

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Marina Junko Shiotsu
Maizato E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA EM 15.04.2003
Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

Avaliação das Propriedades do Pericárdio Bovino Liofilizado

Autor : **Marina Junko Shiotsu Maizato**

Orientador: **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Co-orientador: **Adolfo Alberto Leirner**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS

Avaliação das Propriedades do Pericárdio Bovino Liofilizado

Autor: **Marina Junko Shiotsu Maizato**

Orientador: **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Co-orientador: **Adolfo Alberto Leirner**

Curso: Engenharia Mecânica

Área de concentração: Materiais e Processos

Tese de doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 15 de abril de 2003

S.P. – Brasil

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	unicamp
	M288a
V	EX
TOMBO BC	55938
PROC	16/124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/01/03
Nº CPD	

CM00189232-9

Bib id 301994

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M288a Maizato, Marina Junko Shiotsu
Avaliação das propriedades do pericárdio bovino
lioofilizado / Marina Junko Shiotsu Maizato. --Campinas,
SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia e
Adolfo Alberto Leirner.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Válvulas cardíacas artificiais. 2.
Biocompatibilidade. 3. Compatibilidade sanguínea. 4.
Secagem por congelação. 5. Membranas (Biologia). I.
Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II. Leirner, Adolfo
Alberto. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

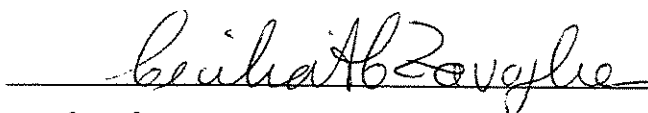
TESE DE DOUTORADO

**Avaliação das Propriedades do Pericárdio
Bovino Liofilizado**

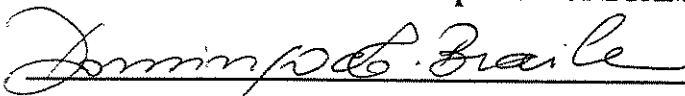
Autor: Marina Junko Shiotsu Maizato

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

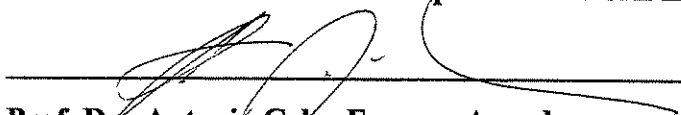
Co-orientador: Adolfo Alberto Leirner



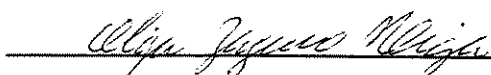
**Prof^a. Dr^a. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**



**Prof. Dr. Domingos Marcolino Braile
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**



**Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca Arruda
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**



**Prof^a. Dr^a. Olga Zazuco Higa
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN – SP**



**Prof. Dr. José Baptista Portugal Paulin
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo**

Campinas, 15 de abril de 2003

Dedicatória

Ao Luiz, meu esposo, pelo seu carinho e apoio durante o decorrer da tese.

À Isabella, minha filha, que veio alegrar o nosso convívio.

Agradecimentos

A realização e a conclusão desta tese só foram possíveis graças ao desprendimento e à generosidade de muitas pessoas que colaboraram durante todo o trajeto do trabalho.

Primeiramente, quero agradecer aos meus orientadores: Prof^a. Dr^a. Cecília A. C. Zavaglia, do Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas (DEMA/FEM/UNICAMP) e Prof. Dr. Adolfo A. Leirner, da Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/HC.FMUSP), que direcionaram os caminhos a trilhar dentro da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ronaldo N. Pitombo, do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que viabilizou a realização desta tese. Foi incansável na liofilização das membranas de pericárdio bovino, com o auxílio inestimável de seu técnico Gledson M. Guimarães sempre pronto para atender às minhas solicitações.

À minha amiga Dr^a. Olga Z. Higa, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN/SP), agradeço a realização dos ensaios de citotoxicidade. Agradeço também o seu empenho para acelerar a conclusão dos ensaios em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

À Dr^a Mônica B. Mathor, do IPEN/CNEN/SP, agradeço a sua colaboração no ensaio de citotoxicidade.

À Dr^a Maria Aparecida P. Camillo, ao Dr. Patrick J. Spencer e ao técnico José Maria de Souza, do IPEN/CNEN/SP, meus agradecimentos pelo auxílio na realização dos ensaios em HPLC.

Quero registrar o meu agradecimento aos funcionários do DEMA/FEM/UNICAMP: meu amigo José Luis Lisboa que, com muita paciência e bom humor, realizou os intermináveis ensaios de tração mecânica; minhas amigas Rita H. B. Jacon e Claudenete Leal, pela realização da microscopia de varredura; Nilza Batista, do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP, sempre simpática, pela ajuda na manipulação do equipamento de Ponto Crítico para a secagem das membranas de pericárdio bovino não liofilizadas.

Aos funcionários da Divisão de Bioengenharia do InCor/HC.FMUSP: minha amiga Ana Maria Lordêlo, pelo auxílio no preparo das membranas de pericárdio bovino para o ensaio de estabilidade térmica; meus amigos Dr. Euclydes Marques, Maria de Lourdes L. Silva, Dimas H. da Silva e Cira D. L. Peixoto, pelo apoio e amizade; meu amigo Sérgio A. Hayashida, pela ajuda no esclarecimento das minhas dúvidas; minha amiga Amélia Q. Hashimoto, pela amizade e revisão gramatical; meu amigo Mauro Ushizima, pela ajuda na elaboração do programa do Mathlab.

Aos funcionários da Fundação Zerbini/Fisics: Inês R. da Silva e Ana Maria R. da Silva, pela coleta de pericárdio bovino nos matadouros de animais; Helena Hiekata, pelo preparo dos reagentes utilizados no tratamento do pericárdio bovino.

Agradecimentos especiais ao meu amigo César A. M. Pereira e ao Prof. Dr. Raul Bolinger, da Biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC.FMUSP, que me ajudaram a realizar os ensaios preliminares de tração mecânica para a definição da amostragem do meu trabalho e pelo empréstimo do dispositivo de corte de corpos de prova-padrão *American Society for Testing and Materials* (ASTM).

Minhas sinceras desculpas se deixei de mencionar algum colaborador; enfim, quero agradecer a todos que direta ou indiretamente me apoiaram, incentivaram e ajudaram na conclusão desta tese.

Epígrafes

O talento educa-se na calma, o caráter no tumulto da vida.

Göethe

*Capacidade de mudar é indispensável. Igualmente indispensável é a
capacidade de adaptar-se rapidamente ao que é bom.*

John Foster Dulles

Um guerreiro da luz sabe que é livre para escolher o que deseja.

*Suas decisões são tomadas com coragem, desprendimento,
e, às vezes, uma certa dose de loucura.*

Paulo Coelho

Resumo

Maizato, Marina Junko Shiotsu, *Avaliação das Propriedades do Pericárdio Bovino Liofilizado*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais e Processos da Universidade Estadual de Campinas, 2003. 120 p. Tese (Doutorado)

A liofilização de membranas de pericárdio bovino (PB) ou de próteses valvares cardíacas pode melhorar e facilitar aspectos como o armazenamento, a esterilização e a manipulação. Este trabalho apresenta alguns resultados da liofilização, referentes às propriedades mecânicas do PB e às temperaturas de encolhimento (ST) em 6 grupos de PB. Foram avaliadas 50 amostras de cada grupo. Os grupos avaliados foram: (1) PB fresco; (2) PB fresco congelado em freezer, liofilizado e reconstituído; (3) PB fresco congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e reconstituído; (4) PB tratado com glutaraldeído/formaldeído; (5) PB tratado com glutaraldeído/formaldeído, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e reconstituído; (6) PB fresco, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado, reconstituído e tratado com glutaraldeído/formaldeído. Determinaram-se, seguindo Norma ASTM D638, a resistência à tração, o módulo de elasticidade e a deformação. Comparou-se a citotoxicidade dos grupos estudados (4) e (5), seguindo adaptações de Nakamura (1989) e Norma ISO 10993. Pesquisou-se também nos grupos (4) e (5) os aldeídos residuais via cromatografia de alta performance. As diferenças encontradas nos resultados obtidos, exceto no grupo (2), durante os ensaios mecânicos são estatisticamente não significantes. Em todos os grupos os resultados da ST são estatisticamente não significantes. Conclui-se que o PB pode ser liofilizado antes ou após o tratamento com glutaraldeído/formaldeído sem sofrer alterações nas propriedades mecânicas e na ST. Também os ensaios em membranas liofilizadas de PB tratadas com glutaraldeído/formaldeído mostraram uma indicação de decréscimo de citotoxicidade e teor de aldeídos residuais.

Palavras-Chave: Pericárdio Bovino, Liofilização, Próteses Valvares, Tecidos Biológicos, Biomateriais, Biopróteses

Abstract

Maizato, Marina Junko Shiotsu, *Evaluation of Lyophilized Pericardium Bovine Properties*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais e Processos da Universidade Estadual de Campinas, 2003. 120 p. Tese (Doutorado)

Lyophilization of bovine pericardium (BP) in patches or manufactured valves may provide improved storage, sterilization, and handling. This paper describes the appraisal of some consequences of lyophilization on BP. Mechanical properties and shrinkage temperatures (ST) of six groups of BP, 50 samples each, were evaluated. Groups were: (1) fresh BP; (2) BP frozen in freezer, lyophilized and rehydrated; (3) BP frozen in liquid nitrogen, lyophilized and rehydrated; (4) BP treated with glutaraldehyde/formaldehyde; (5) BP treated with glutaraldehyde/formaldehyde, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and rehydrated, (6) fresh BP, frozen in liquid nitrogen, lyophilized, rehydrated, treated with glutaraldehyde/formaldehyde. It measured ultimate tensile strength, elasticity module, and elongation, according ASTM D638 Standard. It was compared cytotoxicity of groups (4) and (5) following Nakamura (1989) adaptation and ISO10993 Standard. Also in the groups (4) and (5) the residual aldehydes were measured using high performance liquid chromatography. Mechanical properties, except in group (2), are not statistically significant. Difference in the results of ST in all groups are not statistically significant. We concluded that BP can be lyophilized before and after glutaraldehyde/formaldehyde treatment without changing its mechanical properties and ST. Also Lyophilization of BP treated with glutaraldehyde/formaldehyde resulted in of decreasing cytotoxicity and residual aldehydes.

