UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos - IQSC
Escola de Engenharia de São Carlos - EESC
Instituto de Física de São Carlos - IFSC

Título

**“CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO
PERICÁRDIO BOVINO RETICULADO COM ACETAIS
DO GLUTARALDEÍDO PARA MANUFATURA DE
BIOPRÓTESES VALVULARES CARDÍACAS”**

Sergio Akinobu Yoshioka

USP / IQSC / SBI

8-2-001193

Tese apresentada à área de
Interunidades de Ciência e Engenharia
de Materiais, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciência e Engenharia de Materiais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Goissis

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
IQSC/USP

São Carlos

2000

DEDALUS - Acervo - IQSC

30800010402

Yoshioka, Sergio Akinobu

Caracterização *in vitro* e *in vivo* do pericárdio bovino reticulado com acetais do glutaraldeído para manufatura de biopróteses valvulares cardíacas. / Sergio Akinobu Yoshioka. – São Carlos, IQSC, 2000. 104p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2000.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis

1.Reticulação. 2.Acetais de glutaraldeído. 3.Biopróteses valvulares cardíacas. I.Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ciência e Engenharia de Materiais

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
SERGIO AKINOBU YOSHIOKA, APRESENTADA A ÁREA
INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA EESC-
IFSC-IQSC, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 02/06/2000.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. **GILBERTO GOISSIS** -Orientador (IQSC/USP)

Prof. Dr. **HIDETAKE IMASATO** (IQSC/USP)

Prof. Dr. **DOMINGO MARCOLINO BRAILE** (UNICAMP)

Prof. Dr. **MARCOS ANTONIO ROSSI** (FMRP/USP)

Prof. Dr. **MARCOS PINOTTI BARBOSA** (UFMG)

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Pai e minha Mãe (*in memorian*), pelo apoio moral e perseverança, e principalmente pelo carinho e afeto que me deram.

- Ao Prof. Dr. Gilberto Goissis, pela grande dedicação e compreensão, e principalmente pela paciência e conhecimentos profissionais transmitidos.

- À Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelas análises térmicas e preciosa contribuição na discussão deste trabalho e pela sua amizade.

- À Profa. Sueli Suzigan pelas análises histopatológicas.

- Ao Prof. Dr. Marcos Rossi pelos implantes subcutâneos em ratos.

- Aos técnicos Ézer Biazin, Glaucio D. Broch e Dra. Virgínia C. A. Martins, pelo apoio técnico, companheirismo e amizade no meu dia a dia neste laboratório.

- Às secretárias Eliana e Karina, sempre dispostas e prestativas nos trabalhos datilográficos e principalmente pela sua alegria.

- Aos técnicos Mauro Fernandes e Ana Pucci, pelos espectros no U.V. obtidos.

- Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biomateriais presentes: Antonio Carlos, Cláudia A. Alves, Edvan Tonhi, Fátima A. Giglioti, Maria Helena de Sousa, Marcos Bet, Silvia Machado, Zhara Fazal Chaudry, Washington Levez e a todos que estão começando ou que por ali passaram, pelo apoio e amizade tornando o ambiente de trabalho tranquilo e agradável.

- Ao pessoal da Braile Biomédica - Comércio e Indústria e Representações S.A. que de uma forma ou outra ajudaram nos trabalhos experimentais.

- Aos meus amigos de graduação e pós-graduação pela amizade e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

- Ao CNPq/PADCT pelos auxílios financeiros concedidos através dos projetos: "Programa de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomateriais de Colágeno e Poliuretanas", processo nº 62.0228/91-1 e "Biomateriais de Colágeno em Associação com Polímeros Sintéticos e Sais de Fosfato de Cálcio para Usos na Medicina e Odontologia", processo nº 620001/96.8/SNM.

- À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido através do projeto: "Programa de desenvolvimento e construção de válvulas cardíacas de pericárdio bovino e mecânicas", processo nº 1996/2455-8.

- Ao RHAE/CNPq pelo auxílio financeiro concedido através do projeto: "Desenvolvimento de Válvulas Cardíacas Biológicas e Mecânicas", processo nº 62.0228/91-1.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>v</i>
<i>LISTA DE QUADRO E TABELAS</i>	<i>x</i>
<i>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</i>	<i>xii</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
<i>ABSTRACTS</i>	<i>xv</i>
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. História da arte das próteses de válvulas cardíacas	2
1.2. Calcificação	7
1.2.1. Colágeno	9
1.2.2. Glutaraldeído	12
1) natureza complexa das soluções de glutaraldeído.....	13
2) impermeabilização superficial das matrizes colagênicas	15
3) efeitos citotóxicos das biopróteses valvulares cardíacas reticuladas com glutaraldeído	17
1.2.2.1. Tipos de reticulações com glutaraldeído existentes no tecido	17
1.3. Procedimentos para redução da calcificação das biopróteses valvulares cardíacas.....	19

1) Pré-tratamento dos tecidos biológicos	19
a) com surfactantes ou detergentes.....	19
b) utilização de cátions metálicos trivalentes (Al^{+3} , Fe^{+3} e Ga^{+3}).....	19
c) retirada dos fosfolípidos e organelas celulares.....	19
2) Variações do tratamento dos tecidos biológicos com glutaraldeído	20
a) reticulação dinâmica do tecido com glutaraldeído	20
b) reticulação com concentração progressiva do glutaraldeído	20
c) formação de superfície carregada negativamente	20
1.3.1. Outros agentes reticulantes	21
a) Epóxidos	22
b) Acil azida	22
c) Diisocianatos.....	23
d) Carbodiimidas.....	24
II. OBJETIVOS	25
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1. Reagentes, solventes e materiais utilizados	27
3.2. Preparação e caracterização do acetal de glutaraldeído em etanol.....	27
a) Formação de acetais do glutaraldeído em etanol	27
b) Estudo de reticulação do pericárdio bovino com acetais de glutaraldeído.....	28
3.4. Manufatura da bioprótese valvular cardíaca com o pericárdio reticulado	29
3.5. Caracterização do pericárdio bovino	30
3.5.1. Estabilidade térmica.....	30
a) Temperatura de encolhimento.....	30
b) Calorimetria exploratória diferencial	30

3.5.2. Estabilidade a collagenase.....	31
3.5.2.1. Determinação de conteúdo de colágeno via hidroxiprolina	32
3.5.3. Embebição do pericárdio bovino em solução de etanol	33
3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura	34
3.5.5. Ensaio mecânico	34
3.6. Caracterização da biofuncionalidade.....	35
3.6.2. Teste de fadiga ou durabilidade acelerada	35
3.6.3. Caracterização histopatológica.....	37
3.6.4. Performance hidrodinâmica da bioprótese valvular cardíaca	37
3.6.5. Estudo de calcificação <i>in vivo</i>	39
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1. Formação de acetais do glutaraldeído em etanol acidificado.....	41
4.2. Estabilidade térmica e embebição do pericárdio bovino em etanol	55
4.3. Reticulação do pericárdio bovino com acetais do glutaraldeído	56
4.4. Caracterização do pericárdio bovino	65
4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura	65
4.4.2. Estabilidade a collagenase	66
4.4.4. Ensaio mecânico.....	68
4.5. Caracterização da biofuncionalidade.....	69
4.5.1. Teste de durabilidade acelerada ou fadiga das biopróteses valvulares cardíacas	69
4.5.2. Caracterização histopatológico	70
4.5.3. Performance hidrodinâmica das biopróteses valvulares cardíacas	76
4.5.4. Estudo de calcificação <i>in vivo</i>	81

V. CONCLUSÕES	86
VI. TRABALHOS FUTUROS.....	88
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
IX. GLOSSÁRIO	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema do sistema arterial e venoso (a) e o sentido do fluxo sanguíneo no coração (b) 1
- Figura 2:** Esquemas das válvulas mecânicas de: bola e gaiola (a), disco basculante (b) e duplo folheto (c)..... 3
- Figura 3:** Biopróteses valvulares cardíacas manufaturadas com pericárdio bovino (a) e valvas aórticas porcinas com suporte (b), sem suporte (c) e tratados com glutaraldeído 4
- Figura 4:** Índices atuariais e linearizados de falhas primárias para jovens e adultos em 11 anos da bioprótese valvular cardíaca PB IMC obtido por Braile *et alli* ... 6
- Figura 5:** Bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino com vista superior com as regiões: zona central (a), parede aórtica (b), base dos folhetos (c), comissuras (d) e margem livre (e)..... 9
- Figura 6:** Estrutura do tropocolágeno: estrutura primária na forma de triplete repetitivo (a), cadeia α (b) e molécula de tropocolágeno (c) presente nas matrizes colagênicas..... 10
- Figura 7:** Micrografia do tecido conjuntivo após fixação com corantes básicos (a) e o modelo do quarto alternado penta-fibrilar proposto (b) das fibrilas de colágeno, com a sua peridiocidade D (690 Å): "gap" e "overlap"..... 11

Figura 8: Esquema de reticulação com glutaraldeído entre as moléculas de tropocolágeno.....	13
Figura 9: Espécies químicas presentes em soluções aquosas de glutaraldeído: (a) formas monoméricas; (b) hemiacetais poliméricos; (c) polímeros α e β -insaturados.	14
Figura 10: Espectro no ultravioleta da solução aquosa de glutaraldeído a 0,05% recém purificada em carvão ativo	15
Figura 11: Esquema de impermeabilização superficial devido a distribuição das moléculas de glutaraldeído na matriz colagênica.	16
Figura 12: Formação de ligações cruzadas do tipo piridínium (a), formação da amina secundária tendo como intermediário a base de Schiff (b) e polímeros insaturados (c) em matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído.....	19
Figura 13: Reação de formação de superfície negativa com ácido α -aminooléico....	21
Figura 14: Reação de reticulação da matriz colagênica com os epóxidos.	22
Figura 15: Esquema de reação de formação de ligação peptídica com acil azida.	23
Figura 16: Reticulação com difenilfosforilazida	23
Figura 17: Reação do hexametenodiiisocianato com os grupos aminos livres.	24
Figura 18: Reação do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida com os grupos aminos e carboxílicos livres.....	24
Figura 19: Esquema para a reticulação de matrizes colagênicas por meio de acetais do glutaraldeído: a) formação dos acetais e b) indução de reticulação da matriz com trietilamina e a formação da base Schiff.....	25
Figura 20: Curva de padronização para determinação da concentração de hidroxiprolina em amostras de materiais biológicos ricos em colágeno.....	33

- Figura 21:** Reação entre grupo pirrolidínico da hidroxiprolina com *N,N*-dimetilaminobenzaldeído para a formação do cromóforo.....33
- Figura 22:** Simulador de fadiga da Shelhigh modelo FTS 300, contendo: a câmara de acrílico (A), a bioprótese valvular cardíaca (B) e fole de silicone (C).....36
- Figura 23:** Câmara acrílica de teste do duplicador de pulsos automático da Shelhigh, modelo V. 4.0, para a bioprótese valvular cardíaca nas posições: mitral (M) ou aórtica (A).....38
- Figura 24:** Espectros de absorção no ultravioleta das soluções: aquosa, tampão fosfato pH 7,4 e 0,13 mol/L com GA 1%mol/L após 1 h (a) e 22 h (b) de suas preparações à 25°C.....42
- Figura 25:** Formação do hemiacetal e acetal a partir do aldeído e um álcool primário em meio ácido.....43
- Figura 26:** Espectros de absorção no ultravioleta das soluções de EtOH com concentração de HCl a 10^{-3} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50, (III) 0,10 % e (IV) 0,05% em intervalos entre 2 e 96 h, à 25°C.....44
- Figura 27:** Espectros de absorção no ultravioleta das soluções de EtOH com concentração de HCl a 3×10^{-3} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50, (III) 0,10 % e (IV) 0,05% em intervalos entre 2 e 96 h, à 25°C.....47
- Figura 28:** Espectros de absorção no ultravioleta das soluções de EtOH com concentração de HCl a 10^{-2} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50, (III) 0,10 % e (IV) 0,05% em intervalos entre 2 e 96 h, 25°C49
- Figura 29:** Espectros de absorção no ultravioleta para as soluções de GA em: água, tamponada, EtOH e EtOH acidificado com glutaraldeído a 1% após: (a) 1 h e

(b) 22 h de suas preparações; (c) após 22 h seguidas de 1 hora a temperatura de 40°C.	51
Figura 30: Temperatura de encolhimento do pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído 1,0% e de HCl $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L após exposição aos vapores de trietilamina em diferentes intervalos de tempo.	56
Figura 31: Esquema de distribuição homogênea do glutaraldeído na forma de acetais dentro da matriz colagênica e sua liberação por base orgânica, a trietilamina.	57
Figure 32. Termogramas do pericárdio bovino: nativo (a), tratado com soluções de glutaraldeído a 0,5%, em fosfato pH 7,4, 0,14mol/L por 18 dias, (b); glutaraldeído 1% na forma de acetais (c); glutaraldeído 1% na forma de acetais, seguido do tratamento convencional com GA a 0,05% por 9 h (d).	61
Figura 33: Temperatura de encolhimento do pericárdio bovino tratado com concentrações variáveis diacetais de glutaraldeído e de HCl, seguidas da exposição aos vapores de trietilamina por 24 h.	63
Figura 34: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do pericárdio bovino: tratado com solução de glutaraldeído a 0,5% em fosfato, pH 7,4, 0,14mol/L por 18 dias (a) e glutaraldeído 1% na forma de acetais por 96h (b).	66
Figura 35: Estabilidade relativa à hidrólise por collagenase para o pericárdio bovino: nativo (a); tratado com solução de glutaraldeído a 0,05% em fosfato, pH 7,4, 0,14 mol/L, (b); acetais de glutaraldeído 1,0% (c); acetais de glutaraldeído 1,0%, seguido do tratamento convencional com GA a 0,05% (d).	67
Figura 36: Biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino (a e b) e de valvas porcinas (c e d) com tratamento convencional, e pericárdio bovino com acetais do GA, seguido do tratamento convencional (d e e).	69

Figura 37: Fotomicrografia ótica de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído 1% (a e b) e tratado com acetais de glutaraldeído 1%, seguido do tratamento convencional (tampão fosfato com GA 0,05%) (c e d, 10x).....	73
Figura 38: Fotomicrografia ótica da amostra retiradas da regiões central e lateral da bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino tratado: convencionalmente (TF com GA 0,5% por 18 dias) (a e b, 40x) e com acetais de glutaraldeído, seguido do tratamento convencional (TF com GA 0,05% por 9h) (c e d, 10x), após o teste de fadiga.....	75
Figura 39: Gradiente pressórico médio e área efetiva média avaliados para as biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulso com freqüência de 70, 80, 90 e 100 bpm.	77
Figura 40: Fração de regurgitação e índice de eficiência avaliadas para as biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulsos com freqüências de 70, 80, 90 e 100 bpm..	79
Figura 41: Índice de performance das biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulsos com freqüências de 70, 80, 90 e 100 bpm.	80
Figura 42: Fotomicrografias óticas de pericárdio bovino tratado: convencionalmente(a e b), com acetais de glutaraldeído (c e d) e com acetais de glutaraldeído seguido do tratamento convencional (e e f), após implante em subcutâneo de rato por 28 dias, corados com HE e Von Kossa.....	84

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro I: Vantagens e desvantagens das próteses valvulares cardíacas mecânicas e biopróteses valvulares cardíacas.	2
Tabela I: Variações das absorbâncias e valores da relação 280/235nm para soluções de glutaraldeído (1%) em: água, tampão fosfato (pH 7,4), EtOH absoluto e EtOH acidificada ou não antes e após o aquecimento a 40°C.	52
Tabela II: Valores de embebição e temperatura de encolhimento para pericárdio bovino submetido a diferentes concentrações de EtOH por 24h.	55
Tabela III: Valores de estabilidade térmica determinada por temperatura de encolhimento de matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído em comparação com matrizes tratadas com acetais de glutaraldeído.	59
Tabela IV: Dados de ensaio mecânico e temperatura de encolhimento do pericárdio bovino reticulado com acetais de glutaraldeído e o método convencional.	68
Tabela V: Resultados histopatológicos de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído, acetais do glutaraldeído, seguido do tratamento com glutaraldeído 0,05% por 9h comparado as características mínimas de aceitação.	71
Tabela VI: Resultados histopatológicos de pericárdio bovino tratado com acetais do glutaraldeído, seguido do tratamento convencional (tampão fosfato com glutaraldeído 0,05%), retirado da região central e lateral da bioprótese valvular cardíaca após o ensaio de fadiga.	74

Tabela VII: Resultados histopatológicos de pericárdio bovino tratado convencionalmente, retirado da região central e lateral da bioprótese valvular cardíaca após o ensaio de fadiga.	74
Tabela VIII: Resultados histopatológicos de pericárdios reticulados com tratamento convencional, acetais de glutaraldeído e acetais de glutaraldeído seguido do tratamento convencional, após 28 dias de implante em subcutâneo de rato.	82

RESUMO

Este trabalho descreve a reação de reticulação alternativa do pericárdio bovino com os acetais do glutaraldeído, preparados a partir da solução de glutaraldeído na presença do etanol em meio ácido. Os acetais difundem para dentro da matriz colagênica, e a reticulação ocorre após a desproteção dos grupos aldeídicos com uma amina terciária. O material obtido sob estas condições mostrou as propriedades biológicas e mecânicas similares ou superiores àqueles descritos para o pericárdio bovino reticulado pelo procedimento convencional com glutaraldeído, e provavelmente, com resultados de uma distribuição e natureza química mais homogêneas das reticulações formadas, devido à ausência das reticulações polímeros de glutaraldeído. As biopróteses manufaturadas com pericárdio reticulado com acetais do glutaraldeído, também mostraram durabilidade superior e foi menos suscetível ao processo de calcificação, como determinado em implantes subcutâneos em ratos. Resultados preliminares de teste à fadiga e performance hidrodinâmica foram caracterizados por um comportamento similar àqueles materiais tratados convencionalmente sugerindo que, o pericárdio reticulado com acetais do glutaraldeído pode ser um procedimento alternativo e mais eficiente na manufatura das biopróteses, particularmente com respeito à calcificação, um dos maiores problemas encontrados pós-implante.

Palavras-chave: reticulação; glutaraldeído; acetais; pericárdio bovino, bioprótese cardíaca.

ABSTRACT

This work describes the cross-linking of bovine pericardium with glutaraldehyde acetals, which are its protected forms. The acetals, prepared from a glutaraldehyde solution in the presence of ethanol in acidic media was allowed to diffuse within the collagen matrix, and cross-linking achieved by deprotection with a tertiary amine. The material obtained under this conditions showed biological and mechanical properties similar or superior to those described for bovine pericardium crosslinked by conventional procedure with glutaraldehyde, and probably, as a results of a more homogeneous distribution and chemical nature of the formed cross-links, that is the absence of polymeric cross-links. Bioprostheses manufactured with glutaraldehyde acetals cross-linked bovine pericardium, also showed higher durability and was less susceptible to calcification process, as determined in subcutaneous implant in rats. Preliminary results on fatigue test and hydrodynamic performance were characterized by a behavior similar to those observed for conventionally treated materials suggesting that, glutaraldehyde acetals crosslinked bovine pericardium may be an alternate and more efficient procedure in the manufacture of bioprostheses, particularly in respect to calcification, one of the major problems found post-implantation.

