutaraldeído. Por isso a resistência não apresentou diferenças significativas entre o grupo não-fixado e o grupo fixado.

### 5.2.3 Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica

A Tabela 5-4 mostra o efeito da concentração de glutaraldeído na resistência mecânica da solda.

**Tabela 5-4 - Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica**

Preparação na estufa		Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	Umidade (%)				
40	35	Não	12	0,73	0,65
40	35	Glutaraldeído a 0,65%, por 24 h	7	0,35	0,09
40	35	Glutaraldeído a 1,00%, por 24 h	4	0,35	0,07
40	35	Glutaraldeído a 2,50%, por 24 h	4	0,64	0,19

O que se observa é que para concentrações menores de glutaraldeído a resistência mecânica da solda, quando comparada às amostras não fixadas, reduz-se. Porém, quando fixada com maior concentração utilizada neste teste, 2,5%, a fixação com glutaraldeído é capaz de manter o mesmo nível de resistência mecânica para o tecido soldado.

Na análise de variância dos grupos de dados (Apêndice A), a diferença entre a amostra sem fixação e aquela fixada com glutaraldeído a 0,65% é pouco significativa ( $p=0,247$ ) e menos significativa ainda quando comparada com glutaraldeído a 1,0% ( $p=0,389$ ). Porém, quando comparado com o tecido fixado em glutaraldeído a 2,5%, a diferença é praticamente inexistente ( $p=0,994$ ), ou seja, os valores de resistência mecânica são estatisticamente similares.

Uma maior concentração de glutaraldeído tem uma maior e mais rápida penetração no tecido e na interface da solda, gerando um número maior de ligações cruzadas na região, o que aumenta a resistência da solda.

#### 5.2.4 Efeito da re-hidratação do tecido soldado.

A Tabela 5-5 reporta o efeito da re-hidratação da região soldada na resistência da solda.

**Tabela 5-5 - Efeito da re-hidratação na resistência mecânica**

Preparação na estufa	Fixação Química	Re-hidratação	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
40°C/ 35%	Não	Não	14	0,64	0,64
	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas		7	0,35	0,09
	Glutaraldeído 2,5%, por 24 horas		4	0,64	0,23
	Não	Solução Salina a 0,9%, durante 1h	4	0,04	0,04
	Não	Solução Salina a 0,9%, durante 24h	4	0,00	0,00
	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas		3	0,25	0,07
	Glutaraldeído 2,5%, por 24 horas		4	0,49	0,23

O mais importante a se observar neste experimento é o efeito da re-hidratação sobre a solda obtida na estufa. A solda pode obter excelentes valores de tensão e resistência, logo após a preparação desta na estufa. Porém, depois de apenas 1h de re-hidratação a solda praticamente desfaz-se. Depois de 24h de re-hidratação, então, a solda desaparece e não resta nenhum sinal de adesão entre as bordas.

Surge então a importância da fixação química. Após a fixação com glutaraldeído, Tabela 5-5, é possível notar que os valores de resistência mecânica da solda reduzem-se mas o tecido é capaz de manter ainda um certo grau de adesão mesmo após a re-hidratação.

A re-hidratação teria um efeito contrário ao que ocorre na estufa. Os sítios de ligação que tinham sido liberados pelas moléculas de água e ligados com outra molécula são agora, na presença da solução aquosa, religados às moléculas de água, desfazendo as ligações criadas. Como foi discutido anteriormente, somente a fixação química será capaz de estabilizar estas ligações, através da ligação cruzadas criada pelo agente fixador.

### 5.2.5 Efeito do tempo de exposição ao calor na estufa

A Tabela 5-6 mostra como o tempo de exposição ao calor afeta a resistência mecânica da solda.

**Tabela 5-6 - Efeito do tempo de exposição ao calor na resistência mecânica**

Preparação na estufa			Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tempo				
40	40	24 h	Não	16	0,58	0,52
40	40	48 h	Não	15	3,16	1,00
40	40	24 h	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas	4	0,45	0,12
40	40	48 h	Glutaraldeído 0,65%, por 24 horas	3	0,49	0,16

Quando testam-se as amostras logo após a soldagem, nota-se uma grande diferença nos valores de resistência mecânica quando o tempo de exposição é aumentado de 24 h para 48 h. A média é multiplicada por mais de 5 vezes. Porém, após a fixação das amostras no glutaraldeído, nenhuma diferença é notada entre os valores de resistência.

O aumento da resistência com o tempo de exposição está relacionado, mais uma vez, ao grau de desidratação das moléculas na interface da solda. Um tempo de exposição maior aumenta o número de sítios de ligação liberados pela retirada das moléculas de água, e também o tempo de ligação entre as moléculas das superfícies opostas, aumentando o número de ligações e, conseqüentemente, a resistência da solda.

Os resultados das amostras fixadas levam a crer, porém, que independente do número de ligações criadas durante a solda na estufa, a fixação química criará sempre o mesmo número de ligações cruzadas na região da interface. Este número de ligações cruzadas vai depender na realidade de outros fatores, como concentração do agente fixador e tempo de fixação química, mas não do número de ligações inicialmente criadas na estufa. Ou seja, somente um número determinado de ligações serão reforçadas pela fixação química, e as outras serão desfeitas pela ação reidratante da solução aquosa.

Durante os testes de resistência mecânica da solda com estas amostras, uma das amostras produzidas conforme a linha 1 da Tabela 5-6 (Amostra produzida a 40°C, 40%, durante 24 horas, sem fixação química), teve um comportamento diferente.

Durante o ensaio de tração, somente metade da solda rompeu-se (Figura 5-3, letra A) e a amostra acabou soltando da garra superior sem no entanto romper-se por completo. A amostra foi então cortada perpendicularmente à linha de solda, de modo a retirar a região da solda que tinha rompido (Figura 5-3, letra B). O pedaço soldado foi então submetido a novo ensaio de tração (Figura 5-3, letra C).

Este novo pedaço teve um alto valor de resistência mecânica, 2,48 MPa, quando comparado à média do grupo de dados, de 0,58 MPa.

O que ocorreu com esta amostra está certamente ligado à qualidade da aposição das superfícies na região da solda. No lado que rompeu-se primeiro a aposição das superfícies não era tão boa (aproximação não foi suficiente ou, aproximação foi excessiva ou, superfícies das duas partes estavam desalinhadas entre si), ao contrário do outro lado, em que a aposição estava mais próxima de uma aposição perfeita.

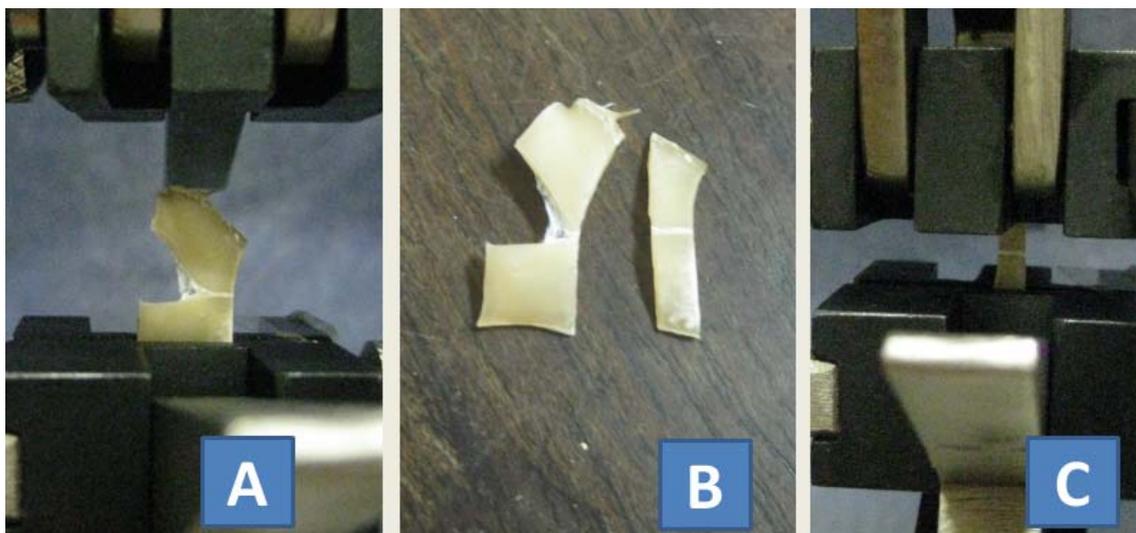


Figura 5-3 - Resistência mecânica elevada em parte de uma das amostras soldadas

### 5.2.6 Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica

A Tabela 5-7 relata os resultados de resistência da solda após tratamento em tempos diferentes de estabilização química com glutaraldeído.

Tabela 5-7 - Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica

Preparação na estufa		Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	Umidade (%)				
40	35	Não	12	0,73	0,65
40	35	Glutaraldeído a 2,50%, por 24 h	4	0,64	0,19
40	35	Glutaraldeído a 2,50%, por 15 dias	3	0,87	0,16

O fator tempo na fixação química é capaz de aumentar um pouco mais a resistência mecânica média da amostra soldada. A análise de variância (Apêndice A) mostra que há uma certa diferença entre os grupos de dados, ainda que estatisticamente pouco significativa ( $p=0,155$ ).

Com um tempo maior de exposição ao glutaraldeído, a penetração no tecido e na interface da solda é ainda maior, ainda que 24 horas já sejam suficientes para a penetração e fixação adequada a 1 mm das superfícies do tecido. Há maior tempo para a ocorrência de uma maior quantidade de ligações cruzadas, reforçando ainda mais a solda.

### 5.2.7 Comparação da resistência mecânica da tecido soldado e do tecido suturado

A Tabela 5-8 reporta dados de resistência mecânica de tecidos soldados e suturados.