Key Words: Bovine Pericardium, Lyophilization, Valves Prostheses, Biological Tissues, Biomaterials, Bioprosthesis

Sumário

Dedicatória
Agradecimentos
Epígrafes
Resumo
Abstract
Lista de figuras
Lista de tabelas
Nomenclatura
Glossário

1	Introdução	1
2	Revisão da literatura	3
3	Material e método	10
	3.1 Estudo preliminar	10
	3.2 Definição dos grupos de pericárdio bovino avaliados	12
	3.3 Definição do padrão de congelamento a ser utilizada na liofilização	13
	3.4 Coleta de pericárdio bovino	13
	3.5 Liofilização de pericárdios	14
	3.6 Ensaios mecânicos de tensão-deformação estática	15
	3.7 Testes de estabilidade térmica	16
	3.8 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	17
	3.9 Análises histológicas das fibras de colágeno do pericárdio bovino	18
	3.10 Teste de citotoxicidade	18

3.11	Análises das soluções de reconstituição e de lavagem através de HPLC	22
4	Resultados	24
4.1	Definição do padrão de congelamento	24
4.2	Ensaio mecânicos	24
4.2.1	Ilustração dos gráficos utilizando o Matlab	27
4.3	Ensaio de temperatura de encolhimento	31
4.4	Resultados da microscopia eletrônica de varredura	33
4.4.1	Influência da velocidade de congelamento na estrutura do pericárdio bovino	33
4.4.2	Análises das superfícies dos pericárdios bovinos	34
4.5	Análises histológicas	35
4.6	Teste de citotoxicidade	38
4.7	Análises de aldeídos em HPLC	40
5	Discussão	59
5.1	Padrão de congelamento	59
5.2	Dados dos ensaios mecânicos: tensão de ruptura, módulo de Young e deformação	60
5.2.1	Grupos F, F-FR-L e F-N-L	60
5.2.2	Grupos G, G-N-L e F-N-L-G	61
5.3	Dados da temperatura de encolhimento	61
5.4	Análises em microscopia eletrônica de varredura	62
5.5	Análises histológicas	63
5.6	Dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade	63
5.7	Dados obtidos pela análise em HPLC	64

6	Conclusões	66
7	Referências bibliográficas	68
8	Bibliografias consultadas	72
	Anexos	73
	Anexo I – Tabelas com os dados completos obtidos nos ensaios mecânicos	73
	Anexo II – Tabela com os valores completos obtidos nos ensaios de temperatura de encolhimento	87
	Apêndices	90
	Apêndice A – Programa Matlab para processamento de dados	90
	Apêndice B – Análise estatística de tensão de ruptura	99
	Apêndice C – Análise estatística do Módulo de Young	103
	Apêndice D – Análise estatística da deformação	106
	Apêndice E – Análise estatística da temperatura de encolhimento	108
	Apêndice F – Análise estatística do ensaio de citotoxicidade	111
	Apêndice G – Análise estatística do ensaio de HPLC	118
	Apêndice H – Crescimento de colônias CHO	120

Lista de Figuras

Figura 1	Congelamento de membranas de pericárdio bovino em nitrogênio líquido	14
Figura 2	Liofilizador tipo bandeja, no qual o material foi liofilizado	14
Figura 3	Dispositivo de ensaio de tração em dois ângulos	16
Figura 4	Equipamento de secagem por ponto crítico	17
Figura 5	Cultivo e distribuição de células CHO	20
Figura 6	Preparação dos extratos	21
Figura 7	Diluição e distribuição dos extratos com RPMI-FCS	21
Figura 8	Tensão de ruptura média dos pericárdios bovinos	26
Figura 9	Módulo de Young médio dos pericárdios bovinos	26
Figura 10	Deformação média na ruptura	27
Figura 11	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F	28
Figura 12	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-FR-L	28
Figura 13	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-N-L	29
Figura 14	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino G	29
Figura 15	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino G-N-L	30
Figura 16	Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-N-L-G	30
Figura 17	Temperatura média de encolhimento dos pericárdios bovinos	32
Figura 18	MEV de membrana de pericárdio bovino liofilizado (vista em corte), que foi submetido a congelamento lento em freezer	33
Figura 19	MEV de membrana de pericárdio bovino liofilizado (vista em corte),	

	que foi submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido	33
Figura 20	MEV das superfícies lisas e rugosas dos pericárdios bovinos, sem tratamento químico	34
Figura 21	MEV das superfícies lisas e rugosas dos pericárdios bovinos tratados quimicamente	35
Figura 22	Morfologia das fibras de colágeno do pericárdio bovino (aumento de 20 vezes)	36
Figura 23	Morfologia das fibras de colágeno do pericárdio bovino (aumento de 20 vezes)	37
Figura 24	Curva de supressão de colônias	39
Figura 25	Curva-padrão de GA, diluição 1:50	40
Figura 26	Curva-padrão de GA, diluição 1:100	41
Figura 27	Curva-padrão de GA, diluição 1:200	42
Figura 28	Gráfico comparativo das diluições de GA	43
Figura 29	Curva-padrão de FA, diluição 1:50	44
Figura 30	Curva-padrão de FA, diluição 1:100	45
Figura 31	Curva-padrão de FA, diluição 1:200	46
Figura 32	Comparação das curvas-padrão de FA	47
Figura 33	Comparação das curvas-padrão de FA (vista ampliada)	48
Figura 34	Curva da amostra 1: G	49
Figura 35	Curva da amostra 2: G	50
Figura 36	Curva da amostra 3: G	51
Figura 37	Curva da amostra 4: G-N-L	52
Figura 38	Curva da amostra 5: G-N-L	53
Figura 39	Curva da amostra 6: G-N-L	54
Figura 40	Curva de calibração do GA no tempo 1	55

Figura 41	Curva de calibração do GA no tempo 2	56
Figura 42	Curva de calibração do FA	56

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ensaio preliminares: temperatura de encolhimento	10
Tabela 2	Ensaio preliminares: tração estática	11
Tabela 3	Dados médios e seus desvios-padrão de ensaios mecânicos	25
Tabela 4	Médias e desvios-padrão dos valores do ensaio de temperatura de encolhimento	31
Tabela 5	Crescimento de colônias	38
Tabela 6	Quantidade de GA liberada nas amostras	57
Tabela 7	Quantidade de FA liberada nas amostras	58
Tabela A-1	Ensaio de membranas de pericárdio bovino F	73
Tabela A-2	Ensaio de membranas de pericárdio bovino F-FR-L	75
Tabela A-3	Ensaio de membranas de pericárdio bovino F-N-L	77
Tabela A-4	Ensaio de membranas de pericárdio bovino G	80
Tabela A-5	Ensaio de membranas de pericárdio bovino G-N-L	82
Tabela A-6	Ensaio de membranas de pericárdio bovino F-N-L-G	84
Tabela A-7	Ensaio de temperatura de encolhimento dos diversos grupos de PB	87

Nomenclatura

- A: área da seção transversal
- ASTM: *American Society for Testing and Materials*
- bpm: batimentos por minuto
- CHO-K1: *Chinese Hamster Ovary – cell lineage*: K1 = ovário de hamister chinês – linhagem K1
- cm: centímetro
- conc.: concentração
- CO₂: dióxido de carbono
- cont. neg.: controle negativo
- cont. pos.: controle positivo
- CY: símbolo utilizado no trabalho dos autores Pereira et al. (1990) para o pericárdio tratado com cianamida
- °C: grau Celsius
- DP: desvio padrão
- E: módulo de Young
- e: erro
- F: pericárdio fresco em solução fisiológica
- FA: formaldeído

- FCS: *Fetal Calf Serum* = soro fetal bovino
- FD: símbolo utilizado no trabalho dos autores Pereira et al. (1990) para o pericárdio tratado fisicamente por liofilização e reconstituído
- F-FR-L: pericárdio fresco congelado em freezer, liofilizado e reconstituído em solução fisiológica
- F-N-L: pericárdio fresco congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e reconstituído em solução fisiológica
- F-N-L-G: pericárdio fresco congelado em nitrogênio líquido, liofilizado, reconstituído em solução fisiológica, tratado a seguir com glutaraldeído e conservado em formaldeído (lavado em solução fisiológica antes da sua utilização nos ensaios)
- FR: congelamento em freezer
- g: grama
- G: pericárdio tratado com glutaraldeído e conservado em formaldeído, que foi lavado em solução fisiológica
- GA: glutaraldeído
- G-N-L: pericárdio tratado com glutaraldeído e conservado em formaldeído, lavado em solução fisiológica, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e reconstituído em solução fisiológica antes da sua utilização
- GT: símbolo utilizado no trabalho dos autores Pereira et al. (1990) para o pericárdio tratado com GA
- HC.FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HD: símbolo utilizado no trabalho dos autores Pereira et al. (1990) para o pericárdio secado por aquecimento em estufa e reconstituído