Keywords: glutaraldehyde, acetals, cross-linking, bovine pericardium, heart valve bioprostheses.

I. INTRODUÇÃO

As valvas cardíacas aórtica e mitral, que estão associadas com a regulação do fluxo sanguíneo (Fig. 1)¹, são susceptíveis a patologias com várias etiologias e fisio-patologias, tais como, malformação congênita, doenças reumáticas, sífilis, processos infecciosos, artrite e processos de calcificação, com consequências graves para o sistema cardiovascular. Estes problemas, via de regra, são solucionados pela substituição das valvas por próteses valvulares cardíacas mecânicas ou biopróteses valvulares cardíacas.

Figura 1: Esquema do sistema arterial e venoso (a) e o sentido do fluxo sanguíneo no coração (b).

1.1. História da arte das próteses cardíacas

A primeira prótese mecânica de uma válvula cardíaca surgiu em 1952, introduzida por Charles Hufnagel², que era uma prótese de bola. Na década de 60, surgiram as próteses valvulares cardíacas de poliuretano³ e mecânica de Starr & Edwards⁴ (bola e gaiola). A bioprótese valvular cardíaca surgiu em 1955 com uso de valva aórtica fresca de cadáveres por Murray⁵. Em 1974, foi desenvolvida a bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino (PB) tratado com glutaraldeído (GA) por Ionescu⁶, surgindo assim os vários modelos de biopróteses valvulares cardíacas tratadas com GA, uma delas desenvolvida por Braile *et alli*⁷.

Apesar da sua grande durabilidade, as próteses valvulares cardíacas mecânicas não eram isentas de complicações, principalmente o tromboembolismo (Quadro I), então foram desenvolvidas as biopróteses valvulares cardíacas, inicialmente confeccionadas a partir de tecidos homólogos⁸⁻⁹ (*fascia lata, dura-mater* ou pericárdio humano) e depois com tecidos heterólogos, como o pericárdio bovino (PB)^{6,9-10} ou de valvas aórticas porcinas¹¹ tratados com glutaraldeído (GA). Contudo, estas biopróteses apresentavam alto índice de falha mecânica após 7 anos de uso, devido geralmente a calcificação em pacientes jovens.

Quadro I: Vantagens e desvantagens das próteses valvulares cardíacas mecânicas e biopróteses valvulares cardíacas.

Prótese	Vantagens	Desvantagens
Mecânica	Durabilidade prolongada e reprodutibilidade de fabricação	Forma não natural e exigência do uso obrigatório de anticoagulantes
Bioprótese	Forma e funcionamento mais próximo ao natural e menor necessidade de anticoagulante	Durabilidade reduzida, difícil reprodutibilidade de fabricação e calcificação em torno de 7 anos de uso

Atualmente, existem dois tipos de próteses valvulares cardíacas:

a) **mecânicas**: confeccionadas com materiais artificiais, entre eles, grafite e ligas metálicas (ex. ligas de titânio) recobertas com carbono pirolítico em diversos formatos, por exemplos: bola e gaiola (Fig. 2a), disco basculante (Fig. 2b), duplo folheto (Fig. 2c) e disco e gaiola¹². Geralmente são de custo elevado e ainda o paciente tem de tomar anticoagulantes, como dicumarínicos, quando necessário ao utilizar a prótese valvular cardíaca mecânica¹³ para minimizar os problemas tromboembólicos;

Figura 2: Esquemas das próteses mecânicas de: bola e gaiola (a), disco basculante (b) e duplo folheto (c).

b) **biopróteses**: manufaturadas com materiais biológicos, tais como, materiais heterólogos: PB⁵ e valvas aórticas porcinas¹¹ (com ou sem suporte) tratados com GA (Fig. 3)¹².

Figura 3: Biopróteses valvulares cardíacas manufaturadas com pericárdio bovino (a) e valvas aórticas porcinas com suporte (b), sem suporte (c) e tratados com glutaraldeído.

Contudo, estes dois tipos de próteses apresentam algumas desvantagens inerentes a elas (Quadro I), que impedem o seu uso por longa duração, visto que uma prótese cardíaca ideal deveria¹³:

- ser estéril e não apresentar respostas alergênicas e de rejeição;
- apresentar conformação estrutural similar àquela existente naturalmente;
- mostrar o mínimo de resistência ao fluxo, assim como prevenir queda de pressão através da válvula;
- ter um mínimo de fluxo reverso necessário para o fechamento da válvula;
- mostrar uma longa durabilidade mecânica e estrutural, com manutenção de suas performances funcionais normais;
- causar traumas mínimos aos elementos sangüíneos e tecidos endoteliais da estrutura cardiovascular ao redor da válvula para não provocar a formação de trombos (coágulos sangüíneos), sem o uso de anticoagulantes;
- não ser barulhenta e incômoda ao paciente;
- ser de fácil posicionamento ou implantação no coração e ser radiopaca;
- possuir um baixo custo de produção e ser reprodutível.

Contudo, em 1988, foram implantadas nos EUA em torno de 51.000

próteses cardíacas e o mercado mundial consome em torno de 130.000 unidades por ano*. Destas, 50% das próteses mecânicas implantadas são do tipo de duplo folheto¹¹. Os principais fabricantes mundiais deste tipo de prótese são a St. Jude (EUA), CarboMedics (EUA) e SORIN (Itália).

No Brasil, a etiologia mais comum para as lesões valvares naturais é a doença reumática, com a maioria de pacientes que necessitam de prótese para substituição da valva danificada¹⁴. São utilizadas em maior quantidade as biopróteses valvulares cardíacas de tecidos biológicos (PB e valvas aórticas porcinas) tratados com GA em meio tamponado (tampão fosfato, pH 7,4 e 0,13mol/L), que representam em torno de 80% das 10 mil próteses cardíacas implantadas anualmente. Destes, cerca de 40% são produzidas pela Braile Biomédica¹⁵.

Entretanto, as circunstâncias clínicas podem prevalecer na escolha do tipo de válvula a ser empregada no paciente. Por exemplo, as biopróteses valvulares cardíacas são geralmente utilizadas em pessoas idosas que não apresentam grande atividade no metabolismo do cálcio. Em contraste, as próteses valvulares mecânicas são mais indicadas para os jovens, apesar do uso constante do anticoagulante, devido ao alto índice de falha das biopróteses valvulares cardíacas nesta faixa etária^{12,13} da população causada pela calcificação.

Revisões extensivas e estudos comparativos mostram que as performances das próteses valvulares mecânicas e biopróteses valvulares cardíacas são basicamente similares¹⁶⁻²³ após 7 anos de uso. Todo desenvolvimento na área durante os últimos 30 anos tem sido realizado com a finalidade de reduzir ou

* RINALD, S.. Comunicação pessoal. Turim, Itália, jun/1993.

tromboembolismo e processos hemorrágicos devidos à terapia de anticoagulantes utilizada para as válvulas mecânicas e às falhas estruturais para as de biopróteses valvulares cardíacas, que geralmente levam a sua calcificação²⁴⁻³⁰ exigindo a sua troca após 7 anos de uso, principalmente nos jovens; segundo os índices atuariais e linearizados obtidos por Braile *et alli*³¹ (Fig. 4), correspondendo a aproximadamente a 310 milhões de ciclos (frequência média de 85 batimentos por minuto).³²

Figura 4: Índices atuariais e linearizados de falhas primárias para jovens e adultos em 11 anos da bioprótese valvular cardíaca PB IMC obtido por Braile *et alli*.

Pelo fato da reação de reticulação com GA não ser satisfatória para aumentar a performance e durabilidade das biopróteses valvulares cardíacas, novas técnicas químicas de fixação, processamento e geometria têm sido introduzidas no caso das biopróteses valvulares cardíacas³³⁻⁴⁶.

As biopróteses valvulares cardíacas utilizadas atualmente são as de

valvas porcinas e de pericárdio bovino (PB), ambas reticuladas com GA em meio tamponado. As biopróteses valvulares cardíacas de valvas porcinas apresentam dois inconvenientes, que são: a presença da estenose (redução de área de fluxo), ocasionada pela diminuição da sua área útil para o fluxo sanguíneo provocada pela sua montagem dentro do suporte valvular (Fig. 3b), e a biodegradação rápida do material após a sua coleta devida à presença de grande quantidade de células³². Isso não ocorre com a bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino, visto que possui pequena quantidade de células e geralmente se utiliza a peça inteira do PB de um único animal adulto para a manufatura de uma bioprótese valvular cardíaca, podendo com isso obter estas biopróteses de diversos tamanhos⁴⁰.

Contudo, existem diversas biopróteses valvulares cardíacas comercializadas tanto de PB como de valvas porcinas tratadas com GA, mas com modificações nos seus procedimentos de tratamentos, isto é, tempo de exposição, concentração e temperatura da solução do GA⁴¹⁻⁴⁵ ou ainda no modelo da bioprótese valvular cardíaca¹¹, com a finalidade de melhorar as suas propriedades biológicas e mecânicas.

1.2. Calcificação

A calcificação, uma das principais causas das falhas estruturais das biopróteses de válvulas cardíacas, é um processo de formação de depósito mineral de fosfato de cálcio insolúvel na forma de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$. Este mineral é formado pelos íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}) disponíveis no plasma ou no fluido extracelular, devida que as concentrações desses íons sejam insuficientes para permitir a precipitação espontânea da hidroxiapatita ou de outras formas de fosfato

de cálcio, mas em quantidades suficientes para suportar o crescimento do cristal⁴⁷, sendo que o acúmulo inicial detectável do depósito dos sais de fosfato de cálcio ocorre nas vesículas matriciais (membranas celulares e de organelas devido à presença de fosfolípidos)⁴⁹ e sobre as fibras de colágeno (espaçamento "gap")⁴⁴.

Apesar de a calcificação das biopróteses valvulares cardíacas ser a principal causa da necessidade da sua substituição, a patogênese inicial pode ter diversos fatores, tais como⁴⁸:

- a- tratamento químico inadequado, que pode levar à formação de gradientes de distribuição de ligações cruzadas (base de Schiff), com a parte interna menos reticulada, deixando o colágeno nativo livre para calcificar-se;
- b- presença de material poroso (camada esponjosa), que facilita a entrada de proteínas, tais como a fosfatase alcalina, liberando facilmente os íons fosfatos presentes nas membranas vesiculares, aumentando a concentração localizada no material;
- c- elasticidade reduzida causada pela formação de ligações de base de Schiff em maior quantidade na superfície;
- d- disponibilidade de espaçamento vazio ("gap") entre as moléculas de tropocolágeno adjacentes para deposição de microcristais de sais de fosfato de cálcio;
- e- alto índice de calcificação em pacientes jovens devido ao seu metabolismo de crescimento ósseo (Fig. 4).

Quanto à região, a calcificação das biopróteses valvulares cardíacas ocorre principalmente nas comissuras e na parte central^{24,30}, devido à maior solicitação mecânica (Fig. 5), provocando a sua substituição. Essas calcificações são

mais intensas nas biopróteses valvulares cardíacas de valvas porcinas do que naquelas de PB. Além da maior estenose³², apresentam ainda a presença de grande quantidade de resíduos celulares no tecido biológico.

Figura 5: Vista superior da bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino com as regiões: zona central (a), parede aórtica (b), base dos folhetos (c), comissuras (d) e margem livre (e).

Os tecidos biológicos utilizados, PB e valvas aórticas porcinas, para manufatura das biopróteses valvulares cardíacas apresentam grande quantidade de colágeno na sua estrutura²¹⁻²². É sobre a estrutura do colágeno que são realizadas as reações de reticulações, sendo assim a grande responsável pela durabilidade mecânica e biológica destes tecidos após o seu implante.

1.2.1. Colágeno

A principal característica do colágeno é a sua unidade estrutural básica, denominada de tropocolágeno, cuja massa molecular (MM) é de aproximadamente de 300.000 Dalton e as dimensões, de 2.800Å de comprimento e 15Å de diâmetro, possui três cadeias α do mesmo tamanho que se entrelaçam compondo uma hélice tripla em forma de um bastonete (Fig. 6)⁵⁰⁻⁵³.

Cada cadeia α da hélice tripla apresenta aproximadamente 1.044 resíduos de aminoácidos (MM cerca de 100.000 Da cada), com unidades repetitivas em forma de tripletes do tipo: $(\text{-Gly-X-Pro-})_n$ ou $(\text{-Gly-X-Hypro-})_n$, sendo X, um aminoácido qualquer⁵¹⁻⁵³. O tropocolágeno apresenta uma região helicoidal e suas extremidades não helicoidais, denominadas de telopeptídeos N- e C-terminais, que possuem respectivamente 16 e 25 resíduos de aminoácidos (Fig. 6)⁵¹⁻⁵³.

Figura 6: Estrutura do tropocolágeno: estrutura primária na forma de triplete repetitivo (a), cadeia α (b) e a molécula de tropocolágeno (c) presente nas matrizes colagênicas.

A compreensão da estrutura microfibrilar do colágeno, só foi possível com a utilização da microscopia eletrônica de transmissão e de difração de raios-X^{51-52,54}, por meio da qual foi observada uma periodicidade D ($D = 690\text{\AA}$ para o tecido úmido e $640\text{\AA}$ para o tecido seco) da microfibrila de colágeno na presença de corantes básico (acetato de uranila) ou ácido (ácido fosfotúngstico) (Fig. 7a). Essa periodicidade está relacionada com a estrutura microfibrilar proposta por Smith⁵¹⁻⁵².

que é o modelo **quarto alternado pentafibrilar** (Fig. 7b). Nele, a molécula de tropocolágeno está deslocada de um quarto em relação à sua molécula vizinha adjacente, apresentando também uma região de espaçamento vazio (gap) entre duas moléculas seguidas de uma região de sobreposição (overlap) das moléculas (Fig. 7b).

Figura 7: Micrografia do tecido conjuntivo após fixação com corantes básicos (a) e o modelo do quarto alternado pentafibrilar proposto expandido (b) da fibrila de colágeno, com a sua periodicidade D (690 Å): "gap" e "overlap".

O colágeno é largamente utilizado como material para implante, tanto na sua forma pura, no caso das membranas periodontais⁵⁵ ou géis de colágeno⁵⁶, quanto na associação com as outras moléculas biológicas (proteínas ou polissacarídeos biológicos) como nos tecidos conjuntivos ou biológicos, como no caso do pericárdio bovino⁷ ou valvas aórticas porcinas⁸, para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas; devido às suas propriedades⁵¹:

- **Físico-químicas:** reticulação variável, que controla o grau de embebição ("swelling"), velocidade controlada de absorção pelo tecido;
- **Físico-mecânicas:** alta força tensora, baixa extensibilidade, retenção de água e entrelaçamento ou orientação das fibras);
- **Biológicas:** antigenicidade mínima, reduzida por tratamento com enzimas ou por reticulação, digestibilidade por collagenase).

Apesar de possuírem reticulações naturais, os tecidos utilizados para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas exigem um aumento dessas reticulações ("cross-linking") para melhorar as suas propriedades biológicas e mecânicas. Essas reticulações podem ocorrer visto que a molécula do colágeno apresenta grupos capazes de formar ligações de reticulação covalente, tais como, os grupos básicos (-NH₂), neutros polares (-OH) e ácidos (-COOH) livres⁵⁷. Isso pode ser realizado por agentes químicos ou físicos (radiação ou aquecimento), sem a destruição da estrutura macromolecular ou microfibrilar do colágeno.

Nos casos dos agentes ou reagentes químicos, o GA^{5, 9, 40-46} é largamente utilizado para a reticulação de matrizes colagênicas para a aplicação na área cardiovascular^{5,9}. Entretanto, existem ainda outros reagentes, tais como, epóxidos³³⁻³⁵, hidrazina (via acil azida)³⁶ ou compostos azidas³⁷, diisocianatos³⁸ e carbodiimidas³⁹.

1.2.2. Glutaraldeído (GA)

O glutaraldeído (GA, 1,5-pentanodial) foi introduzido inicialmente na área biológica, como agente de fixação de tecidos, principalmente na microscopia eletrônica de transmissão⁵⁸ em função da sua capacidade de reagir rapidamente com grupos aminos livres presentes nas proteínas para formar as ligações cruzadas por meio de bases de Schiff (-CH=N-), como mostra a Figura 8. Sua aplicação estendeu-se posteriormente às outras áreas que incluíram técnicas de imobilização de enzimas⁵⁹ e a estabilização de matrizes colagênicas para vários tipos de aplicações, tais como a manufatura de válvulas cardíacas^{5,9}, preparação de membranas periodontais⁵⁵ e géis de colágeno injetáveis⁵⁶.

Seu uso, entretanto, principalmente na área cardiovascular, tem sido freqüentemente associado aos processos de calcificação¹⁹⁻³⁰, citotoxicidade⁶⁰ e a deterioração das propriedades mecânicas após implante de biopróteses valvulares cardíacas⁶.

Figura 8: Esquema de reticulação com glutaraldeído entre as moléculas de tropocolágeno.

Nestes casos, três fatores principais impõem severas restrições à qualidade destes materiais colagênicos obtidos com o seu uso:

1) natureza complexa das soluções de GA

Na realidade, as soluções aquosas de GA são misturas complexas em equilíbrio (Fig. 9), que incluem além do GA livre, estruturas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos monoméricos e poliméricos e vários polímeros α e β -insaturados⁶¹, cujas proporções para uma solução aquosa a 25% a 25°C são de respectivamente 4%, 16%, 9% e 71%, e variáveis em função da concentração da solução, da temperatura e do pH^{46,61-62}. Enquanto a concentração de GA livre à temperatura ambiente é de apenas 4%, a 50°C ela alcança valores de 35%^{46,61}.

Como consequência, a purificação do reagente antes do seu uso através da destilação ou pelo tratamento com carvão ativado, não é garantia para a obtenção de materiais com características desejáveis, fundamentais para seu desempenho

como biomaterial, principalmente na área cardiovascular.

Além do que, nas condições de uso do reagente, a contribuição significativa para o efeito citotóxico pós-implante, pode estar relacionada com a liberação gradual de GA livre^{46,63}, a partir de ligações cruzadas formadas por unidades poliméricas do GA (Fig. 9)⁶¹. Portanto, muitos dos problemas observados com a utilização de GA como um reagente de proteínas, principalmente na área de biomateriais, podem potencialmente estar associados à natureza complexa do reagente em solução aquosa^{61,64}.

a) Formas monoméricas

b) Hemiacetais poliméricos

c) Polímeros α e β -insaturados

Figura 9: Espécies químicas presentes em soluções aquosas de GA: (a) formas monoméricas; (b) hemiacetais poliméricos; (c) polímeros α e β -insaturados.

