UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**RETICULAÇÃO DE PERICÁRDIO BOVINO COM GLUTARALDEÍDO:
EFEITO DA TEMPERATURA, TEMPO DE REAÇÃO E CONCENTRAÇÕES**

ek

Marcos Antônio Piza

Dissertação apresentada à Área de Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais - Campus de São Carlos - Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em "Ciências e Engenharia de Materiais".

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis

São Carlos - SP

1997

Piza, Marcos Antônio

Reticulação de pericárdio bovino com glutaraldeído: efeito da temperatura, tempo de reação e concentrações/Marcos Antônio Piza.—São Carlos, 1997.

63 p.

Dissertação (Mestrado) – Ciências e Engenharia de Materiais de São Carlos, 1997.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis

1. Válvulas cardíacas. 2. Pericárdio Bovino. 3. Glutaraldeído

Ciência e Engenharia de Materiais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

Instituto de Física de São Carlos

Instituto de Química de São Carlos

CAIXA POSTAL - 369

CEP 13560-970 - São Carlos/SP - Brasil

Tel/Fax: (016) 274-9285

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MARCOS ANTONIO PIZA** APRESENTADA JUNTO A ÁREA INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA EESC-IFSC-IQSC, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 19/02/1997.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Gilberto Goissis - DQFM/IQSC/USP

Prof. Dr. Domingos Marcolino Braile - UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Aprício da Silva Curvelo - DFQ/IQSC/USP

DEDICATÓRIA

À **Deus**, pela vida e por tudo mais.

Aos meus pais **Sebastião e Terezinha**
pelo exemplo de amor, honestidade e educação
em todos os dias de minha vida.

À **Cássia**,
pelo amor, incentivo e compreensão
sempre presente ao meu lado.

Ao
Marcio, Marleide, Evandro e Talita
pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Gilberto Goissis, pela oportunidade, dedicação e compreensão, e incentivo durante a realização deste trabalho e principalmente pela paciência e conhecimentos profissionais transmitidos.

- A Prof. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela preciosa contribuição na discussão deste trabalho e pela sua amizade.

- Aos técnicos do laboratório de bioquímica Ézer Biazin e Glauco D. Broch sempre muito prestativos, companheirismo e amizade no dia a dia.

- À Braile Biomédicas de São José do Rio Preto, pelo fornecimento da matéria prima e pelos testes mecânicos realizados.

- A secretária Eliana, pelos serviços prestados, gentileza, amizade e dedicação.

- Aos técnicos Mauro, Ana e Paulo, pelos favores concedidos de forma sempre prestativa.

- Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biomateriais presentes: Virgínia, Zhara, Marcos Bet, Fábio, Júlio, Sônia, Luciana, Sérgio, Délia, Maria Helena, Cristina, Eduarda, pelo apoio, amizade e ótimo ambiente de trabalho.

- Aos Professores e funcionários do Instituto de Química de São Carlos, Departamento de Química e Física Molecular-IQSC e a Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais.

- Ao pessoal da biblioteca e da seção de alunos: Vladerez, Ivani, Sônia, Vilneide, Eliana, Vitória,

- Aos amigos da Pós-graduação e graduação pela amizade e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

- A Elizabete Cristina Campanholo pelo auxílio na correção da redação.
- Ao CNPq pela bolsa concedida.
- Ao CNPq/PADCT pelo auxílio financeiro concedido através do projeto "Programa de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomateriais de Colágeno e Poliuretanas", processo no 620.228/91-1 e 62. 0001/96.8/FNM.

SUMÁRIO

<i>ABREVIATURA.....</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE FIGURAS.....</i>	<i>ii</i>
<i>LISTA DE TABELAS.....</i>	<i>v</i>
<i>RESUMO.....</i>	<i>vi</i>
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>viii</i>
<i>I. INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
<i>I.1. O estado da arte para válvulas cardíacas biológicas.....</i>	<i>6</i>
I.1.1 A química do glutaraldeído frente a tecidos biológicos.....	6
I.1.2. Procedimentos alternativos para o glutaraldeído.....	12
a - Éteres glicidílicos.....	13
b - Azida.....	14
c - Diisocianatos.....	16
d - Agentes anticalcificantes.....	17
e - Tratamento com íons de metais.....	17
f - tratamento com detergentes ou extração com solventes orgânicos.....	18
g - Variantes do tratamento com glutaraldeído.....	19
- Tratamento com ácido α -amino oléico.....	19
- Fixação dinâmica.....	20
-Efeito de temperatura.....	20
- Outros métodos.....	21
<i>I.2. Comentários gerais sobre o estado da arte.....</i>	<i>22</i>

II. OBJETIVO.....	23
III - PARTE EXPERIMENTAL.....	24
III.1. Solventes e Reagentes.....	25
III.2. Tecido Utilizado.....	25
III.3. Experimento de reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído.....	25
III.3.1. Reticulação seqüencial do pericárdio bovino.....	26
III.3.1.1. Temperatura constante de 25°C e tempo variável.....	26
III.3.1.2. Temperatura variável e tempo constante.....	27
A - 90 minutos e concentração de glutaraldeído até 0,5%.....	27
B - 90 minutos e concentração de glutaraldeído até 0,1%.....	27
C - 10 minutos e com concentração de glutaraldeído de até 0,05 e 0,1%.....	28
III.3.2. Reticulação não seqüencial.....	28
III.3.2.1. Tempo variável e Temperatura constante de 25°C	28
III.3.2.2. Temperatura variável e tempo constante.....	28
A - 90 minutos e concentração de glutaraldeído de 0,5%.....	28
B - 90 minutos e concentração de glutaraldeído de 0,1%.....	29
C - 10 minutos e com concentração de glutaraldeído de 0,05 e 0,1%.....	29
III.4. Estabilidade térmica.....	29
III.5. Hidrólise enzimática do pericárdio bovino.....	30
III.5.1. Colagenase.....	30
III.5.1.1. Procedimento.....	30
III.5.2. Tripsina.....	31
III.5.2.1. Procedimento.....	31
III.6. Ensaio Mecânicos.....	33
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
IV.1. ESTABILIDADE TÉRMICA.....	34

IV.2. ESTABILIDADE BIOLÓGICA.....	40
a - Avaliação da atividade após 10 minutos de reação:.....	43
Atividade colagenolítica.....	43
Atividade tripsínica.....	44
b - Avaliação da atividade após 90 minutos de reação:	45
Atividade colagenolítica.....	46
Atividade tripsínica.....	47
IV.3. ENSAIOS MECÂNICOS.....	49
<i>V - CONCLUSÃO.....</i>	<i>52</i>
<i>IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>54</i>

ABREVIATURAS

cm.....	centímetro
DDPA.....	difenilfosforilazida
DMF.....	Dimetilformamida
GA.....	Glutaraldeído
Hyl.....	Hidroxilisina
Lys.....	Lisina
mL.....	mililitro
nm.....	nanômetro
PB.....	Pericárdio bovino
ppm.....	parte por milhão
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
Td.....	Temperatura de desnaturação
TF.....	Tampão fosfato
Te (Ts).....	Temperatura de encolhimento

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema da válvula de bola.....	4
FIGURA 2: Esquema de uma válvula de disco basculante aberta.....	5
FIGURA 3: Diagrama esquemático da válvula mecânica tipo duplo folheto..	5
FIGURA 4: Esquema das reticulações naturais ao longo das fibras de colágeno.....	6
FIGURA 5: Reticulação (ligações cruzadas) do colágeno com glutaraldeído..	7
FIGURA 6: (a) Formas monoméricas do glutaraldeído; (b) formação dos polímeros hemiacetálicos; (c) formação de polímeros α , β -insaturados.....	8
FIGURA 7: Formação de ligações cruzadas na forma de aminas secundárias tendo como intermediário a base de Schiff.....	10
FIGURA 8: Formação de ligações cruzadas do tipo piridínium em matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído.....	11
FIGURA 9: Reticulação de proteína via polímeros α , β -insaturados de glutaraldeído.....	11
FIGURA 10: Reticulação de matrizes de colágeno via éteres glicidílicos.....	13
FIGURA 11 - Reticulação de matrizes de colágeno via azida.....	14
FIGURA 12: Reticulação de matrizes de colágeno via difenilfosforilazida...	15

FIGURA 13: Reação entre ϵ -amino grupos com isocianatos	16
FIGURA 14: Estabilização de matrizes de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e ácido α -amino oléico.....	19
FIGURA 15: Esquema experimental para o desenvolvimento de novos materiais para confecção de válvulas biológicas.....	24
FIGURA 16: Curva de calibração de albumina.....	32
FIGURA 17: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função do tempo de reação e processamento seqüencial, na temperatura de 25°C	35
FIGURA 18: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função do tempo de reação e processamento não seqüencial, na temperatura de 25°C	36
FIGURA 19: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função da temperatura de reação por procedimento seqüencial, no intervalo de tempo de 90min.....	38
FIGURA 20: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função da temperatura de reação por procedimento não seqüencial, durante o intervalo de tempo de 90min.....	40
FIGURA 21: Mecanismo de inibição da ação tripsínica por reação de matrizes colagênicas com glutaraldeído.....	41
FIGURA 22: Estabilidade do pericárdio bovino `a hidrólise enzimática por colagenase (A) e com tripsina (B); em função da temperatura (5, 15, 25, 35, 45°C). Tempo de reação: 90 minutos.....	45

FIGURA 23: Temperatura de encolhimento (°C) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído na concentração de 0,1%, em função da temperatura (5, 15, 25, 35, 45°C). Tempo de reação: 90min49

LISTA DE TABELAS

- TABELA I:** Hidrólise enzimática por collagenase e tripsina de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído por 10 min sob temperatura variável.....42
- TABELA II:** Hidrólise enzimática por collagenase e tripsina de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído por 90 min e temperatura variável.....47
- TABELA III:** Propriedades mecânicas para pericárdio bovino tratado pelo procedimento seqüencial e não seqüencial, em comparação com valores padrões necessários para a confecção de válvulas cardíacas.....50

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método de reticulação mais homogênea no pericárdio bovino (PB), utilizado na confecção de válvulas cardíacas, seguindo um tratamento seqüencial e não seqüencial com concentrações crescentes de glutaraldeído (GA), no intervalo entre 0,001% e 0,5%, com tempos de reação entre 5 e 90min, e temperatura entre 5 e 45°C.