**Tabela 5-8 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido suturado**

Preparação na estufa			Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tempo				
40	35	24 h	Glutaraldeído 2,50%, por 24 horas	4	0,64	0,19
Tecido suturado			Não	3	0,70	0,11
			Glutaraldeído 2,50%, por 24 horas	3	1,36	0,21

A união através de sutura do tecido fixado é aproximadamente duas vezes mais resistente que a união por solda. A análise de variância (Apêndice A) mostra que a diferença é significativa ( $p=0,005$ ).

Importante observar que na união suturada a fixação química também aumenta a sua resistência, pois o tecido fica mais resistente ao rasgamento causado pela sutura quando a união é solicitada mecanicamente.

### 5.2.8 Comparação da resistência mecânica da solda e do tecido íntegro

Os valores de resistência mecânica da solda são comparados com os valores da resistência mecânica do tecido íntegro na Tabela 5-9.

**Tabela 5-9 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro**

Tipo	Preparação na estufa			Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
	Temp. (°C)	Umidade (%)	Tempo				
Tecido soldado	40	35	24 h	-	14	0,64	0,64
	40	35	24 h	Glutaraldeído 2,50%, por 24 horas	4	0,64	0,19
Tecido íntegro	-	-	-	-	11	2,17	0,64
	-	-	-	Glutaraldeído 2,50%, por 24 horas	5	4,45	0,83
	40	35	24 h	-	4	3,18	1,50
	40	35	24 h	Glutaraldeído 2,50%, por 24 horas	3	2,74	0,36

As duas primeiras linhas da Tabela 5-9 referem-se ao tecido soldado não-fixado e fixado com glutaraldeído. As linhas 3 e 4 da tabela referem-se ao tecido íntegro e fresco. As duas últimas linhas da tabela referem-se ao mesmo tecido das linhas 1 e 2, que foi soldado na estufa, porém é parte do tecido que não foi cortada (e conseqüentemente soldada) e manteve-se íntegra. Mas sofreu a mesma exposição ao calor e umidade que a região da solda.

O tecido fresco, sem fixação química, é cerca de 3,3 vezes mais resistente que o tecido soldado.

Quando comparam-se o tecido fresco fixado em glutaraldeído e o tecido soldado, também quimicamente soldado, a diferença é ainda maior. O tecido fresco é quase 7 vezes mais resistente que o tecido soldado.

É interessante quando comparam-se os dados do tecido íntegro fresco quimicamente fixado e o tecido íntegro, submetido à temperatura e umidade, também fixado. A diferença é significativa e o tecido submetido à temperatura e umidade da estufa torna-se menos resistente à tração. A tensão média de resistência é cerca de 60% do tecido fresco.

A explicação para a redução da resistência do tecido íntegro pode estar na ação da temperatura na conformação das moléculas de colágeno que, alteradas, afetam negativamente as ligações intermoleculares.

Este tecido íntegro, que esteve na estufa nas mesmas condições da parte que foi soldada, é cerca de 3 vezes mais resistente que o tecido soldado.

Todos os grupos de dados analisados acima apresentam diferenças significativas entre si. (Veja Análise de Variância no Apêndice A).

### **5.2.9 Comparação da resistência mecânica da solda e do tecido íntegro após alta desidratação das amostras**

Este experimento ocorreu de forma não planejada, porém gerou resultados muito interessantes. O que ocorreu foi que o papel-toalha que mantinha o tecido adjacente à região da solda ficou muito curto e, com a redução do nível de água dentro do recipiente, o papel-toalha parou de umedecer o tecido, que ficou completamente desidratado.

Notou-se que a solda apresentou um ótimo acabamento visual, ficando difícil notar onde estava a linha da solda. De cada amostra retirou-se dois pedaços: um tal como descrito na metodologia de preparação da amostra e que possuía a linha de soldagem e outro no canto da amostra, que não era alcançado pelo corte feito na amostra. As resistências foram comparadas e viu-se que não havia diferença entre as médias de valores dos dois grupos de amostras (Tabela 5-10).

**Tabela 5-10 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro após alta desidratação**

Tipo	Preparação na estufa			Fixação Química	n	Resistência mecânica média (MPa)	Desvio Padrão
	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tempo				
Tecido soldado	40	40	48 h	Não	2	10,75	2,11
Tecido íntegro	40	40	48 h	Não	3	10,68	1,67

Pela Análise de Variância (Apêndice A), vê-se que não há diferença entre os dados ( $p=0,970$ ).

Interessante que uma das amostras soldadas rompeu-se em outra região e não na solda (esta amostra não foi incluída na tabela acima).

Com o alto grau de desidratação, o número de ligações entre as moléculas das duas superfícies apostas deve ter atingido o máximo de ligações possíveis, ficando com uma resistência comparável ao do próprio tecido íntegro.

Vale lembrar que esta resistência da solda vai desaparecer com a re-hidratação, ou seja, a solda só é comparável com o tecido íntegro na situação em que ambos estão totalmente desidratados.

Na realidade a desidratação à temperatura e umidade ambientes é muito pequena, e portanto praticamente não ocorre o efeito de liberação dos sítios de ligações das moléculas de colágeno.

### 5.3 Análise de curvas Tensão x Deformação obtidas nos ensaios de tração.

A primeira observação quando se compara as curvas de tensão x deformação do tecido fresco e o tecido soldado, é a quantidade de deformação que o material sofre antes de romper-se.

A Figura 5-4 mostra uma curva tensão x deformação típica do tecido fresco da aorta porcina. O tecido deforma-se mais de 150% antes de romper-se. Outra observação na Figura 5-4 é que as curvas mostram vários "vales" nos valores de tensão. Eles correspondem ao momento em que apenas uma das camadas do tecido rompe-se. Normalmente observa-se que as camadas externas rompem-se antes, o que leva a crer que estas camadas tem menor elasticidade que a camada intermediária.

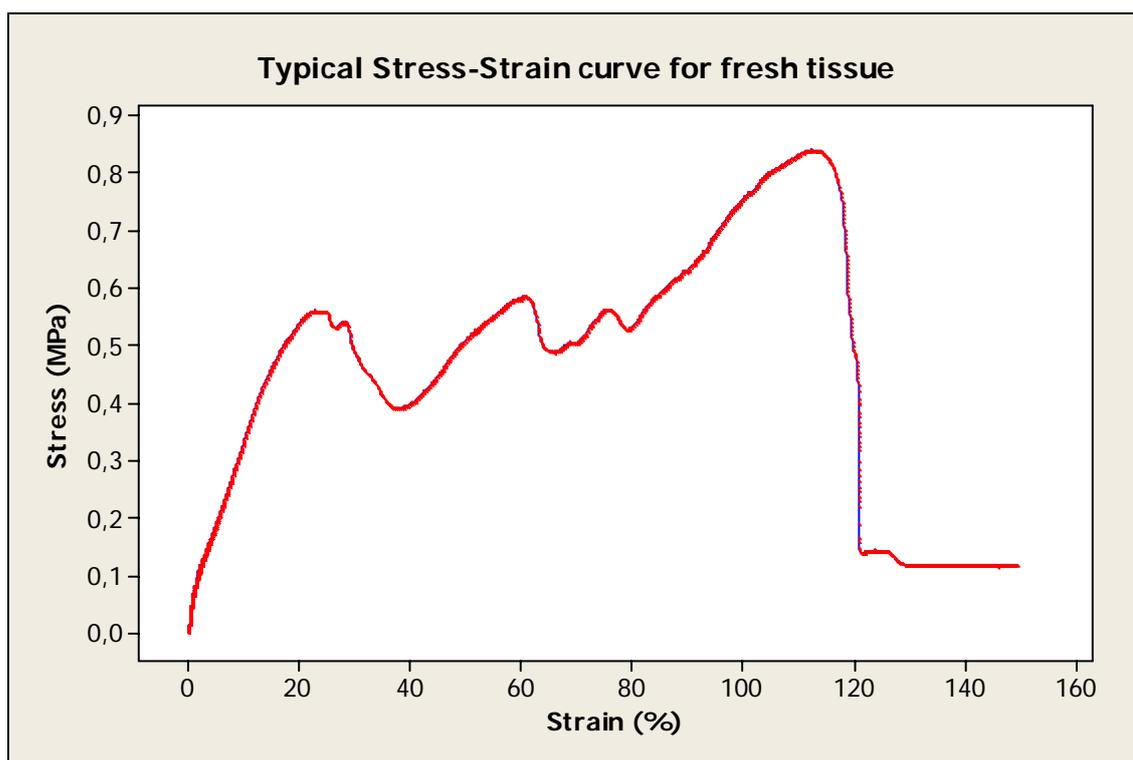
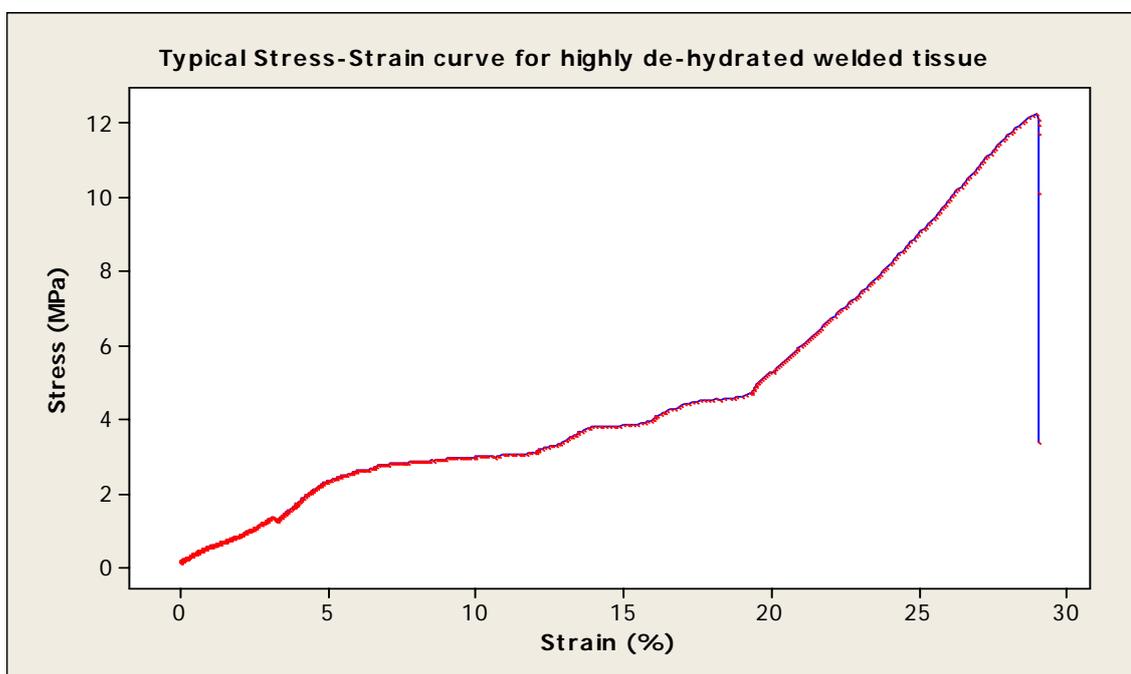