- HDPE: polietileno de alta densidade
- HE: hematoxilina eosina
- HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* = Cromatografia Líquida de Alta Performance
- H₂O: água
- IC₅₀(%): índice de citotoxicidade (ocorre a supressão de 50% do crescimento de colônias)
- ISO: *International Organization For Standardization*
- kgf: quilograma força
- kGy: quilo Gray – a unidade GRAY (Gy) é a unidade de dose de radiação ionizante absorvida no SI (Sistema Internacional de Unidades) e equivale a 1 Joule por quilograma. 1 Gy = 100 rads
- L: liofilizado
- l: litro (segundo a IUPAC são aceitos os símbolos L ou l)
- mg: miligrama
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- MPa: megapascal
- N: newton
- N₂: nitrogênio

- nm: nanômetro
- PB: pericárdio bovino
- PBS–CMF: tampão fosfato livre de cálcio e magnésio
- PE: símbolo utilizado no trabalho dos autores Pereira et al. (1990) para o pericárdio tratado com poliglicidil éter
- rpm: rotações por minuto
- RPMI 1640: meio de cultura de células, desenvolvido por Moore e colaboradores para Roswell Park Memorial Institute em 1966
- ST: temperatura de encolhimento
- ua: unidade de área
- ε_{rup} : deformação na ruptura em %
- $\varnothing$: diâmetro
- σ_{rup} : tensão de ruptura
- %: porcentagem

Glossário:

- **aloenxerto.** [De *al(o)-* + *enxerto.*] S. m. Cir. 1. Enxerto que se realiza de um indivíduo para outro, sendo ambos da mesma espécie, mas de genótipos diferentes.
- **antigenicidade.** [De *antigênico* + *-(i)dade.*] S. f. Imun. 1. Capacidade de reagir com anticorpos resultantes de uma resposta imunológica.
- **antifúngico ou antimicótico.** Adj. S. m. 1. Diz-se de, ou agente que combate doenças produzidas por fungo.
- **antimicrobiano.** [De *ant(i)-* + *microbiano.*] Adj. S. m. 1. Diz-se de, ou agente que extermina micróbios; antimicrobico.
- **autólogo.** [De *aut(o)-*¹ + *-logo.*] Adj. 1. Relativo ao próprio indivíduo. 2. Relativo a substâncias ou a formações anatômicas do próprio organismo do indivíduo.
- **bactéria.** [Do gr. *bakterion*, 'pequeno bastão'; tax. *Bacterium.*] S. f. Biol. 1. Microorganismo unicelular, desprovido de núcleo individualizado, pertencente ao grupo que abrange todos os organismos procariotos, à exceção das cianofíceas. [Cf. micróbio. F. paral.: bactério.] Bactéria bífida. Microbiol. 1. Bactéria us. como aditivo alimentar em certos laticínios [v. lactobacilo].
- **biocompatível.** [De *bi(o)-* + *compatível.*] Adj. 2 g. 1. Compatível com organismo vivo.
- **citotoxicidade (cs).** [De *cit(o)-* + *toxicidade.*] S. f. Imun. 1. Capacidade de um agente de exercer ação lítica específica sobre certas células, principalmente devida à ação imunológica, ou a efeito de medicamento antineoplásico.
- **desnaturação.** [De *desnaturar* + *-ção.*] S. f. 1. Ato ou efeito de desnaturar(-se). 2. Quím. Processo ou efeito de desnaturar (5).

- **desnaturar.** [De des- + natura + -ar2.] V. t. d. 1. Quím. Modificar a estrutura de (proteína) pelo uso de calor ou outros agentes, físicos e químicos, destruindo ou alterando suas propriedades fisiológicas e físicas, mas sem alterar a seqüência de seus aminoácidos constituintes.
- **dura-máter.** S. f. Anat. 1. A mais externa e espessa das três camadas que envolvem o encéfalo e a medula espinhal; paquimeninge. [V. *meninge.*] [Pl.: *duras-máteres.*]
- **enterovírus.** [De *enter(o)-* + *vírus.*] S. m. Microbiol. 1. Gênero de vírus picornavirídeos, agentes infecciosos que atuam no tubo digestivo e que são eliminados pela defecação. 2. Espécie, ou espécime desse gênero.
- **esporo.** [Do lat. cient. *spora* < gr. *sporá*; ingl. *spore.*] S. m. 1. Biol. Célula reprodutora capaz de germinar, dando novo organismo. 2. Zool. Célula resultante da divisão múltipla dos protozoários. 3. Citol. Corpúsculo reprodutivo de fungos e algumas bactérias. [Dim.: esporulo.]
- **estenose.** [Do gr. *sténosis.*] S. f. Patol. 1. Estreitamento de qualquer canal ou orifício.
- **fibroblasto.** [De *fibr(o)-* + *-blasto.*] S. m. Histol. 1. Célula jovem, comum em tecido conjuntivo, que se constitui no principal responsável pela formação de tecido fibroso e de material intercelular amorfo.
- **fungo.** [Do lat. *fungu.*] S. m. Biol. 1. Organismo pertencente ao Reino Fungi (q. v.), e que pode existir ou como célula única, ou formar um corpo multicelular dito micélio, que consiste em filamentos denominados hifas. [Os fungos são encontrados, ger., em condições terrestres úmidas e, devido à ausência de clorofila, são ou parasíticos, ou saprofíticos, em relação a outros organismos.] Fungos imperfeitos. Micol. 1. V. *deuteromicotinos.*
- **genótipo.** [De *gen(o)-2* + *-tipo.*] S. m. Genét. 1. Composição gamética total do indivíduo ou zigoto. 2. O conjunto dos genes de um indivíduo. 3. Grupo de indivíduos de igual constituição genética. [Cf. *fenótipo.*]

- **hemostático.** [De *hemóst(ase)* + *-ático*.] Adj. 1. Referente à hemóstase. 2. Diz-se de medicamento contra as hemorragias. ~ V. *lápis* - e *pinça -a*. • S. m. 3. Medicamento contra as hemorragias.
- **imunogênico.** [De *imun(o)-* + *-gen(o)-* + *-ico*²; ingl. *immunogenic*.] Adj. 1. Que torna imune, produz imunidade.
- **lacínia.** [Do lat. *lacinia*, 'floco de lã', 'franja', 'orla'.] S. f. Bot. 1. Segmento de qualquer órgão foliáceo, profundo, estreito e agudo no ápice. [Aplica-se muito ao cálice e à corola. Var.: *lacínio*.] No caso de válvulas cardíacas o termo lacínia refere-se às cúspides (Formação pontiaguda que se apresenta como projeção, em especial cada uma das formações triangulares que compõem a valva cardíaca).
- **ligação cruzada.** são reticulados tridimensionais, onde as ramificações das moléculas podem estar interligadas com diferentes cadeias lineares. Estas configurações moleculares provocam alterações nas propriedades dos polímeros.
- **micobactéria.** [Adapt. do tax. *Mycobacterium*.] S. f. Bacter. 1. Gênero de bactérias da família *Mycobacteriaceae* (v. *micobacteriáceas*), que se apresentam como bastões gram-positivos retos, ou ligeiramente encurvados, aeróbicos, acidorresistentes, sendo a maioria delas de crescimento lento. 2. Qualquer espécie desse gênero, como, p. ex., a *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, e a *M. leprae*, o agente causador da lepra. 3. Qualquer espécime desse gênero.
- **occipício .** [Do lat. *occipitiu*.] S. m. Anat. 1. A parte ínfero-posterior da cabeça; occipúcio, occipital.
- **patches.** pedaços de tecidos biológicos ou sintéticos utilizados para fazer um remendo ou um reforço em artérias, veias, coronárias, coração, etc.
- **pericárdio.** [Do lat. cient. *pericardium* < gr. *perikárdion*.] S. m. Anat. 1. Saco externamente fibroso e internamente seroso, que reveste por fora o coração.
- **picornavirídeos.** S. m. pl. Microbiol. 1. Família de vírus de ARN (q. v.), de ínfimas dimensões, e que inclui, entre outros, os gêneros rinovírus e enterovírus.

- ***slow viruses***. (“virus lento”) vírus com um longo período de incubação entre a infecção e o desenvolvimento de doenças degenerativas como a doença de Kuru ou doença Creutzfeldt-Jakob.
- **suboccipital** . [De *sub-* + *occipital*.] Adj. 2 g. Anat. 1. Localizado abaixo do occipício.
- **tecido conjuntivo**. Histol. 1. Tecido, de que há algumas variedades, e que apresenta diversos tipos celulares, separados por grande quantidade de material intercelular constituído por fibras e por substância fundamental amorfa.
- **xen enxerto** (êr). [De *xen(o)-* + *enxerto*.] S. m. Cir. Plást. 1. Enxerto de tecido transplantado de um indivíduo para outro de espécie diferente.

1 Introdução

O pericárdio bovino (PB), membrana que envolve o coração bovino, é um tecido biológico amplamente estudado na literatura médica e já em uso clínico. A estrutura de tecidos biológicos tipo PB é basicamente de colágeno e são empregados na medicina, após serem adequadamente tratados física e/ou quimicamente para melhorar as suas propriedades mecânicas e imunogênicas, além de controlar os processos de degradação ou calcificação, conforme Herrero et al. (1999). Exemplos de utilização desses tecidos: confecção de próteses cardíacas e próteses vasculares, reparação de ligamentos, sistemas de liberação controlada de drogas, agentes hemostáticos, enxertos, etc.

As próteses valvares confeccionadas com tecidos assim tratados possuem um bom desempenho hidrodinâmico e baixa trombogenicidade, mas o seguimento clínico a longo prazo mostram ainda falhas funcionais por ruptura das lacínias das válvulas e extensa calcificação, conforme Jayakrishnan e Jameela (1996).