Os resultados de temperatura de encolhimento (Ts) mostraram que a reticulação do pericárdio bovino é heterogênea, principalmente para baixas concentrações de glutaraldeído (0,001%). Entretanto esta heterogeneidade é menos perceptível para concentrações superiores de GA, principalmente para o tratamento seqüencial, sugerindo uma melhor qualidade de reação de reticulação.

Em todos os tratamentos realizados, os melhores resultados foram obtidos para o tratamento seqüencial à 45°C, para 90 minutos de reação e 0,1% de GA, onde os valores de Ts ($\cong 90^{\circ}\text{C}$) foram muito próximos daqueles para concentrações superiores de GA (0,5%). Encontrou-se também, nestas condições, os menores valores de hidrólise enzimática (colagenase = 3,8% e

tripsina = 1,9%). Estes comportamentos devem estar associados a uma maior concentração de GA monomérico e, portanto, maior eficácia das soluções de GA na promoção das ligações de reticulação e também à exposição de um maior número de sítios de reação da matriz de PB.

Os resultados dos ensaios de hidrólise enzimática com collagenase e tripsina, confirmaram a maior eficácia do tratamento seqüencial, principalmente sabendo-se que: a) a reação de PB com GA envolve amino grupos de lisina; b) a tripsina só age sobre ligações peptídicas envolvendo lisina com ϵ -amino grupo livre. A partir disto, é possível prever que um maior número de ϵ -amino grupos estão bloqueados, não permitindo a ação enzimática nestes locais, mostrando que o material encontra se mais reticulado.

Testes mecânicos realizados nos materiais tratados nas condições citadas acima, mostraram valores dentro da faixa aceitável para a confecção de válvulas cardíacas para o tratamento seqüencial.

ABSTRACT

The object of this work was the development of a new procedure for homogeneous crosslinking of bovine pericardium (BP), to improve its properties when used for cardiac valves confection. A sequential treatment with increasing concentrations of glutaraldehyde (GA), from 0.001% to 0.5%, was used in temperatures ranging from 5°C to 45°C and reaction times ranging from 5 to 90 min.

Shrinkage temperature (Ts) results showed that non-sequential and sequential treatments produced heterogeneous crosslinking of bovine pericardium, mainly for lower concentrations of glutaraldehyde (0.001%). The heterogeneity is less perceptible for greater concentrations of glutaraldehyde, specially in the sequential treatment, suggesting better quality of crosslinking reaction.

Best results were obtained for the sequential treatment at 45°C, for 90 min and 0.1% of glutaraldehyde, with Ts values ($\cong 90^{\circ}\text{C}$) very similar to those found for higher glutaraldehyde concentration (0.5%). In these conditions, the smaller values of enzymatic hydrolysis were obtained (collagenase = 3.8% and trypsin = 1.9%). This behavior, at 45°C, may be

associated to the presence of higher monomeric glutaraldehyde concentration, more efficient in the crosslinking promotion, and to the exposition of a great number of reaction sites in bovine pericardium matrix.

The results of enzymatic hidrolysis with collagenase and tripsin, confirmed that sequential treatment is more efficient, specially knowing that: a) the GA for BP reaction involved ϵ -amino groups of lisin: b) the tripsin alone act over peptides bonds involving lisin with free ϵ -amino groups. Then, it is possible to predict that a great number of ϵ -amino groups were blocked, not permitting enzimatic action, showing that the materials were more crosslinked.

Mechanical tests for materials treated as above demonstrated that for sequential treatment the values are within the acceptable range for cardiac valves construction.

I. INTRODUÇÃO

A função principal das válvulas cardíacas é a regulação do fluxo sanguíneo. Entretanto, por problemas de natureza patológica como a malformação congênita, doenças reumáticas, sífilis, processos infecciosos, artrite e processos de calcificação, algumas vezes precisam ser substituídas. A substituição deve ser feita por próteses mecânicas ou biológicas.

A primeira prótese valvular, implantada em 1952 por Charles Hufnagel¹, consistia em uma prótese de bola (prótese mecânica) que foi colocada na aorta descendente de um paciente com insuficiência aórtica grave. Em 1955, Murray² deu início ao emprego dos homoenxertos valvulares, implantando uma válvula aórtica fresca, também na aorta descendente. Em 1960, Albert Starr utilizou uma prótese de bola para substituição da válvula mitral³ e a partir de então, as próteses valvulares mecânicas passaram a ser amplamente utilizadas, dando início a vários modelos de válvulas mecânicas. Estas válvulas no entanto, não eram isentas de complicações, tais como o tromboembolismo, que foi o principal motivo pela introdução das biopróteses. Estas foram confeccionadas inicialmente a partir de materiais homólogos como a *fascia lata*, *dura-máter* ou pericárdio ou heterólogos como a válvula porcina⁴ e pericárdio bovino (PB)⁵. A estabilização destes materiais era realizada

anteriormente com reagentes como o formaldeído, a glicina e o glicerol, mas somente a partir da década de 60, quando foi introduzido o glutaraldeído (GA), que tinha como finalidade aumentar a biocompatibilidade e melhoria das qualidades mecânicas, houve utilização em larga escala destas válvulas. Este procedimento foi introduzido por Carpentier no final da década de 60⁶.

Apesar das inúmeras modificações que foram feitas desde então, a grande variedade de válvulas mecânicas e biológicas introduzidas mostrou a incapacidade, de qualquer dos implantes, de preencher as características de uma prótese ideal. Os substitutos valvulares, apesar de propiciarem aumento de sobrevida, devido a melhora da função cardíaca, com conseqüente melhoria da qualidade de vida dos pacientes, não foram isentos de complicações pós-implante⁷⁻¹¹.

Um dos maiores problemas associados às biopróteses são as falhas estruturais causadas por rupturas na superfície do material que levam a calcificação; nas válvulas mecânicas, além do desgaste, o maior problema é o tromboembolismo não dispensando portanto, a administração crônica de anticoagulantes. Para as biopróteses é suficiente na maioria dos casos¹¹, o uso de antiagregantes plaquetários⁵.

Apesar dos problemas diferentes, uma análise comparativa de performance, mostrou que válvulas mecânicas e biológicas têm o mesmo índice de morbidez após 10 anos do implante^{8,11,12,13,14}. Problemas nas válvulas biológicas ou mecânicas estão associados ainda a indicações clínicas

corretas, baseadas em critérios que incluem os grupos classificados por faixa etária¹⁵⁻¹⁹ e os grupos com ou sem contra-indicação à administração de anticoagulantes²⁰⁻²¹. Um exemplo, é a recomendação de válvulas mecânicas para pacientes jovens e válvulas biológicas para pacientes com idade mais avançada, visto que, nos jovens²² a atividade metabólica associada ao crescimento do tecido ósseo é mais intensa. Outras características também são levadas em consideração tais como modificações do quadro sangüíneo (eritrócitos, leucócitos e plaquetas)²³, substituição das válvulas causada por doenças que induzem à seqüelas cardíacas²⁴ e a necessidade de nova cirurgia devido a falha da primeira válvula implantada²⁵⁻²⁶.

Uma prótese cardíaca valvular ideal deve ter as seguintes características:

- não ser trombogênica;
- ter boa hemodinâmica;
- durabilidade de 15 a 50 anos (de 35 a 40 milhões de ciclos por ano);
- controle de qualidade confiável;
- ter baixo custo de fabricação;
- ser resistente à infecção;
- silenciosa;
- ser de fácil implantação;
- ser biologicamente inerte.

As figuras 1, 2 e 3 mostram exemplos de válvulas mecânicas mais empregadas atualmente. Desde a primeira substituição de uma válvula cardíaca natural por um dispositivo artificial (válvula de bola de acrílico engaiolada) em 1953¹, houve grande evolução. Durante a década de 70 apareceram as primeiras válvulas de disco basculante²⁷ que representaram um avanço significativo, principalmente em relação às suas propriedades hemodinâmicas. No final da década de 70 surgiu a válvula de duplo folheto²⁸ (St. Jude), a partir da qual a grande preocupação foi produzir válvulas construídas com materiais que respondessem melhor ao implante de longo prazo²⁹, culminando, assim, com a introdução do carbono pirolítico³⁰ e mais recentemente do recobrimento das superfícies metálicas com nitreto de titânio³⁰. As válvulas mais comumente substituídas encontram-se no átrio esquerdo (válvula mitral) e na saída da artéria (válvula aórtica), apresentando estas, diâmetros externos entre 19 a 35 mm.

FIGURA 1: Esquema da válvula de bola.

FIGURA 2: Esquema de uma válvula de disco basculante aberta.

FIGURA 3: Diagrama esquemático da válvula mecânica tipo duplo folheto.

I.1. O estado da arte para válvulas cardíacas biológicas

I.1.1. A química do glutaraldeído frente a tecidos biológicos

O uso do GA, apesar dos vários problemas com que é associado a performance das válvulas biológicas pós-implante, principalmente a degeneração e a calcificação³¹⁻³², ainda é o método preferencial de fixação em virtude de sua capacidade de reagir com ϵ -amino grupos de resíduos de lisinas (Lys) presentes nas proteínas para formar ligações cruzadas (Figura 4) na forma de bases de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$). O objetivo é melhorar a biocompatibilidade e as propriedades mecânicas dos tecidos empregados em sua confecção.

FIGURA 4: Esquema das reticulações naturais ao longo das fibras de colágeno.

Os problemas observados com as válvulas biológicas pos-implante são decorrentes essencialmente da natureza histológica dos tecidos empregados, da reatividade e propriedades químicas do GA em solução, que resultam na impermeabilização superficial do tecido. A consequência é uma reação heterogênea de tal forma que, regiões internas do tecido ainda mantêm suas características originais, que por exposição, após ruptura mecânica, são responsáveis pelo início do processo de calcificação³³⁻³⁷.

Do ponto de vista da reatividade química, a única reação desejável entre o GA e tecidos biológicos seria aquela com grupos ϵ -amino de resíduos de Lys e hidroxilisina (Hyl) de moléculas adjacentes de tropocolágeno para a formação de ligações cruzadas do tipo base de Schiff (Figura 5).

FIGURA 5: Reticulação (ligações cruzadas) do colágeno com glutaraldeído.

No entanto, soluções aquosas de GA são caracterizadas por misturas complexas em equilíbrio contendo GA livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos (monomérico e polimérico) e vários polímeros α , β -insaturados^{5,35} (Figura 6).

a) Formas monoméricas

b) Hemiacetais poliméricos

c) Polímeros α , β -insaturados

FIGURA 6: (a) Formas monoméricas do glutaraldeído; (b) formação de polímeros hemiacetálicos; (c) formação de polímeros α , β -insaturados.