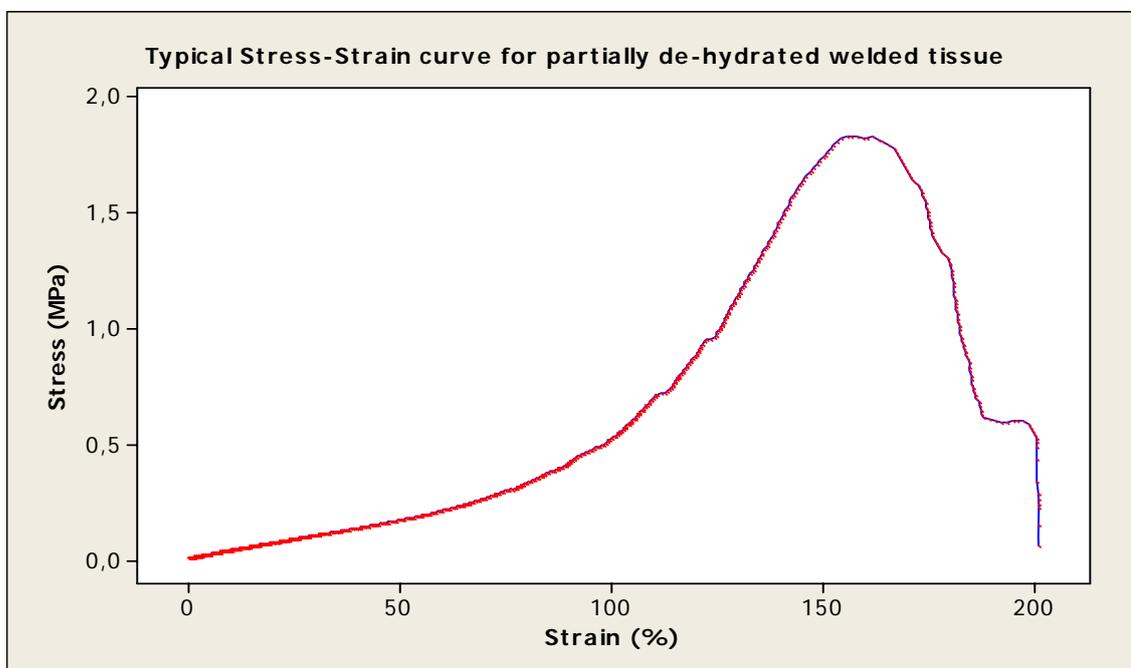
Figura 5-4 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido fresco.

A Figura 5-5 é uma curva típica do tecido soldado, e com alto grau de desidratação – neste caso todo o tecido ficou desidratado. A desidratação e o rompimento da solda – menos resistente que o tecido íntegro – reduzem a quantidade de deformação para em torno de 40% e ampliam a tensão de ruptura (de 0,8MPa para 10MPa). Nota-se também na comparação entre estes dois gráficos que o rompimento é bem mais abrupto no tecido soldado do que no tecido fresco. Este rompimento abrupto – rompimento frágil – é exatamente o rompimento da linha de solda. No tecido fresco percebe-se um rompimento mais dúctil.



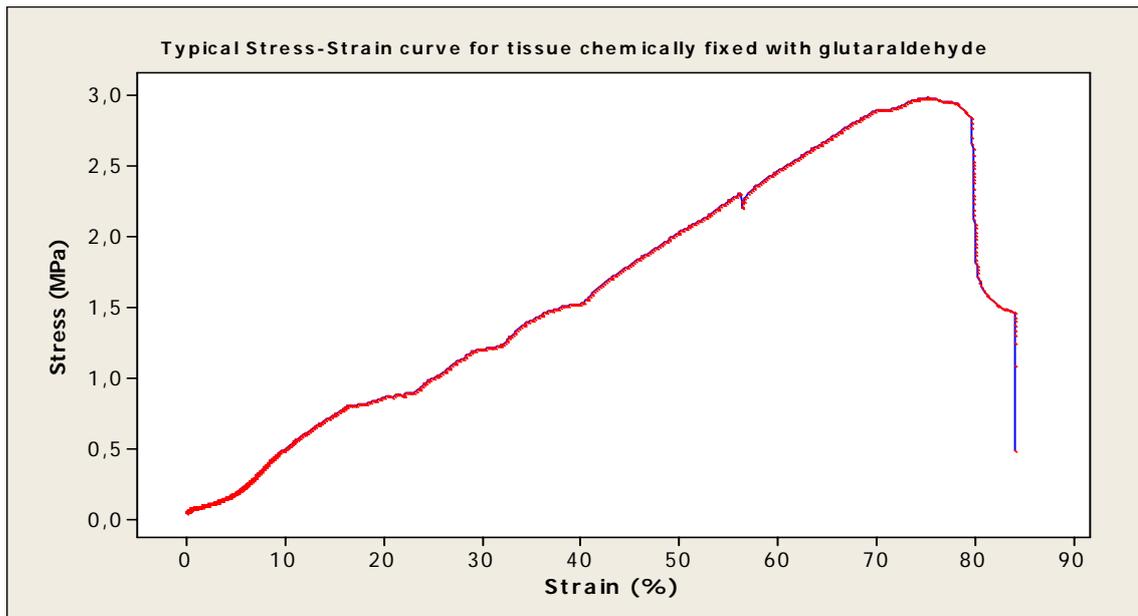
**Figura 5-5 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido soldado e com alto grau de desidratação.**

A Figura 5-6 mostra a curva do tecido íntegro – ou seja, não soldado – mas que foi submetido à desidratação na estufa, nas mesmas condições em que são feitas as soldas. Esta amostra estava parcialmente desidratada, ou seja, havia uma parte do tecido umedecido pelo papel-toalha, como descrito na seção de Metodologia. Mesmo parcialmente desidratado, o tecido íntegro ainda mantém uma alta ductilidade – entre 200% e 300% de deformação. Note que o tecido desidratado fica mais resistente à tração. Esta maior resistência aliada à sua flexibilidade são os responsáveis pela grande taxa de deformação (até cerca de 2 vezes o tecido fresco).



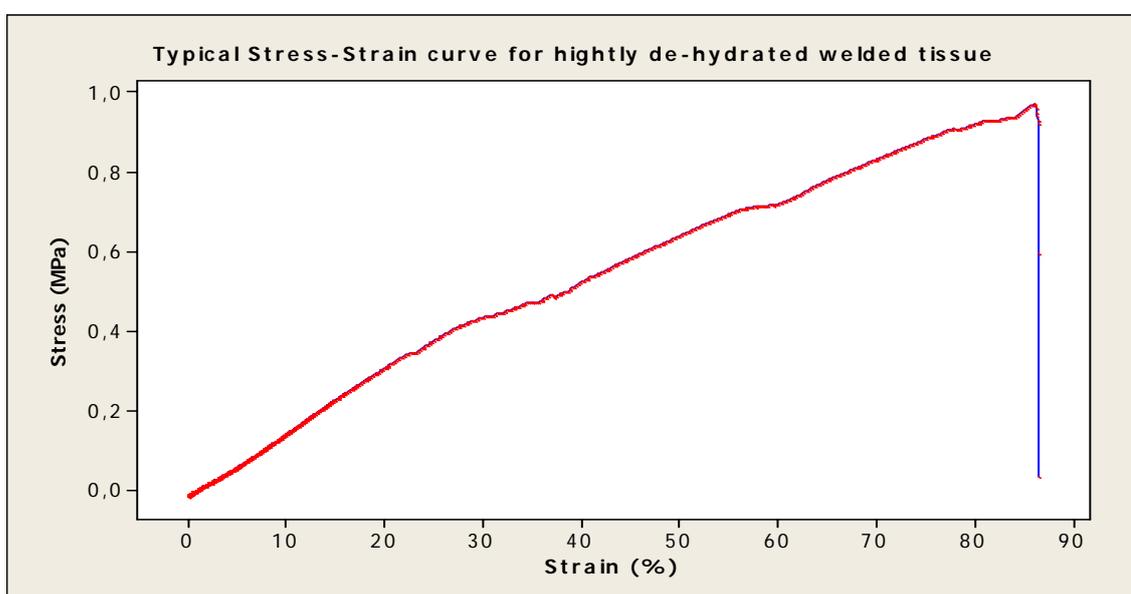
**Figura 5-6 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido parcialmente desidratado na estufa**

A quantidade de deformação do tecido íntegro é reduzida com a fixação química do tecido, o que já era de esperar. A Figura 5-7 mostra curvas típicas do tecido fixado quimicamente, em que as deformações não atingem 100%. Nota-se, porém, que a resistência do tecido é maior após a fixação.