O processo de liofilização, secagem de material por sublimação a vácuo, se aplicado em tecidos biológicos humano e animal, poderá facilitar sua estocagem para serem utilizados *a posteriori*, permitindo a confecção de produtos médico-hospitalares (enxertos, próteses, etc.). Os tecidos liofilizados poderão ser preservados secos, permitindo manipulação mais simples e serem esterilizados com raios gama ou outros meios que garantam uma esterilização efetiva. A reconstituição desses tecidos preservados poderá ser feita de forma igualmente simples.

O objetivo principal deste trabalho foi o de estudar as alterações que o processo de liofilização poderia provocar nas características do pericárdio bovino. O PB, após liofilização, foi analisado e avaliado com a finalidade de demonstrar que é possível reconstituí-lo e empregá-lo da mesma forma que o não liofilizado. As possíveis alterações foram estudadas de forma comparativa, utilizando-se como padrão pré-liofilização:

- ♦ Membrana de pericárdio bovino fresco
- ♦ Membrana de pericárdio bovino tratada quimicamente com glutaraldeído e conservada em formaldeído

Pesquisou-se, também, se a liofilização poderia melhorar a compatibilidade biológica do pericárdio tratado com glutaraldeído (GA) / formaldeído (FA), uma vez que estudos feitos por Franks (1998) mostraram que o processo elimina, por sublimação a vácuo, alguns componentes voláteis ou solúveis em água.

Neste estudo, todos os pericárdios bovinos analisados foram colhidos em matadouros, seguindo as técnicas já estabelecidas para a confecção das válvulas de pericárdio bovino, descritas por Ionescu et al. (1977) e Braile (1990). Os corpos de prova utilizados foram recortados de diversas regiões do pericárdio bovino em posições aleatórias e em quantidade suficiente para possibilitar um estudo estatístico. Os ensaios feitos foram de:

- ♦ Tração mecânica;
- ♦ Estabilidade térmica;
- ♦ Visibilização das estruturas dos pericárdios liofilizados e não liofilizados;
- ♦ Análise histológica;
- ♦ Citotoxicidade nas membranas de pericárdio bovino, tratadas com glutaraldeído, comparando-se as liofilizadas e não liofilizadas;
- ♦ Análise quantitativa de aldeídos, utilizando cromatografia líquida de alta performance. Foram medidos, comparativamente, os aldeídos residuais em tecidos de PB tratados com GA, liofilizados e não liofilizados.

A análise dos resultados desses ensaios permitirá caracterizar as propriedades do pericárdio bovino, que é o objetivo proposto deste trabalho.

2 Revisão da literatura

A liofilização é um processo para obtenção de produtos secos pela retirada da água de compostos sólidos úmidos ou de soluções ou dispersões, com a obtenção de gelo, que é removido por sublimação a vácuo.

A liofilização é muito utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e em produtos biológicos. Na área farmacêutica é um processo importante que permite a preservação de drogas sensíveis ao calor e a agentes biológicos. A aplicação mais comum na indústria farmacêutica é na manufatura de produtos injetáveis.

O processo de liofilização foi introduzido comercialmente por volta da Segunda Guerra Mundial com a finalidade de preservar o plasma sangüíneo. A seguir, o processo foi utilizado para a liofilização de antibióticos, vacinas, vitaminas, etc. Gatlin e Nail (1994) mostraram que a importância da liofilização aumenta com o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a base de proteínas, peptídeos e outras macromoléculas que são química e fisicamente instáveis em soluções aquosas.

Segundo Franks (1998) e Jennings (1997), a qualidade do produto liofilizado pode ser influenciada por diversos fatores como: recipiente utilizado para o congelamento, a quantidade do meio líquido utilizado durante o congelamento, estabilidade do material ao ciclo de congelamento, modelo do liofilizador, temperatura e velocidade de congelamento, umidade residual, ciclos de secagem, etc.

Os produtos biológicos e farmacêuticos liofilizados devem obedecer a certos critérios e requisitos como a estabilidade física, química, mecânica e biológica. Os processos devem possibilitar boa repetitividade e baixo custo, conforme Franks (1998).

A liofilização dos produtos biológicos facilita a esterilização dos mesmos por meios efetivos, utilizando raio gama. Parízek et al. (1989) descreveram experiência de 5 anos,

trabalhando com pericárdios bovinos tratados com GA, liofilizados e esterilizados por radiação gama para utilização como substituto de dura-máter na reconstituição suboccipital em crianças. Os mesmos autores também experimentaram esterilizar os pericárdios liofilizados, utilizando óxido de etileno, obtendo-se um bom resultado.

O GA e o FA são freqüentemente citados como líquidos esterilizantes, entretanto, pelos estudos de Hilbert et al. (1988) não são eficazes contra *slow viruses*. Produtos contendo aldeídos são mais rigorosamente desinfetantes de alto grau. A eficácia dos aldeídos como esterilizantes para bactérias, fungos e enterovírus dependem basicamente das condições de concentração, pH, temperatura e tempo de exposição. Baixas concentrações de GA, como as utilizadas na fixação de tecidos biológicos para promover as ligações cruzadas não são muito eficazes contra micobactérias, esporos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*) e fungos (*Chaetomium globosum*). As próteses valvares são atualmente esterilizadas e preservadas em soluções de FA após tratamento com GA, seguindo o processo definido por Ionescu et al. (1977) e Braile (1990). Para Hilbert et al. (1988), o FA a 4% é um antifúngico e antimicrobiano mais eficiente do que o GA a 0,2% e 0,5%, concentrações normalmente utilizadas para promover as ligações cruzadas nos tecidos biológicos.

Diversos materiais biológicos (aloenxertos ou xenenxertos) estão sendo utilizados na área cardiovascular. Entre os materiais biológicos usados estão o pericárdio bovino, as válvulas de porco, as válvulas humanas, a dura-máter humana, etc.

Em especial, o pericárdio bovino vem sendo utilizado na confecção de válvulas cardíacas artificiais, enxertos vasculares, dutos e *patches*, após tratamento com GA.

Segundo método estabelecido por Ionescu et al. (1977) e adaptado por Braile (1990), os pericárdios, após coleta em matadouros, são selecionados quanto à espessura, uniformidade da superfície das membranas e submetidos à limpeza mecânica e lavados por 3 horas com solução de Hanks e, a seguir, são moldados e fixados durante duas semanas com solução de glutaraldeído a 0,5% , pH 7,4 e usando tampão fosfato. A estrutura inicial do pericárdio bovino sofre alteração permanente com a formação de ligações cruzadas entre os grupos amino e os aldeídos. Posteriormente, esses materiais são conservados estéreis em formaldeídos a 4%.

Produtos confeccionados com PB tratados com GA, antes da sua utilização, necessitam serem lavados em solução fisiológica de modo a eliminar ao máximo os resíduos de aldeídos. Segundo diversos pesquisadores como Hilbert et al. (1988), Beuchamp et al. (1992) e Grabenwöger et al. (1998), o aldeído residual é uma das causas da calcificação desses produtos. No caso das válvulas de pericárdio bovino, a calcificação (juntamente com perfuração e/ou ruptura das suas lacínias) tem sido apontada como uma das causas de falhas precoces. No intuito de resolver o problema da calcificação das próteses biológicas, pesquisadores como Ferrans et al. (1991), Khor (1997), Herrero et al. (1999), entre outros, têm estudado alternativas de tratamento sem a utilização de GA.

Pereira et al. (1990) estudaram os efeitos de tratamentos alternativos ao GA nas propriedades mecânicas. As características mecânicas estudadas foram em pericárdios:

- ◆ Fresco (F);
- ◆ Tratado com GA (GT);
- ◆ Tratados com cianamida (CY);
- ◆ Tratados com Poliglicidil éter (PE);
- ◆ Tratados fisicamente por liofilização e reconstituídos (FD);
- ◆ Secados por aquecimento em estufa e reconstituídos (HD).

Ainda os pesquisadores Pereira e colaboradores, por meio de análise visual e tátil desses materiais, observaram que os materiais tratados com GT e PE ficaram mais firmes e espessos que o material fresco, enquanto os tratados com CY ficaram mais flácidos. Os pericárdios submetidos à liofilização não apresentaram diferença com o pericárdio fresco. O material HD ficou aderido e encolheu na estufa, tendo de ser cuidadosamente descascado da bandeja da estufa. Os materiais tratados GT e HD ficaram com tonalidade amarelada, enquanto os PE e CY ficaram mais brancos e brilhantes que o material fresco.

A temperatura de encolhimento (*shrinkage temperature*) ou temperatura de estabilidade térmica ou, ainda, temperatura de desnaturação protéica foi usada por Woodroof (1979) e Moore et al. (1996) como indicador da estabilização das fibras de colágenos, em materiais como o pericárdio bovino e, as lacínias de válvulas de porco, nos tratamentos com GA, PE, acil azida, ou

quaisquer outros reagentes químicos que promovam ligações cruzadas, a fim de melhorar as suas características mecânicas.

O valor da temperatura de estabilidade térmica é conseguido imergindo uma tira de pericárdio estirada em solução fisiológica, fixada a um indicador de aumento de tensão, que é aquecida à razão de aproximadamente 1°C/min e registrando a temperatura em que o pericárdio sofre um encolhimento.

Pereira et al. (1990) estudaram também a temperatura de estabilidade térmica desses materiais tratados. Comparando as temperaturas de encolhimento obtidas com o valor da temperatura de encolhimento do pericárdio fresco, somente os materiais tratados GT e PE apresentaram um aumento na temperatura, ultrapassando os 80°C, indicando que houve incorporação significativa de ligações cruzadas no pericárdio. Os materiais FD e HD não tiveram alterações na estrutura das ligações, e as temperaturas de estabilidade térmica não diferenciaram do material fresco. O material CY teve diminuição na temperatura de estabilidade térmica, podendo ser um indício de degradação do material durante o seu tratamento.