O único critério utilizado para a verificação do "grau de pureza" das

soluções de GA empregadas na manufatura de válvulas cardíacas é a relação das absorvâncias 280/235 nm (Fig. 10), correspondentes às concentrações relativas de GA livre e formas poliméricas insaturadas^{40,64}. São consideradas soluções aceitáveis quando essa relação estiver entre 1,5 e 2,5^{40,64}.

Figura 10: Espectro no ultravioleta da solução aquosa do glutaraldeído a 0,05% recém-purificada em carvão ativo.

2) impermeabilização superficial das matrizes colagênicas

A característica básica da reação do GA com tecidos biológicos é a impermeabilização superficial (Fig. 11), que está relacionada com a química do reagente em solução, impedindo uma reação mais homogênea com estes tecidos⁶⁰, principalmente quando empregado em altas concentrações, condição esta de processamento para a maioria dos métodos de manufatura de biopróteses valvulares cardíacas.

Essa impermeabilização ocorre rapidamente com o GA polimérico e como consequência a não reticulação de regiões internas da matriz colagênica^{61,62}. A resultante é a presença de tecido residual nativo, que por exposição após as falhas

mecânicas, pode funcionar como regiões que induzirão a calcificação²⁴⁻³⁰. O GA tem sido utilizado há mais de quatro décadas como reagente mais freqüente para reticulação de proteínas⁵⁸, entretanto sempre foi empregado sem maior preocupação com a qualidade de suas reações, as quais estão intimamente relacionadas à composição das soluções.

Figura 11: Esquema de impermeabilização superficial devido à distribuição das moléculas do glutaraldeído na matriz colagênica.

A penetração de GA em tecido hepático é bastante lenta à temperatura ambiente e a extensão de penetração é inversamente proporcional à profundidade do tecido⁶⁰. Para o PB foi demonstrado que a fixação com o GA ocorre na superfície das fibras, principalmente quando empregado em altas concentrações⁶⁰⁻⁶², condição esta de processamento para a maioria dos métodos de manufatura de biopróteses valvulares cardíacas. Essas considerações mostram a dificuldade de se obter materiais homogêneos com a utilização do GA para a manufatura das biopróteses valvulares cardíacas, característica desejável em qualquer biomaterial, principalmente naqueles dirigidos ao sistema cardiovascular. A resultante geralmente é a presença de tecido residual nativo, que por exposição após falhas mecânicas, pode funcionar como regiões potenciais primárias de calcificação^{24-30, 60-62}.

Técnicas de microscopia eletrônica têm revelado que a calcificação podem ocorrer após as alterações iniciais na superfície dos folhetos²⁴⁻³⁰, que expõem o colágeno nativo livre, um dos fatores iniciais da patogênese de calcificação.

3) efeitos citotóxicos das biopróteses valvulares cardíacas reticuladas com glutaraldeído

A heterogeneidade das soluções de GA, como consequência da presença de estruturas poliméricas estáveis^{46,61}, apresenta efeitos citotóxicos manifestados para concentrações entre 10 e 25 ppm de GA liberados pelas biopróteses valvulares cardíacas tratadas com esse reagente⁶⁰. Tratamentos com soluções capazes de reagir com a função aldeídica não minimizam esses problemas, que ocorrem devido à heterogeneidade dos tipos de reticulações induzidas por esse reagente, pois só neutralizam as funções aldeídicas livres durante o processamento⁶⁵⁻⁶⁷, não impedindo sua liberação pós-implante.

Apesar dos vários problemas associados com as biopróteses valvulares cardíacas, principalmente a degeneração e processos de calcificação do tecido²⁴⁻³⁰, o uso do GA ainda é o método preferido de reticulação. A ação do GA sobre o PB na manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, além de aumentar a sua durabilidade biológica, aumenta também as suas propriedades mecânicas do tecido pela formação de ligações cruzadas através da base de Schiff, como o produto de reação do aldeído com grupo ϵ -amino de resíduos de lisina e hidroxilisina de moléculas adjacentes de tropocolágeno⁶⁸. Entretanto, estas ligações deveriam ocorrer apenas como consequência da reação de um mol de GA com dois grupos NH_2 presentes na proteína, conforme mostrado anteriormente pela Figura 8.

1.2.2.1. Outros tipos de reticulações com glutaraldeído no tecido

Contudo, nas condições em que são utilizadas as soluções de GA, três tipos possíveis de ligações cruzadas^{69,70} podem ser formados inicialmente com o colágeno: bases de Schiff (Fig. 8)⁷⁰, derivadas do íon piridínio (Fig. 12a), seguido por reações de condensação aldólica com GA livre (Fig. 12b) e aminas secundárias estáveis através da reação de adição de aminas primárias a polímeros insaturados de GA (Fig. 12c). Esses tipos de reticulações podem ser possíveis sítios de ramificações de novas moléculas de GA na superfície da matriz colagênica, devidas à presença de grupos aldeídicos livres.

1.3. Procedimentos para minimização da calcificação das biopróteses valvulares cardíacas

Em vista das patogêneses iniciais de calcificação das biopróteses valvulares cardíacas tratadas com GA e com a finalidade de aumentar a sua durabilidade *in vivo*, foram desenvolvidos diversos processos físico-químicos ou químicos para minimizar a calcificação das biopróteses valvulares cardíacas tratadas com GA, tais como:

1) Pré-tratamento dos tecidos biológicos

a) surfactantes ou detergentes

Com o uso de surfactantes ou detergentes⁷¹, é possível a retirada dos fosfolípidos presentes no PB ou nas valvas porcinas, que a fosfatase alcalina poderia hidrolisar liberando os íons fosfatos, afetando o equilíbrio de concentração de íons fosfato e cálcio existente na corrente sanguínea, precipitando-os na forma de seus sais.

Figura 12: Formação de ligações cruzadas do tipo piridínio (a) da amina secundária tendo como intermediária a base de Schiff (b) e polímeros insaturados (c) em matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído.

b) cátions metálicos trivalentes (Al^{+3} , Fe^{+3} e Ga^{+3})

Os cátions metálicos trivalentes⁷²⁻⁷³ ocupam os locais de deposição do íon cálcio (Ca^{+2}), tais como grupos carregados negativamente, impedindo assim o início do crescimento de microcristais de sais de fosfato de cálcio, diminuindo com isto a calcificação das biopróteses valvulares cardíacas. Contudo, estes íons vão

sendo retirados lentamente do tecido biológico, conforme o uso, pois estes íons estão apenas mantidos eletrostaticamente nestes tecidos.

c) extração dos fosfolipídeos e organelas celulares

A retirada de fosfolipídeos garante a diminuição de sítios de fosfatos para a interação com íons cálcio e também diminui a ação da fosfatase alcalina para a liberação de íons fosfatos necessários para a formação de microcristais de sais de fosfato de cálcio. Esta extração é realizada em solventes orgânicos, no caso das misturas de clorofórmio e metanol⁷⁴ ou ainda com uma pré-incubação em etanol⁴⁴. Entretanto, tais solventes podem apresentar um efeito desidratante no biomaterial, que induziriam as modificações nos espaçamentos entre as moléculas de tropocolágeno adjacentes⁴⁴.

2) Variações do tratamento dos tecidos biológicos com GA

a) reticulação dinâmica da matriz colagênica com GA

A reticulação com GA é normalmente realizada na forma estática, produzindo um material que não leva em consideração a demanda mecânica que ocorrerá na bioprótese valvular cardíaca durante o seu processo de oclusão e abertura. A reticulação dinâmica com GA é realizada obedecendo as regiões de maior demanda mecânica da bioprótese valvular cardíaca na forma definitiva, com as reticulações ocorrendo com maior intensidade nessas regiões durante o processo de oclusão e abertura dos folhetos *in vitro*⁴².

b) reticulação com concentração progressiva do GA

Nesse tipo de tratamento, ocorre um aumento progressivo da concentração do GA até 0,5%, sendo a concentração inicial do GA pequena (menor

que 0,05%), de tal forma que reduza a impermeabilização superficial, permitindo assim que a molécula de GA penetre no interior do tecido⁷⁵.

c) formação de superfície carregada negativamente

A formação de superfícies carregadas negativamente pode ser obtida com emprego de moléculas carregadas negativamente, que possam reagir com grupos aldeídos do GA preso à matriz colagênica, como no caso do ácido α -aminooléico (aminooleic acid, AOA[®])^{10,67,76-78} ou aminoácidos ácidos (ácido glutâmico ou aspártico)⁶⁷ (Fig. 13). O AOA[®] possui um grupo hidrofóbico (hidrocarboneto) grande que impede a difusão de dos íons cálcio no interior do tecido⁷⁸.

Figura 13: Reação de formação de superfície negativa com ácido α -aminooléico.

Existem também os compostos difosfonatos (3-amino-1-hidróxi-propano-difosfonato)⁷⁹, que poderiam ficar presos à superfície da bioprótese valvular cardíaca de modo similar ao ácido α -aminooléico, formando compostos de complexação que impediriam a precipitação dos sais de fosfato de cálcio. Contudo a sua liberação lenta

no organismo do paciente pode acarretar efeitos colaterais inconvenientes, tais como a osteoporose.

Desses processos, apenas a formação de superfície carregada com ácido α -aminooléico após o tratamento do tecido com GA é utilizada para manufatura das biopróteses valvulares cardíacas⁷⁸.

1.3.1. Outros agentes reticulantes

Tem sido introduzidos outros agentes reticulantes, devido à dificuldade de obter-se biomateriais mais homogêneos e estáveis com o uso do GA, para tentar minimizar os efeitos de deterioração das matrizes colagênicas utilizadas na área cardiovascular. Entre eles temos:

a) epóxidos

Os epóxidos^{32-34,80} são éteres glicídlicos, que têm grande reatividade com grupos carboxílicos, aminos e hidroxilas (Fig. 14). Estes compostos têm diferente número de grupos funcionais epóxidos, em função do tamanho da sua cadeia³³.

Figura 14: Reação de reticulação da matriz colagênica com os epóxidos.

b) acil azida

O processo de acil azida³⁶ apresenta alguns inconvenientes, tais como o uso do solvente orgânico (metanol) (Fig. 15), diminuindo assim a estabilidade mecânica e biológica das matrizes colagênicas tratadas com esse processo.

Figura 15: Esquema de reação de formação de ligação amídica com acil azida.

Um outro composto que realiza a mesma reação da acil azida é a difenilfosforilazida³⁷, um composto solúvel em água, com a vantagem de não necessitar da reação de metilação em meio metanólico ácido (Fig. 16). Para ocorrer este tipo de ligação nos dois casos, os grupos aminos (-NH₂) e os carboxílicos (-COOH) necessitam estar próximos entre si, caso contrário não ocorre a formação da ligação amídica (-CONH-). No caso desta reação, além da formação de uma ligação do tipo amida ainda existe a vantagem da distribuição mais uniforme das ligações cruzadas na matriz colagênica.

Figura 16: Reticulação com difenilfosforilazida.

c) diisocianatos (OCN-R-NCO)

A reticulação com os diisocianatos³⁸ envolve a ligações de dois grupos aminos livres adjacentes à formação da ligação tipo uréia (-NH-CO-NH-), como mostrado na Figura 17. Infelizmente, além da formação da camada de impermeabilização semelhante àquela que ocorre com o GA, tem-se também a

desidratação do biomaterial, pois a reação do diisocianato não pode ocorrer na presença de água, visto que o grupo isocianato (-NCO) será hidrolisado para a formação de grupo amino livre, competindo com a formação da ligação de reticulação (ligação do tipo uréia).

Figura 17: Reação do hexametilenodiisocianato com os grupos aminos livres.

d) Carbodiimidas

Carbodiimidas são largamente utilizados para a formação de ligações peptídicas (-CONH-) nas sínteses protéicas^{39, 81}. A sua reação ocorre com os mesmos grupos daqueles realizados com as azidas, como é o caso do cloreto de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, que é solúvel em água (Fig. 18)⁸¹.

Figura 18: Reação do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida com os grupos aminos e carboxílicos livres.

Contudo, a introdução de novos reagentes ou mesmo variações metodológicas envolvendo o GA, ou não apresentou ainda os resultados desejados, ou os resultados de suas aplicações na forma de biopróteses valvulares cardíacas ainda não foram testadas suficientemente para uma avaliação mais rigorosa de suas performances hidrodinâmicas e durabilidade *in vivo*.

II. OBJETIVOS

Uma alternativa para o uso do GA está relacionada com a propriedade que os aldeídos possuem ao reagir com álcoois para formar acetais ou hemiacetais⁸² em meio ácido, que são formas estáveis e não reativas com os grupos aminos (também protegidos na forma protonada) para a formação da base de Schiff (Fig. 19a), sem que ocorra a formação de polímeros α e β -insaturados. Portanto, essas formas quimicamente protegidas da função aldeídica e amínica podem ser ativadas de modo rápido pela adição de uma base orgânica, permitindo ao reagente uma difusão mais homogênea no interior da matriz (Fig. 19b).

Figura 19: Esquema para a reticulação de matrizes colagênicas por meio de acetais do glutaraldeído: a) formação dos acetais e b) indução de reticulação da matriz com trietilamina e a formação da base Schiff.

Deste modo, espera-se obter materiais com reticulações ou ligações cruzadas mais bem definidas quimicamente e com uma distribuição mais uniforme (Fig. 19b), isto é, um mol de GA para dois moles de grupo amino livres ($-NH_2$), principalmente no interior do material, que possam minimizar os efeitos de impermeabilização com provável redução dos efeitos citotóxicos e de calcificação em função das condições empregadas para a preparação de hemiacetais e diacetais de GA, o que não ocorre na reação em meio aquoso tamponado (método convencional).

Com base no exposto acima, os objetivos deste trabalho foram:

- estudos de formação dos hemiacetais ou acetais do GA;
- reticulação com GA após a sua liberação dentro da matriz colagênica, neste caso PB para a formação da base de Schiff.

Os materiais reticulados foram então caracterizados por sua propriedade:

- térmica (temperatura de encolhimento e calorimetria exploratória diferencial);
- mecânica (ensaio mecânico);
- biológica (ensaios histopatológicos e estabilidade frente a collagenase);
- biofuncionalidade (implantes subcutâneos em ratos para verificar a sua calcificação e avaliação da performance hidrodinâmica e durabilidade acelerada das biopróteses valvulares cardíacas manufaturadas com estes materiais reticulados).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes, solventes e materiais utilizados

Exceto pelo 1,5-pentanodial (glutaraldeído, GA, Union Carbide) que foi comercial, os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A..

O pericárdio bovino (PB) foi coletado em matadouros a partir de animais com idade entre 2,5 e 4,5 anos, lavado diversas vezes com solução salina (NaCl a 0,9%) para retirar-se o sangue presente nestes materiais e mantido na solução salina por 24 h. O PB foi fornecido pela Braile Biomédica - Indústria e Comércio e Representações S/A (S. J. Rio Preto - SP), conforme os procedimentos e técnicas descritas para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas³⁹.

3.2. Preparação e caracterização do acetal de glutaraldeído em etanol

Inicialmente, o GA comercial (50%) foi purificado com carvão ativado (1%) até que 0,5 mL do filtrado diluído para 100 mL em água apresentasse a relação de absorbância de 280/235 nm acima de 1,5, medidas no espectrofotômetro do UV da Hitachi, modelo U-3210, Japan.

a) Formação de acetais do glutaraldeído em etanol

Preparou-se uma solução de GA em EtOH absoluto com concentração de 0,100 mol/L (1,0%) e $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L de HCl. E a seguir foram realizadas medidas

espectrofotométricas na região do UV entre 200 e 350nm, com intervalo de tempo entre 2 e 96h, utilizando-se como branco solução ácida de EtOH.

Foram realizadas as mesmas medidas com outras soluções de GA em EtOH com concentração entre 0,05 a 1,0%, e de HCl entre $1,0 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, e nas soluções de GA a 1,0% em meio aquoso e em tampão fosfato (TF), pH 7,4, 0,13 mol/L.

b) Estudo de reticulação do pericárdio bovino com acetais de glutaraldeído

Amostras de PB (3,0x3,0 cm) foram equilibradas gradualmente em concentrações crescentes de EtOH de 0 a 100% com variação de 10%, a cada 30 min. Após atingir a concentração de 100% de EtOH, as amostras de PB foram transferidas para EtOH (100%) contendo $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L de HCl no mínimo por 12h, sendo então colocadas em solução de EtOH contendo HCl 3×10^{-3} mol/L e GA entre 1,0 % (v/v), mantendo-as durante 12, 24, 48 e 96h. Após estes intervalos de tempo, as amostras de PB, exceto aquela tratada por 48h, que foi exposta aos vapores de trietilamina (TEA) por 0, 12, 24, 48 e 72h, as demais foram expostas por 48h, sendo então lavadas diversas vezes com água e colocadas em TF até o seu uso a 10°C.

Repetiu-se o experimento acima, exceto na exposição aos vapores de TEA, que foi por apenas 12h, utilizando-se soluções de GA em EtOH com concentrações de GA entre 0,05% e 2,0%, e de HCl entre $1,0 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Foram retiradas pequenas tiras de 2,0 x 0,2 cm de cada amostra de PB, e equilibradas em TF pH 7,4, 0,13 mol/L por 24 h, com a finalidade de verificar a sua estabilidade térmica avaliada por temperatura de encolhimento (shrinkage

temperature, Ts) para cada condição de tratamento acima.

A amostra que apresentou alto valor de Ts foi utilizada para comparar com aquelas amostras de PB submetidas ao tratamento com solução de GA a 0,05% em TF pH 7,4, 0,13 mol/L por 48 e 96h.

3.4. Manufatura das biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino reticulado

Nove peças inteiras de PB montadas sobre bastidores circulares de PVC com diâmetro de 17,5 cm foram reticuladas conforme descrito abaixo para a manufatura das biopróteses valvulares cardíacas:

a) **Tratamento com acetais do glutaraldeído (GADA)**: 6 peças de PB foram tratadas com GADA na melhor condição acima por 48h e expostas a vapores de TEA por 12 h. Os materiais obtidos foram novamente submetidos ao procedimento descrito anteriormente, nas mesmas condições de tempo e concentração.

b) **Tratamento com acetais do glutaraldeído (GADA) seguido do GA em tampão fosfato (GADAP)**: 3 peças de PB já tratadas com GADA no item acima, foram submetidas ao tratamento a seguir com uma solução de GA a 0,05% em TF por um período de 9 h.

c) **Tratamento com solução de GA (0,5%) em tampão fosfato (método convencional)**: 3 peças de PB foram submetidas ao tratamento com solução de GA a 0,5% em solução de TF por um período cerca de 18 dias, com trocas periódicas da solução, conforme descrito nos procedimentos normais³⁹ fornecidos pela empresa Braile Biomédica - Indústria e Comércio e Representações S/A (S. J.

Rio Preto - SP).

As peças de PB obtidas acima foram ainda tratadas com solução de água oxigenada (0,5V) por 6h, em seguida lavadas três vezes com solução aquosa de cloreto de sódio (0,9%) e armazenadas em tampão acetato (0,2 mol/L) a pH 5,4, contendo 4% de formaldeído à temperatura ambiente para as suas caracterizações, como descritas a seguir.