**Figura 5-7 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido fixado quimicamente com glutaraldeído.**

Quando se comparam as curvas do tecido soldado sem fixação e com fixação química – Figura 5-5 e Figura 5-8 – percebe-se um aumento da quantidade de deformação absorvida pelo tecido fixado antes de romper-se, ao contrário do que ocorre no tecido íntegro. A explicação está no fato de que o tecido desidratado tem muito baixa ductilidade e o glutaraldeído, além de fixar o tecido quimicamente, também re-hidrata o tecido, recuperando parte de sua ductilidade. Portanto, é possível deformar o tecido um pouco mais antes de romper a solda – ainda que rompa com uma tensão menor.



**Figura 5-8 - Curvas tensão x deformação típicas do tecido soldado e fixado quimicamente em glutaraldeído.**

Cada curva apresentada nas figuras 5-4 a 5-8 representa a curva de apenas uma das amostras analisadas, e não a média das amostras.

#### 5.4 Análise no Microscópio Eletrônico de Varredura

A amostra soldada em estufa e fixada quimicamente em glutaraldeído 0,65% foi observada no MEV ambiental. Observando-se a **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a Figura 5-10, nota-se a presença de fibras que partem de um borda e estendem-se até a outra borda, criando uma ligação entre as duas. As dimensões destas fibras, que pela Figura 5-10 têm um diâmetro da ordem de 5 a 10  $\mu\text{m}$ ,

coincidem com as dimensões de fibras de colágeno, que variam entre 1 a 20  $\mu\text{m}$  (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999).

Nota-se também que não há sinais de soldagem por fusão do material na interface, o que pode ser inferido da planicidade com que se manteve a superfície de ambas as bordas, planicidade esta produzida pelo corte com a lâmina do bisturi.

A melhor hipótese que pode-se inferir destas imagens é que ocorrem então ligações químicas entre as fibras de colágeno das superfícies apostas, e que estas levam à união das duas bordas.

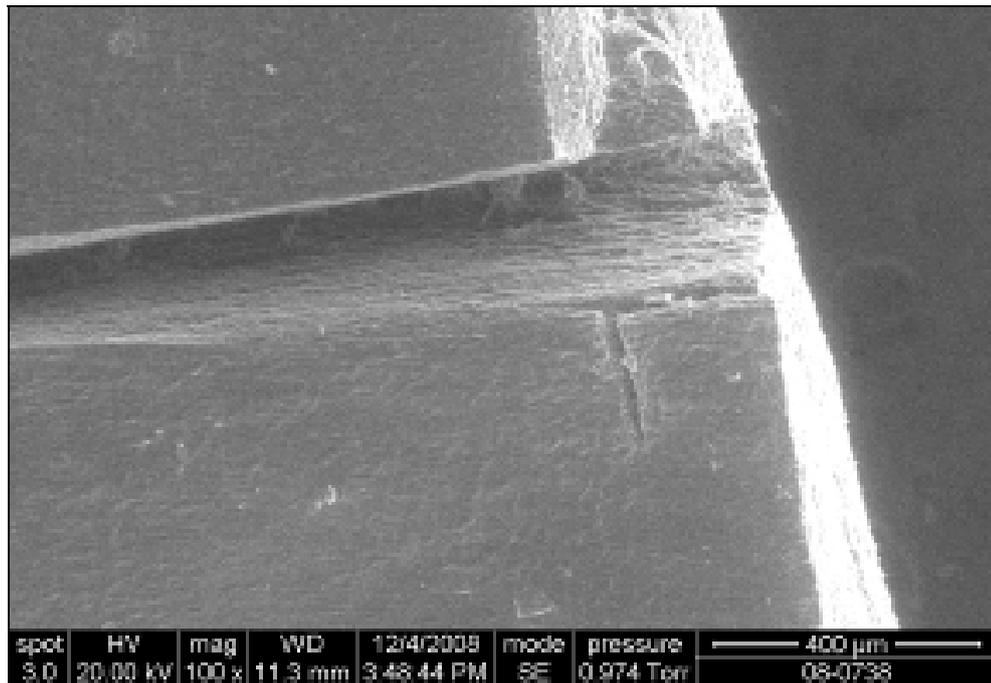


Figura 5-9 - Imagem gerada no MEV da região da solda térmica (100x)

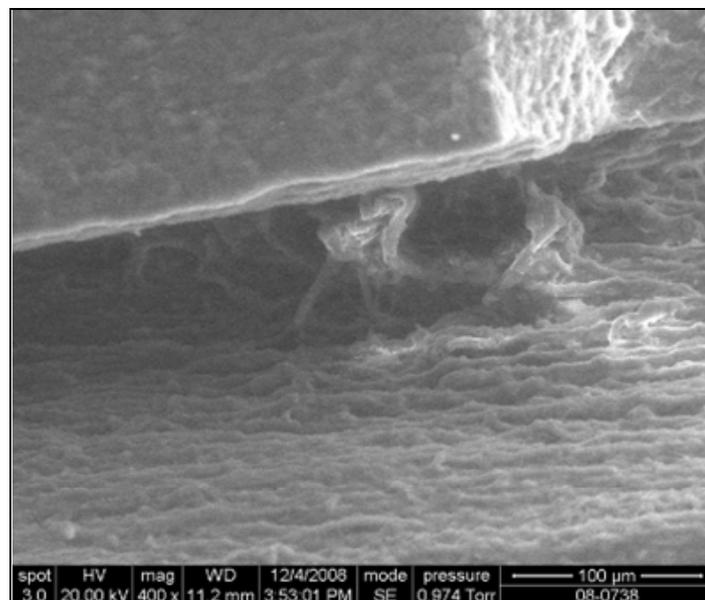


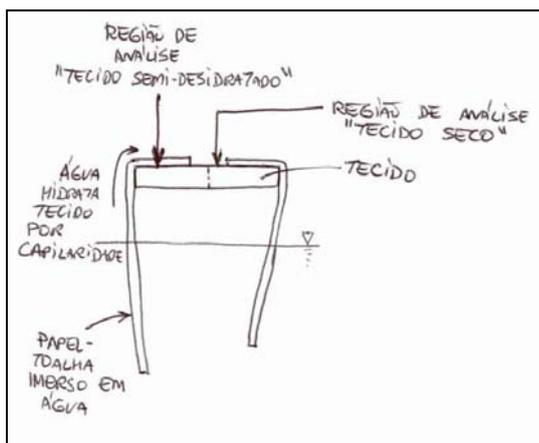
Figura 5-10 - Imagem gerada no MEV da região da solda térmica (400x)

## 5.5 Análise com Microscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para investigar alterações na estrutura do tecido frente à desidratação pela elevação de temperatura e redução da umidade. A amostra de tecido analisada foi posicionada no microscópio de forma que a camada íntima da parede da aorta (camada interna da artéria) ficasse voltada para o laser durante a análise.

Espectros foram obtidos de três amostras: um tecido fresco, um tecido parcialmente desidratado e um tecido bastante desidratado (Figura 5-11). Os espectros obtidos foram sobrepostos e normalizados, para uma comparação adequada. O espectro resultante foi dividido em 4 figuras (Figura 5-12 até Figura 5-15), para facilitar a visualização.

Neste espectro, a linha azul representa um tecido fresco, ou seja, sem nenhuma ação sobre o tecido, como desidratação, fixação química ou qualquer outro tratamento. O tecido foi analisado cerca de uma semana depois de recebido do abatedouro. O tecido (segmento aórtico de porcino) é recebido do abatedouro até no máximo 6 dias após a morte do porcino e é mantido em álcool benzílico a 0,5%. Esta amostra será o controle, e a chamaremos de “tecido fresco”.



**Figura 5-11 – Desenho esquemático mostrando as regiões do tecido analisadas na espectroscopia Raman.**

A linha laranja representa uma parte do tecido que foi exposta à temperatura e baixa umidade na câmara climática, porém mantida úmida pelo papel-toalha em contato com ela e cuja outra extremidade estava mergulhada em água (Figura 5-11). Ainda que o tecido seja mantido com um suprimento de umidade, ele apresenta um certo grau de desidratação. Chamaremos esta amostra de “tecido semi-desidratado”.

A linha vermelha representa a análise da região do tecido bem próxima à região de solda, e que ficou diretamente exposta à temperatura e baixa umidade da câmara climática. Chamaremos esta amostra de “tecido seco” (Figura 5-11).