Por exemplo, uma solução aquosa de GA a 25 % e na temperatura de 25°C apresenta apenas 4% de GA livre, estando o restante sob a forma de mono e diidratados, hemiacetais cíclicos^{35,38}, além de polímeros

α , β -insaturados. Esse equilíbrio depende da temperatura, concentração e pH. Soluções a 25%, quando aquecidas a 50°C, aumentam a concentração de aldeído livre até valores de 35%. Soluções concentradas de GA são relativamente estáveis a baixas temperaturas, enquanto mantidas em meio aquoso, mas perdem rapidamente suas qualidades em soluções tamponadas perto da neutralidade.

Em relação à sua reatividade com o tecido biológico, foi demonstrado que além de lenta à temperatura ambiente, a extensão de sua penetração é inversamente proporcional a profundidade do tecido³⁶. Para o PB foi demonstrado que a fixação com o GA ocorre na superfície das fibras, principalmente quando empregado em altas concentrações, condição esta que corresponde àquela de processamento para a maioria dos métodos de confecção de biopróteses³⁵. Essa impermeabilização é decorrente principalmente da formação de ligações cruzadas poliméricas³⁹ e tem como consequência a não reticulação de regiões internas da matriz colagênica³⁶. A resultante é a presença de tecido residual nativo que, por exposição após falhas mecânicas, pode funcionar como sítio primário para o início do processo de calcificação, como tem sido mostrado por técnicas de microscopia eletrônica³³⁻³⁴.

Ainda como consequência da heterogeneidade das soluções de GA, surgem manifestações citotóxicas provavelmente devido às ligações cruzadas

poliméricas, que podem gradualmente liberar o GA pós-implante. Efeitos citotóxicos do GA são observados para concentrações entre 10 e 25 ppm^{35,40}. Tratamentos com reagentes capazes de bloquear a função aldeídica não minimizam esses problemas, uma vez que só neutralizam as funções aldeídicas livres⁴¹⁻⁴² durante o processamento, não impedindo, portanto, sua liberação pós-implante.

Outras complicações, também relacionadas ao uso do GA, estão associadas à heterogeneidade dos tipos de ligações cruzadas induzidas por esse reagente. Nas condições em que são utilizados, três tipos de ligações cruzadas³⁸ são formados: base de Schiff (Figura 7), derivadas do íon piridínium, seguido por reações de condensação aldólica com GA livre (Figura 8) e a formação de aminas secundárias estáveis através da reação de adição de aminas primárias a polímeros α , β -insaturados de GA (Figura 9).

FIGURA 7: Formação de ligações cruzadas na forma de aminas secundárias tendo como intermediário a base de Schiff.

FIGURA 8: Formação de ligações cruzadas do tipo piridínio em matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído.

FIGURA 9: Reticulação de proteína via polímeros α , β -insaturados de glutaraldeído.

Por outro lado o único critério utilizado para verificar o "grau de pureza" das soluções de GA empregadas na confecção de válvulas cardíacas é a relação das absorbâncias 280/235 nm, indicativa das concentrações relativas de GA livre e formas poliméricas. São consideradas soluções aceitáveis aquelas cujos índices estão entre 1,5 e 2,5, que são dependentes da procedência comercial do GA e do método de purificação.

As considerações acima mostram a dificuldade de obter-se materiais homogêneos para a confecção das biopróteses, pelo tratamento com GA, característica desejável em qualquer biomaterial, principalmente os dirigidos ao sistema cardiovascular.

I.1.2. Procedimentos alternativos para o glutaraldeído

Novas técnicas têm sido introduzidas visando melhorar a performance das biopróteses, que se utilizam ou de novos reagentes tais como os tratamentos com éteres glicídicos e hexametilenodiisocianatos⁴³⁻⁴⁹, glicerol⁵⁰, azida⁴¹⁻⁴², quelantes de cálcio⁵¹⁻⁵², ou variações metodológicas no uso do GA^{32,53-56}. Os resultados ou não são promissores ou ainda não apresentam causística significativa para que tais modificações possam ser avaliadas do ponto de vista clínico.

a - Éteres glicidílicos

Este método é caracterizado pela utilização de epóxidos ⁵⁷, que dá origem a materiais mais hidrofílicos em relação àqueles tratados com GA, devido ao tipo de ligações químicas principalmente aquelas do tipo éster (Figura 10), e a formação de grupos alcóolicos.

FIGURA 10: Reticulação de matrizes de colágeno via éteres glicidílicos.

Em experimentos de subcutâneo de ratos, este tratamento mostrou-se menos susceptível a processos de calcificação quando comparado com materiais tratados com GA. Este tratamento forneceu materiais com valores de temperatura de encolhimento e resistência a degradação enzimática aceitáveis para a confecção de válvulas cardíacas, entretanto seus valores foram inferiores àqueles tratados com GA, principalmente a degradação enzimática que foi 3,6 vezes inferior. Os resultados de propriedades mecânicas foram similares em ambos tratamentos. Um dos problemas desta reação é a alta

reatividade dos epóxidos com todos os sítios ativos presentes no colágeno, tornando difícil sua manipulação em função da baixa seletividade química.

b - Azida

Para o caso da reação de PB com acil azida⁵⁸ (Figura 11), em relação àquela realizada com GA, as vantagens estão associadas à ausência de citotoxicidade (que no caso do GA ocorre após o implante, com a liberação de GA livre através de ligações cruzadas poliméricas³⁹), formação de ligações cruzadas apenas entre grupos próximos, não induzindo portanto as ligações poliméricas, e também não alterando o ponto isoelétrico da proteína. Os resultados de temperatura de desnaturação e resistência a degradação enzimática apresentaram valores similares àqueles encontrados para materiais tratados com GA e aceitáveis para a confecção de válvulas cardíacas.

FIGURA 11 - Reticulação de matrizes de colágeno via azida.

Um dos problemas da metodologia introduzida inicialmente é que alterações estruturais podem ser induzidas sobre a matriz, devido às reações de transesterificação dos grupos ésteres presentes nas cadeias α do tropocolágeno⁵⁹, durante a metanólise, ou de hidrazinólise, que poderiam eventualmente levar à alterações estruturais da matriz com resultantes imprevisíveis nas propriedades mecânicas do material. Outro problema com a metodologia convencional é a baixa eficiência da reação global, principalmente a etapa da metanólise que consome cerca de uma semana.

Recentemente, um método mais eficiente para reticulação, via azida, foi introduzido pelo uso da difenilfosforilazida (DDPA)⁴², onde as reações de esterificação e hidrazinólise são suprimidas, minimizando, portanto, alterações estruturais em função do mecanismo da sua reação (Figura 12). Além disso, este processo é significativamente mais rápido em relação ao processo original.

FIGURA 12: Reticulação de matrizes de colágeno via difenilfosforilazida.

Um problema comum aos dois métodos, entretanto, é a utilização de solventes orgânicos como metanol e o dimetilformamida (DMF), cujos efeitos sobre a estrutura do PB não foram descritos.

c - Diisocianatos

Outro tratamento alternativo para o GA é a utilização do hexametilenodiisocianato, também uma molécula bifuncional capaz de ligar covalentemente nos resíduos de ϵ -amino grupo de lisina tanto intra como intercadeia, formando poliuréias entre os grupos isocianatos e grupos aminas⁴³ (Figura 13). Por meio deste tratamento obteve-se materiais com valores de temperatura de desnaturação, resistência à degradação enzimática e propriedades mecânicas aceitáveis para a confecção de válvulas cardíacas. O material tratado com hexametilenodiisocianato apresentou menores índices de citotoxicidade depois da implantação em subcutâneo de ratos, quando comparados ao GA⁶⁰. Entretanto, ainda não existem dados publicados a respeito de implantes valvulares com os materiais obtidos por meio deste tratamento.

FIGURA 13: Reação entre ϵ -amino grupos com isocianatos.

d - Agentes anticalcificantes

Agentes anticalcificantes a base de difosfonatos e agentes complexantes de cálcio tem sido empregados⁶¹. Seus mecanismos consistem em inibir o crescimento de cristais de fosfato de cálcio. Entretanto, estes tratamentos que são utilizados pós-implante não são isentos de efeitos colaterais, pois também induzem a descalcificação da matriz óssea⁶¹. Minimização destes efeitos tem sido tentadas pela fixação destes agentes na própria matriz da prótese biológica⁶². O reagente mais comum empregado para este propósito é o 3-amino-1-hidroxipropanodifosfonato ($\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COH}(\text{P}(\text{O})_2\text{OH})_2$), o qual foi incorporado ao pericárdio bovino pelos resíduos da função aldeído do glutaraldeído⁶³.

e - Tratamento com íons de metais

Íons metálicos como Al^{+3} e Fe^{+3} , freqüentemente empregados em pacientes com falhas renais, também têm sido utilizados na prevenção de calcificação de biopróteses, provavelmente por não permitir o crescimento de cristais de hidroxiapatita^{41, 61}, e sem efeitos adversos para o organismo⁶¹. Sua ação também pode estar associada ao mecanismo da fosfatase alcalina, por meio da competição que estes íons fazem com o cálcio, tanto na formação da fase mineral pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina ou sua competição com íons metálicos Zn^{+2} e Mg^{+2} da enzima. A ação dos íons Al^{+3} e Fe^{+3} se faz principalmente em células desvitalizadas do PB ou em regiões das

membranas ricas em fosfato, prevenindo a cristalização de hidroxiapatita nestes sítios. Os tratamentos com estes íons têm sido feitos não apenas por administração convencional, mas também por liberação controlada em matriz de quitosana, um polissacarídeo natural, não tóxico e biodegradável⁶⁴.

Ações mais eficazes destes íons foram observadas após a remoção seletiva de lipídeos do tecido biológico, pelo tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) ou solventes orgânicos. Efeitos similares são observados quando se remove as proteoglicanas⁶⁵.

f - Tratamento com detergente ou extração com solventes orgânicos

Pré-tratamento do folheto das válvulas biopróteses com detergentes inibem a calcificação do implante devido à extração de fosfolipídeos e proteoglicanas que modificam a superfície de cargas na matriz colagênica⁶⁵, graças à sua grande densidade de carga negativa. Estes dois componentes teciduais estão diretamente implicados no processo de calcificação das biopróteses, por meio de reações com o cálcio em virtude da presença do fosfato ou sulfato que poderiam dar início à formação de sais de cálcio insolúveis, germes iniciais para a nucleação de hidroxiapatita⁶⁵. O inconveniente associado a estes procedimentos é a desestruturação da matriz tecidual que, via de regra, é intensa^{65,66}.

g - Variantes do tratamento com glutaraldeído

- Tratamento com ácido α -amino oléico

Ácido 2-amino-oléico³¹ é um potente agente anticalcificante, biocompatível e não tóxico que é introduzido na matriz do tecido após um pré-tratamento com GA (Figura 14). Os resultados obtidos *in vivo* com estes materiais mostraram uma redução significativa da calcificação das biopróteses pós-implante em carneiros, sugerindo que este método venha a ser de grande utilidade na preparação de materiais, não apenas para a construção de biopróteses, mas também de outros materiais para a área cardiovascular.