3.5. Caraterização do pericárdio bovino

3.5.1. Estabilidade térmica

a) Temperatura de encolhimento (Ts)

Foi obtida em um equipamento para determinação de ponto de fusão da Quimis, modelo Q-340-13, Brasil, adaptado para medidas de Ts. Amostras de PB de cerca de 2,0 x 20,0 mm de comprimento foram fixadas na parte inferior de um tubo graduado em mm (4,0 mm de diâmetro interno e 0,4 mm de parede) contendo cerca de 1mL de TF. A taxa de aquecimento foi de 1,5 - 2,0°C/min, com início a 25°C. O valor de Ts foi determinado pela temperatura média entre o início do encolhimento até uma redução de 1/3 do comprimento total da amostra, sendo todas as medidas realizadas em triplicatas.

b) Calorimetria exploratória diferencial

Neste experimento, foram utilizados pequenos discos de 5 mm de diâmetro de PB reticulados ou não e equilibrados em TF por um período de 24 h no mínimo. As massas dos PB para a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC = Differential Scanning Calorimetry) foram de no mínimo 10,0 mg e colocadas

em panelas de alumínio, e o padrão utilizado foi o Índio metálico (In). As análises foram realizadas em um equipamento da TA Instruments DSC-2010, USA, com taxa de aquecimento a 10°C/min desde 25°C até 150°C.

3.5.2. Estabilidade diante à collagenase

Este experimento foi realizado utilizando-se a enzima collagenase (tipo V da bactéria *Clostridium histolyticum* da Sigma, 435 UI/mg-C-9263). A extensão da solubilização foi acompanhada pela liberação dos peptídeos solúveis que foram determinados através da hidroxiprolina (Hypro)⁸³, em triplicatas, com os materiais reticulados pela técnica convencional (GA), por GADA e por GADAP, em comparação com a estrutura nativa (pericárdio bovino).

Amostras de PB tratados com GA ou com seus acetais foram embebidas em uma solução aquosa de ácido acético (0,5 mol/L) por 24h, e depois lavadas exaustivamente com solução aquosa de ácido acético a pH 3,5, até o seu equilíbrio a este pH. Atingido o pH 3,5, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizadas até peso constante no liofilizador da Edwards, modelo Modulyo, USA, sendo então guardadas em dessecador com NaOH sólido até o seu uso.

Foram colocados dois discos de PB tratados com GA (convencional, GADA e GADAP) ou não (massa seca próxima de 8 mg) em 5 mL da solução contendo collagenase *Clostridium histolyticum*, tipo V (Sigma) (50U/mL) em solução-tampão Tris-HCl a 10mmol/L e pH 7,4 com CaCl₂(25 mmol/L) para cada intervalo de tempo de 0 a 100 h, e em seguida foi feita uma desaeração em uma bomba de vácuo para melhor penetração da solução na amostra. Após esses

intervalos de tempo, as soluções com as amostras foram centrifugadas, sendo que 1 mL de cada solução sobrenadante foi retirada e hidrolisada na presença de 1,0 mL de HCl (6 mol/L) por 24h para a determinação da concentração de colágeno através da Hypro.

3.5.2.1. Determinação de conteúdo de colágeno via hidroxiprolina

As concentrações de colágeno do PB foram obtidas indiretamente pela determinação do conteúdo de Hypro⁸³. Para tanto, as soluções hidrolizadas foram secadas à baixa pressão em um rota-vapor da Brickman-Buchner, Switzerland, a uma temperatura entre 60 a 70°C. Os resíduos secos foram diluídos em H₂O, de tal forma que as suas concentrações ficassem dentro da faixa da curva de padronização de Hypro, conforme mostrado na Figura 20. A estimativa de diluição foi feita assumindo-se um conteúdo de Hypro de 13%⁸⁴ nas amostras. A metodologia empregada utilizou as seguintes soluções:

- tampão citrato-acetato (0,24 mol/L /0,99 mol/L) a pH 6,0;
- solução de Cloramina-T (0,062 mol/L) em solução de H₂O:n-propanol: tampão citrato-acetato: n-propanol (2,5:2,5) e completado para 25 mL com solução tampão citrato-acetato: n-propanol:H₂O (10:2:3);
- solução de DAB(1,00 mol/L em de n-propanol:ácido perclórico (60% v/v) (7:6,5) e completado para 25 mL com *n*-propanol.

A seguir, as soluções de Hypro de 1µg/mL (11,1 µmol/L) com volumes entre 0,1 a 2,0 mL foram colocadas em tubos de ensaio e o volume completado para 2 mL com H₂O. Adicionou-se a cada amostra 1 mL de solução de Cloramina-T a 20°C deixando-se os tubos em repouso por 20 min. A seguir foi adicionado 1 mL da

solução DAB sob agitação vigorosa e os tubos colocados em banho de H₂O à 60°C. Após 15 min, os tubos foram resfriados e as absorbâncias das soluções lidas em 550 nm, obtendo-se a curva de padronização (Fig. 23), via reação de formação de cromóforo, como mostra a Figura 21⁸⁵.

Figura 20: Curva de padronização para determinação do conteúdo de Hidroxiprolina em amostras de materiais biológicos ricos em colágeno.

Figura 21: Reação entre grupo pirrólico da hidroxiprolina com *N,N*-dimetilaminobenzaldeído para a formação do cromóforo.

3.5.3. Embebição do pericárdio bovino em solução de etanol

Os percentuais de embebição ($E_{\%}$) foram determinados em discos de PB com diâmetro de 1,0 cm submetidos ao tratamento com concentrações crescentes de 0, 30, 70 e 100% de etanol(EtOH). Essas medidas foram realizadas após a redução gradativa de EtOH até o equilíbrio de todos os discos em TF por 24 h, que, depois das lavagens exaustivas com água, foram pesados após a retirada do excesso de água. Cada disco de PB foi então congelado e liofilizado (liofilizador da Edwards, modelo Modulyo) até um peso constante. Os resultados de embebição obtidos correspondem a uma média de três determinações independentes, que foram estabelecidas pela fórmula abaixo:

$$E_{\%} = \frac{(m_{\text{úmida}} - m_{\text{liof.}})}{m_{\text{liof.}}} \cdot 100$$

onde: $m_{\text{úmida}}$ é a massa do PB úmido e $m_{\text{liof.}}$ é massa do PB liofilizado:

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

Discos de 1,0 cm de diâmetro de PB congelados em nitrogênio líquido e liofilizados foram fixados em porta-amstras de alumínio com cola epóxi, as bordas recobertas com pasta de prata para conduzir a corrente elétrica, e depois recobertas com uma camada de ouro (espessura de 30nm). As porta-amstras com os discos circulares fixos foram colocadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da Zeiss®, modelo DSM 960, Germany, operado com um feixe de elétrons primários de 20 keV.

3.5.5. Ensaio mecânico

Foram realizados ensaios mecânicos para determinar a elongação e resistência mecânica das peças de PB reticuladas com GA ou acetais do GA (GADA), segundo a norma técnica do ASTM-D-638 (1984), na Braile Biomédica - Indústria e Comércio e Representações S/A (S. J. Rio Preto - SP). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.6. Caracterização da biofuncionalidade

3.6.1. Manufatura da bioprótese valvular cardíaca com pericárdio bovino reticulado

As biopróteses valvulares cardíacas foram manufaturadas manualmente na Braile Biomédica S.A. com uma peça inteira de PB em uma sala estéril³⁹, com a finalidade de não ocorrer a presença de materiais estranhos durante a manufatura das biopróteses valvulares cardíacas.

Os testes a seguir foram realizados para observar o comportamento hidrodinâmico e de durabilidade acelerada das biopróteses valvulares cardíacas manufaturadas com PB tratado com o novo método, comparando-as com PB e valvas porcinas tratadas convencionalmente comercializados pela Braile Biomédica SA.

3.6.2. Testes de fadiga ou durabilidade acelerada

Os testes foram realizados no aparelho simulador de fadiga da Shelhigh modelo FTS 300 (USA). Este equipamento possui quatro câmaras acrílicas de biopróteses valvulares cardíacas independentes, cada uma conectada a dois foles de silicone flexível que funcionam como uma câmara de complacência (Fig. 22). O

sistema tem um controle único com um indicador de controle da frequência de pulso e um contador de ciclos. A abertura e oclusão da bioprótese valvular cardíaca são obtidos por movimentos alternados dos foles produzidos pelo motor.

A medição da pressão de fechamento foi feita com sensor Millar Mikro-Tip modelo MPC-500, conectado a dois amplificadores modelo TCB-500, ambos da Millar Instruments, Inc. (Houston, TX, USA).

O uso da lâmpada estroboscópica com velocidade variável permite observar a bioprótese valvular cardíaca como se ela estivesse parada ou se movimentando lentamente (na posição desejada), tornando possível avaliar a bioprótese valvular cardíaca durante o teste sem a necessidade de desligar totalmente o aparelho. Todas as biopróteses valvulares cardíacas foram testadas em solução aquosa álcool benzílico a 2,0% com pH de 6,5 a 25°C, obtendo-se uma densidade de 1g/mL⁸⁶ e a pressão de fechamento de 200 a 300 mm Hg.

Figura 22: Simulador de fadiga da Shelhigh modelo FTS 300, contendo: a câmara de acrílico (A), a bioprótese valvular cardíaca (B) e fole de silicone (C).

O aparelho foi ajustado para gerar 1.800 ciclos/min ou 108.000 ciclos/h,

com registro simultâneo do tempo de operação. O total de ciclos é calculado multiplicando-se o número de horas durante as quais a bioprótese valvar cardíaca permaneceu em funcionamento pelo número de ciclos/h, ou seja:

$$\text{Total de ciclos} = 108000 \times n^{\circ} \text{ de horas}$$

Posteriormente ao teste de fadiga acelerada, as biopróteses valvulares cardíacas foram desmontadas e o material biológico analisado histopatologicamente, como descrito a seguir.

3.6.3. Caracterização histopatológica

Cada amostra de 1 cm² de PB tratado com GA na forma de acetais ou convencional passou por processos distintos descritos para suas avaliações histopatológicas⁸⁷, que foram realizadas pela Profa. Sueli Suzigan (Laboratório Riopretense de Anatomia Patológica e Citopatológica S/C Ltda - LARPAC, S.J. Rio Preto - SP). Os corantes utilizados foram: Hematoxilina e Eosina (HE), Sirius Red ou Picrosirius (cora colágeno em vermelho), Tricrômio de Gomori (cora colágeno em verde) e Orceína (cora as fibras elásticas em preto ou marrom escuro). O grau de intensidade foi analisado como máxima para +1/5, moderada para +3/5 e mínima para +5/5.

3.6.4. Performances hidrodinâmicas das biopróteses valvulares cardíacas

As performances hidrodinâmicas foram realizadas em um sistema duplicador de pulso automático da Shelhigh, modelo V. 4.0, USA, para estudo da evolução hidrodinâmica das biopróteses valvulares cardíacas, que consiste numa

câmara acrílica conectada a dois amplificadores, um fluxômetro eletromagnético da Carolina Medical Electronics, Inc., modelo FM 501D (Winstonsalen, NC, USA), transdutor diferencial de pressão e um sensor eletromagnético acoplados a um microcomputador PC AT 286 (Fig. 23).

Esse sistema pode ser configurado para testar bioprótese valvular cardíacas na posição mitral ou aórtica, dependendo da posição do sensor de pressão, e analisa a bioprótese valvular cardíaca de acordo com o protocolo para mitral ou aórtica (Fig. 23). Os testes de performance hidrodinâmica foram realizados com as biopróteses valvulares cardíacas na posição mitral com uma solução aquosa de álcool benzílico a 1% e pH 6,5 a 25°C, com uma densidade de 1 g/mL⁸⁶.

Figura 23: Câmara acrílica de teste para a bioprótese valvular cardíaca nas posições: mitral (M) ou aórtica (A) do duplicador de pulsos automático da Shelhigh, modelo V. 4.0.

As biopróteses valvulares cardíacas de diâmetro de 31 mm foram submetidas a 5 fases de operação correspondentes a 60, 70, 80, 90 e 100 batimentos por minuto (bpm), com volume de ejeção programado de 90 mL por batimento,

conseguindo assim aumentar progressivamente o débito cardíaco simulado. Foram realizados 5 testes para cada bioprótese valvular cardíaca durante 190 min.

Os parâmetros das biopróteses valvulares cardíacas avaliados no duplicador de pulso consistiram em parâmetros do sistema, tais como:

- fração de regurgitação: fração em percentual do volume ejetado que retorna durante o fechamento;

- área efetiva do orifício (AEO): área da bioprótese valvular cardíaca em cm^2 , que abre efetivamente durante o ciclo cardíaco sob fluxo e pressão constantes, obtida pela fórmula de Gorlin:

$$\text{AEO} = \frac{Q}{\text{C.F.} \cdot \sqrt{\Delta P}}$$

onde: Q = fluxo, C.F. = fatores de conversão e ΔP = variação de pressão;

- gradiente pressórico transvalvular: perda de pressão média causada pela bioprótese valvular cardíaca;

- índice de performance (IP) das biopróteses valvulares cardíacas em relação à área efetivamente aberta e a teoricamente calculada:

$$\text{IP} = \frac{\text{área efetiva do orifício}}{\text{área de montagem externa}}$$

- índice de eficiência: semelhante ao índice de performance considerando-se também a fração de regurgitação;

3.6.5. Estudo de calcificação *in vivo*

Os implantes subcutâneos em ratos, *Rattus norvegicus albinus* da

linhagem Holtzmann, foram realizados para a avaliação da calcificação biológica *in vivo* em função da atividade celular local pelo Prof. Dr. Marcos Rossi (Laboratório de Patologia, Faculdade de Medicina de Riberão Preto - USP). O procedimento geral consistiu na implantação de pedaços de aproximadamente 1 cm² do material reticulado, por tricotomia da região dorsal escapular e pélvica (lado direito e esquerdo, com incisões de 2 cm), num total de 4 implantes por animal, seguida de desinfecção com álcool iodado. Neste caso foram utilizados os seguintes PBs reticulados com: método convencional, acetais de GA seguidos do tratamento convencional com GA 0,05% por 9 h e este último seguido pelo tratamento convencional.

Após tempos de 3, 7, 14 e 28 dias, os animais, após anestesia com éter etílico, tiveram as áreas dos implantes removidas e fixadas em formaldeído por 48 horas. Seguiu-se a rotina laboratorial para a inclusão em parafina, e cortes subsequentes de 6 µm de espessura foram colocadas nas lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método Von Kossa (VK) e Hematoxilina e Eosina (HE) para microscopia óptica.

No primeiro caso, deixou-se a lâmina em uma solução aquosa de nitrato de prata (1%) por 60 min. Após esse tempo, foi exposta à luz UV na forma direta da luz solar. A seguir foi lavada três vezes com água destilada e a prata não reagida foi removida pela adição da solução de tiosulfato de sódio (2%) por 5 min e lavada novamente três vezes com água destilada. Após essas lavagens, as lâminas foram coradas com HE, como descrito anteriormente nos ensaios histopatológicos e analisadas pela Profa. Sueli Suzigan (Laboratório Riopretense de Anatomia Patológica e Citopatológica S/C Ltda - LARPAC, S.J. Rio Preto - SP).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Formação de acetais do glutaraldeído em etanol acidificado

A Figura 24 corresponde aos espectros na região do UV das soluções de GA (1,0%) em água (Fig. 24aI e 24bI) e em tampão fosfato a pH 7,4 e 0,13 mol/L (TF) (Fig. 24aII 24bII), após 1h e 22h do seu preparo. Observou-se inicialmente um pequeno pico em 235 nm e outro maior em 280nm, correspondentes as formas: polimérica insaturada e à livre do GA respectivamente em ambas soluções após 1h do seu preparo. Após 22h do seu preparo, a solução de GA em água não apresentou nenhuma variação significativa nas absorbâncias na região do UV utilizada; enquanto em meio de TF manifestou um aumento significativo em 235nm, mostrando que ocorre a formação de polímeros insaturados do GA em TF como utilizado no tratamento convencional, que pode produzir uma reticulação não-homogênea nos tecidos biológicos ao ser tratado nessas condições.

Entretanto, a Figura 24 mostra também que nas condições de uso convencional para reticulação, isto é, em tampão fosfato pH7,40 e 0,13mol/L (TF), a grande variação de absorbância em 235nm é devido ao elevado valor de ϵ (absortividade molar) das formas poliméricas, visto que a sua formação não afeta significativamente a concentração do GA monomérico, e que é um dos responsáveis pela impermeabilização superficial dos tecidos biológicos durante a reação nessa

solução.

Figura 24: Espectros de absorção no ultravioleta para as soluções de glutaraldeído a 1% em: água, tampão fosfato pH7,40 e 0,13 mol/L após: (a) 1 h e (b) 22 h de suas preparações à 25°C.

Um método encontrado para minimizar o efeito da reatividade dos grupos aldeídicos com o tecido e a formação do GA polimérico, é a proteção dos grupos aldeídicos na forma de grupos não reativos ao tecido para que possam se distribuir uniformemente no tecido antes da reticulação. Visto que tanto o acetal quanto o hemiacetal do GA não possuem grupos que possam absorver radiação na região do espectro no UV (Fig. 25), ao contrário do GA nas formas polimérica

insaturada ou livre, que ocorrem em duas regiões bem específicas, em 235 e 280 nm (Fig. 24), correspondentes aos grupos das duplas ligações de carbono-carbono (C = C) e da carbonila (C = O)⁸⁸, foram assim avaliadas as condições para se obter uma solução de GA mais estável com a presença mínima do GA polimérico insaturado em EtOH acidificado, e com os seus grupos aldeídicos protegidos de tal forma que possa ocorrer uma distribuição mais homogênea do reagente no tecido sem a impermeabilização superficial.

Figura 25: Formação do hemiacetal e do acetal a partir do aldeído e um álcool primário em meio ácido.

Estudos comparativos no UV foram realizados com as soluções de GA em EtOH na presença de concentrações variáveis de HCl entre 10⁻² e 10⁻³ mol/L e de GA entre 0,05 e 1,0% (v/v) em um intervalo entre 2 e 96 h (Fig. 26, 27 e 28) para observar a diminuição ou ausência do GA nas formas monomérica e polimérica na região do UV estudado. O intervalo de tempo utilizado nesse experimento deve-se ao tempo necessário para a formação e distribuição homogênea do GA na sua forma protegida dentro da matriz colagênica, no caso do PB, que apresenta uma espessura aproximadamente de 0,3 mm (PB úmido).

Na Figura 26, observa-se o comportamento das soluções de GA em

EtOH a uma concentração de HCl a 10^{-3} mol/L em concentrações variáveis de GA entre 0,05% e 1,0%, em períodos de 2, 24, 48 e 96 h após as suas preparações.

Figura 26: Espectros no ultravioleta das soluções de glutaraldeído em etanol com concentração de HCl a 10^{-3} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50%, (III) 0,10 % e (IV) 0,05% entre 2 e 96 h a 25°C.