Analisando os gráficos no sentido crescente dos números de onda, observamos as seguintes alterações nos espectros que são as mais evidentes:

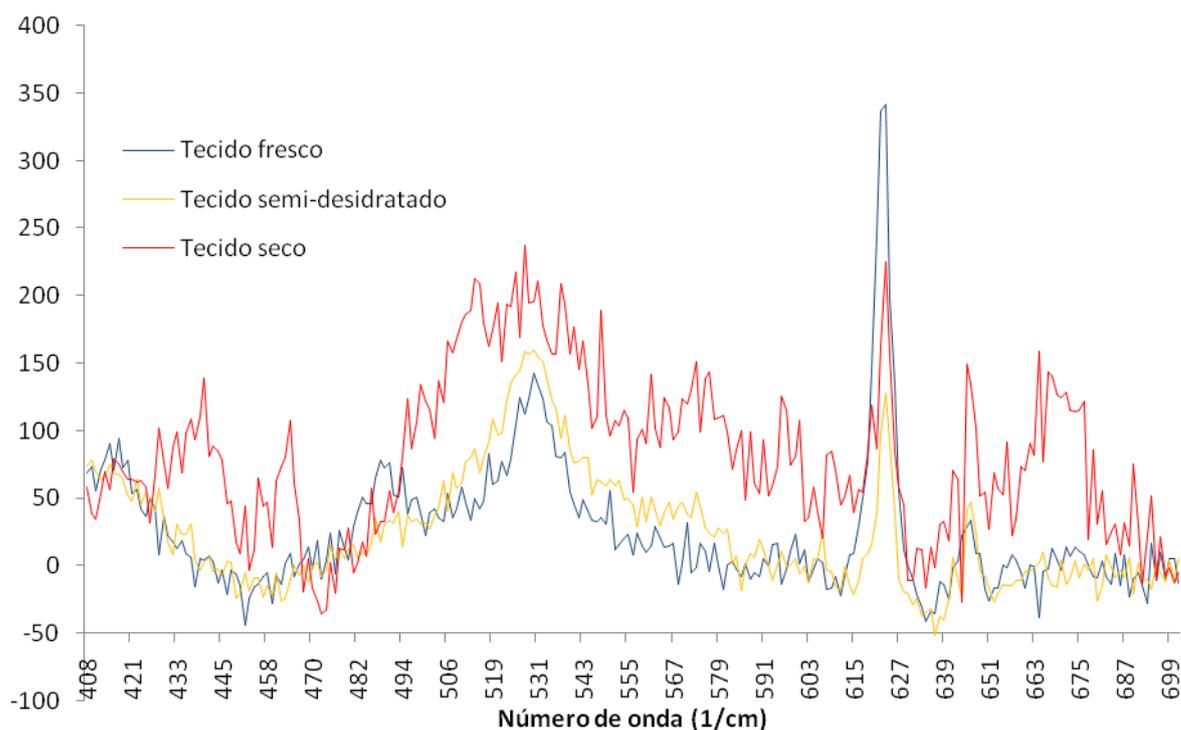
1. Na Figura 5-12 percebe-se uma aumento da intensidade do sinal na banda entre  $420$  e  $470\text{ cm}^{-1}$  e também na banda entre  $500$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ . Ligações S-S normalmente aparecem na faixa entre  $430$  e  $550\text{ cm}^{-1}$ , o que leva a crer que um grande número destas ligações surgiram na região do tecido seco. A detecção destas ligações através da espectroscopia Raman é muito forte. Esta ligação que surge coincide com o estudo de SCHERR *et al.* (1998), que acredita que as ligações disulfito eletrostáticas e covalentes, que surgem com a desnaturação induzida pelo calor, aumentam a resistência final na solda. Ele cita ainda que a presença de ligações dissulfito em tecidos soldados termicamente foi demonstrada por vários investigadores.
2. Na banda entre  $640$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  também pode-se notar um aumento na intensidade do sinal para o tecido seco (Figura 5-12). A região entre  $630$  e  $790\text{ cm}^{-1}$  normalmente corresponde, na espectroscopia Raman, a ligações C-S alifáticas. (Horiba Jobin Yvon)
3. Na banda entre  $1000$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  nota-se uma redução da intensidade do sinal no tecido seco quando comparado ao tecido fresco. Porém, entre  $1040$  e  $1145\text{ cm}^{-1}$  é nítido o aumento do sinal no tecido seco em comparação com o tecido fresco (Figura 5-13). A espectroscopia Raman detecta fortemente para as ligações C=S, que normalmente ocorrem na banda entre  $1000$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$ , e para ligações C-S aromáticas, que ocorrem numa banda mais estreita, entre

1080-1100  $\text{cm}^{-1}$ . (Horiba Jobin Yvon) Isso leva a crer que a desidratação leva a uma mudança nas ligações existentes no tecido, principalmente nas ligações envolvendo o enxofre.

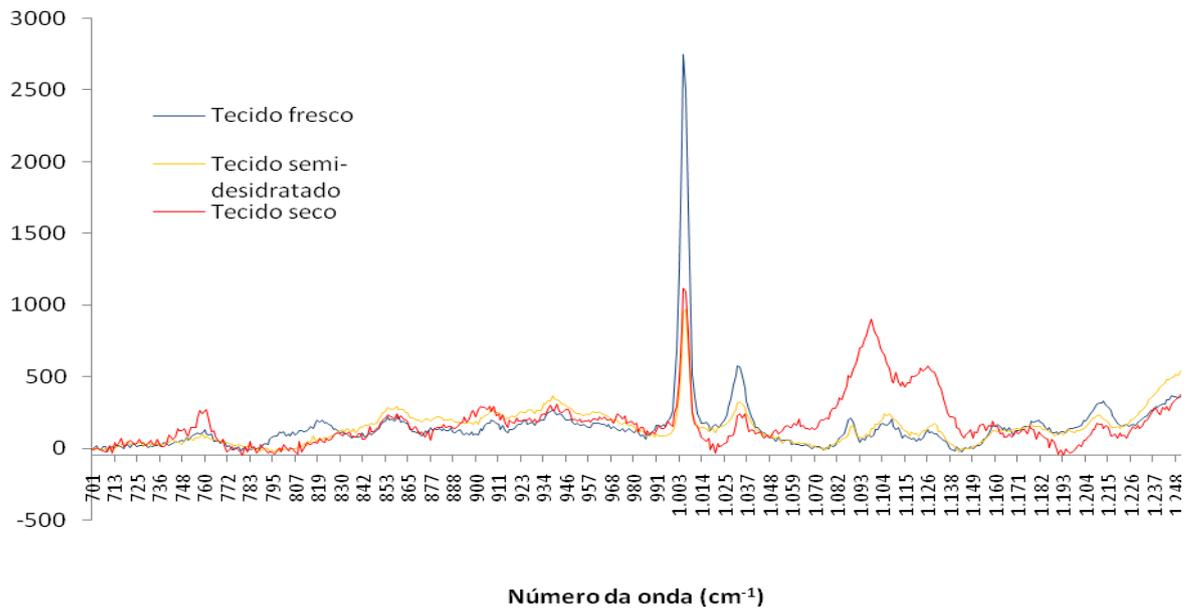
4. Mudanças são observadas na banda de 1660  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem à Amida I (BADII e HOWELL, 2003). A alteração na densidade do sinal denota alterações na conformação das proteínas e na estrutura secundária. Porém não foram observadas alterações significativas em 940, 990 e 1239  $\text{cm}^{-1}$ , o que reflete alterações na hélice, na cadeia e na espira, respectivamente (BADII e HOWELL, 2003).
5. Na banda em 1443  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 5-13), associada aos grupos metil e metileno, e cujo aumento na intensidade denota a desnaturação da proteína (DONG *et al.*, 2003), nota-se um aumento da intensidade no tecido seco, o que denota que houve uma desnaturação do tecido na região da solda.
6. A próxima banda que mostra uma nítida alteração no tecido seco, em comparação às amostras semi-desidratada e fresca, é na banda aproximadamente entre 1500 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 5-14), onde a intensidade do sinal é bem maior para o tecido seco. A detecção nesta banda pelo Raman é de intensidade média para ligações como N=N alifáticas (normalmente na banda 1550 a 1580  $\text{cm}^{-1}$ ) e C-NO<sub>2</sub> assimétricas (normalmente na banda entre 1530 a 1590  $\text{cm}^{-1}$ ) (Horiba Jobin Yvon).
7. Na banda entre 3000 e 3800  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 5-15) nota-se nitidamente que a intensidade do sinal decresce do tecido fresco para o semi-desidratado e deste para o seco. Esta banda está associada à presença de moléculas de água na amostra (LEIKIN *et al.*, 1997), portanto a redução na intensidade acontece conforme esperado.
8. Na banda entre 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 5-15) temos as ligações C-H (Horiba Jobin Yvon). A variação das intensidades de uma amostra para a outra não é tão nítida assim, mas nota-se uma ligeira alteração no formato do pico nesta banda. No tecido fresco, o pico apresenta dois “degraus” bem definidos, um de cada lado do pico. À medida que caminhamos no sentido do tecido mais seco,

observamos que estes “degraus” perdem um pouco de sua definição. Uma hipótese é que a quantidade de ligações C-H não varia muito, mas que pode ocorrer variações nos formatos das moléculas de hidrocarbonetos.

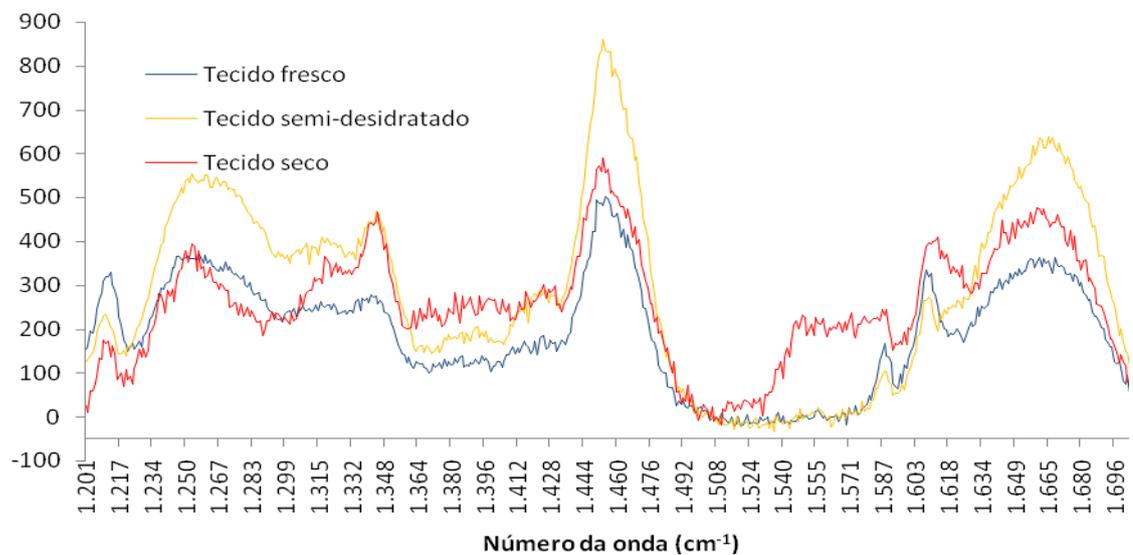
O que pode-se inferir dos dados acima é que algumas alterações químicas ocorrem durante o aquecimento do tecido, e não somente uma simples fusão por entrelaçamento das fibras de colágeno, desnaturadas por ação do calor. Uma pista importante encontrada nesta análise foram as ligações disulfito e as ligações C-S e C=S, que surgiram com maior intensidade no tecido seco. Estas ligações, em que o enxofre o elemento principal, e que já foram citadas em pesquisas anteriores, pode ser um dos principais contribuintes para a promoção da união dos tecidos.