FIGURA 14: Estabilização de matrizes de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e ácido α -amino oléico.

- Fixação dinâmica

Estudos dinâmicos realizados com as biopróteses mostraram que as tensões as quais os folhetos são submetidos após implantes, são bastante diferentes quando comparados sua parte inferior com sua parte superior⁶⁷. Partindo desta informação, foi introduzido o processamento das válvulas, tanto de PB quanto de porcina, com GA, durante seu funcionamento dinâmico^{68,69}, na tentativa de melhor adaptar as reações de reticulação ao seu funcionamento biológico.

- Efeito da temperatura

No processo de reticulação convencional, em que é empregado GA em altas concentrações e em temperatura ambiente, ocorre polimerização de GA na superfície das fibras de colágeno impedindo uma penetração deste no interior do tecido³³⁻³⁴.

Com base nos estudos de fixação do tecido por GA para avaliações histopatológicas, uma maneira de melhorar a qualidade da fixação foi realizá-la com temperaturas mais altas⁷⁰. Quando matrizes colagênicas são expostas à temperaturas entre 45 e 60°C, ocorrem modificações no tecido, possibilitando uma maior reatividade e maior homogeneidade na reação do tecido com GA, em função da exposição de sítios de reação que não são expostos em temperaturas ambientes⁷¹. Além disso, com relação a solução de GA, a

vantagem de utilizar altas temperaturas, está relacionada com o aumento na formação de monômeros a partir de suas formas poliméricas³⁵.

O produto da reação em altas temperaturas entre PB e GA seria mais homogêneo em toda a extensão do tecido, com menor índice de ligações cruzadas poliméricas, melhorando as qualidades mecânicas, com redução simultânea da citotoxicidade e a expectativa de menores taxas de calcificação.

- Outros métodos

Estes métodos, de modo geral, implicam no tratamento dos tecidos fixados com GA e aminoácidos, proteínas ou mesmo antibióticos⁷². Somente a combinação de gentamicina e glicina preveniu a calcificação quando implantado em subcutâneo de ratos, possivelmente pela mudança na superfície de carga^{72,73}.

Um tratamento alternativo, na tentativa de prevenir a calcificação, consistiu na utilização de sulfato de protamina. Modificações no tecido são causadas pelas reações com sulfato de protamina, um peptídeo polibásico, rico em arginina, que altera as cargas superficiais do colágeno, via reticulação com formaldeído e posteriormente glutaraldeído, conferindo resistência à calcificação⁷⁴.

I.2. Comentários gerais sobre o estado da arte

Apesar de tantos métodos alternativos, o GA continua sendo utilizado, pois um teste definitivo de eficiência e validade destes tratamentos alternativos envolve ensaios clínicos das válvulas, elevando o custo da pesquisa, com resultados a longo prazo. Outro fator determinante diz respeito à falta de garantia quanto a calcificação, pois mesmo materiais que apresentaram resultados positivos nos ensaios (testes anticalcificação *in vitro* e *in vivo*), estão sujeitos à ruptura do material e em seguida ocorrência de calcificação quando as biopróteses forem implantadas nos pacientes, após transcorrer a expectativa de vida média que está em torno de onze anos em adultos¹⁴.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um novo método de reticulação do PB com GA, sendo o PB tratado desde baixas concentrações de GA até aquelas convencionalmente utilizadas⁷⁵ e, também associado a variações de temperatura. É esperado que se obtenha, a partir da introdução destas variáveis, materiais com melhores propriedades mecânicas para a confecção de válvulas cardíacas, principalmente sabendo-se que:

- Em baixas concentrações de GA, associado a variações de temperatura, deverá ocorrer um deslocamento do equilíbrio para a forma de GA de livre, e também deverá exercer efeitos estruturais sobre a matriz colagênica, permitindo uma maior penetração do reagente e, como consequência, dar origem à reações mais homogêneas, melhorando as propriedades mecânicas e biológicas das biopróteses.

III - PARTE EXPERIMENTAL

FIGURA 15: Esquema experimental para o desenvolvimento de novos materiais para confecção de válvulas biológicas

III.1. - Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau PA: H_3PO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH , NaCl , HCl , CaCl_2 , etanol, tartarato de sódio e potássio, tris(hidroximetil)-aminometano (tampão Tris). Os demais foram a glicina, colagenase (Sigma-tipo V, 435 U/mg), tripsina (Merck-3,5U/mg), albumina de soro bovino (Sigma - 96-99%), glutaraldeído (GA, Union Carbide), o qual foi purificado como descrito na literatura⁵, e sua pureza determinada pela relação das absorvâncias 280/235nm que, para o caso de válvulas cardíacas biológicas, deve estar compreendida entre 1,5 a 2,5. Neste trabalho a relação obtida foi de 2,7.

III.2. Tecido Utilizado

O tecido utilizado foi o pericárdio bovino (PB), fornecido pela Braile Biomédica S.A.(São José do Rio Preto), já desengordurado e obtido de animais com idade entre 30 e 60 meses, o sangue removido por lavagem com solução de NaCl 0,9%, seguido de água para remoção do NaCl e estocado em solução de etanol a 70%.

III.3. Experimento de reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído

Os experimento de reticulação foram realizados em peças de PB com dimensões de 2 x 3 cm e 5 x 5 cm, com espessura de 0,25mm a 0,30mm previamente equilibrados em tampão fosfato (TF) 0,13 Mol.L^{-1} pH 7,4, por

24 h, seguido do tratamento com soluções de GA de acordo com a rotina geral: intervalo de temperatura entre 5 e 45°C, tempo de reação entre 5 e 90 min. Concentrações de GA foram variáveis entre 0,001% e 0,5% e o volume empregado foi de 10 mL para cada 6cm² de PB. As reações de reticulação foram realizadas em erlenmeyer de 125 mL fechados com PARAFILM e a temperatura controlada por meio de banho termostático. Após o tempo pre-determinado para a reação, as peças foram lavadas durante 15 min, por 4 vezes, com solução de TF. A reação de reticulação foi interrompida pelo tratamento com uma solução glicina:borato³⁶ 0,025 Mol.L⁻¹:0,05Mol.L⁻¹ pH 9,2, durante 30 min., seguido por quatro lavagens com solução de TF a intervalos de 15 min. Este tratamento foi realizado antes de qualquer tratamento subsequente do PB com outras soluções de GA ou estocagem para sua avaliação posterior.

III.3.1. Reticulação seqüencial do pericárdio bovino

III.3.1.1. Temperatura constante de 25°C e tempo variável.

Trinta e seis peças de PB de 2 x 3 cm foram divididas em seis grupos com seis unidades cada, sendo cada grupo tratado com uma solução de GA a 0,001% na temperatura de 25°C. Ao término de 5 min, uma das peças foi retirada e, após o procedimento padrão descrito no item III.3, mantida na geladeira. As demais peças foram tratadas com uma solução de GA com concentração imediatamente superior e este procedimento repetiu-se até que a

última peça deste conjunto tivesse sido tratada seqüencialmente com concentrações de GA e tempos de reações que variaram entre 0,001% 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,5% e 5, 10, 20, 40, 60 e 90 min.

III.3.1.2. Temperatura variável e tempo constante

A - 90 minutos e concentração de glutaraldeído até 0,5%

Trinta peças de PB de 2 x 3 cm foram divididas em cinco grupos de seis unidades e um dos grupos foi tratado com uma solução de GA a 0,001% em TF na temperatura de 5°C, por 90 min. Após este tempo uma das peças foi removida e tratada como descrito no item III.3. As demais peças foram transferidas para a solução de GA de concentração imediatamente superior e este procedimento repetiu-se até que todo o conjunto fosse tratado com concentrações de GA entre 0,001% e 0,5% num intervalo de temperatura entre 5, 15, 25, 35 e 45°C, por períodos de 90 min.

B - 90 minutos e concentração de glutaraldeído até 0,1%

Neste experimento, adotou-se o mesmo procedimento e com as mesmas variáveis do tratamento no item A, com exceção da concentração de GA, que foi até 0,1% neste, contra 0,5% naquele. Estes materiais foram submetidos à ação de collagenase e tripsina.

C - 10 minutos e com concentrações de glutaraldeído até 0,05 e 0,1%

Este tratamento seguiu o mesmo procedimento descrito no item anterior, exceto que as peças foram tratadas por tempos de 10 minutos, concentrações de GA até 0,05% e 0,1% e temperaturas de 5, 25 e 45°C. Estes materiais foram submetidos à ação de collagenase e tripsina.

III.3.2. Reticulação não seqüencial

III.3.2.1. tempo variável e temperatura de 25°C.

Trinta e seis peças de PB de 2 x 3cm foram divididas em seis grupos de seis unidades. Para o primeiro grupo, cada peça, isoladamente, foi tratada a 25°C, com uma solução de GA a 0,001%, e submetidas a reticulação por tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 90 min. Após as lavagens convencionais, já descritas acima, foram mantidas em TF. Os demais grupos passaram pelo mesmo tratamento, exceto com concentrações de GA de 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,5%.

III.3.2.2. Temperatura variável e tempo constante

A. 90 minutos e concentração de glutaraldeído de 0,5%

Trinta peças de PB de 2 x 3cm foram divididas em cinco grupos de seis unidades. Para o primeiro grupo, cada peça isoladamente foi tratada por um tempo de 90 minutos com uma solução de GA a 0,001%, nas temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45°C. Após as lavagens convencionais, já descritas acima,

foram mantidas em TF. Os demais grupos passaram pelo mesmo tratamento, exceto com concentrações de GA de 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,5.

B - 90 minutos e concentração de glutaraldeído de 0,1%

Neste experimento, adotou-se o mesmo procedimento e com as mesmas variáveis do tratamento no item A, com exceção da concentração de GA, que foi de 0,1% neste, contra 0,5% naquele. Estes materiais foram submetidos à ação de collagenase e tripsina.