Para a solução mais concentrada de GA (1%) em EtOH (Fig. 26aI, 26bI,

26cI e 26dI), observou-se que a solução etanólica acidificada com HCl a 10^{-3} mol/L apresentou um aumento gradativo na região abaixo de 235 nm, com o progresso da reação, o que foi observado também na região próxima de 250 nm após 48h (Fig. 26cI e 26dI). Exceto após 2h em 280nm observou-se a presença do pico correspondente a forma livre do GA, as demais soluções etanólicas nessas regiões ou não apresentavam absorbância ou ocorriam sobreposições de bandas, dificultando a análise em 235 ou 280 nm do UV.

Para a solução de GA 0,5% em EtOH com HCl a 10^{-3} mol/L observou-se um aumento gradativo em duas regiões distintas, uma próxima a 210 nm e outra em 250 nm (Fig. 26aII, 26bII, 26cII e 26dII) para todas as soluções, excetuando-se aquele no período de 24h, que possuía um pico próximo a 280 nm.

No caso da solução de GA 0,1% em EtOH com HCl a 10^{-3} mol/L observou-se inicialmente um aumento gradativo na absorbância na região abaixo de 230 nm (Fig. 26aIII), que se tornou mais intensa à medida que aumentava intervalo de tempo (Fig. 26aIII, 26bIII e 26cIII e 26dIII). Enquanto a solução de GA a 0,05% em EtOH com HCl a 10^{-3} mol/L apresentou um pico com aumento gradativo próximo a 225 nm (Fig. 26aIV) e, após 24h, surgiu gradativamente uma região com valor de absorbância negativo na região próxima a 235 (26bIV, 26cIV e 26dIV).

A solução mais diluída de GA (0,05%) em EtOH apresentou banda em 225 nm, que não variou significativamente com o aumento do intervalo de tempo. Esses resultados mostram, exceto pela solução mais diluída (0,05%), que as soluções de GA em EtOH na presença de HCl a 10^{-3} mol/L não apresentavam uma solução homogênea e estável no período estudado.

A Figura 27 mostra o comportamento das soluções de GA em EtOH a uma concentração de HCl a 3×10^{-3} mol/L nas mesmas concentrações de GA e intervalos de tempo da Figura 26, que comparativamente apresentou maiores absorvâncias principalmente para as concentrações maiores do 0,05% de GA.

Para a solução mais concentrada de GA (1%) em EtOH acidificado observou-se a formação de um pico de pequena intensidade próximo a 280 nm (Fig. 27aI), correspondente a forma monomérica do GA, e uma região abaixo de 225 nm que aumentou gradativamente a absorvância com a diminuição do comprimento de onda. Contudo, não se observou nenhuma modificação significativa nos valores de absorvância na região do UV estudada em diferentes intervalos de tempo (Fig. 27bI, 26cI e 26dI).

Mas as soluções de GA em EtOH com HCl 3×10^{-3} mol/L e concentrações de GA a 0,5 e 0,1% apresentaram comportamentos significativamente semelhantes, apesar das intensidades serem diferentes (Fig. 27aII e 27aIII), podendo-se observar novamente nas regiões abaixo de 250 nm, que a solução de GA 0,5% teve um aumento considerável de absorvância à medida que diminui o comprimento de onda, formando uma banda de absorvância próximo a 225 nm. Para os intervalos maiores de tempo, os comportamentos de absorvância dessas soluções mostraram um aumento gradativo com o aumento do intervalo de tempo (24 a 96h), sendo novamente mais intensas para a de concentração de 0,5%, principalmente em 225 nm quando comparada àquela de menor concentração (0,1%) (Fig. 27bII, 27bIII, 27cII e 27cIII).

Figura 27: Espectros no ultravioleta das soluções de glutaraldeído em etanol com concentração de HCl a 3×10^{-3} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50%, (III) 0,10 % e (IV) 0,05% entre 2 e 96 h a 25°C.

A solução mais diluída de GA (0,05%) em EtOH apresentou banda negativa em 225 nm, que aumentava lentamente com o aumento do intervalo de

tempo. Nesta concentração de HCl, apenas a solução de GA a 1% apresentou-se mais homogênea e sem variação significativa na absorção nos intervalos de tempos estudados com pequenas quantidades de GA polimérico e monomérico.

No caso da Figura 28, observou-se o comportamento das soluções de GA em EtOH com uma concentração de HCl a 10^{-2} mol/L nas mesmas concentrações de GA e intervalos de tempo da Figura 26, que em relação às Figuras 26 e 27 apresentou valores negativos de absorbâncias para soluções de GA com concentrações menores de 1,0%.

Para a solução mais concentrada de GA (1%) ocorreu a formação de uma banda próxima a 225 nm (Fig. 28aI), que aumentou gradativamente até 48h (Fig. 28bI e 28cI); e que, a 96h reduziu significativamente (28dI). No caso da solução de GA em EtOH acidificada com GA 0,1% (Fig. 28aIII, 28bIII, 28cIII e 28dIII) mostrou um comportamento de absorbância contrário a solução mais concentrada de GA, apresentando valores de absorbância negativos.

As duas outras soluções de GA em EtOH acidificado com concentrações de GA a 0,05 e 0,5% apresentaram inicialmente comportamento de absorbância similares para as regiões entre 250 e 350 nm; enquanto que para as regiões menores que 250 nm, a solução etanólica com concentração de GA (0,5%) teve um aumento gradativo de absorbância quanto menor o comprimento de onda (Fig. 28aII e 28aIV). Contudo, à medida que aumentava o intervalo de 2 para 96h, essas duas soluções começaram a apresentar absorbâncias negativas na região abaixo de 250 nm, sendo mais intensas para a solução de menor concentração de GA (0,05%) (Fig. 28aIV, 28bIV, 28cIV e 28dIV).

Figura 28: Espectros no ultravioleta das soluções de glutaraldeído em etanol com concentração de HCl a 10^{-2} mol/L na presença de glutaraldeído a: (I) 1,00%, (II) 0,50%, (III) 0,10 % e (IV) 0,05%, entre 2 e 96 h a 25°C .

As absorvâncias negativas mostradas nas Figuras 27 e 28 devem-se à presença de água liberadas durante a formação do acetal. Os deslocamentos dos picos

de absorbâncias provavelmente devem-se ao solvente e/ou à formação do hemiacetal e acetal na solução.

Portanto, as Figuras 26, 27 e 28 mostraram, exceto pela solução de GA em EtOH com concentração de HCl 3×10^{-3} mol/L e GA 1,0%, que os comportamentos espectrofotométricos no UV (200 a 350 nm) das soluções de GA em EtOH nas concentrações de HCl entre 10^{-2} e 10^{-3} mol/L e GA nas concentrações entre 0,05% e 1,0%, em intervalos de tempo entre 2 e 96 h das suas preparações, foram muito variáveis, devido à presença de grupos aldeídicos livres e de polímeros insaturados do GA, o que os torna não recomendáveis para a reticulação de matrizes colagênicas.

Uma vez encontrada a solução que apresentou a melhor condição de formação dos hemiacetais ou acetais (solução de GA em EtOH com HCl $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L e GA 1,0%), esta foi comparada com os espectros no UV das soluções de GA (1%) em tampão fosfato a pH 7,4 e 0,13 mol/L (TF) (Fig. 29-I), água (Fig. 29-II), EtOH (Fig. 29-III) e em EtOH com $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L de HCl (Fig. 29-IV), após 1 h (Fig. 29a) e 22 h (Fig. 29b) das preparações das soluções a 25°C, e após 22 h seguido de 1 h a 40°C (Fig. 29c). Neste caso utilizando uma solução estoque de GA depois de dois meses da sua purificação.

Todos os espectros da Figura 29 foram caracterizados pela presença de dois máximos de absorções em 280 e 235 nm, correspondentes às absorções de GA livre e polimérico, respectivamente^{40, 64}.

Figura 29: Espectros de absorção no ultravioleta para as soluções de glutaraldeído em: água, tampão fosfato, EtOH e EtOH acidificado de glutaraldeído a 1% após: (a) 1 h e (b) 22 h de suas preparações a 25°C; (c) após 22 h seguido de 1 h a 40°C.

Os espectros no UV da Figura 29 mostram para todos os casos alterações nas curvas de absorbância das soluções de GA. As variações mais significativas no entanto só foram observadas para as soluções de GA em TF (Fig. 29cI), cuja

característica foi um aumento significativo da absorbância em 235nm; e para a solução de GA em EtOH acidificada com HCl a $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L⁸⁹⁻⁹⁰, na qual ocorreu uma redução drástica, praticamente desaparecendo o pico correspondente à banda com λ_{max} igual a 280nm (Fig. 29b e 29c), relativo ao GA livre, correspondente à dupla ligação do grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) da função aldeídica.

Tendo em vista que a relação 280/235 é uma medida da variação das concentrações relativas do GA livre em relação às formas poliméricas⁶³, as variações destas relações em função do tempo e das condições da solução também foram avaliadas (Tabela I).

Tabela I: Variações das absorbâncias e valores da relação 280/235nm para soluções de GA (1%) em: água, tampão fosfato (pH 7,4) e etanol acidificado ou não, antes e após o aquecimento a 40°C.

λ (nm)	Absorbância em função do tempo de reação ^a											
	Tampão (I)			H ₂ O (II)			EtOH (III)			EtOH/HCl (IV)		
	1h	22h	23h ^b	1h	22h	23h ^b	1h	22h	23h ^b	1h	22h	23h ^b
280	0,51	0,51	0,61	0,47	0,46	0,54	0,21	0,14	0,14	0,11	0,02	0,03
235	0,16	0,64	1,05	0,12	0,08	0,12	0,12	0,10	0,08	0,07	0,07	0,07
<u>280</u> 235	3,00	0,80	0,60	3,80	5,20	4,20	1,60	1,30	1,70	1,60	0,20	0,40

^a - estes dados são referentes aos espectros da Fig. 29;

^b - tempo de reação de 22 h seguido de 1 h a 40°C.

Para soluções aquosas de GA, os valores observados para a relação de 280/235 nm após 1 h (Fig. 29aII), 22 h (Fig. 29bII) e 22 h de reação seguidas de 1 h a 40°C (Fig. 29cII e Tabela I) foram de respectivamente 3,8, 5,2 e 4,2, o que sugere

que, sob temperatura ambiente, as soluções de GA têm o seu equilíbrio deslocado no sentido da forma de GA livre. Isso provavelmente se deve às formas de hemiacetais poliméricos já existentes na solução-estoque de GA que estão formando o GA livre. No entanto, esse equilíbrio é desfavorecido pelo aquecimento da solução, como mostrado pelo decréscimo da relação 280/235 (Tabela I) para um valor de 4,2.

Para o caso das soluções tamponadas de GA, os valores observados para a relação 280/235 para tempos de equilíbrio de 1 h (Fig. 29aI), 22 h (Fig. 29bI) e 22 h de reação seguidas de 1 h a 40°C (Fig. 29cI) foram de respectivamente 3,0, 0,8 e 0,6 (Tabela I). Estas reduções das relações sugerem que, diferentemente das soluções aquosas de GA, em soluções tamponadas a concentração das estruturas poliméricas aumenta constantemente em função do tempo e das condições empregadas na reação. Essas condições podem causar a impermeabilização superficial e os efeitos citotóxicos pós-implantes das biopróteses valvulares cardíacas, comprometendo as suas propriedades mecânicas e biológicas.

As soluções de GA em EtOH, no entanto, mostraram um comportamento bem diferenciado quando comparadas com as soluções aquosas ou tamponadas de GA. Nos dois casos, as soluções de GA em EtOH e EtOH/HCl (Fig. 29aIII, 29bIII, 29cIII e 29aIV, 29bIV e 29cIV) foram caracterizadas pela presença de duas bandas bem definidas de absorções em 235 e 280 nm, com uma característica comum, que foi a redução significativa das absorbâncias em 280 nm, indicativa de uma redução nas concentrações de GA livre nos dois casos. Esse efeito foi muito mais pronunciado para a solução ácida, cujos valores de absorbância para o intervalo de tempo de 22 h foi praticamente zero, provavelmente em função da catálise promovida pela espécie H^+ presente, como mostra o esquema da Figura 26. As

relações 280/235 para as soluções de EtOH e EtOH/HCl após 1 h e 22 h a 25°C, e 22 h seguido de 1 h a 40°C, foram respectivamente de 1,66, 1,33, 1,75 e 1,67, 0,26 e 0,41.

Apesar do acréscimo da relação 235/280 para a solução de ETOH/HCl para 22h e 1 h a 40°C, o valor da forma polimérica (235 nm) continua constante e igual a 0,07, assim como o valor em 280 é apenas de 0,03. Isso provavelmente mostra que uma pequena quantidade da forma polimérica é ainda estável mesmo em meio EtOH/HCl.

Diferentemente dos perfis dos espectros no UV observados para soluções aquosas e tamponadas de GA, as diminuições das absorbâncias observadas em 280nm não foram acompanhadas por aumentos simultâneos das absorbâncias em 235nm, sugerindo que o desaparecimento do GA livre nas soluções de EtOH não está associada à formação de espécies poliméricas. Nestas condições, devido à alta concentração de EtOH, que não favorece a formação dos hemiacetais (GAHA), os acetais (GADA) devem ser a forma química predominante para o GA (Esquema I). Nos dois casos, os aumentos de temperatura favoreceram a forma livre de GA, como sugerido pelos aumentos observados pelas relações de 280/235.

Nos dois casos dos estudos espectrofotométricos ocorreu uma diferença significativa dos picos de absorbância tanto em 235 quanto em 280nm para a solução de GA a 1,0% em EtOH com $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L de HCl (GADA), já que eram soluções estoques de GA com intervalos de tempos diferentes após a sua purificação, como pode ser observado tanto para a solução aquosa quanto para a solução tamponada de GA, nas quais ocorrem um pico de absorbância em 235 nm, correspondente a forma polimérica de GA.

4.2. Estabilidade térmica e embebição do pericárdio bovino em EtOH

Uma das preocupações na introdução da reticulação do PB por meio de acetais de GA está associada à prolongada exposição do material ao etanol, pois não só a reação é realizada em meio alcoólico mas também sua estocagem. Os resultados da Tabela II mostram o comportamento da estabilidade térmica para PBs submetidos a estas condições. Enquanto para o PB nativo equilibrado em TF o valor de T_s foi de $63,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$, para o PB mantido em etanol nas concentrações de 30, 70 e 100%, os valores de T_s foram de respectivamente $64,5 \pm 1,2$, $65,5 \pm 0,4$ e $65,3 \pm 0,4^\circ\text{C}$, indicando que, do ponto de vista da estabilidade térmica, as variações estruturais não foram significativas.

Tabela II. Valores de embebição e temperatura de encolhimento para pericárdio bovino submetido a diferentes concentrações de EtOH por 24 h.

Propriedade	EtOH (%)			
	0	30	70	100
Embebição (%)	$76,6 \pm 1,0$	$79,2 \pm 1,4$	$78,5 \pm 2,1$	$78,5 \pm 1,0$
$T_s (^{\circ}\text{C})^{(a)}$	$63,6 \pm 0,5$	$64,5 \pm 1,2$	$65,5 \pm 0,4$	$65,3 \pm 0,4$

^(a): valores determinados após equilíbrio do material em TF por 24 h.

Eventuais alterações estruturais também podem ser detectadas pelo parâmetro de embebição tendo em vista a capacidade desidratante do EtOH. Os resultados da Tabela II mostram os valores de embebição de PB nativo e de amostras de PB mantidas inicialmente em EtOH por 24 h, seguidos do equilíbrio em TF por

24h. Enquanto para o pericárdio nativo o valor da embebição foi de $76,6 \pm 1,0\%$, para os materiais previamente equilibrados em EtOH 30, 70 e 100% estes valores foram de respectivamente $79,2 \pm 1,4$, $78,5 \pm 2,1$ e $78,5 \pm 1,0\%$. Esses resultados confirmaram os de estabilidade térmica, indicando que a passagem gradual do PB de soluções aquosas tamponadas para EtOH absoluto não alterou significativamente a estrutura do PB, podendo, desta forma, realizar a reticulação neste solvente.

4.3. Reticulação do pericárdio bovino com acetais do glutaraldeído

Os resultados da Figura 30 correspondem aos valores de estabilidade térmica determinados como T_s das peças de PB equilibradas por 48 h em uma solução de GA em EtOH, contendo 1,0% de GA e 3×10^{-3} mol/L de HCl e que em seguida foram expostas aos vapores de TEA por intervalos de tempo entre 0 e 72 h.

Figura 30: Temperatura de encolhimento do pericárdio bovino tratado com acetais de GA 1,0% e de HCl $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L por 48h após exposição aos vapores de TEA em diferentes intervalos de tempo.

Estes resultados mostraram os aumentos progressivos na estabilidade

térmica, que variou de $63,6 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para o pericárdio nativo até um valor de $85,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ após 24 horas. Após esse período, os valores de T_s mantiveram-se constantes e os valores para 48 e 72h foram de respectivamente $86,8 \pm 0,5$ e $86,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Tal resultado, por um lado, mostrou que o princípio da proteção do GA como hemiacetais ou acetais (Figura 31), na prática, funciona de modo efetivo, pois os valores de T_s obtidos se enquadram dentro daqueles aceitos para PB tratado com GA pelo processo convencional e que devem ser $> 83^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, os resultados da Figura 30 mostram também que tanto a reação de desproteção do GA quanto a reação de reticulação se processam praticamente dentro de 24 horas, visto que após esse período, os aumentos de T_s não foram significativos.

Figura 31: Esquema de distribuição homogênea do GA na forma protegida dentro da matriz colagênica e sua liberação por base orgânica, trietilamina.

A eficiência da proteção do GA via acetais foi confirmada por experimentos e comparações mostrados na Tabela III referentes aos valores de estabilidade térmica do PB determinada como T_s para as várias etapas pelas quais

passa a rotina estabelecida para a reticulação de PB por meio de GADA^{85,86} e em comparação com o procedimento convencional. Os valores de Ts para PB exposto à solução de EtOH mais HCl 3×10^{-3} mol/L e, em seguida aos vapores de TEA foram de respectivamente $64,9 \pm 0,5$ e $67,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$, que não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para PB nativo ($63,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$) ou equilibrado em EtOH absoluto ($65,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Esses resultados sugerem que as exposições de PB a soluções de EtOH/HCl e TEA de modo sequencial, por tempos superiores a 24 h também não produziram alterações significativas na estrutura da matriz. Não observando a desnaturação do tecido, foi adicionado, então, o GA a 1% à solução de EtOH/HCl para a difusão do reagente no tecido.

Tabela III: Valores de estabilidade térmica determinada por temperatura de encolhimento de matrizes colagênicas tratadas com GA em comparação com matrizes tratadas com acetais de GA.