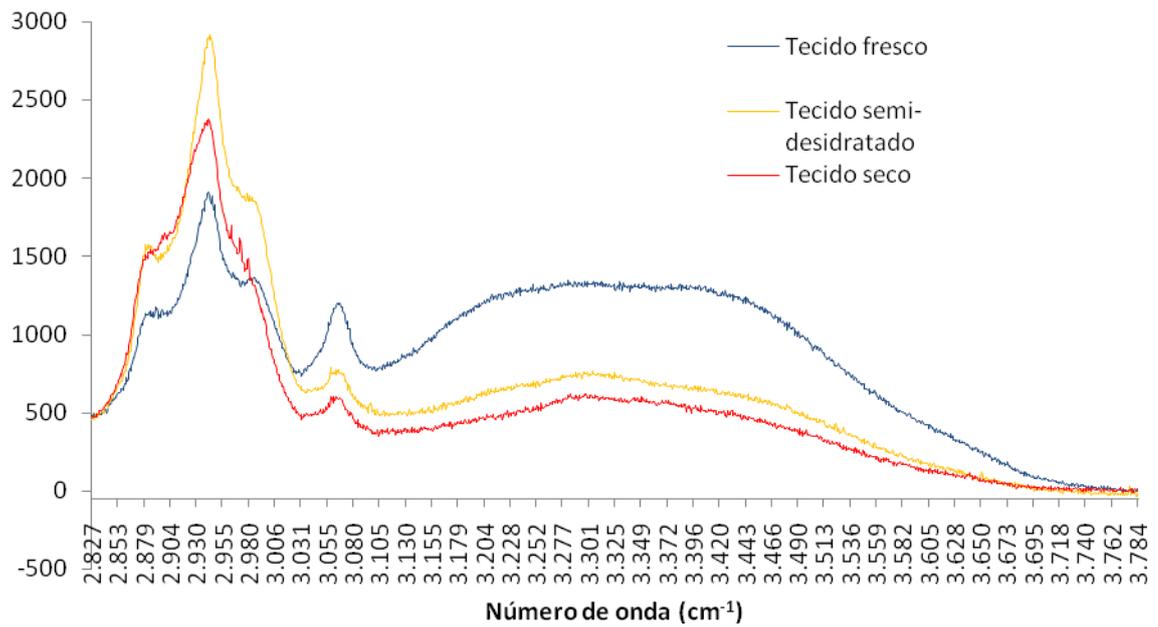
**Figura 5-12 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 400 a 700  $\text{cm}^{-1}$ .**



**Figura 5-13 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 700 a 1250  $\text{cm}^{-1}$ .**



**Figura 5-14 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 1200 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ .**



**Figura 5-15 - Espectro das amostra de tecido fresco, semi-desidratado e seco. Banda de 2800 a 3800  $\text{cm}^{-1}$ .**

## 6 CONCLUSÕES

Uma variabilidade nos resultados para cada um dos experimentos – como foi o caso das amostras preparadas a 40 °C e 35% de umidade, em que os valores variavam de 0,07 MPa até 2,1 MPa – leva a crer que há vários fatores com grande peso nos resultados finais. Os principais fatores observados podem ser resumidos como:

- Grau de desidratação na região da solda: Quanto maior a desidratação, melhores são os resultados obtidos. Porém esta grande diferença nos resultados é reduzida substancialmente após fixação química e re-hidratação.
- Qualidade da aposição das bordas a serem soldadas: Observou-se que uma boa aposição das bordas contribui significativamente para o sucesso da solda.
- Controle da umidade: Os testes em estufas diferentes mostraram que o controle da umidade é importante para se obter boas soldas.
- Controle da temperatura: Há uma faixa de temperatura ideal para realizar as soldas, que deve ser um pouco acima da temperatura ambiente, em torno de 40 °C, e não acima de 50 °C, onde o tecido encolhe muito e a solda não pode ser obtida.

As melhores soldas foram obtidas a 40 °C, com a umidade controlada entre 30 e 40%.

Quanto ao fator tempo de exposição dentro da estufa, um aumento do tempo aumentou significativamente as médias de resistência mecânica. Mas esta diferença desaparece depois da fixação química.

Outra observação significativa nos ensaios de tração é a importância da fixação química do tecido soldado. Os experimentos demonstraram que a solda desfaz-se quando a amostra é submetida a re-hidratação após o processo na estufa. Mas a solda não desfaz-se quando o tecido soldado é submetido a uma fixação química,

antes da re-hidratação. Em suma, pode-se dizer que a solda ocorrida na estufa cria condições para que a fixação química ocorra nas fibras na região de interface entre as duas partes, ligações estas estáveis e resistentes a re-hidratação – esta afirmação é reforçada pelos testes preliminares que demonstraram que a simples fixação química não é capaz de, sozinha, restabelecer a união entre duas partes. Bons resultados foram obtidos com a fixação química em glutaraldeído a 2,50% por 15 dias.

Quando comparado com a sutura, a média da resistência mecânica da amostra soldada é a metade da obtida com a sutura, mas a avaliação de alguns valores isolados mostraram que há o potencial de se obter soldas com resistência comparável à sutura. Além disso, vale lembrar que a sutura apresenta a desvantagem da concentração de tensão na região onde a sutura atravessa o tecido.

Quando comparada ao tecido íntegro, é interessante notar que a resistência mecânica é praticamente a mesma do tecido quando ambos estão altamente desidratados. Mas após a fixação química – que também re-hidrata – o tecido íntegro mostra-se 7 vezes mais resistente que o tecido soldado – diferença similar ao observado em outros trabalhos, como o de FENNER (1994).

Quanto ao entendimento do mecanismo envolvido na soldagem do tecido, algumas pistas foram obtidas durante os experimentos. Algumas observações oriundas dos experimentos levam a crer que a soldagem ocorre pela ocorrência de ligações químicas entre as fibras colágenas na interface das duas partes unidas, e não pela simples fusão do tecido e união pelo entrelaçamento destas fibras – mesmo porque as soldas também foram realizadas em temperaturas abaixo da temperatura de fusão do tecido. Isso fica demonstrado pelas imagens obtidas no MEV, em que se vê fibras interligando as duas faces das bordas unidas, e o aspecto plano das bordas, diferente do que se esperaria ver caso houvesse uma fusão do material naquela região.

A espectroscopia Raman também trouxe algumas informações sobre ligações que surgiram como efeito do calor sobre o tecido.

Os indícios de que a ligação ocorra pela existência de ligações químicas entre as fibras de colágeno, e o fato de que a solda se desfaz quando a amostra é re-hidratada logo após o processo de soldagem, sugere que a hipótese levantada no trabalho de

FENNER (1994) é a que melhor explica o mecanismo envolvido na soldagem. Ou seja, a exposição ao calor desidrata o tecido e as moléculas de água retiradas liberam sítios de ligações nas moléculas de colágeno. Os sítios de ligações livres das fibras das duas bordas opostas encontram-se formando uma ligação química. Esta ligação é então reforçada através da fixação química com o glutaraldeído.

## **7 RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS**

Os resultados dos experimentos com a parede aórtica soldada na estufa com controle de temperatura e umidade mostraram que a solda do tecido é possível, e que valores de resistência mecânica razoáveis podem ser alcançados com o desenvolvimento da técnica.

Mais do que obter uma solda com elevada resistência, demonstrou-se que esta pode ser alcançada sem a utilização de elementos exógenos (colas, albuminas, cromóforos) para auxiliar a adesão, ou seja, apenas calor foi o suficiente para criar a união das duas partes.

Quando comparados a valores obtidos em outras pesquisas similares, vê-se que os valores médios de resistência mecânica aqui obtidos são bem promissores, sendo muitas vezes superiores aos obtidos em grande maioria dos trabalhos de estudiosos referenciados neste trabalho.

Demonstrou-se que a fixação química com glutaraldeído tem profunda importância na estabilidade da solda, quando se contempla a re-hidratação do tecido e o seu contato com diversas soluções de processo e fluidos fisiológicos.

O aspecto visual da solda também foi um ponto positivo, mostrando que a região pode apresentar um bom acabamento, o que é interessante para aplicações como a fabricação de biopróteses de válvulas cardíacas.

Portanto, a soldagem térmica do tecido do segmento aórtico é possível, com grande possibilidade de se obterem resultados ainda melhores. Salvo a longo prazo (efeitos da fadiga), que não foi avaliado. Há um potencial para estudar aplicações do método na fabricação de biopróteses de válvulas cardíacas.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como discutido anteriormente, o sucesso da solda é afetado por variações nos parâmetros controle de temperatura e umidade, qualidade da aposição das bordas a serem soldadas, tempo de exposição à temperatura e à fixação química com glutaraldeído, concentração do agente de fixação química, efeito da re-hidratação e grau de desidratação.