C - 10 minutos e com concentrações de glutaraldeído de 0,05 e 0,1%

Para este tratamento foi utilizado o mesmo procedimento que o anterior, exceto que as peças foram tratadas por tempos de 10 minutos, concentrações de GA de 0,05% e 0,1% e temperaturas de 5, 25 e 45°C. Estes materiais foram submetidos à ação de collagenase e tripsina.

III.4. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica é uma medida indireta do índice de reticulação de uma matriz colagênica submetida a reagentes de reticulação e pode ser avaliada por Td (Temperatura de desnaturação) ou Ts (Temperatura de encolhimento). Neste trabalho foi utilizado o valor de Ts representando a média do intervalo de temperatura onde uma amostra de tecido, no caso o PB, encolhe 1/3 de seu comprimento original⁵⁹. O valor Ts foi determinado após o tratamento de PB como descrito nos experimentos de reticulação.

De cada peça PB, tratada ou não com GA, foram retiradas de três a cinco tiras de 20 x 2 mm cada, sendo esta fixada na parte inferior de um tubo de vidro cilíndrico de 3 mm de diâmetro interno, contendo solução de TF. Este tubo de vidro foi imerso em silicone líquido cuja temperatura foi elevada com razão de aquecimento de 2°C/min a partir da temperatura ambiente. Os resultados de Ts, expressos neste trabalho, representam uma média de três a cinco determinações independentes e o equipamento utilizado foi aquele da Quimis para determinação de ponto de fusão, modelo Q 340-13, com adaptações para medidas de Ts.

III.5. Hidrólise enzimática do pericárdio bovino

III.5.1. collagenase

III.5.1.1. Procedimento

De cada peça de PB tratado com GA nos experimentos III.3.1.2 (B e C) e III.3.2.2 (B e C), ou não tratado, foram retirados 3 discos de 0,8 cm de diâmetro, sendo removido o excesso de solução com papel de filtro. Estes discos foram pesados, colocados em frascos de vidro, congelados em nitrogênio e liofilizados até massa constante, obtendo-se aproximadamente 10 mg de massa para cada disco, os quais foram colocados em solução de collagenase (Sigma - tipo V, 435U/mg) com tampão tris-HCl 10mM contendo CaCl₂ 25 mM, a pH 7,4, numa relação massa de enzima:proteína de 0,0345 mg/mg de proteína, com atividade de 17U/mg. O conjunto de solução

enzimática e PB, após terem sido submetidos ao vácuo para penetração da enzima na matriz, foram colocados em estufa bacteriológica por 96 h à temperatura de 37°C. Após este período, o material foi aquecido em banho maria por 5 min e o resíduo, após 3 lavagens com água por intervalos de 15 min, foi congelado em nitrogênio e liofilizado até a massa constante. A intensidade da reação hidrolítica da collagenase foi medida pela relação entre a massa não degradada e a massa inicial.

III.5.2. Tripsina

III.5.2.1. Procedimento

De cada peça de PB, tratada nos experimentos III.3.1.2 (B e C) e III.3.2.2 (B e C) ou não tratado, foram obtidos 3 discos de diâmetro de 0,5 cm, aquecidos por 5 min em banho maria para a desnaturação do colágeno (a tripsina só age sobre colágeno desnaturado⁵⁹) e, em seguida, os discos, individualmente, foram congelados em nitrogênio e liofilizados até massa constante, cerca de 3mg/disco. A solução de tripsina (Merk - 3,5U/mg) foi preparada em tampão borato 0,2Mol.L⁻¹ a pH 7,6, numa relação de massa enzima:proteína de 0,016 mg/mg de proteína, com uma atividade de 0,056U/mg. O CaCl₂ que normalmente é utilizado nas hidrólises com tripsina, não foi empregado, pois sua presença interfere na reação com Biureto⁷⁶. Após a adição da solução de tripsina, as amostras foram submetidas ao vácuo, para penetração da enzima na matriz, sendo em seguida, colocadas em estufa bacteriológica por 10 horas na temperatura de 25°C. Após este período, os

hidrolisados foram aquecidos em banho maria por 3 min para inibir a ação da enzima e as suspensões centrifugadas à 3000rpm por 10 min. A avaliação da extensão da solubilização foi determinada pela análise dos peptídeos solúveis no sobrenadante pelo método de Biureto⁷⁶ como se segue:

Adicionou-se 1 mL de sobrenadante em 4 mL da solução de Biureto (1,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 6g de tartarato de sódio e potássio, 300 mL solução de NaOH a 10% e o volume completado para um litro) e após homogeneização, deixou-se repousar por 30 min a temperatura ambiente. As absorbâncias (coloração resultante: azul) foram lidas em 544nm (Hitachi mod. 1.100). As concentrações de peptídeos livres foram determinadas pela interpolação destes valores de absorbância, em uma curva de calibração. Os resultados de absorbância foram comparados com uma curva de calibração para a albumina, obtida nas mesmas condições com concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL (Figura 16).

FIGURA 16: Curva de calibração de albumina.

III.6. Ensaios Mecânicos

Os PB utilizados para ensaios mecânicos, foram fixados em bastidores de plásticos de 16 cm de diâmetro com tensão controlada, a fim de evitar dobras ou estiramento excessivo do tecido, e as amostras estudadas foram: a - O PB tratado, seqüencialmente, na concentração de GA de 0,001% à 0,1%, com uma temperatura de 45°C, tratadas durante o tempo de 90min para cada etapa de tratamento; b - O PB tratado, não seqüencialmente, para a concentração de GA de 0,1% e nas mesmas condições de tempo e temperatura.

O critério de escolha destes materiais tiveram como base o Ts e a estabilidade a hidrólise enzimática. Os ensaios, realizados pela Braile Biomédica S.A, foram feitos segundo a norma ASTM-D-638 da American Society for Testing and Materials.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. ESTABILIDADE TÉRMICA

Os resultados da Figura 17 mostraram a dependência de T_s para PB, tratado com GA, em função do tempo de reação entre 5 e 90 minutos e tratamento seqüencial na concentração de GA de 0,001 a 0,5%. Como esperado, os valores de T_s aumentam com a concentração, independentemente do tempo de tratamento, mas diretamente proporcionais a concentração de GA. Enquanto para a solução a 0,001%, após 90 minutos, o valor de T_s foi de $66,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$, para a concentração de 0,5% seqüencial, após 90 minutos, o valor de T_s foi de $88,7 \pm 0,4^\circ\text{C}$.

Observou-se que, para o tratamento seqüencial, até 0,05% de GA, as curvas foram caracterizadas por um valor máximo de T_s , que diminuiu para 10 minutos. Para o caso da concentração de GA a 0,001%, o valor máximo de T_s , após 5 minutos, foi de $68,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$ que diminuiu em seguida estabilizando-se próximo aos $66,5^\circ\text{C}$. À medida em que se aumentou a concentração de GA, este ponto de máxima foi menos acentuado e quase não foi observado para a concentração de GA de 0,5%. Esse comportamento de T_s para baixas

concentrações de GA, sugere que a reação de GA com PB, nas condições empregadas, não é homogênea, seja em termos de evolução estrutural da matriz ou da estabilização da química das reações de reticulação.

FIGURA 17: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função do tempo de reação e processamento seqüencial, na temperatura de 25°C .

Os resultados para PB, tratados de modo não seqüencial (Figura 18), nas mesmas condições de tempo e concentração como descrito para o tratamento seqüencial (Figura 17), apresentaram um comportamento de T_s

similar, exceto que, enquanto as curvas neste último tornaram-se mais homogêneas a partir da concentração de 0,05%, a aparente heterogeneidade da reação, para o tratamento não sequencial, foi observada-mesmo para concentração de GA de 0,5%.

FIGURA 18: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função do tempo de reação e processamento não sequencial, na temperatura de 25°C .

Apesar de similares, os resultados de T_s , para o tratamento sequencial, sugerem que este procedimento dê origem à materiais mais

homogêneos e podem estar associados a um maior número e a uma maior homogeneidade na distribuição das ligações de reticulação. Estas diferenças de comportamento não são devidas às diferenças de concentrações totais de GA utilizadas, pois, no método seqüencial, a somatória das concentrações foi de 0,666%, comparado com 0,5%, para o tratamento não seqüencial, o que é reforçado pela similaridade nos valores de Ts que foram respectivamente $87,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $88,4 \pm 0,6$.

Os estudos do efeito da temperatura sobre a reação de reticulação de PB com GA, medidos com Ts, para concentrações entre 0,001 e 0,5%, no intervalo de temperatura entre 5°C e 45°C , por um tempo de 90 minutos de reação (Figura 19), mostraram que o Ts foi mais sensível às variações de temperatura em concentrações intermediárias de GA, sendo menos sensível em concentrações maiores e menores. No caso do tratamento com solução de GA a 0,001% o valor de Ts, que a 5°C foi de $69,1 \pm 0,2$, decresceu, ligeiramente, em temperaturas maiores, mas se manteve praticamente constante, nestas, provavelmente porque a concentração de GA utilizada não é suficiente para completar a reação de reticulação.

Para o caso da concentração 0,005%, os valores de Ts subiram progressivamente, em função do aumento da temperatura, até um valor de $79,4 \pm 0,4$ com uma temperatura de 35°C , decaindo a seguir, sugerindo que, nestas condições pode estar ocorrendo uma regressão estrutural do pericárdio,

provavelmente associado a rearranjos das ligações de reticulação. Para concentrações superiores a 0,005%, as curvas de dependência do T_s para o tratamento seqüencial, em função da temperatura, foram similares, com maior sensibilidade à temperatura observada para as concentrações entre 0,01 e 0,5% de GA.

FIGURA 19: Temperatura de encolhimento (°C) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função da temperatura de reação por procedimento seqüencial, no intervalo de tempo de 90min.

Nestes casos, exceto para a concentração de 0,01%, os valores de T_s a 45°C foram todos próximos àquele determinado após o tratamento sequencial com a concentração de GA a 0,5%, o que sugere que concentrações de GA, superiores a 0,1%, podem não ser necessárias para o tratamento de PB com GA, se a reação é realizada na temperatura de 45°C e, levando-se em conta, apenas o parâmetro estabilidade térmica como índice de qualificação para válvulas cardíacas.