Temperatura de encolhimento ($^\circ\text{C}$) ^(a)									
Pericárdio nativo				Pericárdio Reticulado					
TF	EtOH			GA ^(b)		GADA			
	---	HCl	HCl/ TEA	48h	96h	lav. EtOH/ TEA ^(c)	48h ^(d)	96h ^(d)	96/TF (GA 0,05%) ^(e)
$63,6$ $\pm 0,5^{(f)}$	$65,3$ $\pm 0,5$	$64,9$ $\pm 0,5$	$63,6$ $\pm 0,5$	$85,2$ $\pm 0,5$	$86,2$ $\pm 0,5$	$67,8$ $\pm 0,5$	$84,5$ $\pm 0,5$	$87,0$ $\pm 0,5$	$89,0$ $\pm 0,5$

(a) - as temperaturas de encolhimento foram obtidas após equilíbrio em TF por 24 h;

(b) - tratado com GA 0,05% em tampão fosfato 0,0740, 0,13mol/L;

(c) - determinados após lavagens exaustivas com EtOH e exposição em TEA;

(d) - determinados após 24h de exposição a vapores de TEA, após tratamento com GADA;

(e) - tratado com GADA por 96h, em seguida tratado com GA(0,05%) em TF por 9h

(f) - erro experimental.

Para os casos de PBs equilibrados previamente em solução de GADA por tempos de 48 e 96 h, com posterior exposição a vapores de TEA por tempo de 24 h, os valores de T_s determinados foram de respectivamente $84,5 \pm 0,5$ e $87,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, bastante próximos àqueles obtidos pelo tratamento convencional (Tabela III).

Entretanto, amostras de PB equilibradas previamente em solução de GADA (concentração nominal de GA a 1,0%) seguidas por lavagens exaustivas com EtOH e posteriormente expostas a vapores de TEA, deram origem a materiais com um valor de T_s de $67,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$, muito próximo àqueles obtidos para o material nativo ou àqueles equilibrados em EtOH, EtOH/HCl ou EtOH/HCl/TEA, cujos valores de T_s oscilaram entre $63,6$ e $65,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Tabela III). Esses resultados mostraram que a lavagem do PB com EtOH, anterior ao tratamento com TEA, removeu as formas protegidas do GA (GADA) do interior da matriz e portanto nenhuma reação de reticulação ocorreu como demonstra o valor de T_s obtido para estes materiais.

Portanto os resultados da Figura 29 e aqueles da Tabela III mostram que o GA em EtOH e na presença de ácido tem seus grupos aldeídicos eficientemente protegidos na forma de acetais (GADA), e sob esta forma impedidos de reagir com os grupos aminos livres da proteína para a formação da base de Schiff ($-\text{CH}=\text{NH}-$). A reatividade da função aldeídica só é restaurada após a exposição à TEA.

Assim sendo, a expectativa é que, sob esta forma o reagente pode difundir-se mais homoganeamente na matriz, dando origem a reações de reticulação mais homogêneas e, como mostram as Figuras 26, 27 e 28, sem a introdução de ligações de reticulação formada por GA polimérico.

O tratamento do material exposto a soluções de GADA por 96h, seguido

pela metodologia convencional (TF com GA 0,05%) durante 9h, não induziu a um aumento substancial do valor de T_s , que foi de $89,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em comparação com um valor de T_s de $87,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ daquele tratado apenas com GADA. Como dado comparativo, o tratamento de PB com soluções de GA a 0,5%, nas condições convencionalmente utilizadas para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, deu origem a materiais com valores de T_s de $85,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $86,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$, para tempos de reação de 48 e 96 h, respectivamente (Tabela III).

Os dados de estabilidade térmica obtidos por T_s foram confirmados também por DSC e os termogramas são mostrados pela Figura 32. Para o caso do PB tratado apenas com GA pelo procedimento convencional (GA 0,5% em tampão fosfato, pH 7,4 e 0,13 mol/L por 18 dias), o valor do pico da temperatura de transição foi de $90,4^\circ\text{C}$ (Fig. 32d), em comparação com o valor de $87,7^\circ\text{C}$ para o PB tratado com GADA (Fig. 32b). Este último, tratado em seguida com GA 0,05%, em TF por 9h, deu origem a uma transição térmica em $91,4^\circ\text{C}$ (Fig. 32c) em comparação com aquela do PB nativo em $69,7^\circ\text{C}$ (Fig. 32a).

Estes resultados acima confirmaram de modo seguro que não ocorria a desnaturação da matriz colagênica presente no PB durante todo o processamento envolvendo a técnica de reticulação com GADA. As transições observadas acima de 100°C (Figura 32) correspondem à perda de moléculas de água contidas na matriz do PB.

Figure 32. Termogramas do PB: nativo (a); tratado com GA 0,5% em tampão fosfato por 18 dias (b); tratado com GADA equilibrado por 96 h e exposto a vapores de TEA (c) e tratado com GADA equilibrado por 96 h e exposto a vapores de TEA e tratado com GA 0,05% por 9 h (d).

A eficiência da reação do GA na forma de diacetais (GADA) ficou demonstrada, quando comparamos os volumes e as concentrações efetivas utilizadas para a reação com PB, em comparação ao procedimento convencional. Considerando-se que os volumes de embebição para PB em EtOH foram similares àqueles determinados para TF (Tabela II), o volume efetivo de reagente disponível para a reação por grama de PB (g_{PB}) seria de cerca de 0,77 mL. Este volume corresponderia a uma concentração efetiva de GA cerca de 108 $\mu\text{moles}/g_{PB}$ para o GA na forma de GADA, em comparação com 271 $\mu\text{moles}/g_{PB}$, para o caso da solução de GA a 0,05% (volume total de 5 ml). Como o número estimado de μmoles de grupos aminos nos resíduos de lisinas/ g_{PB} é de 30,8 $\mu\text{moles}/g_{PB}$, considerando-se

a similaridade dos valores de T_s obtidos nos dois casos, em bases molares, o GA na forma de GADA foi cerca de 2,5 vezes mais eficiente do que o GA (processo convencional). Esse resultado pode ser confirmado através das caracterizações a seguir, principalmente através dos testes de estabilidade frente à ação da collagenase, que serão mostrados mais adiante.

Embora os resultados de UV obtidos mostrassem que a melhor condição de obter uma solução homogênea na forma de acetais ou hemicetais era aquela de 1,0% de GA e HCl 3×10^{-3} mol/L, foram ainda realizados estudos de estabilidade térmica de PB tratados em soluções de EtOH com concentrações variáveis de GA entre 0,5 e 2,0%, e de HCl entre $1,0 \times 10^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L com tempos variáveis entre 0 a 72 h, e exposição aos vapores de TEA por 24 h (Fig. 33). Esse experimento foi realizado para confirmar a eficiência do processo de formação do GADA obtida através das análises das Figuras 26, 27 e 28.

Observou-se que para concentração de GA 0,5% (Fig. 33aI), a estabilidade máxima do PB obtida após 96h foi aquele que tratado na presença de HCl 10^{-1} mol/L, cujo valor foi de $81,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$, enquanto os demais tratamentos com concentrações de HCl de 10^{-2} , 3×10^{-3} e 10^{-3} mol/L, os valores de T_s foram respectivamente de $80,2 \pm 0,3$, $79,0 \pm 0,3$ e $77,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$. Contudo nenhum deles chegou a uma temperatura constante no intervalo de tempo estudado.

Na Figura 33b, observou-se um aumento gradativo também na maioria das concentrações de HCl até 48 h de tratamento, com o valor de T_s obtido de $85,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$, chegando ao valor máximo de $86,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para aquele que foi tratado com HCl a $3 \cdot 10^{-3}$ mol/L e GA 1,0% (Fig. 33bI).

Figura 33: Temperatura de encolhimento de pericárdio bovino tratado com concentrações variáveis de acetais de glutaraldeído e de HCl, após a exposição aos vapores de trietilamina por 24 h.

Nas demais concentrações de HCl, observou-se que os valores de T_s tiveram também um aumento gradativo até 48h, mas com valores menores que

83,0°C (Fig. 33bII, 33bIII, 33bIV). Enquanto que na Figura 33c, na qual a concentração de GA foi de 2,0%, observou-se um aumento gradativo similar para todas as concentrações de HCl (10^{-1} a 10^{-3} mol/L), tornando-se quase constantes após 48h de tratamento, com valores de Ts máximos menores que 83,0°C após 96 h de tratamento.

Os resultados acima mostraram que, para a concentração de GA menor que 1% (Fig. 33a), ou a concentração do ácido era tão grande que a exposição posterior aos vapores de TEA não conseguiram neutralizá-los, ou a concentração do GA era tão diluída que não apresentaram uma reticulação máxima, obtendo valores de Ts constantes menores de 83,0°C (Fig. 33a).

No caso da concentração de GA maior que 1%, não houve aumento considerável na estabilidade térmica do PB após a exposição aos vapores de TEA, devido ao excesso de GA (2%), que forma uma superfície quase impermeável, dificultando ou impedindo a entrada dos vapores de TEA no seu interior (Fig.33c), obtendo-se assim colágeno nativo no seu interior, obtendo assim valores de Ts menores do que 83°C.

Nesses resultados, observou-se também que a condição que atingiu o maior valor de estabilidade térmica das peças de PB tratado com solução etanólica foi aquela que continha as seguintes concentrações de HCl a 3×10^{-3} mol/L e de GA a 1,0%(v/v), em que o valor de Ts atingiu em torno de $85,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$ após 48 h de equilíbrio em solução de acetais de GA, chegando a $86,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ após 96h de equilíbrio, seguido da exposição aos vapores de TEA por 24 h.

Esses dados de Ts comprovaram também os resultados obtidos dos

espectros no UV das soluções de EtOH da Figuras 26, 27 e 28, contendo o ácido forte e o GA, onde a solução mais estável espectrofotometricamente apresentou também uma liberação do grupo aldeído protegido na forma de acetal mais facilmente, não necessitando de concentrações mais fortes de HCl para formar o acetal.

Os resultados acima mostram que o GA quando em EtOH acidificado tem seus grupos aldeídicos efetivamente protegidos, e sob a forma como se encontram, provavelmente diacetais (GADA), não são capazes de reagir com os grupos aminos livres da proteína para a formação da base de Schiff ($-\text{CH}=\text{NH}-$). Esta ligação só é formada, e de modo eficiente, quando comparada com os métodos convencionais, após a exposição do material aos vapores de TEA (Tabela III).

4.4. Caracterização do pericárdio bovino

4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) de PB tratado com GADA a 1% (Fig. 34a) mostrou que, exceto por uma maior compactação do tecido, a estrutura fibrilar presente no tecido nativo é mantida, e também não existem diferenças estruturais significativas quando comparado com aqueles tratados com soluções tamponadas de GA a 0,5% (Fig. 34b), como foi verificado anteriormente pelos dados de estabilidade térmica, tanto por DSC como por Ts.

Essa maior compactação deve-se provavelmente a uma modificação da estrutura, extração de lipídeos ou alteração na quantidade de água na estrutura fibrilar ao tratar o pericárdio bovino com etanol⁴³.

Figura 34. Fotomicrografias de microscopia eletrônica da superfície de PB: tratado convencionalmente com glutaraldeído a 0,5% por 18dias (a) e tratado com soluções de acetais de glutaraldeído por 96h seguido da exposição à trietilamina por 24h (b).

4.4.2. Estabilidade a collagenase

As curvas da Figura 35 mostram os ensaios da estabilidade frente à collagenase, de PB nativo (Fig. 35a) em comparação com os PB tratados com soluções tamponadas de GA a 0,05% (Fig. 35b), soluções de GADA/TEA (Fig. 35c) e GADA/TEA após o tratamento convencional com GA a 0,05% (Fig. 35d). A ordem de estabilidade biológica crescente determinada para o PB foi: nativo < reticulado convencionalmente com GA 0,05% em TF por 96h < reticulado com GADA 1% por 96h = reticulado com GADA 1% seguido do tratamento convencional com GA 0,05% por 9h. Enquanto, após 80 h, a estabilidade dos materiais obtida pelo método convencional apresentou uma extensão de hidrólise de cerca de 6%(m/m), para os materiais tratados com GADA, os percentuais de hidrólise após 80 h se estabilizaram em cerca de 1%, estabilidade esta que não foi implementada por tratamento posterior com soluções de GA pelo método convencional (Fig. 35d).

Esses resultados mostram que o tratamento do PB com GADA dá provavelmente origem a estruturas mais estáveis à ação da enzima, quando comparados com o procedimento convencional, pressupondo também uma maior homogeneidade da reticulação com GA, aumentando assim a estabilidade biológica pós-implante, visto que a collagenase é a única enzima existente nos tecidos a atuar eficientemente sobre matrizes colagênicas, que dependem inversamente do número de reticulação presente nestas matrizes. Isso mostra a eficiência da reticulação do PB com acetais de GA 1% numa concentração de GA ($108 \mu\text{moles/g}_{\text{PB}}$) menor em relação ao tratamento convencional com GA (0,05%, $271 \mu\text{moles/g}_{\text{PB}}$), visto anteriormente.

Figura 35: Estabilidades relativas à hidrólise por collagenase para o pericárdio bovino quando: nativo (a); tratado com soluções de GA a 0,05%, pH 7,4, 0,13M, (b); 1% GA na forma de acetais (c); 1% GA na forma de acetais, seguido do tratamento convencional com GA a 0,05% (d).

4.4.4. Ensaio Mecânico

A tensão de ruptura e módulos de elongação na quebra determinados para PB reticulado com GADA foram de respectivamente $1,67 \pm 0,33 \text{ kgf/mm}^2$ ($12,60 \pm 2,0 \text{ N/mm}^2$) e $59,2 \pm 6,8\%$, comparáveis àqueles valores de aceitação para a manufatura das biopróteses valvulares cardíacas (Tabela IV), demonstrando que este novo procedimento apresenta-se como um novo método para a obtenção de materiais com características mecânicas desejáveis para a manufatura da bioprótese valvular cardíaca.

Tabela IV. Dados de ensaio mecânico e temperatura de encolhimento do pericárdio bovino reticulado com acetais de glutaraldeído e o método convencional.

Características físico-mecânicas	Tipo de tratamento do PB		
	GADA	GADAP	Valores aceitáveis ^a
Espessura (mm)	$0,29 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01$	0,25/0,35
Tensão de ruptura (kgf/mm ²)	$1,67 \pm 0,33$	$1,46 \pm 0,10$	>1,50
Elongação (%)	$36,3 \pm 1,8$	$50,8 \pm 5,0$	>17,0
Índice de tenacidade	$12,5 \pm 2,0$	$32,6 \pm 4,2$	>11,5

^a: Valores de aceitação para o PB reticulado convencionalmente para manufatura de biopróteses valvulares cardíacas⁸⁷.

A comparação apenas dos valores de índice de tenacidade e de elongação dos materiais obtidos com GADA e aquele tratado com GADA seguido do tratamento convencional (GADAP) mostra que esses materiais são aparentemente mais dúcteis e rígidos, isto é, são tecidos com maior capacidade de deformação, necessitando de maior energia para o rompimento, reforçando ainda mais a ideia de

aplicação para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas.

4.5. Caracterização da Biofuncionalidade

Este item discute a caracterização *in vitro* e *in vivo* dos parâmetros necessários e que precedem o início dos experimentos de implantes das biopróteses valvulares cardíacas em animais, uma rotina indicada pelo FDA (Food and Drug Administration - USA). Essas avaliações incluem os testes de durabilidade acelerada associada as alterações histopatológicas antes e após a eles, estudos de calcificação em subcutâneo de rato e de performance hidrodinâmica, sendo utilizadas nos testes de fadiga e performance hidrodinâmica apenas as biopróteses valvulares cardíacas de PB tratado com GADAP e de PB e de valvas porcinas com tratamento convencional (Fig. 36).

Figura 36: Biopróteses valvulares cardíacas de: pericárdio bovino (a e b) e de valvas porcinas com tratamento convencional (c e d) e pericárdio bovino reticulado com acetais do glutaraldeído, seguido do tratamento convencional (e e f).

4.5.1. Teste de Durabilidade Acelerada ou Fadiga

As biopróteses valvulares cardíacas utilizadas no teste de durabilidade acelerada ou fadiga foram a de PB tratado convencionalmente (TF, GA 0,5% por 18 dias) e a de PB tratado com acetais de GA seguido do tratamento convencional (TF, GA 0,05% por 9h). Os resultados preliminares obtidos mostraram que a bioprótese valvular cardíaca manufaturada com PB tratado com acetais de GA seguindo do tratamento convencional (TF, GA 0,05% por 9h) (GADAP) apresentou destruição da estrutura (esgarçamento ou ruptura) do PB tratado após 310 milhões de ciclos, correspondentes a 7,5 anos de implante em um paciente humano, ultrapassando os valores mínimos de teste recomendados pela FDA de 150 milhões de ciclo (correspondentes a 3,5 anos de implante). Para isso, foram coletadas as amostras do centro e da lateral das biopróteses valvulares cardíacas para estudo histopatológico, após cerca de 150 milhões de ciclos para a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado convencionalmente e cerca de 300 milhões para a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com acetais do GA (1,0%) seguido do tratamento convencional com GA (0,05%) por 9h (GADAP).

4.5.2 Ensaios histopatológicos

A presença de fibras colagênicas e elásticas íntegras com distribuição homogênea são de importância vital para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, pois só existem estes tipos de estruturas em maior quantidade no PB, assim como a presença de espaços vazios dentro do material pode diminuir as suas propriedades mecânicas e biológicas, facilitando a sua calcificação biológica após o implante. O pericárdio bovino após fixação com GA 0,5% em TF por 18 dias

(método convencional), antes do teste de fadiga é considerado ideal ou com as características mínimas de aceitação (CMA) para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, quando as suas fibras colagênicas mostram-se pouco retificadas (2+/5 em uma escala de 1+/5 a 5+/5), com celularidade preservada (2+/5) (Tabela V)¹⁵.

Tabela V: Resultados histopatológicos de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído comparado com as características mínimas de aceitação (CMA).

Características Histopatológicas ^a	Tipo de tratamento do PB		
	GADA ^b	GADAP ^c	C.M.A.
Retenção de Fibras Elásticas	2 (Concentração lateral)	2 (distribuição homogênea)	2 a 3
Número de Vasos	1 Periféricos	2 Periféricos	1 Periféricos
Celularidade	1	2	2
Fragmentação de fibras colagênicas	1 (Espaços de 2+/5, com localização heterogênea)	(Espaço de 1+/5 localização heterogênea)	-----
Fragmentação de Fibras Elásticas	1(Fibras delicadas com distribuição periféricas)	(fibras delicadas, distribuição homogênea)	-----

^a: grau de fibras degradadas (1+/5: mínima, 5+/5: máxima degradação). Corantes utilizados: Hematoxilina, Sirius red, Orcina, Verhoff e Tricromio de Gomori;

^b: acetais do glutaraldeído (1%);

^c: acetais do glutaraldeído(1%), seguido do tratamento com GA 0,05% por 9h.