A grande variabilidade nos resultados de resistência mecânica mostra um potencial para se obter médias ainda melhores do que as apresentadas aqui, portanto, fica a sugestão de, em trabalhos futuros, investigar outras variações nestes parâmetros. Por exemplo:

- Desenvolver dispositivos que mantenham uma melhor aposição das bordas a serem soldadas. Investigar também os fatores que definem uma boa aposição das bordas durante todo o processo de solda e como lidar com o encolhimento do tecido durante o aquecimento.
- Investigar outras combinações de tempo de exposição ao calor, temperatura, umidade e tempo de exposição ao glutaraldeído.
- Efeito de concentrações maiores de glutaraldeído para a fixação química.
- Investigar os efeitos de uma exposição mais prolongada a re-hidratação e também o efeito que outros fluidos podem ter sobre a solda, como, por exemplo, o sangue ou uma solução similar.
- Avaliar a solda em um teste de envelhecimento acelerado ou de fadiga, para investigar a resistência a longo prazo.

E uma vez que se demonstrou ser possível obter solda no tecido por efeito térmico, fica também a sugestão de desenvolver um trabalho sobre a solda a laser do tecido. Segundo acreditam vários pesquisadores, o tecido absorve a energia luminosa do feixe de laser e a transforma em energia térmica, que tem um efeito semelhante ao obtido neste trabalho. Sugere-se, neste caso, iniciar estudos com a seguinte

combinação: Laser de diodo e região da solda com o cromóforo indocianina verde, que é a combinação mais freqüente encontrada nos trabalhos na área.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Badii, F., Howell, N.K. Elucidation of the Effect of Formaldehyde and Lipids on Frozen Stored Cod Collagen by FT-Raman Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 51, p1440-1446, 2003.
2. Barriera, D., Reddy, P.P., McLoire, G.A., Bagli, D., Khoury, A.E., Farhat, W., Lilge, L., Merguerian, P.A. Lessons Learned from Laser Tissue Soldering and Fibrin Glue Pyeloplasty in an in Vivo Porcine Model. *The Journal of Urology*, Toronto, 164, p1106-1110, Setembro 2000.
3. Chivers, R.A. In Vitro Tissue Welding Using Albumin Solder: Bond Strengths and Bonding Temperatures. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, Heslington, 20, p179-187, 2000.
4. Constantinescu, M.A., Alfieri, A., Mihalache, G., Stuker, F., Ducray, A., Seiler, R.W., Frenz, M., Reinert, M. Effect of laser soldering irradiation on covalent bonds of pure collagen. *Lasers Med Sci*, Berna, 22, p41913, Setembro 2007.
5. Dong, R., Yan, X., Pang, X., Liu, S. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomelecular Spectroscopy*, Shandong, 60, 3, p557-561, Fevereiro 2004.
6. Fenner, J., Moseley, H., Martin, W., Wheatley, D.J. Strength of Tissue Bonds as a Function of Surface Apposition. *Lasers Med Sci*, Glasgow, 7, p375-379, 1992.
7. Fenner, J.W., Martin, W., Moseley, H., Wheatley, D.J. Dehydration: A Model for (Low-Temperature) Argon Laser Tissue Bonding. *Phys. Med. Biol.*, Glasgow, 39, p2147-2160, Agosto 1994.

8. Gulson, M., Derelli, Z., Tabakoglu, H.O., Bozkulak, O. Closure of Skin Incisions by 980-nm Diode Laser Welding. *Lasers Med Sci*, Estambul, 21, p5-10, 2006.
9. HORIBA JOBIN YVON, *Raman Application Note: Raman Bands. Raman Data and Analysis*.
10. Jayakar, D., Gozo, F., Gomez, E., Carlos, C. Use of tissue welding technology to obliterate left atrial appendage - novel use of LigaSure. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, Chicago, 4, p372-373, 2005.
11. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999. 427pp.
12. Karatzias, G.T., Lachanas, V.A., Papouliakos, S.M., Sandris, V.G. Tonsillectomy Using the Thermal Welding System. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties*, Larissa, 67, p225-229, 2005.
13. Kopchok, G., Grundfest, W.S., White, R.A., Fujitani, R.M., Litvack, F., Klein, S.R., White, G.H. Thermal Studies of In-Vivo Vascular Tissue Fusion by Argon Laser. *J. Invest. Surg.*, 1, p5-12, 1988.
14. Kuklin, A. Method and System for Laser Tissue Welding. , , 2001.
15. La Joie, E.N., Barofsky, A.D., Gregory, K.W., Prael, S.A. Patch Welding with a Pulsed Diode Laser and Indocyanine Green. *Lasers Med Sci*, Portland, 12, p49-54, Novembro 1996.
16. Leikin, S., Parsegian, V.A., Yang, W.-H., Walrafen, G.E. Raman Spectral Evidence for Hydration Forces Between Collagen Triple Helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Tallahassee, 94, p11312-11317, Outubro, 1997.
17. Lemoore, G.M., Anderson, R.R., DeCoste, S. Preliminary Evaluation of Collagen as a Component in the Thermally Induced 'Weld'. *Proc. SPIE*, Los Angeles, 1422, 116, p116, 1991.

18. McNally, K.M., Sorg, B.S., Welch, A.J., Dawes, J.M., Owen, E.R. Photothermal effects of laser tissue soldering. *Phys. Med. Biol.*, Austrália, 44, p983-1002, 1999.
19. Menovsky, T., Beek, J.F., Thomsen, S.L. Laser (-assisted) nerve repair. A review.. *Neurosurg. Rev.*, Houston, 18, p225-235, 1995.
20. Nimni, M.E. The Cross-Linking and Structure Modification of the Collagen Matrix in the Design of Cardiovascular Prosthesis. *Journal of Cardiac Surgery*, Los Angeles, 3, p523-533, Dezembro 1988.
21. Oréfice, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S. *Biomateriais. Fundamentos & Aplicações*. 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 pp.
22. Ott, B., Züger, B.J., Erni, D., Banic, A., Schaffner, T., Weber, H.P., Frenz, M. Comparative In Vitro Study of Tissue Welding Using a 808 nm Diode Laser and a Ho:YAG Laser. *Lasers Med Sci*, Berna, 16, p260-266, 2001.
23. Prael, A.S., Pearson, S.D. Rate Process Models for Thermal Welding. *SPIE*, Portland, 2975, p245-252, 1997.
24. Reiser, K.M., Small, W., Maitland, D.J., Heredia, N.J., da Silva, L.B., Matthews, D.L., Last, J.A. Laser Welding and Collagen Crosslinks. *Lawrence Livermore National Laboratory*, San Jose, Fevereiro 1997.
25. Sawyer, P.H. Collagen Welding Rod Material for Use in Tissue Welding. *United States Patent*, Brooklyn, Outubro 1992.
26. Scherr, D.S., Poppas, D.P. Laser Tissue Welding. *Urologic Clinics of North America*, Nova Iorque, 25, 1, p123-135, Fevereiro 1998.
27. Schober, R., Ulrich, R., Sander, T., Dürselen, H., Hessel, S. Laser-Induced Alteration of Collagen Structure Allows Microsurgical Tissue Welding. *Science*, , 232, 4756, p1421-1422, Junho 1986.

28. Shober, R., Ulrich, F., Sander, T., Durselen, H., Hessel, S., Laser-Induced Alteration of Collagen Substructure Allows Microsurgical Tissue Welding. *Science*, 232, p1421-1422, 1986.
29. Small, W., Celliers, P.M., Kopchok, G.E., Reiser, K.M., Heredia, N.J., Maitland, D.J., Eder, D.C., London, R.A., Heilbron, M., Hussain, F., White, R.A., Da Silva, L.B., Matthews, D.L. Temperature Feedback and Collagen Cross-Linking in Argon Laser Vascular Welding. *Lasers Med Sci*, Davis, 13, p98-105, 1998.
30. Talmor, M., Bleustein, C.B., Poppas, D.P. Laser Tissue Welding. A Biotechnological Advance for the Future.. *Arch Facial Plast. Surg.*, Nova Iorque, 3, p207-213, 2001.
31. THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, Lexington, Mass., R. Rox Anderson. *Method and Apparatus for Joining Collange-Containing Materials*. US 005925078A, 4 nov. 1996, 20 jul. 1999.
32. White, R.A., Kopchok, G.E., Donayre, C.E., Peng, S.K., Fujitani, R.M., White, G.H., Uitto, J. Mechanism of Tissue Fusion in Argon Laser-Welded Vein-Artery Anastomoses. *Lasers Surg. Med.*, 8, p83-89, 1988

## 10 APÊNDICES

### 10.1 Apêndice A: Análises de Variância dos dados de Tensão Média de Resistência.

#### 10.1.1 Análise de Variância para os dados da Tabela 5-1 - Resistência mecânica x Umidade Relativa

##### One-way ANOVA: 40-30; 40-35

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,194	0,194	0,54	0,473
Error	18	6,494	0,361		
Total	19	6,688			

S = 0,6006    R-Sq = 2,90%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
40-30	6	0,8550	0,4847	+-----+-----+-----+-----+ (-----*-----)
40-35	14	0,6400	0,6397	(-----*-----) +-----+-----+-----+-----+

0,30            0,60            0,90            1,20

Pooled StDev = 0,6006

##### One-way ANOVA: 40-35; 40-40

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,027	0,027	0,08	0,780
Error	28	9,408	0,336		
Total	29	9,435			

S = 0,5797    R-Sq = 0,28%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
40-35	14	0,6400	0,6397	-----+-----+-----+-----+ (-----*-----)
40-40	16	0,5801	0,5221	(-----*-----) -----+-----+-----+-----+