Este comportamento de T_s observado às temperaturas superiores a 35°C, estão provavelmente associados a uma maior concentração de GA monomérico⁵ e, portanto, aumento da eficiência das soluções de GA na promoção das ligações de reticulação. Este comportamento pode estar associado também à exposição de um maior número de sítios de reação da matriz de PB, decorrentes de rearranjos estruturais da matriz, como observado para o comportamento do PB, após o tratamento com solução de GA a 0,005% a 35°C.

Os resultados do tratamento não sequencial, apresentados na Figura 20, foram similares àqueles do tratamento sequencial, exceto que não foi observado, para o caso da concentração de GA a 0,005%, a regressão da matriz. A evolução de T_s para o tratamento sequencial mostrou que os materiais obtidos por este procedimento são mais homogêneos quando

comparados com aqueles obtidos pelo tratamento não seqüencial, da mesma forma que ocorreu nos estudos da dependência do tempo de reação.

FIGURA 20: Temperatura de encolhimento ($^{\circ}\text{C}$) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, em função da temperatura de reação por procedimento não seqüencial, durante o intervalo de tempo de 90 min.

IV.2. ESTABILIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios para a determinação da estabilidade biológica relativa do PB, obtido pelos métodos de reticulação seqüencial e não seqüencial, foram

avaliados pela ação da collagenase e tripsina. A extensão de hidrólise por collagenase é inversamente proporcional ao grau de reticulação. A tripsina atua sobre resíduos de ϵ -amino grupo de lisina livres. Entretanto sua ação é inibida se este grupo estiver com sua carga neutralizada, que é o caso quando esta terceira função está comprometida pela formação da base de Schiff, grupo funcional formado na reação de reticulação do PB tratado com GA (Figura 21).

FIGURA 21: Mecanismo de inibição da ação tripsínica por reação de matrizes colagênicas com glutaraldeído.

Os resultados de collagenase e tripsina para PB tratados sequencialmente ou não, com concentrações de GA entre 0,001% a 0,1%, por

tempos de 10 e 90 min e com temperaturas entre 5°C e 45°C, são mostrados pela Figura 22 e Tabelas I e II. A resultante geral dos números mostrados foram aqueles esperados, isto é, maiores concentrações de GA e maiores temperaturas estão associadas, via de regra, a menores índices de hidrólise, seja por collagenase ou tripsina. Algumas diferenças, entretanto, foram observadas, decorrentes da metodologia de reticulação empregada e do tempo de reação.

TABELA I: Hidrólise enzimática por collagenase e tripsina de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído por 10 min e temperatura variável.

tempe ratura (°C)	Forma de tratamento	(%) de massa degradada					
		collagenase			tripsina		
		Atividade enzimática (17 U/mg)			Atividade enzimática (0,056 U/mg)		
		[GA] (%)			[GA] (%)		
		0	0,05	0,1	0	0,05	0,1
5	seqüencial	94,6	92,1	92,3	64,7	42,8	33,5
	não seqüencial		92,3	91,6		51,8	43,2
25	seqüencial	94,6	77,3	29,8	64,7	56,5	46,3
	não seqüencial		94,0	83,6		61,7	56,5
45	seqüencial	94,6	37,9	1,6	64,7	22,1	6,0
	não seqüencial		42,5	5,1		40,8	25,8

a - Avaliação da atividade após 10 minutos de reação:

Atividade collagenolítica

Os resultados mostraram que, para 10 minutos de reação e em uma temperatura de 5°C, praticamente não foram observadas diferenças significativas de estabilidade enzimática quando comparou-se o procedimento seqüencial ao não seqüencial, visto que, os índices de hidrólise para os materiais tratados foram cerca de 92%, muito próximos daqueles determinados para o pericárdio nativo que foi de 94,6%, indicativo também que a reação de GA com PB a baixas temperaturas é lenta.

Entretanto, com aumento da temperatura para 25°C, houve diferenças significativas de estabilidade enzimática, onde os materiais, tratados seqüencialmente, mostraram sempre uma maior estabilidade. Neste caso, enquanto o material tratado seqüencialmente mostrou um índice de hidrólise de 29,8% para o tratamento com GA a 0,1%, no tratamento não seqüencial os resultados de hidrólise mostraram um índice de 83,6%. Os resultados de materiais tratados a 45°C, mostraram mais uma vez a maior estabilidade de materiais tratados seqüencialmente, sendo os índices de hidrólise iguais a 1,6% e 5,1%, respectivamente, para o tratamento seqüencial e não seqüencial.

Em relação ao índice de hidrólise do pericárdio nativo, materiais tratados seqüencialmente com GA, até a concentração de 0,1%, na temperatura de 45°C, foram mais estáveis do ponto de vista da collagenase, por um fator de

59,0 vezes, enquanto que o procedimento não seqüencial foi mais estável apenas por um fator de 18,4 vezes.

Atividade tripsínica

Para o caso da atividade tripsínica, os resultados mostraram que, da mesma forma para o caso da colagenase, as diferenças de índices de hidrólise de materiais tratados seqüencialmente ou não, na temperatura de 5°C, não foram muito significativas. Entretanto, à medida que se aumentou a temperatura, diferenças significativas foram observadas, principalmente, para a temperatura de 45°C. Neste caso, enquanto o método seqüencial apresentou um índice de hidrólise de 6,0%, o PB tratado não seqüencialmente apresentou um índice de 25,8%, ou seja, cerca de 4,3 vezes menos estável à ação da tripsina em bases comparativas. Portanto nas condições utilizadas, os resultados de atividade tripsínica mostraram que materiais tratados com GA, pelo procedimento seqüencial, foram mais estáveis biologicamente, mostrando que este processo é capaz de introduzir um maior número de reticulações na matriz colagênica.

Em relação ao índice de hidrólise do pericárdio nativo, materiais tratados seqüencialmente com GA, até a concentração de 0,1%, na temperatura de 45°C, foram mais estáveis do ponto de vista da tripsina, por um fator de 10,7 vezes, enquanto que materiais tratados pelo procedimento não seqüencial foram mais estável apenas por um fator de 2,5 vezes.

b - Avaliação da atividade após 90 minutos de reação:

O comportamento da estabilidade biológica, determinado a um tempo de reação a 90 min, nas mesmas condições do tratamento a 10 min são mostrados pela Figura 22 e Tabela II.

FIGURA 22: Estabilidade do pericárdio bovino frente à hidrólise enzimática por collagenase (A) e com tripsina (B) em função da temperatura (5, 15, 25, 35 e 45°C). Tempo de reação: 90 minutos.

Atividade collagenolítica

Diferentemente dos resultados mostrados pela Tabela I, quando o PB tratado durante 10 minutos, na temperatura de 5°C, foi submetido a ação da collagenase e, praticamente não houve diferenças significativas na hidrólise, em função do tratamento seqüencial e não seqüencial. Para o tratamento a 90 minutos, as diferenças nos índices de hidrólise foram significativas, tendo o PB tratado seqüencialmente mostrado muito mais estabilidade do que o não seqüencial.

No tratamento seqüencial, o índice de hidrólise foi de 9,5% enquanto que, no tratamento não seqüencial o índice de hidrólise foi de 70,5%, sugerindo, portanto que, mesmo com baixas temperaturas, tempos maiores de tratamento levam a materiais mais estáveis, e neste caso cerca de 8 vezes (Tabela II). Apesar dos índices de hidrólise, para temperatura superiores a 15°C, ainda favorecerem o tratamento seqüencial, as diferenças não se mostraram tão significativas quando comparadas com tratamento de apenas 10 minutos (Tabela I).

Em relação ao índice de hidrólise do PB nativo, materiais tratados seqüencialmente com GA, até a concentração de 0,1%, foram mais estáveis do ponto de vista da collagenase, por um fator de 25,7 vezes, enquanto que, materiais tratados pelo procedimento não seqüencial foram mais estáveis por um fator de 18,8 vezes.

Atividade tripsínica

Para o caso da ação tripsínica, os resultados mostraram que o tratamento seqüencial foi sempre mais eficiente na promoção da reação de reticulação (Figura 22 e Tabela II).

TABELA II: Hidrólise enzimática por collagenase e tripsina de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído por 90 min e temperatura variável.

Temperatura (°C)	Forma de tratamento	(% de Massa degradada)			
		Collagenase		Tripsina	
		Atividade enzimática (17 U/mg)		Atividade enzimática (0,056 U/mg)	
		[GA] (%)		[GA] (%)	
		0	0,1	0	0,1
5	seqüencial	97,8	9,5	50,7	40,4
	não seqüencial		70,6		52,9
15	seqüencial	97,8	7,2	50,7	19,6
	não seqüencial		9,1		37,2
25	seqüencial	97,8	2,6	50,7	9,3
	não seqüencial		6,5		15,5
35	seqüencial	97,8	7,4	50,7	3,4
	não seqüencial		5,3		6,0
45	seqüencial	97,8	3,8	50,7	1,9
	não seqüencial		5,2		2,3

Quando se comparam os índices de hidrólise para reações realizadas com tempos de 10 e 90 minutos para o tratamento seqüencial, observou-se que o índice de hidrólise para temperatura de 45°C por 10 minutos de reação, foi de 6%, enquanto que, àqueles para tempos de 90 minutos foram respectivamente de 9,3, 3,4 e 1,9% para as temperaturas de 25, 35 e 45°C, indicando assim uma maior eficiência do tratamento em temperaturas superiores.

Em relação ao índice de hidrólise do PB nativo, materiais tratados seqüencialmente com GA, até a concentração de 0,1%, foram mais estáveis do ponto de vista da tripsina, por um fator de 26,6 vezes, enquanto que, materiais tratados não seqüencial foram mais estáveis por um fator de 22,0 vezes.

É interessante observar que estas variações de estabilidade enzimática, principalmente para temperaturas menores, não apresentam correlação direta com Ts, visto que, para as mesmas condições de concentração de GA, os métodos seqüencial e não seqüencial não apresentaram diferenças significativas no comportamento de Ts como mostra a Figura 23. Estes resultados associados àqueles de estabilidade enzimática, mostraram que estabilidade térmica não é um parâmetro ideal para o acompanhamento e qualificação de materiais biológicos para uso como biomateriais, principalmente, em caso de utilização na confecção de válvulas

cardíacas. Entretanto esta avaliação se faz necessária para uma avaliação quantitativa do material e também serve para mostrar se realmente ocorreu a ação do GA sobre o PB.

FIGURA 23: Temperatura de encolhimento (°C) para o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído na concentração de 0,1%, em função da temperatura (5, 15, 25, 35 e 45°C). Tempo de reação: 90 min.