Como se pode verificar pela Tabela V, o PB tratado com GADA e seguido do tratamento convencional com GA 0,05% e 9h (GADAP) antes do teste de fadiga apresentou características histopatológicas mais próximas das características mínimas de aceitação para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, com as fibras colagênicas com seu ondeamento preservado (2+/5), distribuição homogênea (Fig. 37a); com celularidade preservada (2+/5); vascularização preservada (2+/5) e periférica; presença de delicados espaços entre fibras colagênicas (1+/5) de distribuição heterogênea e fibras elásticas delgadas e de distribuição homogênea (Fig. 37b e Tabela VI) em comparação com o PB tratado apenas com GADA, o qual apresentou as fibras colagênicas com seu ondeamento preservado (2+/5), porém com maior concentração das mesmas nas laterais (Fig. 36a); com celularidade presente, contudo diminuída (1+/5); presença de espaços entre as fibras colagênicas (2+/5) e de localização central; fibras elásticas preservadas, delgadas e periféricas e vasos preservados e periféricos (1+/5) (Fig. 36b).

Além destes dados histopatológicos, os dados de estabilidade térmica, degradação enzimática e ensaio mecânico mostraram que o PB tratado com GADA seguido do tratamento convencional com GA 0,05% e 9h (GADAP) mostrou ser comparável àquele tratado convencionalmente (tampão fosfato pH 7,4 e 0,13 mol/L com GA 0,5% por 18 dias). Portanto, apenas este tipo de material foi utilizado para a manufatura da bioprótese valvular cardíaca realizando-se o teste de performance hidrodinâmica e de durabilidade *in vitro* e verificando-se o seu uso definitivo na forma de uma bioprótese valvular cardíaca.

Para as análises histopatológicas das amostras retiradas da biopróteses valvulares cardíacas do pericárdio bovino após o teste de fadiga, foram coletadas as

amostras do centro e da lateral das biopróteses valvulares cardíacas após cerca de 150 milhões de ciclos para a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado convencionalmente e cerca de 310 milhões para aquela bioprótese de PB tratado com acetais do GA seguido do tratamento convencional com GA (0,05%) por 9h.

Figura 37: Fotomicrografias óticas de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído (1%) (a e b), seguido do tratamento convencional (glutaraldeído 0,05% e 9h) (c e d) (100x).

De modo geral, as amostras retiradas da região lateral revelaram-se mais preservadas que aquelas retiradas do centro. Isso se deve ao fato de que a região central da válvula, por onde passa o fluxo, sofre mais atrito que a região lateral, causando assim um maior desgaste do tecido nesse local, independentemente do tipo de tratamento sofrido pelo pericárdio (Tabela VI e VII).

Tabela VI: Resultados histopatológicos do pericárdio bovino tratado com acetais do glutaraldeído, seguido do tratamento convencional (tampão fosfato com GA 0,05%), retirado da região central e lateral da bioprótese valvular cardíaca após o teste de fadiga.

Características Histopatológicas	Região da bioprótese	
	Central	Lateral
Fragmentação das fibras	3+/5	2+/5
Hialinização do tecido	3+/5	2+/5
Celularidade	---	---
Presença de espaços entre fibras	3+/5	2+/5

Tabela VII: Resultados histopatológicos de pericárdio bovino tratado convencionalmente, retirado da região central e lateral da bioprótese valvular cardíaca após o teste de fadiga.

Características Histopatológicas ^a	Região da válvula	
	Central	Lateral
Fragmentação das fibras	3+/5	2+/5
Hialinização do tecido	--	--
Celularidade	1+/5	--
Presença de espaços entre fibras	2+/5	2+/5

^a: grau de intensidade (1+/5: mínima, 5+/5: máxima degradação). Corantes utilizados: Hematoxilina:Eosina (HE), Sirius red, Orcina, Verhoff e Tricrômio de Gomori.

Os resultados histopatológicos após o teste de fadiga mostraram que o pericárdio tratado com GADAP apresentou alterações mais acentuadas em comparação com aquele tratado de modo convencional após o ensaio de fadiga acelerada, principalmente na fragmentação das fibras (no centro 3+/5 e na lateral

2+/5), presença de espaços vazios entre fibras (no centro 3+/5 e na lateral 2+/5) e hialinização (no centro 3+/5 e na lateral 2+/5), diminuindo consideravelmente as suas propriedades mecânicas e biológicas (Fig. 38a e 38b). Isto é também observado no pericárdio bovino com tratamento convencional, mas com uma intensidade menor, tanto para a fragmentação das fibras (no centro 3+/5 e na lateral 2+/5) quanto na presença de espaços vazios entre elas (no centro e na lateral 2+/5) (Fig. 38c e 38d).

Figura 38: Fotomicrografias óticas da região central e lateral da bioprótese valvular cardíaca de pericárdio bovino tratado convencionalmente (0,5%) (a e b, 40x) e tratado com acetais de glutaraldeído, seguido do tratamento convencional (0,05%) (c e d, 10x), após o teste de fadiga acelerada. Coloração pela Hematoxilina e Eosina..

As diferenças observadas entre os PB com diferentes tratamentos após o

ensaio de fadiga acelerada devem-se ao tempo no qual a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP permaneceu no aparelho de teste de fadiga, que foi cerca de 310 milhões de ciclos, enquanto que aquele com tratamento convencional permaneceu apenas 150 milhões de ciclos.

4.5.3. Performance hidrodinâmica das biopróteses valvulares cardíacas

Os testes de performance hidrodinâmica foram realizados nas biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino e valvas aórticas porcinas tratadas convencionalmente (método da Braile Biomédica), e de pericárdio bovino tratado com acetais de GA seguido do tratamento convencional com GA 0,05% por 9 h (Fig. 36), com diâmetros de 31 mm⁹¹. Utilizou-se a bioprótese valvular cardíaca de valvas aórticas porcinas tratada convencionalmente como comparação negativa, isto é, que apresenta a pior performance hidrodinâmica em relação as duas biopróteses valvulares cardíacas encontradas comercialmente no Brasil.

Os valores do gradiente pressórico da bioprótese valvular cardíaca de valva porcina tratadas convencionalmente foram maiores do que aquelas de PB tratado com GADAP e de forma convencional como mostrado na Figura 39a, provavelmente devido à sua menor área efetiva útil de fluxo. Portanto, a pressão para abrir os folhetos foi maior, e a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP nas frequências 60, 70 e 80 bpm apresentou comportamento similar ao da válvula porcina, enquanto que, com 90 e 100 bpm, foi similar ao de PB tratado convencionalmente.

Biopróteses cardíacas de: PB tratado com GADAP (—□—). PB tratado convencionalmente (- -○- -) e valva porcina tratado convencionalmente (···△···).

Figura 39: Gradiente pressórico médio (a) e área efetiva média (b) avaliados para as biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulso com frequências de 70, 80, 90 e 100 bpm.

Comparativamente, para a frequência de 60 bpm, a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP apresentou valores de área efetiva média do orifício próximos àquele da porcina; e para frequência de 80 a 100 bpm (Fig. 39b).

esta bioprótese apresentou valores similares àquele de PB tratado convencionalmente, demonstrando que, para frequência baixa, aquela de PB tratado com GADAP apresenta um comportamento estenótico em relação à outra, isto é, ocorre uma redução da área efetiva de fluxo, o que pode ser observado naquela de porcina em todas as frequências¹⁸.

Os valores da fração de regurgitação em todas as frequências na bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP foram maiores do que naquela bioprótese de PB tratado convencionalmente e superiores que àquele da porcina, como mostra a Figura 40a. Esses resultados já eram esperados, pois o material para a manufatura da bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP apresentava-se rígido, impedindo uma oclusão total dos folhetos da bioprótese valvular cardíaca. Isso não ocorreu nas biopróteses valvulares cardíacas de valvas porcinas tratadas convencionalmente, onde os valores da fração de regurgitação são menores, visto que o seu formato é mantido semelhante ao da valva porcina natural.

Os valores de índice de eficiência na bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP foram menores, em todas as frequências, que aqueles tratados convencionalmente (Fig. 40b), sendo mais expressivo na frequência de 60 bpm. No caso da porcina, os valores constantes em diversas frequências se devem principalmente à manutenção do seu formato natural, como comentado anteriormente.

Figura 40: Fração de regurgitação (a) e índice de eficiência avaliadas para as biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulsos com frequências de 70, 80, 90 e 100 bpm.

O índice de performance das válvulas de PB tratado com GADAP

mostrou valores menores que aqueles das válvulas tratadas convencionalmente, principalmente com 60 bpm (Fig. 41); se que nas frequências superiores a 70 bpm, tornam-se próximos àqueles da porcina, pois esta válvula é montada dentro do suporte, o que diminui drasticamente a área disponível de fluxo¹⁸. Isso já não ocorre com a válvula de PB tratado com GADA, provavelmente devido a uma maior rigidez do material obtido pelo tratamento com GA na forma de GADA, que pode estar associada a um efeito de desidratação da matriz colagênica induzida pelo próprio solvente, neste caso o etanol.

Biopróteses cardíacas de: PB tratado com GADAP (—□—). PB tratado convencionalmente (---○---) e válvula porcina tratada convencionalmente (....Δ....).

Figura 41: Índice de performance para as biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro, submetidas ao duplicador de pulsos com frequências de 70, 80, 90 e 100 bpm.

Os resultados preliminares acima mostram, portanto, que a performance da bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP foi similar ou próxima que à de PB tratado convencionalmente nas altas frequências de pulsos estudadas.

Exceto pelos valores maiores para a fração de regurgitação e menores para o índice de eficiência, a bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com GADAP apresentou uma semelhança entre àqueles de PB e porcina tratados convencionalmente, demonstrando provavelmente que a geometria ou formato da bioprótese valvular cardíaca manufaturada de PB com o novo procedimento deve ser modificado para apresentar a performance similar àquela de PB tratado convencionalmente.

4.5.4. Estudo de Calcificação *In Vivo*

Neste ensaio, os fragmentos de PB utilizados foram aqueles reticulados com: GADAP (acetais de GA 1%, seguido do tratamento com TF, GA 0,05%, 9h) (Fig. 42a e 42b), convencionalmente (TF, GA 0,5%, 18 dias) (Fig. 42c e 42d) e GADAP seguido do tratamento convencional (Fig. 42e e 42f), e que foram explantados 2, 7, 14 e 28 dias após o implante subcutâneo em rato, *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Holtzmann.

As análises da presença de células responsáveis pelo processo inflamatório, visto que são a resposta primária do tecido vizinho ao material implantado, foram realizadas apenas nos materiais explantados 28 dias do implante, devido às respostas teciduais estarem relacionadas mais ao material implantado e não ao trauma causado nos tecidos vizinhos durante a colocação do implante. Foram então observadas menores quantidades de células responsáveis pelo processo inflamatório na superfície, tais como, neutrófilos, piócitos, células gigantes, epitelóides, linfócitos, plasmócitos e mastócitos, para o PB tratado apenas com GADAP implantado (Fig. 42a) em relação àquele tratado apenas convencionalmente. TF pH 7,4 e 0,13 mol/L (Fig. 42c), e comparáveis com aquele tratado com GADAP

seguido do tratamento convencional (Fig. 42e).

Tabela VIII: Resultados histopatológicos dos pericárdios reticulados com tratamento convencional, acetais de glutaraldeído e acetais de glutaraldeído seguido do tratamento convencional após 28 dias do implante subcutâneo em ratos.

Características Histopatológicas ^(a)	Pericárdio tratado ^(b)		
	GADAP ^(c)	Convencional ^(c)	GADAP + convenc. ^(c)
Calcificação superficial	4+/5	3+/5	2+/5
Fibrose superficial	3+/5	2+/5	2+/5
Neoformação vascular superficial	2+/5	3+/5	2+/5
Fibras colagênicas preservadas	Discretas alterações: 1+/5 (centro) e discreta fragmentação superficial (2+/5)	Preservadas na porção central e fragmentação superficial discreta (2+/5)	Preservadas no centro e discreta fragmentação superficial (2+/5)
Material amorfo	3+/5	1+/5	2+/5
Infiltrado inflamatório superficial	3+/5	4+/5	4+/5

(a): escala de intensidade: +1/5 (mínima) e +5/5 (máxima);

(b): PB reticulado com: GADAP (acetais de GA, seguido do tratamento com TF, GA 0,05%, 9h), convencionalmente (TF com GA 0,5%, 18 dias) e GADAP seguido do tratamento convencional;

(c): resultados avaliados de duas lâminas de cada material explantado nos ratos, dois na região dorsal e dois na pélvis.

Segundo as Figuras 42b, 42d, 42f e Tabela VIII, a calcificação do PB tratado com GADAP seguido do tratamento convencional foi menor (2+/5) em comparação com aqueles tratados apenas com GADAP (4+/5) ou convencionalmente (3+/5), onde se verificou que a calcificação do PB tratado convencionalmente possui pontos multifocais de calcificação (maior intensidade) (Fig.42b).

O PB tratado com GADAP apresentou alguns pontos de baixa intensidade (Fig.42d), enquanto que aquele tratado com GADAP seguido do tratamento convencional (TF com GA 0,5% por 18 dias) apresentou uma calcificação muito discreta, necessitando de um aumento maior (40x) para visualizar a presença dos pontos de calcificação (42f).

Apesar de não ser um dado quantitativo de calcificação, o método de von Kossa para localizar os sítios de calcificação no microscópio ótico só é possível com a concentração mínima de fosfato de cálcio igual ou superior a 15 µg/mg de tecido seco⁷⁶; isso quer dizer que as quantidades de cálcio presentes nos pericárdios implantados, no caso daqueles tratados com GADAP e convencionalmente (TF com GA 0,5% por 18 dias), foram maiores que 15 µg de cálcio/mg de tecido, visto que apresentaram grau calcificação moderada (3+/5) a intensa (+4/5), enquanto que aquele tratado com GADAP seguido do tratamento convencional (TF com GA 0,5% por 18 dias) apresentou menores que 15 µg de cálcio/mg de tecido, já que ocorre baixa intensidade (+2/5).

Figura 42: Fotomicrografias óticas de pericárdios bovinos tratados: convencionalmente (a e b), com acetais de glutaraldeído (c e d) e com acetais de glutaraldeído seguido do tratamento convencional (e e f), após implante subcutâneo em rato por 28 dias, corados pelas metodologias de HE e von Kossa.

Devido a ser apenas um dado relativo, os dados de calcificações obtidos após 28 dias de implante demonstraram que os materiais com tratamento convencional e aqueles tratados com GADAP apresentaram calcificações de intensa a moderada, enquanto o material tratado com GADAP seguido do tratamento convencional apresentou baixa intensidade de calcificação, sugerindo claramente que um pré-tratamento com GADAP ao tratamento convencional pode induzir mudanças significativas na intensidade de calcificação desses materiais após implante na forma de biopróteses valvulares cardíacas, sem induzir modificações drásticas nas suas propriedades biológicas e histológicas.

V. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos de reticulação de matrizes colagênicas com GA, na forma de acetais, isto é, em solução GA 1,0% em EtOH com HCl 3×10^{-3} mol/L, pode-se concluir que:

1 - os dados de UV desta solução mostraram ser mais eficientes na proteção dos grupos aldeídicos livres, além da minimização da formação do GA polimérico, reduzindo assim a impermeabilização superficial e os efeitos citotóxicos;

2 - a reticulação do tecido com esta solução só ocorre eficientemente após exposição aos vapores de TEA por 24h, obtendo-se assim materiais com propriedades mecânicas, biológicas, elásticas, morfológicas e térmicas próximos ou superiores àqueles obtidos pelo tratamento convencional;

3 - a bioprótese cardíaca manufaturada com PB tratado com esse novo procedimento seguido do tratamento convencional (TF com GA 0,05%, 9h) apresentou dados preliminares de durabilidade acelerada elevados, e ainda performance hidrodinâmica em baixa frequência de pulso similar àquela confeccionada com valvas porcinas e, em alta frequência, similar ao pericárdio tratado convencionalmente;

4 - resultados dos estudos histopatológicos mostraram que os materiais tratados com esse novo processo apresentaram similares àqueles tratados convencionalmente;

5 - o grau de calcificação dos implantes subcutâneo em ratos foi reduzido significativamente quando o material tratado convencionalmente foi previamente tratado com este novo procedimento.

VI. TRABALHOS FUTUROS

Devido aos testes demorados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os trabalhos futuros consistirão de estudos estatísticos para avaliar melhor tanto a durabilidade das biopróteses manufaturadas com PB tratado com este novo processo químico, em vista da sua aplicação comercial dentro dos padrões internacionais relacionados com este tipo de biomaterial, tais como:

- número adequado de biopróteses valvular cardíacas testadas na performance hidrodinâmica e fadiga acelerada;
- implante das biopróteses valvulares cardíacas em animais, tais como, carneiros e bezerros, para verificar a sua calcificação ou a sua durabilidade *in vivo*;
- desenvolvimento de uma nova geometria para manufatura da bioprótese valvular cardíaca de PB tratado com esse novo procedimento para se obter uma performance hidrodinâmica similar àquele de PB tratado convencionalmente.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMABIS, J.; MARTHO, G.R. Circulação, respiração e excreção. São Paulo, Editora Moderna, 1991. Cap.18, p.277-78.
2. HUFNAGEL, C.A.; HARVY, W.P. The surgical correction of aortic insufficiency. **Bull. Georgetown Univ. Med. Cent.**, v.6, p.60-5, 1953.
3. BRAUNWALD, N.S.; COOPER, T.C.; MORROW, A.G. Experimental replacement of mitral valve with flexible polyurethane foam prosthesis. **Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.**, v.6, p.315-22, 1960.
4. STARR, A.; EDWARDS, M.L. Mitral replacement clinical experience with ball valve prosthesis. **Ann. Surg.**, v.15, p.726-40, 1961.
5. MURRAY, G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. **Angiology**, v.7, p.466-71, 1956.
6. IONESCU, M.I.; PAKRASHI, B.C.; MARY, D.A.; BARTEK, I.T.; WOOLER, G.H. Long-term evaluation of tissue valves. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.68, p.361-79, 1974.
7. SUZIGAN, S.; BRAILE, D.M.; SOUZA, D.R.; ROSSI, M. Pathologic findings in 74 dysfunctional Braile-Biomédica bovine pericardial heart valves recovered at reoperation, 1978 to 1990. **J. Cardiovasc. Surg.**, v.35, p.139-45, 1994.

8. MORAES, C.R.; ARRUDA, M.B.; LAGRECA, J.R.; ESCOBAR, M.; VICTOR, E.G.; CAVALCANTI, J.L.; RAPOSO, L.; GOMES, J.M.P. Válvulas cardíacas de *fascia-lata*, *dura-mater* e pericárdio (resultados em 55 casos operados). **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.3, p.60-2, 1976.
9. PUIG, L.B.; VERGINELLI, G.; BELLOTTI, G.; KAWABE, L.; FRACK, C.C.R.; PILEGGI, F.; DECOURT, L.; ZERBINI, E.J. Homologous *dura-mater* cardiac valves. Preliminary study of 30 cases. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.64, p.154-60, 1972.
10. CHEN, W.; SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Porcine heart valves: mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. **Circulation**, v.90, p.323-29 1994.
11. KHAN, S. (1998) Types of prosthetic valves.
<http://www.csm.edu/cvs/md/valve/vlvtypes.htm> (5oct. 1997).
12. WALTHER, T.; FALK, V. Prosthetic heart valves. **New Eng. J. Med.**, v. 335, p.407-16, 1996.
13. SCHOEN, F.J. Heart valve replacement materials. In: CHAHN, R.W., ed. **Encyclopedia of Material Science and Engineering**. New York, Pergamon Press, 1990. v.2, p.948-54. Suplemento.
14. BRAILE, D.M.; SOARES, M.J.F.; SOUZA, D.R.S.; RAMIRES, V.D.A.; SUZIGAN, S.; LOURENÇO, M.F. Expectativa funcional de biopróteses valvulares. I. Testes físicos e histopatológicos para aproveitamento de regiões de pericárdio bovino. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.59, p.169-75, 1992.