Quanto aos ensaios mecânicos, ainda os mesmos autores analisaram: curva de tensão x deformação, tensão de relaxamento, módulo de Young, alongamento e tensão de ruptura. Os materiais tratados GT e PE apresentaram resultados similares, condizentes com a incorporação das ligações cruzadas na estrutura dos pericárdios bovinos, enquanto os materiais CY e FD não apresentaram nenhuma diferença com o pericárdio fresco. O material submetido ao aquecimento HD, apesar de não ter induzido nenhuma formação de ligações cruzadas na sua estrutura, sofreu um grande aumento no valor do módulo e tensão de ruptura, talvez pelo tecido ter secado sob tensão, desidratado e encolhido, aumentando a sua rigidez, mas as demais características não sofreram diferenças com o material fresco.

Ainda, Pereira e colaboradores concluíram que diante dos resultados obtidos para GT e PE e por estes não apresentarem diferenças significativas, o PE pode ser uma alternativa para diminuir os problemas de calcificação dos pericárdios bovinos, após a realização de estudos detalhados de biocompatibilidade e citotoxicidade. Concluíram também que a liofilização dos materiais biológicos é uma possibilidade atraente para armazenamento de tecidos biológicos,

visando sua utilização futura, uma vez que não causa alterações na estabilidade térmica e nem nas propriedades mecânicas.

Curtil et al. (1997a e 1997b) tomando como base estudos anteriores feitos por Pate e Sawyer (1953) e Davies et al. (1968) estudaram a possibilidade de liofilização de válvulas porcinas e a sua utilização como substrato para crescimento de cultura de células.

Pate e Sawyer (1953), tentando resolver problemas de conservação de enxertos arteriais homólogos, iniciaram os estudos de liofilização em segmentos aórticos de cães e apresentaram os resultados em 1953, concluindo que o processo de liofilização mantém os enxertos em condições de utilização, conservando inalteradas as suas propriedades mecânicas.

O primeiro implante de aloenxerto de válvula humana foi realizado em 1962, no Guy's Hospital em Londres. De 1962 a 1967, uma série de 91 pacientes receberam válvulas humanas esterilizadas por métodos químicos e liofilizadas. Segundo Davies et al. (1968), das 91 válvulas implantadas em posição aórtica, 37 tiveram regurgitação sem estenose e 54 tiveram estenose ou estenose e regurgitação. Do total de pacientes, 16 foram a óbito nas 4 primeiras semanas pós-implante e 15 tiveram morte posterior. As válvulas implantadas, à medida que falhavam, foram sendo retiradas e avaliadas através de exames histológicos. Os pesquisadores observaram que todas as válvulas estavam acelulares e algumas apresentavam calcificação. Em uma outra série de válvulas humanas liofilizadas e implantadas, estudadas por Moore et al. (1975), o número de falhas, em um período de 3 anos, chegava a um terço do total de válvulas implantadas. Todas as válvulas que funcionaram 3 anos antes de apresentarem falhas estavam calcificadas. Esses resultados desfavoráveis fizeram com que o estudo de válvulas humanas liofilizadas fosse abandonado.

Curtil et al. (1997a e 1997b) observaram que a esterilização poderia ser feita de forma menos agressiva que a utilizada por Davies et al. (1968). Diferentemente de Davies e colaboradores a intenção de Curtil e colaboradores, ao liofilizarem as válvulas, era servir de substrato para crescimento celular autólogo, fazendo um controle adequado da porosidade das lacínias, objetivando melhorar o tempo de vida útil e melhorar os resultados clínicos. Para tanto, utilizaram válvulas pulmonares porcinas, sendo que a porosidade adequada foi conseguida controlando a velocidade de resfriamento e secagem a vácuo no processo de liofilização. Como

os poros da matriz não se comunicavam entre si, os autores acharam conveniente perfurá-los manualmente e, assim, obter estrutura adequada para o crescimento celular. O estudo do processo de liofilização demonstrou a possibilidade de atender 3 funções:

- ♦ Criar um substrato para crescimento de fibroblastos;
- ♦ Eliminar as células do doador;
- ♦ Preservar a estrutura do colágeno e a resistência mecânica da válvula.

Ainda Curtil e colaboradores citaram vantagens desse processo: a estocagem segura por um longo prazo da matriz, a facilidade de transporte do banco de tecidos para o cirurgião, a redução da imunogenicidade e, talvez, uma maior longevidade das válvulas confeccionadas por meio de liofilização e engenharia de tecidos, quando comparadas com as válvulas frescas.

Occhiogrosso et al. (1987) apresentaram resultados de um trabalho, no qual foi verificada redução de antigenicidade da dura-máter humana quando submetida à liofilização. Os autores fizeram um estudo utilizando extratos da dura-máter humana fresca e da dura-máter humana liofilizada, verificando o consumo dos complementos no soro de humanos, ratos e de coelhos. Os resultados obtidos mostraram que o processo de liofilização promoveu pequena diminuição da antigenicidade e que a variabilidade dos resultados é mais significativa quando foram utilizados soros de espécies diferentes.

Nos estudos de citotoxicidade, Gendler et al. (1984) verificaram que pericárdios bovinos tratados com GA e conservadas em FA, mesmo após serem submetidos a prolongadas lavagens (mais de 60 min) em solução fisiológica, continuavam citotóxicos.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro*, segundo a Norma ISO 10993-5, pode ser feito utilizando extrato do material, em contato direto ou indireto com as células, sendo o seu resultado expresso de forma qualitativa ou quantitativa.

Wallin e Arscott (1998) mencionam a importância do ensaio de citotoxicidade, para determinar quantidades de componentes perigosos capazes de serem biologicamente extraídos, nos materiais utilizados na área médica. Esse ensaio é de alta sensibilidade e serve como ponto de partida para determinar a biocompatibilidade de um material.

Os aldeídos residuais podem ser quantificados, utilizando um processo de análise via cromatografia líquida de alta performance HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). O HPLC é um processo cromatográfico, que pode ser definido como técnica de separação, envolvendo transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel, segundo Kazakevich (2002).

HPLC utiliza a fase móvel (eluente) para separar os componentes de uma mistura. Esses componentes são primeiramente dissolvidos em um solvente e, então, forçados a fluírem através da coluna cromatográfica sob alta pressão. A fase estacionária é definida como um enchimento imóvel da coluna. A interação do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária pode ser manipulada através da escolha dos solventes e fases estacionárias. Como resultado, o HPLC consegue um alto grau de versatilidade não encontrado em outros sistemas de cromatógrafos e com a habilidade de separar grande variedade de misturas químicas.

3 Material e método

3.1 Estudo preliminar

Foi feito um estudo preliminar de viabilidade do projeto, utilizando-se um pequeno número de amostras de pericárdio bovino ($n = 5$). Foram analisadas as propriedades mecânicas do pericárdio bovino tratado com GA/FA, liofilizado e reconstituído em soro fisiológico, por meio de ensaios mecânicos estáticos de tração, temperatura de estabilidade térmica e visibilização da integridade das fibras colágenas com base na análise histológica por microscopia óptica.

Por se tratar de materiais biológicos e, portanto, possuir diferentes propriedades dimensionais e qualitativas, fez-se necessário um estudo do tamanho da amostra para os ensaios, a fim de obter dados estatísticos válidos.

A Tabela 1 apresenta as temperaturas de encolhimento dos ensaios preliminares das membranas de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e preservado em formaldeído, liofilizado e reconstituído em solução fisiológica.

Tabela 1 Ensaios preliminares: temperatura de encolhimento

amostra	temperatura de encolhimento (°C)
1	85,5
2	86,0
3	84,5
4	79,5
5	79,5
média $\pm$ DP: 83,0 $\pm$ 3,2 °C	

A Tabela 2 apresenta o resultado dos ensaios preliminares de tração estática do pericárdio bovino tratado com GA e preservado em FA, liofilizado e reconstituído em solução fisiológica.

Tabela 2 Ensaios preliminares: tração estática

amostra	σ (kgf/mm ²)
1	2,95
2	1,98
3	1,25
4	1,39
5	2,27
média $\pm$ DP: 2,0 $\pm$ 0,7 kgf/mm²	

O tamanho da amostra calculado utilizando os resultados do ensaio preliminar de encolhimento resultou em tamanho da amostra inferior ao resultado obtido do ensaio preliminar de ensaio de tração, sendo assim, o estudo preliminar de ensaio de tração serviu para definir o tamanho da amostra necessária (n) para que o estudo tenha validade estatística, seguindo o método e a equação de Montgomery (1994):

$$n = \left(\frac{DP \times z_{\alpha/2}}{e} \right)^2$$

Onde:

n = número de amostras

e = erro admitido = 0,2 kgf/mm²

$\alpha = 0,5$

$z_{\alpha/2}$ = valor tabelado = 1,96

DP = desvio padrão

O número de amostras necessário para o estudo ter validade estatística foi calculado com base nos resultados dos ensaios preliminares: n = 46 amostras. Assim, foi adotado para todos os ensaios mecânicos e de temperatura de encolhimento n = 50 amostras.