IV.3. ENSAIOS MECÂNICOS

O PB, tratado sequencialmente ou não, foi submetido a medida de espessura, Ts e testes de resistência mecânica. Os resultados obtidos são

apresentados na Tabela III, sendo possível comparar os resultados deste tratamento com os padrões mínimos necessários para confecção de uma válvula cardíaca⁴.

TABELA III: Propriedades mecânicas para pericárdio bovino tratado pelo procedimento seqüencial e não seqüencial, em comparação com valores padrões necessários para a confecção de válvulas cardíacas.

Parâmetros	Padrão Braile Biomédicas	Novo tratamento		Novo tratamento + tratamento convencional	
		Seqüen ^a	não seqüen	Seqüen	Não seqüen
Ts (°C)	83,0	83,0	85,0	84,0	86,0
Espessura (mm)	0,25-0,30	0,32-0,35	0,25-0,32	0,32-0,36	0,35-0,36
Elongamento (%)	acima de 17	50,00	47,50	61,25	58,75
Índice de tenacidade	acima de 11,5	32,81	32,16	65,23	54,63
Resistência à tração (Kgf/mm ²)	acima de 1,8	1,75	1,66	2,13	1,86

^a = seqüencial

Os resultados de ensaios mecânicos, mostrados na Tabela III, apresentaram-se acima dos valores mínimos necessários para a confecção de

válvulas cardíacas, com exceção aos obtidos no teste de resistência à tração que foi de 1,75 Kgf/mm² para tratamento seqüencial. Esse mesmo material foi tratado, convencionalmente pela Braile Biomédica, obtendo-se, então para todos os ensaios mecânicos, valores superiores aos mínimos necessários e também superiores aos obtidos nos ensaios acima citados.

V - CONCLUSÃO

Os resultados de estabilidade térmica mostraram que a reticulação do PB é heterogênea, em função da reatividade e propriedades químicas do GA em solução e da própria estrutura do pericárdio. Esta heterogeneidade, entretanto foi reduzida quando tratou-se o material seqüencialmente em altas temperaturas.

Os resultados mostraram que o tratamento seqüencial do PB, dá origem à materiais mais homogêneos do ponto de vista de estabilidade enzimática, sugerindo uma distribuição de reticulação mais uniforme tanto no interior como na superfície do material, o que não acontece com o tratamento convencional.

Os resultados de hidrólise enzimática mostraram que Ts não é um parâmetro apropriado para qualificar materiais destinados à confecção de válvulas cardíacas, pois, para as mesmas condições de concentração de GA, os métodos seqüencial e não seqüencial não apresentaram diferenças significativas no comportamento de Ts, observando-se entretanto variações de estabilidade enzimática.

Os resultados de ensaios mecânicos, com exceção da resistência à tração, apresentaram valores aceitáveis para a confecção de válvulas cardíacas, com tempo de reação inferior ao tratamento convencional.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - HUFNAGEL, C.A.; HARVEY, W.P. The surgical correction of aortic insufficiency. Bull. Georgetown U. Med. Cent., v.6, p.60-5., 1952.
- 2 - MURRAY, G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. Angiology, v. 7, p.466-71, 1955.
- 3 - STARR, A., EDWARDS, M.L. Mitral replacement: clinical experience with a ball valve prosthesis. Ann. Surg., v.15, p.726-40, 1960.
- 4 - DAVID, T.E.; ROPCHAN, G. C.; BUTANY, J. W.; Aortic valve replacement with stentless porcine bioprotheses, J. Card. Surg., vol.3, p.501-5, 1988.
- 5 - BRAILE, DM. Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica na posição mitral. São Paulo, 1990. Tese de doutorado - Escola Paulista de Medicina.
- 6 - CARPENTIER, A.; NASHEF, A.; CARPENTIER, S.; AHMED, A.; GOUSSEF, N. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprotheses. Circulation., v.70, suppl. I, p.165-8, 1984.
- 7 - SCHOEN, F.J. The first step to understanding valve failure: an overview of pathology. Eur. J. Cardiothorac Surg., v.6, suppl. 1P, p.S50-3, 1992.
- 8 - WERNLY, J.A., CRAWFORD, M.H. Choosing a prosthetic heart valve. Cardiol. Clin., v.9, n.2, p.329-38, 1991.

- 9 - VRANDRECIC, M.O.; GONTIJO FILHO, B.; PAULA E SILVA, J.A.; FANTINI, F.A.; BARBOSA, J.T.; SAO JOSE, M.C.; DOS SANTOS PINTO, C.A.; VIEIRA, G.L.; OLIVEIRA, H.G.; RABELO, S.; PEREDO, E.A.; BARBOSA, M.; MOTTO, H.C.; BRAGA, M.A.; MACIEL, F.J. Clinical results with the Biocor porcine bioprostheses. J. Cardiovasc. Surg., v.32, n.6, p.807-13, 1991.
- 10 - SUZIGAN, S.; BRAILE, D.M.; SOUZA, D.R.; ROSSI, M.A. Pathologic findings in 74 dysfunctional Braile-Biomédica bovine pericardial heart valves recovered at reoperation, 1978 to 1990. J. Cardiovasc.Surg., v.35, n.2, p.139-145, 1994.
- 11 - RENZULLI, A.; DE LUCA, L.; CARUSO, A.; VERDE, R.; GALZERANO, D.; COTRUFO, M.S.O. Acute thrombosis of prosthetic valves: a multivariate analysis of the risk factors for a life threatening event. Eur. J. Cardiothorac. Surg., v.6,n.8, p.412-20, 1992.
- 12 - HAMMERMEISTER, K.E.; SETHI, G.K.; HENDERSON, W.G.; OPRIAN, C.; KIM, T.; RAHIMTOOLA, S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease. N. Engl. J. Med., v.328, n.18, p.1289-96, 1993.
- 13 - JAMIESON, W.R. Modern cardiac valve devices-bioprostheses and mechanical prostheses: state of the art. J. Card. Surg., v.8, n.1, p.89-98, 1993.
- 14 - BRAILE, D. M.; ARDITO, R. A.;GRECO, O. T.; LORGA, A.M. IMC bovine pericardial valve:11 years. J. Cardiac Surg.,v. 6, n. 4p. 580-88, 1991.
- 15 - HATA, T.; NAMBA, H.; SONE, Y.; KUINOSE, M.; MURAKAMI, T.; TANIGUCHI, G. Mechanical valve thrombosis in the tricuspid

- position - reoperative management of 2 cases. Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi., v.39, n.2, p.236-9, 1991.
- 16 - SOLYMAR, L.; RAO, P.S.; MARDINI, M.K.; FAWZY, M.E.; GUINN, G. Prosthetic valves in children and adolescents. Am. Heart J., v.121, n.2 pt. 1, p.557-68, 1991.
- 17 - THULIN, L.I. Age-related complications and optimal choice of artificial heart valves in elderly patients. J. Cardiovasc. Surg., v.32, n.4, p.497-502, 1991.
- 18 - McGRATH, L.D.; COLKINS, M.S.; CHEN, C.; BAILEY, R.M.; GRAF, D.; FERNANDEZ, J. Actuarial survival and other events following valve surgery in octogenarians: comparison with an age-, sex-, and race-matched population. Eur. J. Cardiothorac. Surg., v.5, n.6, p.319-25, 1991.
- 19 - ACAR, J. What type of heart valve prosthesis after age 70. Ann. Cardiol. Angiol., v.40, n.10, p.571-3, 1991.
- 20 - NINET, J.; EL KIRAT, M.; VIGNERON, M.; CURTIL, A.; PERINETTI, M.; CHAMPSAUR, G. Saint-Jude Medical tricuspid prosthesis. Long term clinical, biological and echocardiographic assessment. Arch. Mal. Coeur Vaiss., v.84, n.3, p.343-7, 1991.
- 21 - SBAROUNI, E.; OAKLEY, C.M. Outcome of pregnancy in women with valve prostheses. Heart J., v.71, n.2, p.196-201, 1994.
- 22 - BRAILE, D. M.; VOLPE, M. A.; RAMIN, S.L.; SOUZA, D.R.S. Tratamento cirúrgico das valvopatias. Parte 1. Rev.Bras. cir. Cardiovasc., v. 9, p. 113-122, 1994.
- 23 - KOPPENSTEINER, R.; MORITZ, A.; SCHLICK, W.; FENZI, G.; ROEDLER, S.; EHRINGER, H.; WOLLNER, E. Blood rheology after cardiac valve replacement with mechanical prostheses or bioprostheses. Am. J. Cardiol., v.67, n.1, p.79-83, 1991.

- 24 - COUDRAY, N.; PAVIE, A.; FONTANEL, M.; LABEDAN, F.; CARABASSE, D.; LIONNET, P.; PAPOUIN, G.; ROULLET, J.C.; LECA, F.; CABROL, C. Our experience with bioprostheses in French Polynesia. A follow-up study from 1975 to 1988. Arch. Mal. Coeur Vaiss., v.84, n.9, p.45-64, 1991.
- 25 - BROWN Jr., P.S.; ROBERTS, C.S.; McINTOSH, C.L.; SWAIN, J.A.; CLARK, R.E. Late results after triple-valve replacement with various substitute valves., Ann. Thorac. Surg., v.55, n.2, p.502-8, 1993.
- 26 - KAWACHI, Y., MASUDA, M.; TOMINAGA, R.; TOKUNAGA, K., Comparative study between St. Jude Medical and bioprosthetic valves in the right side of the heart., Jpn. Circ. J., v.55, n.6, p.553-62, 1991.
- 27 - MULDER, G. A., Five years' experience with the Björk-Shiley tilting disc valve in isolated aortic valvular disease, J Thorac. Cardiovasc. Surg., 68:403, 1974
- 28 - NICOLOFF, DM., EMERY, RW., Current status of the St Jude cardiac valve prosthesis., Contemp. Surg., 15, 11-26, 1979.
- 29 - PACCAGNELLA, A., MAJINI, G., OTTAVIANI, G., ARRU, P., SANTI, M., VALLANA, F., Properties of a new carbon film for biomedical applications., The International Journal of Artificial Organs., vol.9, n.2, p 127-130, 1986.
- 30 - PARK, J.B., Biomaterials Science and Engineering., New York, Plenum Press, 1984.
- 31 - GOTT, J.P., PAN-CHIH, DORSEY, L.M., JAY, J.L., JETT, G.K., SCHOEN, F.J., GIRARDOT, J.M., GUYTON, R.A., Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization., Ann. Thorac. Surg., v.53, n.2, p.207-15, 1992.
- 32 - GRIMM, M., EYBL, E., GRABENWOGER, M., SPREITZER, H., JAGER, W., GRIMM, G., BOCK, P., MULLER, M.M., WOLNER,