15. INOVAÇÃO em Parceria: Válvulas de pericárdio bovino aumentam a sobrevida de pacientes cardíacos. **Notícias da FAPESP**, n 28, Jan./Fev. 1998.
16. GROSS, D.R.; DEWANJEE, M.K.; ZHAI, P.; LANZO, S.; WU, S.M.
Successful prosthetic mitral valve implantation in pigs. **ASAIO J.**, v.43, p.M382-M386, 1997.
17. BRAILE, D.M.; GODOY, M.F.; SOUZA, D.R.S.; OLIVEIRA, A.M.P.L.;
BARBOSA, R.C.; ARAUJO, R.B.; GOISSIS, G. Comparative study between bioprosthesis in vitro: pericardial x porcine valves. **Artif. Organs**, v.19, p.1063-70, 1995.
18. GABBAY, S.; MCQUEEN, D.M.; YELLIN, E.L.; FRATER, R.W.M. In vitro hydrodynamic comparison of mitral valves prostheses at high flow rates. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.76, p.771-87, 1978.
19. BRAILE, D.M.; ZAIANTCHICK, M.; SOUZA, D.R.S. Prótese de pericárdio bovino PB IMC: 11 anos em posição mitral. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.59, p.13-21, 1992.
20. BARBARO, V.; DANIELE, C.; GRIGIONI, M.; PALOMBO, A.;
SARGENTINI, A. *In vitro* evaluation of prosthetic heart valves: towards comparable testing. **J. Med. Eng. Technol.**, v.16, p.10-14, 1992.
21. LIAO, K.; SEIFFER, E.; HOFFMAN, D.; YELLIN, E.L.; FRATER, R.W.M.
Bovine pericardium versus porcine aortic valve comparison of tissue biological properties as prosthetic valves. **Artif. Organs**, v.16, p.361-65, 1992.

22. COURTMAN, D.W.; PEREIRA, C.A.; KASHEF, V.; MCCOMB, D.; LEE, J.M.; WILSON, G.J. Development of pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.28, p.655-66, 1994.
23. DAVIS, E.A.; GREENE, P.S.; CAMERON, D.E.; GOTT, V.I.; LASCHINGER, J.C.; STUART, R.S.; SUSSMAN, M.S.; WATKINS, L.; BAUMGARTNER, W.A. Bioprosthetic versus mechanical prostheses for aortic valve replacement in the elderly. **Circulation**, v.94, p.II121-II125, 1996. Suplemento.
24. STRATES, B.; LIAN, J. NIMNI, M.E. Calcification in cardiovascular tissues and bioprostheses. In: NIMNI, M.E., ed. **Collagen: Biotechnology**. Boca Raton, CRC Press., 1988. v.3, p.273-92.
25. SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J.; NELSON, A.C.; BERNHARD, W.F.; NASHEF, A.; HAWLEY, M. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart calcification. **Lab. Investigation**, v.52, p.523-32, 1985.
26. SABBAAH, H.N.; HAMID, M.S.; STEIN, P.D. Mechanical stresses and anatomic integrity of bioprosthetic heart valves. **Cardiac Chronicle**, v.1, p.1-4, 1986.
27. BERNACCA, G.M.; FISHER, A.C.; MACKAY, T.G.; WHEATLEY, D.J. Calcification and stress distribution in bovine pericardial heart valves. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, p.959-66, 1992.
28. TOMAZIC, B.B.; BROWN, W.E.; SHOEN, F.J. Physicochemical properties of calcific deposits isolated from porcine bioprosthetic heart valves removed from patients following 2-13 years function. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.28, p.35-47, 1994.

29. LEVY, R.J.; SHOEN, F.J.; ANDERSON, H.C.; HARASAKI, H.; KOCH, T.H.; BROWN, W.; LIAN, J.B.; CUMMING, R.; GAVIN, J. Cardiovascular implant calcification: a survey and update. **Biomaterials**, v.12, p.707-14, 1991.
30. LEE, Y.S. Morphogenesis of calcification in porcine bioprosthesis: insight from high resolution electron microscopic investigation at molecular and atomic resolution. **J. Electron Microsc.**, v.42, p.156-65, 1993.
31. GABBAY, S; IOSIF, M.C. System *in vitro* characterization heart valve bioprostheses under accelerated fatigue conditions and under physiologic conditions. **Biomed. Instrum. & Tech.**, v.26, p. 408-13, 1992.
32. TU, R.; SHEN, S.H.; LIN, D.; HATA, C.; THYAGARAJAN, K.; NOISHIKI, Y. QUIJANO, R.C. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.28, p.677-84, 1994.
33. SUNG, H.W.; CHANG, Y.; CHIU, Y.T.; HSU, H.L.; SHIH, C.C.; LU, J.H.; YANG, P.C. Evaluation of an epoxy-fixed biological patch with ionically bound heparin as a pericardial substitute. **Biomaterials**, v.17, p.1693-701, 1996.
34. SUNG, H.W.; HSU, Y.S.; LEE, Y.S.; LIN, D.S. Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: effects of pH, temperature, and fixative concentration. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.31, p.511-18, 1996.
35. PETITE, H.; FREI, V.; HUC, A.; HERBAGE, D. Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissue as pericardium. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.24, p.179-187, 1990.

36. PETITE, H.; FREI, V.; HUC, A.; HERBAGE, D. Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.28, p.159-65, 1994.
37. NAIMARK, W.A.; PEREIRA, C.A.; TSANG, K.; LEE, J.M. HMDC crosslinking of pericardial tissue: a potential role of solvent environment in the design of bioprosthetic materials. **J. Mat. Sci. Mat. Med.**, v.6, p.235-41, 1995.
38. LEE, J.M.; EDWARDS, H.H.L.; PEREIRA, C.A.; SAMI, S.I. Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). **J. Mat. Sci.: Mat. Med.**, v.7, p.531-41, 1996.
39. BRAILE, Domingo Marcolino. **Prótese valvular: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral**. São Paulo, 1990. 110p. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Ministério da Educação e Cultura.
40. WALKER, D.K.; SCOTTEN, L.N.; BROWNLEE, R.T. New generation tissue valves. Their *in vitro* function in the mitral position. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.88, p.573-82, 1984.
41. DUNCAN, A.C.; BOUGHNER, D.; VESELY, I. Dynamic glutaraldehyde fixation of porcine aortic valve xenograft. **Biomaterials**, v.17, p.1849-56, 1996.
42. GRATZER, P.F.; PREREIRA, C.A.; AND LEE, J.M. Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.31, p.533-43, 1996.

43. VYAVAHARE, N.; HIRSCH, D.; LERNER, E.; BASKIN, J.Z.; SHOEN, F.J.;
BIANCO, R.; KRUTH, H.S.; ZAND, R.; LEVY, R.J. Prevention of
bioprosthetic heart valve calcification by ethanol pre-incubation. Efficacy and
mechanisms. **Circulation**, v.95, p.479-88, 1997.
44. ZILLA, P.; WEISSENSTEIN, C.; BRACHER, M.; ZAHNG, Y.; KOEN,
W.; HUMAN, P.; VON OPPELL, U. High concentration reduce rather than
increase the calcification of aortic wall tissue. **J. Heart Valve Dis.**, v.6,
p.502-9, 1997.
45. RUIJGROK, J.M.; DE WIGN, J.R.; BOON, M.E. Optimizing of glutaraldehyde
crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as
measured by shrinkage temperature. **J. Mat. Sc. Mat. Med.**, v.5, p.80-7,
1994.
46. ANDERSON, H.C. Calcific diseases. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.107, p.343-8,
1983.
47. WUTHIER, R.E. Basic Science and pathology: a review of the primary
mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of
cells, mitochondria and matrix vesicles. **Clin. Orthop. and Rel. Res.**, n.169,
p.219-42, 1982.
48. BOSKEY, A.H. Basic science and pathology: currents concepts of the
physiology and biochemistry of calcification. **Clin. Orthop. and Rel. Res.**,
n.157, p.225-48, 1981.
49. BRAILE, D.M.; ZAIANTCHICK, M.; SOUZA, D.R.S. Prótese de pericárdio
bovino PB IMC: 11 anos em posição aórtica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.59,
p.13-21, 1992.

50. NIMNI, M.E.; HARKNESS, R.D. Molecular structure and function of collagen. In: NIMNI, M.E., ed. **Collagen: Biochemistry**. Boca Raton, CRC Press, 1988. v.1, p.1-77.
51. LIGHT, N.; BAYLEI, A.J. Molecular structure and stabilization of the collagen fibre. In: VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of Collagen**. London, Academic Press, 1980. p.15-38.
52. SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, v.219, p.157-63. 1968.
53. TRELSTAD, R. Le collagène. **La Recherche**, v.12, p.312-21, 1981.
54. CHAPMAN, J.A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K.M.; KADLER, K.E. The collagen fibril – a model system for studying the staining and fixation of a protein. **Electron Microsc. Rev.**, v.3, p.143-82, 1990.
55. CIRELLI, J.A.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTONIO, R.A.C.; LIA, R.C.C.; GOISSIS, G.; ROSSA JUNIOR, C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions an histometric analysis in dogs. **Biomaterials**, v.18, p.1227-34, 1997.
56. MCPHERSON, J.M.; SAWAMURA, S.; ARMSTRONG, R. An examination of biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.20, p.93-107, 1986.
57. EASTOE, J.E. Composition of collagen and allied proteins. In: RAMACHANDRAN, G.N., ed. **Treatise on collagen: chemistry of collagen**. London, Academic press, 1967. v.1, p.1-72.
58. KOK, L.P.; BOON, M.E. **Microwave cookbook for microscopists**. Leiden, Coulomb Press, 1992. p.183.

59. CHIBATA, I. **Immobilized enzymes: research and development.** Tokyo. Kobamsha Ltda., 1978. p.284.
60. HUANG-LEE, L.L.H.; CHEUNG, D.T.; NINMI, M.E. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.24, p.1185-201, 1990.
61. WOODROOF, E.A. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. **J. Bioeng.**, v.2, p.1-9, 1978.
62. SUNG, H.W.; SHIH, J.S.; HSU, C.S. Crosslinking characteristics of porcine tendons: effects of fixation with glutaraldehyde or epoxy. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.30, p.361-7, 1996.
63. NIMNI, ME.; CHEUNG, D.T.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. In: NIMNI, M.E., ed. **Collagen: Biochemistry and Biomechanics.** Boca Raton, CRC Press, 1988. v.3, p. 1-38.
64. KAWAHARA, J.; OHMORI, T.; OHKUBO, T.; HATTORI, S.; KAWAMURA, M. The structure of the glutaraldehyde in aqueous solution determined by ultraviolet absorption and light scattering. **Anal. Biochem.**, v.201, p.94-8, 1992.
65. GRABENWÖGER, M.; GRIMM, M.; EYBL, E.; LEUKAUF, C.; MÜLLER, M.M.; PLEACK, H.J.; BÖCK, P. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.26, p.1231-40, 1992.

66. CHANDA, J. Post-treatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium. **Artif. Organs**, v.18, p.408-10, 1993.
67. CHEN, W.; KIM, J.; SHOEN, R.J.; LEVY, R.J. Effect of 2-amino oleic acid exposure conditions on the inhibition of calcification of glutaraldehyde cross-linked porcine aortic valves. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.28, p.1485-95, 1994.
68. HONDA, I.; ARAI, K. Determination of the number of crosslinks in collagen from mechanical properties of swollen fibers. **J. App. Polym. Sc.**, v.62, p.1577-86, 1996.
69. CHEUNG, D.T.; NIMNI, M.E. Mechanisms cross-linking of proteins by glutaraldehyde. II. Reactions with monomeric and polymeric collagen. **Connect. Tis. Res.**, v.10, p.201-16, 1982.
70. CHEUNG, D.T.; NIMNI, M.E. Mechanisms of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen in tissues. **Connect. Tis. Res.**, v.13, p.109-15, 1984.
71. HIRSCH, D.H.; DRADER, J.; THOMAS, T.J.; SHOEN, F.J.; LEVY, J.T. LEVY, R.J. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled releases studies. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.27, p.1477-84, 1993.
72. PATHAK, Y.V.; BOYD, J.; LEVY, R.J.; SCHOEN, F.J. Prevention of calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium through controlled release polymeric implants: studies of Fe^{3+} , Al^{3+} , protamine sulphate and levamisole. **Biomaterials**, v.11, p.718-23, 1990.

73. TAN, W.M.; LOKE, W.K.; TAN, B.L.; WEE, A.; KHOR, E.; GOH, K.S.

Trivalent metal ions in the prevention of calcification in glutaraldehyde treated biological tissues. Is there chemical correlation? **Biomaterials**, v.14, p.1003-7, 1993.

74. JORGE-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ, P.; GUTIERREZ, M.; CASTILLO-

OLIVARES, J.L. Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans. **Biomaterials**, v.12, p.683-9, 1991.

75. FIGUEIRÓ, Sonia Duarte. **Reticulação progressiva de pericárdio bovino:**

novo procedimento para confecção de válvulas cardíacas. São Carlos, 1995. 62p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

76. GOTT, J.P.; PAN, C.; DORSEY, L.M.A.; JAY, J.L.; JETT, G.K.; SHOEN, F.J.;

GIRARDOT, J.M.; GUYTON, R.A. Calcification of porcine valves: successful new method of antimineralization. **Ann. Thorac. Surg.**, v.5, p.207-15, 1992.

77. GOTT, J.P.; GIRARDOT, M.N.; GIRARDOT, J.M.; HALL, J.D.; WHITLARK,

J.D.; HORSLEY, W.S.; DORSEY, L.M.; LEVY, R.J.; CHEN, W.; SCHOEN, F.J.; GUYTON, R.A. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. **Ann. Thorac. Surg.**, v.64, p.50-8, 1997.

78. CHEN, W.; SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic

acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. **Circulation**, v.90, p.323-9, 1994.

79. HIRSCH, D.; DRADER, J.; PATHAK, Y.V.; YEE, R.; SHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in a rat subdermal model by FeCl_3 and ethanehydroxydiphosphonate: pre-incubation and polymeric controlled release studies. **Biomaterials**, v.14, p.70-11, 1993.
80. IMAMURA, E.; SAWATANI, O.; KOYANASHI, H.; NOISHIKI, Y.; MIYATA, T. Epoxy compounds as a new crosslinking agent for porcine aortic leaflets: subcutaneous implant studies in rats. **J. Card. Surg.**, v.4, p.50-7, 1989.
81. OLDE DAMINK, L.H.H.; DIJKSTRA, P.J.; VAN LUIN, J.A.; VAN WACHEM, P.B.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. In vitro degradation of dermal sheep cross-linked using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials**, v.17, p. 679-84, 1996.
82. BRESLOW, R., ed. Reactions of carbonyl compounds. In: BRESLOW, R. **Organic reaction compounds**. An introduction. 2.ed. New York, W.A. Benjamin Inc., 1969. p.188-189.
83. STEGEMANN, H.H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin. Chim. Acta**, v.18, p.267-73, 1967.
84. MORIWAKI, Cássia Maria Emiko Yasuoka. **Efeito do dimetilsulfóxido sobre a embebição e solubilização da serosa bovina**. São Carlos, 1990. 77p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

85. ESTEVE-ROMERO, J.S.; PONS, L.M.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C.; RAMIS-RAMOS, R.M. Determination of pyrrol derivatives and hydroxyproline with 4-(dimethylamino)benzaldehyde in a micellar medium. **Anal. Letters**, v.27, p.1557-67, 1994
86. GABBAY, S.; IOSIF, M.; ANDRWS, J. Reproducibility of accelerated fatigue testing conditions for meaningful comparative studies and clinical predictions. In: GABBAY, S.; MUELLER, E., eds. **Clinical predictive value of in-vitro accelerated fatigue testing of heart valve bioprostheses**. St. Louis, American Association for Advancement of Medical Instrumentation, 1980. p.30-45.
87. FORTI, Fábio Luis. **Comportamento estrutural de matrizes colagênicas tratadas com dioxano: propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas**. São Carlos, 1995. 77p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo.
88. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1990. p.263-84.
89. YOSHIOKA, S.A.; BRAILE, M.D.; RAMIREZ, V.D.A.; GOISSIS, G. The chemical protecting group concept applied in crosslinking of natural tissues with glutaraldehyde acetals. **Artif. Organs**, v.22, p.210-14, 1998.
90. YOSHIOKA, S.A.; GOISSIS, G.; BRAILE, M.D.; RAMIRES, V. Reticulação de matrizes colagênicas com diacetais de glutaraldeído para preparação de novos biomateriais. **Polim. Ciên. Tecnol.**, v.5, n.4, p. 39-47, 1995.

91. YOSHIOKA, S.A.; GOISSIS, G.; ARAUJO, R.B.; RAMIRES, V.D.A.;
GODOY, M.F.; BRAILE, M.D. Performance hidrodinâmica de biopróteses
valvulares cardíacas de pericárdio bovino tratado com acetais de
glutaraldeído. **Rev. Bras. Eng. Biomed.**, v.15, p.5-10, 1995.

VIII. GLOSSÁRIO

Área efetiva média: área de uma válvula em cm^2 , que abre efetivamente durante o ciclo cardíaco sob fluxo constante.

Celularidade: é o número de núcleos de células observadas no pericárdio bovino, principalmente na subcamada fibrosa com predominância de fibroblastos.

Doenças reumáticas: Uma doença do sistema imunológico que pode ser desenvolvida depois de uma infecção da bactéria do tipo *streptococcus* (que causa febre escarlata). Esta doença envolve o cérebro, o coração (estenose da valva mitral e endocardite), as juntas (artrite) e pele.

Escapular: região referente ao ombro.

Estenose: diminuição repentina do diâmetro da área de fluxo sanguíneo durante o seu percurso.

Fração de regurgitação: é a fração do volume ejetado registrado em percentual, que retorna durante o fechamento (oclusão) da válvula ou valva.

Gradiente pressórico transvalvular: variação da pressão em mm de Hg através da válvula.

Hialinização: Significa uma alteração do colágeno, onde aconteceu uma fibrose, que aumenta o "volume" de colágeno, de maneira amorfa,

ficando de aspecto "róseo-claro" na coloração pela HE e sem núcleos em seu interior

Índice de eficiência: semelhante ao índice de performance considerando também a fração de regurgitação.

Índice de performance: razão entre as áreas efetivamente aberta e a teoricamente calculada.

^ Valva cardíaca: válvula cardíaca natural ou nativa.