3.2 Definição dos grupos de pericárdio bovino avaliados

Os pericárdios foram divididos em 6 grupos de estudo, a saber:

Grupos	Características
F :	pericárdios frescos em solução fisiológica;
G :	pericárdios tratados com glutaraldeído e conservados em formaldeído, que foram lavados em solução fisiológica;
F-FR-L :	pericárdios frescos congelados em freezer, liofilizados e reconstituídos em solução fisiológica;
F-N-L :	pericárdios frescos congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e reconstituídos em solução fisiológica;
G-N-L :	pericárdios tratados com glutaraldeído e conservados em formaldeído, lavados em solução fisiológica, congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e reconstituídos em solução fisiológica antes da sua utilização;
F-N-L-G :	pericárdios frescos congelados em nitrogênio líquido, liofilizados, reconstituídos em solução fisiológica, tratados a seguir com glutaraldeído e conservados em formaldeído. Lavados em solução fisiológica antes da sua utilização nos ensaios.

Serão descritos os estudos realizados, tais como: congelamento, ensaios mecânicos de tração, teste de estabilidade térmica, análise por microscopia eletrônica de varredura, análise anatomopatológica, estudo da citotoxicidade e aldeídos residuais.

Nos ensaios realizados, o grupo F foi considerado como grupo-controle para os grupos F-FR-L e F-N-L; o grupo G foi considerado como grupo-controle para os grupos G-N-L e F-N-L-G.

3.3 Definição do padrão de congelamento a ser utilizada na liofilização

Dado o grande número de amostras imposto para validade estatística e as dificuldades na coleta do material, optou-se pela escolha de apenas um tipo de congelamento, seguindo o critério descrito, a seguir:

- ◆ Dois lotes de pericárdio bovino fresco ($n = 50$) foram submetidos a duas velocidades de congelamento: lentamente em freezer e rapidamente em nitrogênio líquido;
- ◆ Os lotes de pericárdio bovino foram liofilizados, utilizando um liofilizador tipo bandeja e, após a sua reconstituição em solução fisiológica, foram submetidos a ensaios mecânicos estáticos de tração e foram determinadas as temperaturas de encolhimento;
- ◆ Os resultados obtidos desses lotes foram comparados com os resultados dos ensaios mecânicos e de encolhimento de pericárdio bovino fresco ($n = 50$);
- ◆ A velocidade de congelamento escolhida para utilização no processo de liofilização, para o grupo dos tratados, foi aquela que conseguiu manter as características do pericárdio liofilizado mais próximas daquelas encontradas no pericárdio fresco.

3.4 Coleta de pericárdio bovino

A coleta e a limpeza dos pericárdios bovinos foram feitas logo após o abate de bezerros de 2 a 3 anos de idade, em matadouros, seguindo os mesmos procedimentos já padronizados por Ionescu et al. (1977) e Braile (1990) para a confecção de próteses valvares.

3.5 Liofilização de pericárdios

Os pericárdios bovinos, após a coleta e a limpeza, foram:

- ◆ Congelados em freezer ou nitrogênio líquido e liofilizados, sem nenhum tratamento químico.
- ◆ Tratados quimicamente com GA e FA, lavados em solução fisiológica e congelados em nitrogênio líquido e liofilizados.

O congelamento em nitrogênio líquido foi feito deitando o nitrogênio líquido sobre o pericárdio bovino duas a três vezes, para que todo o material fosse congelado (Figura 1). A seguir, as membranas de pericárdio foram colocadas em bandejas do liofilizador e liofilizadas por 24 horas (Figura 2). O liofilizador utilizado nos ensaios foi o modelo *Lyolab-G* (*Secfroid, Lausanne, Switzerland*).

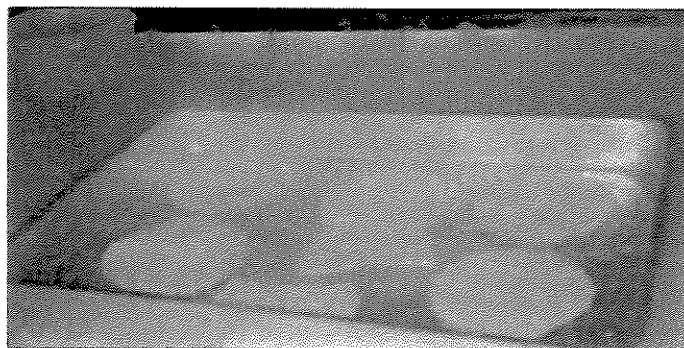


Figura 1 Congelamento de membranas de pericárdio bovino em nitrogênio líquido.

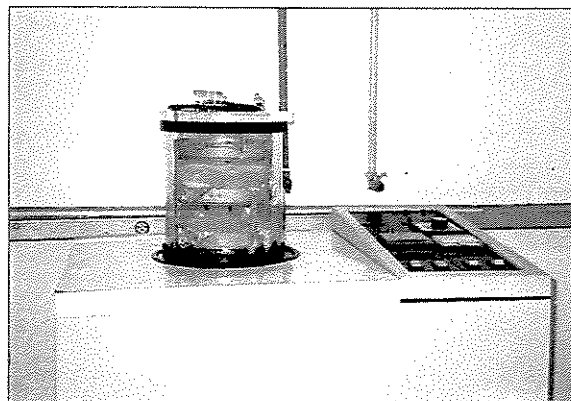


Figura 2 Liofilizador, tipo bandeja, no qual o material foi liofilizado.

3.6 Ensaios mecânicos de tensão – deformação estática

Todos os ensaios de tensão–deformação foram realizados de acordo com a Norma ASTM D638, para um corpo de prova do tipo V (Figura 3c) e velocidade de ensaio de 15 mm/min. Utilizou-se máquina universal de ensaio (Figura 3) MTS (*Material Testing System*), modelo *Test Star-II* (MTS, *Mineapolis, USA*), com célula de carga com capacidade para 100kgf (980,665N), utilizando um fundo de escala de 10kgf (98,0665N). As amostras foram cortadas em direções aleatórias, sendo que o número de corpos de prova utilizado foi $n = 50$, para cada tipo de procedimento, para satisfazer os critérios de validade estatística. Todos os corpos de prova feitos com materiais liofilizados foram devidamente reconstituídos com solução fisiológica, antes de sua utilização nos ensaios de tração estática. As espessuras dos corpos de prova foram medidas com micrômetro e calculadas as áreas da seção transversal.

A curva obtida da força versus deslocamento foi visualizada na tela do computador e os valores medidos fornecidos ao *software* do equipamento MTS modelo *Test Star II* (MTS, *Mineapolis, USA*). Esses pontos foram analisados utilizando um programa feito em *software* da *Matlab R12*, (*MathWorks, Inc – USA*), que calcula os valores de tensão e traça os gráficos de tensão versus deformação para cada ensaio realizado, fornecendo os valores de tensão de ruptura. Calcula, também, o coeficiente angular da região elástica dessa curva que fornece o módulo de elasticidade também conhecido como módulo de Young (Apêndice A).

As análises dos dados dos ensaios mecânicos foram realizadas utilizando ferramenta ANOVA e Testes comparativos (*Tukey Test* ou *Student-Newman-Keuls Method*) próprios para cálculos estatísticos (Apêndices B, C e D). Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

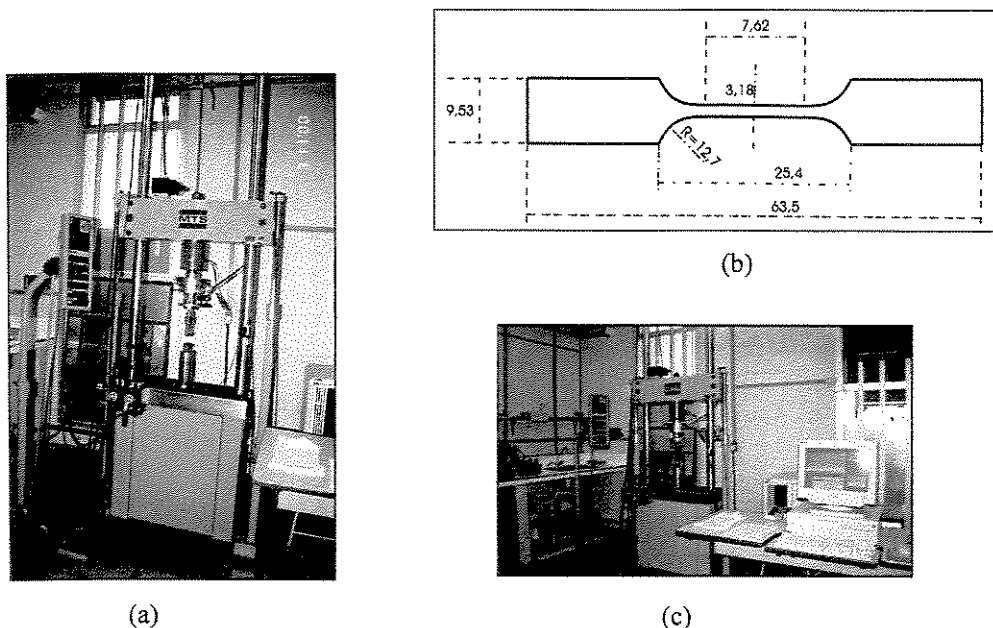


Figura 3 Dispositivo de ensaio de tração em dois ângulos.

(a) equipamento de tração MTS.

(b) corpo de prova utilizado

(c) sistema de aquisição.

3.7 Testes de estabilidade térmica

Para a realização desse ensaio, os corpos de prova foram cortados em direções e locais aleatórios em forma de fitas retangulares de 50 x 10 mm. O número de amostras utilizado foi $n=50$ para cada grupo de pericárdio bovino estudado. As amostras liofilizadas foram reconstituídas em solução fisiológica antes da sua utilização.