- E., Glutaraldehyde affects biocompatibility of bioprosthetic heart valves., Surgery., v.111, n.1, p.74-8, 1992.
- 33 - 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, n.3, p.156-65, 1993.
- 34 - LEE, Y.S., Calcification of porcine bioprosthesis implanted into human heart: high resolution scanning electron microscopic and scanning tunneling microscopic investigation., J. Electron Microsc., v.43, n.3, p.131-40, 1994.
- 35 - RUIJGROK, J.M., WIJN, J.R., BOON, M.E., Optimizing glutaraldehyde cross-linking effects of time, temperature and concentrations measured by shrinkage temperature. J. Mat. Sci. Mat. Med., v.5, p.80-87, 1994.
- 36 - CHEUNG, D.T., NATASHIA, P., KO, E.C., NIMNI, M.E., Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen in tissues. Connect Tis. Res., v.13, p.109-15, 1985.
- 37 - CHEUNG, D.T., NIMNI, M.E., Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen., Connect. Tis. Res., v.10, p.201-6, 1982.
- 38 - WOODROOF, E.A., Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. J. Bioeng., v.2, p.1-19, 1978.
- 39 - NIMNI, M. E., Collagen., CRC Press, Inc., v. 3, cap. 11, 1988.
- 40 - SCHOEN, F.J., TSAO, J.W., LEVY, R.J., Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses., Am. J. Pathol., v. 123, 134-145 1986.
- 41 - SIMMONS, D.M., KEARNEY, J.N., Evaluation of collagen cross-linking techniques for the stabilization of tissue matrices. Biotechnol. Appl. Biochem., v.17, pt.1, p.23-9, 1993.

- 42 - PETIT, H., FREI, V., HUC, A., HERBAGE, D., The use of diphenylphosphoryl-azide for crosslinking of collagen biomaterials., J. Biomed. Mat. Res., v.28, p.159-65, 1994.
- 43 - NAIRMARK, W.A., PEREIRA, C.A., TSANG, K., LEE, M.J.J., HMDC crosslinking of bovine pericardial tissues: a potential role of the solvent environment in the design of bioprosthetic materials., J. Mat. Sci: Mat. Med., v.6, p.235-41, 1995.
- 44 - TOMIZAWA, Y., NOISHIKI, Y., OKOSHI, T., KOYANAGI, H., Development of a polyepoxy compound cross-linked heterologous connective tissue tube. ASAIO J., v.38, n.3, p.M357-61, 1992.
- 45 - XI, T., LIU, F., XI, B., Effect of pretreatment with epoxy compounds on the mechanical properties of bovine pericardial bioprosthetic materials., J. Biomater. Appl., v.7, n.1, p.61-75, 1992.
- 46 - XI, T., MA, J., TIAN, W., LEI, X., LONG, S., XI, B., Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests in vitro and in vivo. J. Biomed. Mater. Res., v.26, n.9, p.1241-51, 1992.
- 47 - GIRARDOT, M.N., TORRIANNI, M., GIRARDOT, J.M., Effect of AOA on glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve cusps and walls: binding and calcification studies., Int. J. Artif. Organs., v.17, n.2, p.76-82, 1994.
- 48 - SUNG, H.W., TU, R., SHEN, S.H., WITZEL, T.H., LIN, D., HATA, C., KINGSBURY, C.J., NOISHIKI, Y., TOMIZAWA, Y., QUIJANO, R.C., A newly developed porcine heart valve bioprosthesis fixed with an epoxy compound. An experimental evaluation. ASAIO J., v.40, n.2, p.192-8, 1994.
- 49 - SUNG, H.W., SHEN, S.H., TU, R., LIN, D., HATA, C., NOISHIKI, Y., TOMIZAWA, Y., QUIJANO, R.C., Comparison of the cross-linking

- characteristics of porcine heart valves fixed with glutaraldehyde or epoxy compounds. ASAIO J., v.39, n.3, p.M532-6, 1993.
- 50 - LIAO, K.X., SEIFTER, E., GONG, G.F., YELLIN, E.L., FRATER, R.W., Improved biocompatibility of bovine pericardium using a new method of cross linking., ASAIO Trans., v.37, n.3, p.M175-6, 1991.
- 51 - JOHNSTON, T.P., WEBB, C.L., SCHOEN, F.J., LEVY, R.J., Assessment of the in vitro transport parameters for etanehydroxy diphosphate through a polyurethane membrane. A potential refillable reservoir drug delivery device., ASAIO J., v.38, n.3, p.M611-6, 1992.
- 52 - GOLOMB, G., SCHLOSSMAN, A., SAADEH, H., LEVI, M., VAN GELDER, J.M., BREUER, E., Bisacylphosphonates inhibit hydroxyapatite formation and dissolution in vitro and dystrophic calcification in vivo., Pharm. Res., v.9, n.1, p.143-8, 1992.
- 53 - GRIMM, M.; GRABENWOGER, M.; EYBL, E.; MORITZ, A.; BOCK, P.; MULLER, M.M.; WOLNER, E. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. J. Card. Surg., v.7, n.1, p.58-64, 1992.
- 54 - GRABENWOGER, M., GRIMM, M., EYBL, E., LEUKAUF, C., MULLER, M.M., PLENCK Jr, H., BOCK, P., Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. J. Biomed. Mater. Res., v.26, n.9, p.1231-40, 1992.
- 55 - HOFFMAN, D., GONG, G., LIAO, K., MACALUSO, F., NIKOLIC, S.D., FRATER, R.W., Spontaneous host endothelial growth on bioprostheses. Influence of fixation. Circulation., v.86, n.5, suppl., p.II75-9, 1992.
- 56 - POMERANTZEFF, P.M., LEINER, A.A., HAYASHIDA, S.A., SILVA, M.L., PURCHIO, R.A., JATENE, A.D., A non-conventional reniform

- heart valve bioprosthesis with improved performance, ASAIO J., v.38, n.3, p.M607-10, 1992.
- 57 - IAMURA, E., SAWATANI, KOYANAGI, H., NOISHIKI, Y. MIYATA, T., Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets: subcutaneous implant studies in rats, Journal of Cardiac Surgery., v. 4, p. 50-57, 1989.
- 58 - PETIT, H., RAULT, I., HUC, A., MANASHE, P., HERBAGE, D., Use of the acil azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium, Journal of Biomedical Materials Research., v. 24, p. 179-187, 1990.
- 59 - RAMACHANDRAN, G. N., Treatise on collagen., London, Academic Press, v. 1, 1967.
- 60 - DAMINK, L. H. H., DIJKSTRA, P. J., VAN LUYN, M. J. A, VAN WACHEM. P. B., NIEUWENHUIS, P., FEIJEN, J., Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate, Journal of Materials Science: Materials in medicine., v. 6, p. 429-434, 1995.
- 61 - HIRSCH, D., SCHOEN, F. J., LEVY, R. J., Effects of metallic ions and diphosphonates on inhibition of pericardial bioprosthetic tissue calcification and associated alkaline phosphatase activity, Biomaterials, v. 14, n. 5, p. 371-377, 1993.
- 62 - LEVY, R. J., WOLFRUM, J., SCHOEN, F. J., HAAWWLEY, M. A., LANGER, R., Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by controlled-release diphosphonate., Science., v. 228, p. 190-92, 1958.
- 63 - WEBB, C. L., BENEDICT, J. J., SCHOEN, F. J., LINDEN, J. A.,LEVY, R. J., Inhibition of bioprosthetic heart valve calcification with aminodiphosphonate covalently bound to residual aldehyde groups, Ann Thorac Surg., v. 46, p. 309-316, 1988.

- 64 - CHANDY, T., MOHANTY, M., JOHN, A., RAO, B. S., SIVAKUMAR, R., SHARMA, C. P., VALIATHAN, M. S., Structural studies on bovine bioprosthetic tissues and their *in vivo* calcification: prevention via drug delivery, Biomaterials., v. 17, n. 6, p. 577-585, 1996.
- 65 - HERRERO, E. J., FERNANDEZ, P., GUTIERREZ, M., OLIVARES, J. L. C., Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans, Biomaterials., v. 12, p. 683-688, 1991.
- 66 - KRASOVSKAYA, S. M., UZHINOVA, M. D., ANDRIANOVA, M. YU., PRISCHENKO, A. A., LOMONOV, M. V., Biochemical and physicochemical aspects of biomaterials calcification, Biomaterials., v. 12, p. 817-820, 1991.
- 67 - CROFTS, C. E., TROWBRIDGE, E. A., The tensile strength of natural and chemically modified bovine pericardium, Journal of Biomedical Materials Research., v. 22, p. 89-98 1988.
- 68 - SONG, T., VESELY, I., BOUGHNER, D., Effects of dynamic fixation on shear behavior of porcine xenograft valves, Biomaterials, v. 11, p. 191-196, 1990.
- 69 - NOORT, R. VAN., YATES, S. P., MARTIN, T. R. P., BARKER, A. T., BLACK, M. M., A study of effects glutaraldehyde and formaldehyde on the mechanical behaviour of pericardium, Biomaterials., v. 3, p. 21-6, (1982).
- 70 - KOK, L. P., BOON, M. E., Microwave cookbook for microscopists., Coulomb Press., Leiden, 1992.
- 71 - HOPWOOD, D., YEAMAN, D., MILNE, G., Histochem. J., v. 20, p. 341, 1988.
- 72 - CHANDA, J., Posttreatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium, Artif Organs., v. 18, n. 5, p. 408-410, 1994.

- 73 - HERRERO, E. J., FERNÁNDEZ, P., ESCUDERO, C., GARCÍA-PÁEZ, J. M., CATILLO-OLIVARES, J. L., Calcification of pericardial tissue preteated with different amino acids, Biomaterials., v. 17, n. 6, p.571-575, 1996.
- 74 - GOLOMB, G., ERZA, V., Prevention of bioprosthetic heart valve tissue calcification by charge modification: effects of protamine binding by formaldehyde, Journal of Biomedical Materials Research., v. 25, p.85-98, 1991.
- 75 - FIGUEIRÓ, S. D., Retiuculação progressiva de pericárdio bovino: novo procedimento para confecção de válvulas cardíacas. São Carlos, 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos: Universidade de São Paulo.
- 76 - BRUENING, G., Biochemical Experimentals., New york, John Wiley, cap. 1, p. 1-11, 1970.