0,40            0,60            0,80            1,00

Pooled StDev = 0,5797



**One-way ANOVA: 40-35; 50-35**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,203	0,203	0,54	0,474
Error	16	6,050	0,378		
Total	17	6,253			

S = 0,6149    R-Sq = 3,25%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
40-35	14	0,6400	0,6397	(-----*-----)
50-35	4	0,8955	0,4934	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
 0,35            0,70            1,05            1,40

Pooled StDev = 0,6149

**One-way ANOVA: 30-35; 50-35**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	1,010	1,010	8,19	0,029
Error	6	0,739	0,123		
Total	7	1,749			

S = 0,3510    R-Sq = 57,73%    R-Sq(adj) = 50,68%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
30-35	4	0,1850	0,0545	(-----*-----)
50-35	4	0,8955	0,4934	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
 0,00            0,40            0,80            1,20

Pooled StDev = 0,3510

### 10.1.3 Análise de Variância para os dados da Tabela 5-3 - Resistência mecânica: Tecido não-fixado x tecido fixado

#### One-way ANOVA: 30-35; 30-35 G065-24

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,00005	0,00005	0,02	0,905
Error	6	0,01930	0,00322		
Total	7	0,01935			

S = 0,05672    R-Sq = 0,26%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
30-35	4	0,18500	0,05447	(-----*-----)
30-35 G065-24	4	0,19000	0,05888	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----  
0,120      0,160      0,200      0,240

Pooled StDev = 0,05672

#### One-way ANOVA: 40-35; 40-35 G065-24

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,404	0,404	1,43	0,247
Error	19	5,372	0,283		
Total	20	5,776			

S = 0,5317    R-Sq = 7,00%    R-Sq(adj) = 2,10%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
40-35	14	0,6400	0,6397	(-----*-----)
40-35 G065-24	7	0,3457	0,0940	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----  
0,00      0,30      0,60      0,90

Pooled StDev = 0,5317

**One-way ANOVA: 40-40; 40-40 G065-24**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,054	0,054	0,24	0,633
Error	18	4,130	0,229		
Total	19	4,184			

S = 0,4790    R-Sq = 1,30%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
40-40	16	0,5801	0,5221	-----+-----+----- (-----*-----)
40-40 G065-24	4	0,4500	0,1163	(-----*-----) -----+-----+-----+----- 0,00      0,30      0,60      0,90

Pooled StDev = 0,4790

**10.1.4 Análise de variância para os dados da Tabela 5-4 - Efeito da concentração do glutaraldeído na resistência mecânica****One-way ANOVA: Não; G0,65**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,404	0,404	1,43	0,247
Error	19	5,372	0,283		
Total	20	5,776			

S = 0,5317    R-Sq = 7,00%    R-Sq(adj) = 2,10%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Não	14	0,6400	0,6397	-----+-----+----- (-----*-----)
G0,65	7	0,3457	0,0940	(-----*-----) -----+-----+-----+----- 0,00      0,30      0,60      0,90

Pooled StDev = 0,5317

**One-way ANOVA: Não; G1,0**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,262	0,262	0,79	0,389
Error	16	5,333	0,333		
Total	17	5,594			

S = 0,5773    R-Sq = 4,68%    R-Sq(adj) = 0,00%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
Não	14	0,6400	0,6397
G1,0	4	0,3500	0,0668

0,00      0,35      0,70      1,05

Pooled StDev = 0,5773

**One-way ANOVA: Não; G2,5**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,000	0,000	0,00	0,994
Error	16	5,422	0,339		
Total	17	5,422			

S = 0,5821    R-Sq = 0,00%    R-Sq(adj) = 0,00%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
Não	14	0,6400	0,6397
G2,5	4	0,6425	0,1852

0,35      0,70      1,05      1,40

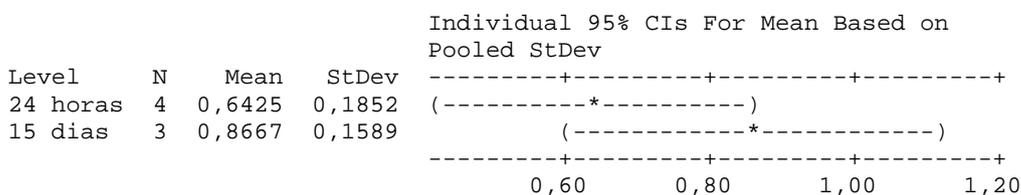
Pooled StDev = 0,5821

### 10.1.5 Análise de Variância dos dados da Tabela 5-7 - Efeito do tempo de fixação química na resistência mecânica

#### One-way ANOVA: 24 horas; 15 dias

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,0861	0,0861	2,81	0,155
Error	5	0,1533	0,0307		
Total	6	0,2395			

S = 0,1751    R-Sq = 35,97%    R-Sq(adj) = 23,16%

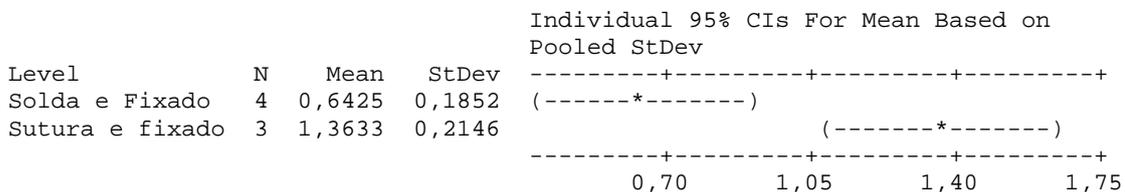


### 10.1.6 Análise de Variância dos dados da Tabela 5-8 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido suturado

#### One-way ANOVA: Solda e Fixado; Sutura e fixado

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,8907	0,8907	22,85	0,005
Error	5	0,1949	0,0390		
Total	6	1,0857			

S = 0,1975    R-Sq = 82,04%    R-Sq(adj) = 78,45%



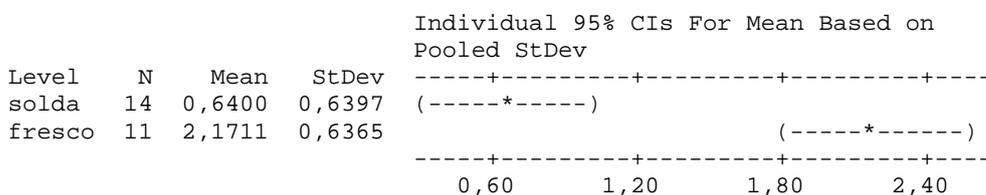
Pooled StDev = 0,1975

### 10.1.7 Análise de Variância dos dados da Tabela 5-9 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro

#### One-way ANOVA: solda; fresco

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	14,440	14,440	35,44	0,000
Error	23	9,371	0,407		
Total	24	23,811			

S = 0,6383    R-Sq = 60,65%    R-Sq(adj) = 58,93%

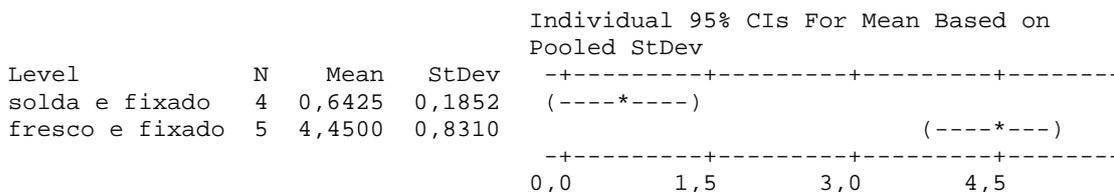


Pooled StDev = 0,6383

#### One-way ANOVA: solda e fixado; fresco e fixado

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	32,216	32,216	78,72	0,000
Error	7	2,865	0,409		
Total	8	35,081			

S = 0,6397    R-Sq = 91,83%    R-Sq(adj) = 90,67%



Pooled StDev = 0,6397

**One-way ANOVA: fresco e fixado; íntegro na estufa e fixado**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	5,461	5,461	10,85	0,017
Error	6	3,020	0,503		
Total	7	8,481			

S = 0,7095    R-Sq = 64,39%    R-Sq(adj) = 58,46%

Level	N	Mean	StDev
fresco e fixado	5	4,4500	0,8310
íntegro na estufa e fixad	3	2,7433	0,3592

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	Lower CI	Upper CI
fresco e fixado	3,6189	5,2811
íntegro na estufa e fixad	2,3846	3,1020

2,0                      3,0                      4,0                      5,0

Pooled StDev = 0,7095

**One-way ANOVA: solda e fixado; íntegro na estufa e fixado**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	7,5660	7,5660	104,81	0,000
Error	5	0,3609	0,0722		
Total	6	7,9269			

S = 0,2687    R-Sq = 95,45%    R-Sq(adj) = 94,54%

Level	N	Mean	StDev
solda e fixado	4	0,6425	0,1852
íntegro na estufa e fixad	3	2,7433	0,3592

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	Lower CI	Upper CI
solda e fixado	0,4573	0,8277
íntegro na estufa e fixad	2,3846	3,1020

0,80                      1,60                      2,40                      3,20

Pooled StDev = 0,2687

**10.1.8 Análise de Variância dos dados da Tabela 5-10 - Resistência mecânica: Tecido soldado x tecido íntegro após alta desidratação**  
**One-way ANOVA: Soldado; Íntegro**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,01	0,01	0,00	0,970
Error	3	10,06	3,35		
Total	4	10,06			

S = 1,831    R-Sq = 0,06%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Soldado	2	10,745	2,114	(-----*-----)
Íntegro	3	10,677	1,671	(-----*-----)

7,5      10,0      12,5      15,0

Pooled StDev = 1,831