O corpo de prova foi estirado sem carga, imerso em solução fisiológica, sofrendo aquecimento à razão de aproximadamente $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Quando o corpo de prova sofreu um encolhimento com um súbito aumento de sua tensão, as temperaturas do início e final do encolhimento foram anotadas, definindo-se a média desses valores como sendo a temperatura de encolhimento. Foi utilizado um equipamento confeccionado pela Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração do HC.FMUSP, utilizando termômetro digital modelo MT510 (Minipa Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil).

As análises dos dados de temperatura de encolhimento foram realizadas utilizando-se a ferramenta ANOVA para cálculo estatístico (Apêndice E). Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3.8 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas, no MEV modelo JXA840-A (JEOL, *Akishima, Japan*), com o objetivo de detectar:

- ♦ A influência da velocidade de congelamento na formação dos interstícios deixados no material pela retirada do líquido durante o processo de liofilização.
- ♦ Possíveis alterações no perfil das superfícies dos pericárdios liofilizados, nos lados rugoso e liso.

Os materiais analisados por microscopia eletrônica de varredura, quando não liofilizados, são desidratados sucessivamente em álcool etílico a 30, 50, 70, 90 e 100% e secados no equipamento de secagem por ponto crítico, modelo CPD 030 (BAL-TEC AG, *Balzers, Germany*) (Figura 4). As amostras foram cortadas, fixadas sobre suportes metálicos adequados, utilizando fitas condutoras dupla face e metalizadas a vácuo, para finalmente serem observadas no MEV.

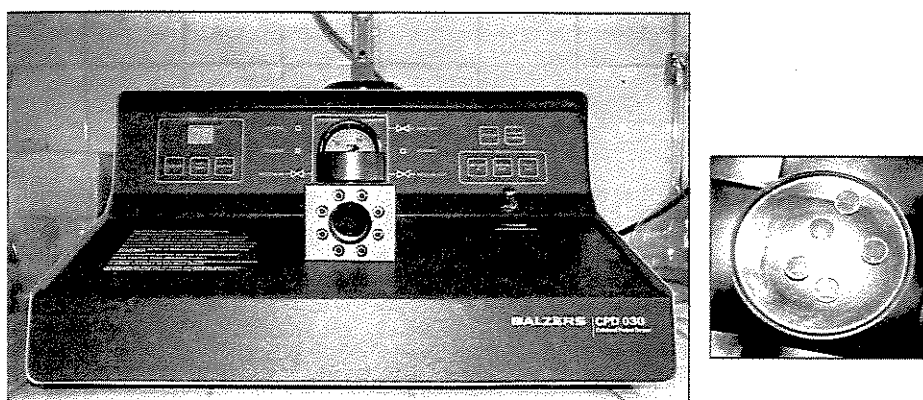


Figura 4 Equipamento de secagem por ponto crítico.

À esquerda: vista geral do equipamento.

À direita: as amostras nas cestas, prontas para serem introduzidas no equipamento.

3.9 Análises histológicas das fibras de colágeno do pericárdio bovino

A integridade das fibras de colágeno dos pericárdios bovinos foi verificada por análise histológica. As amostras dos materiais de cada grupo estudado foram reconstituídas em solução fisiológica e a sua estrutura fixada em formol a 10% e enviadas para análise anatomopatológica (Patologia Cardoso de Almeida, São Paulo, Brasil). Cada amostra foi cortada no sentido longitudinal e transversal e incrustadas em bloco de parafina. Com um micrótomo os blocos de parafina com os materiais foram cortados e as lâminas preparadas e examinadas por microscopia ótica utilizando corante HE (hematoxilina eosina).

3.10 Teste de citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade do PB foi realizada nesta pesquisa, usando-se os extratos dos materiais, de acordo com a metodologia estabelecida por Nakamura et al. (1989) e Norma ISO 10993 - parte 5.

A Norma ISO recomenda que a relação entre área do material a ser estudada/volume do veículo de extração esteja entre $0,5\text{cm}^2/\text{ml}$ a $6,0\text{cm}^2/\text{ml}$. Foram realizados dois estudos utilizando para cada um deles o volume total de 60ml do veículo de extração, para amostras com superfícies de 180cm^2 e 30cm^2 .

O pericárdio bovino, após tratamento utilizando GA a 0,56%, seguindo as condições preconizadas por Ionescu (1977) e Braile (1990), foi conservado em formaldeído a 4% durante um período superior a 3 meses. Esses pericárdios, assim tratados, foram divididos em dois grupos, para determinar a citotoxicidade:

- ◆ Grupo que foi lavado em solução fisiológica e submetido à liofilização e reconstituído em solução fisiológica, denominado de grupo G-N-L.
- ◆ Grupo que foi simplesmente lavado em solução fisiológica, denominado de grupo G.

Os grupos G-N-L e G, juntamente com os grupos-controles positivo e negativo (pela norma ISO 10993) foram esterilizados em raio gama a 25kGy.

O controle positivo utilizado foi uma solução de fenol a 0,05% e o controle negativo foram grânulos de polietileno de alta densidade (HDPE).

O grupo G-N-L foi reconstituído, com agitação, em 500ml de solução fisiológica, e o grupo G que ficou imerso em formaldeído foi lavado, com agitação, em 500ml de solução fisiológica, utilizando 100ml de solução em cada lavagem, em um total de 5 lavagens. Os dois grupos foram, a seguir, imersos cada qual num frasco, contendo 60ml de líquido de extração. Como líquido de extração, utilizou-se o próprio meio de cultura composto de RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (FCS) e 1% de solução de penicilina-estreptomicina, todos produtos da GIBCO BRL® (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA*), permanecendo por 48 horas a 37°C. Os extratos foram, então, submetidos à microfiltração e diluídos no meio de cultura progressivamente em 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

As placas de cultura de células foram preparadas, utilizando-se células de ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) da (*American Type Culture Collection -ATCC, Manassas, USA*).

As células CHO-K1 foram deixadas no meio RPMI 1640-FCS, em recipiente plástico, a 37°C em ambiente umidificado em atmosfera com 5% CO₂. Após o crescimento de camada celular confluyente, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com tampão fosfato livre de cálcio e magnésio (PBS-CMF), produto da GIBCO BRL® (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA*). A cultura foi tratada com 0,25% de solução de tripsina para desprender as células do frasco. Após, as células foram transferidas para tubos de ensaio com rosca e centrifugadas por 5min a 1500rpm. A seguir, lavadas duas vezes em PBS-CMF. As células foram novamente suspensas em RPMI 1640-FCS, procurando obter uma suspensão de 100 células/ml. Um volume de 2ml dessa suspensão foi adicionado a cada placa de um conjunto de Placas de Petri para cultura, com 60mm de diâmetro e incubadas a 37°C, durante 4 horas para adesão celular. Após esse período, o meio de cultura foi removido e substituído por 5ml de RPMI 1640-FCS fresco na placa controle e nas restantes por extratos a 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Todas as

concentrações foram feitas em triplicata. As placas de cultura foram incubadas por 8 dias, a 37°C em ambiente umidificado em atmosfera com 5% CO₂, para formação de colônias.

Para a contagem das colônias, o meio foi removido das Placas de Petri e as colônias foram fixadas e coradas com 2% de Rodamina B em formaldeído a 4%. O número de colônias em cada placa foi contado em um contador digital de colônias CP600 (Phoenix, Araraquara, Brasil) e comparado com o número de colônias de CHO da placa de controle, na qual só existiam as células de CHO em meio de cultura, com o crescimento de 100% de colônias. O resultado da citotoxicidade foi expresso em índice de citotoxicidade IC₅₀(%) (concentração do extrato que suprime 50% do crescimento de colônias em relação ao extrato do grupo controle negativo).

Os três esquemas das Figuras 5, 6 e 7 ilustram os passos do processo (ensaios de citotoxicidade).

O estudo estatístico foi realizado utilizando ANOVA, comparando os resultados do controle positivo, controle negativo, grupo G e grupo G-N-L (Apêndice F). Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

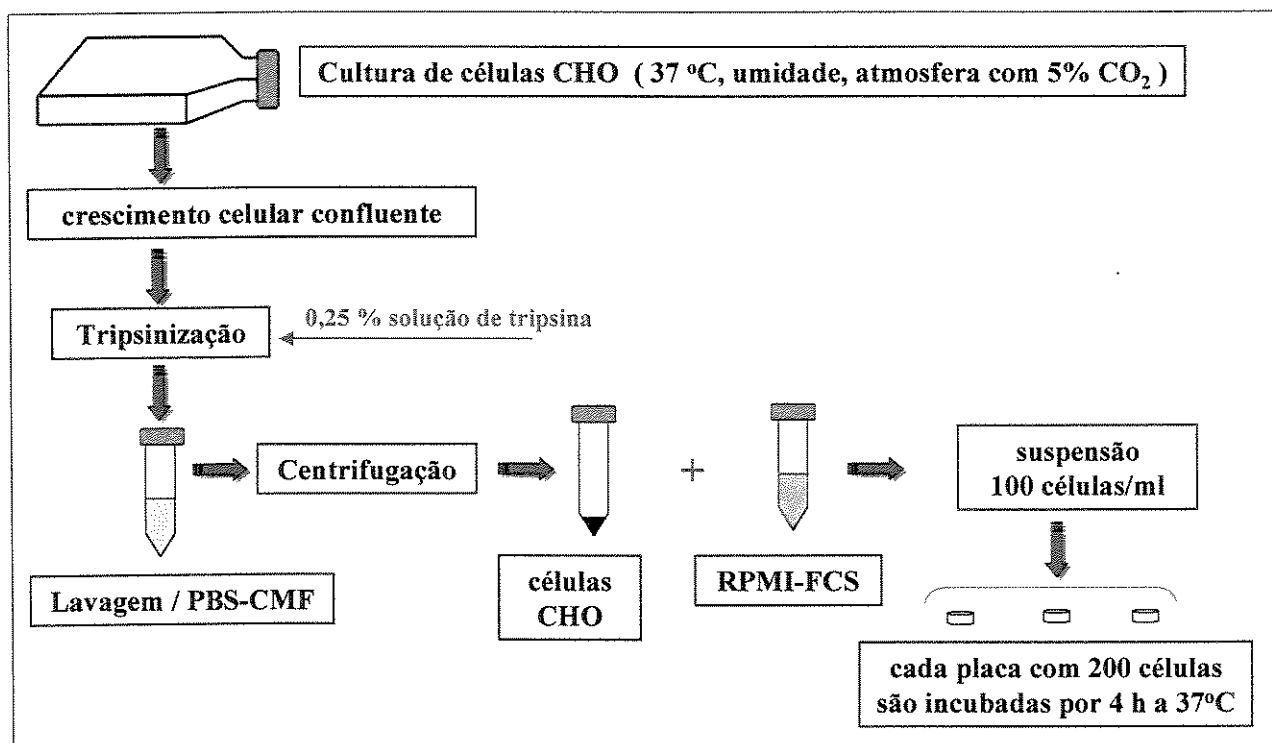


Figura 5 Cultivo e distribuição de células CHO.

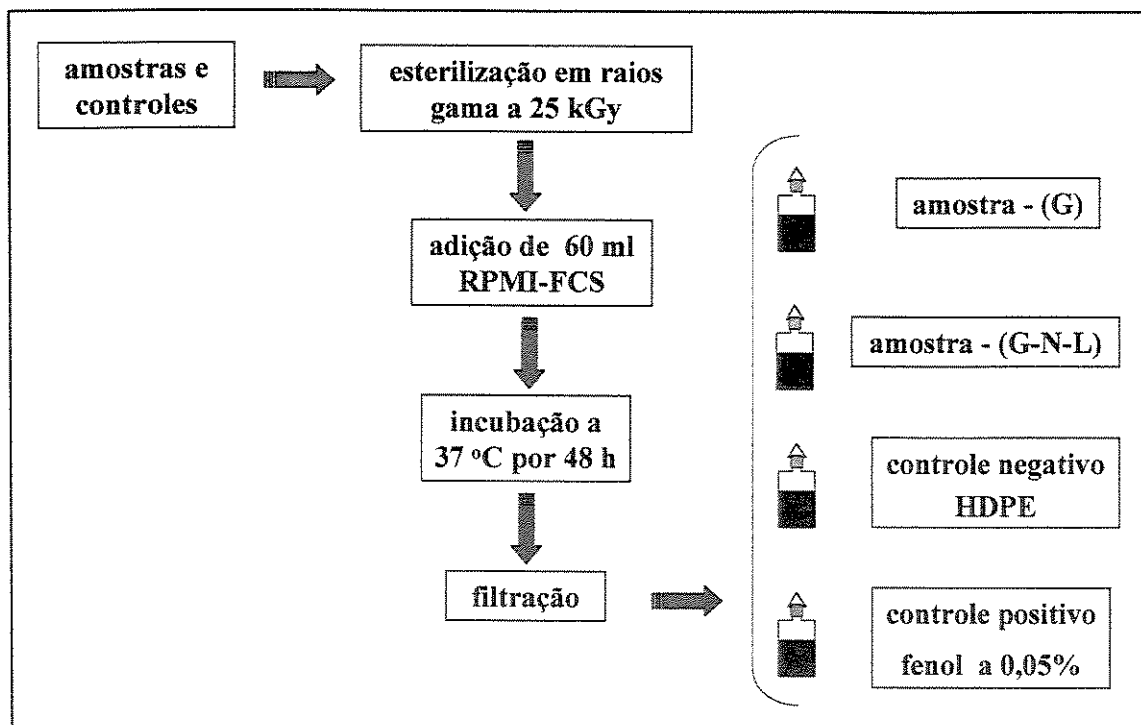


Figura 6 Preparação dos extratos.

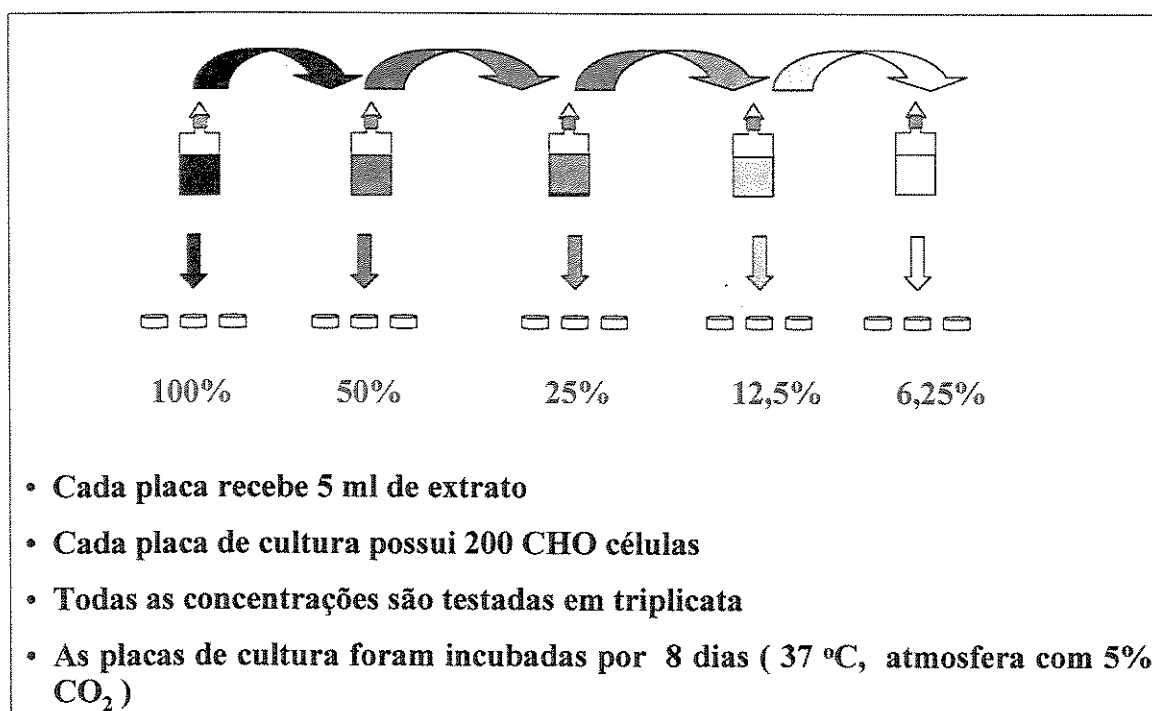


Figura 7 Diluição e distribuição dos extratos com RPMI-FCS.

3.11 Análises das soluções de reconstituição e de lavagem através de HPLC

Por meio da cromatografia de alta performance (HPLC), equipamento modelo SCL-10A-VP (*Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, USA*), foram feitas dosagens de aldeídos residuais nos grupos: G-N-L e G.

Os ensaios em HPLC foram feitos utilizando a coluna de fase reversa C18 (*Pharmacia, Freiburg, Germany*), com gradiente entre 65% a 80% em 10min, utilizando tampão acetonitrila + H₂O, temperatura de coluna de 25°C e comprimento de onda de 254nm.

As membranas de pericárdio bovino das amostras foram cortadas em tamanho padronizado de Ø 22mm, pesadas em balança analítica, antes do tratamento com glutaraldeído e sua conservação em formaldeído.

Dessa forma, cada uma das membranas preparadas e tratadas foram lavadas em 50ml de soro fisiológico, utilizando agitação magnética, durante 5 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido 3 vezes para cada membrana. Após a terceira lavagem em solução fisiológica, as membranas foram divididas em 6 amostras (cada uma das amostras é composta de 5 membranas) para extração dos aldeídos residuais: 3 foram imersas, cada qual em 50ml de solução fisiológica, permanecendo assim durante uma semana; e, outras 3 amostras foram liofilizadas e cada qual imersa em 50ml solução fisiológica durante uma semana.

As 6 amostras de soluções para análise em HPLC foram assim preparadas:

- ◆ amostras 1, 2 e 3: solução fisiológica em que as membranas de pericárdio bovino após a 3ª lavagem ficaram imersas por uma semana.
- ◆ amostras 4, 5 e 6: solução fisiológica em que as membranas de pericárdio bovino após a liofilização ficaram imersas por uma semana.

A seguir, foram levantadas as curvas-padrão das características do glutaraldeído e do formaldeído para determinar o tempo de detecção desses reagentes no HPLC. O reagente utilizado para a determinação dos aldeídos foi o 2,4 dinitrofenilhidrazina (*Fluka, Buchs*,

Switzerland), adotado nos trabalhos de Lipari e Swarin (1982), Eybl et al. (1989) e Grimm et al. (1992).

Após o levantamento das curvas-padrão, passaram-se pela coluna do HPLC, alíquotas das 6 amostras preparadas, para detectarem a quantidade de aldeídos residuais nestas soluções.

A avaliação estatística dos dados resultantes do ensaio em HPLC foi realizada utilizando o t-test, (Apêndice G). Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Definição do padrão de congelamento

Escolheu-se a velocidade de congelamento rápido em N₂ líquido em detrimento ao congelamento lento em freezer, para os outros grupos de pericárdios tratados quimicamente, pois os resultados das propriedades mecânicas, visuais e táteis dos pericárdios frescos congelados em N₂ líquido e submetidos ao processo de liofilização, foram mais semelhantes aos pericárdios frescos não liofilizados.

4.2 Ensaios mecânicos

Os dados completos dos ensaios mecânicos estão apresentados nas Tabelas A-1 a A-6 que se encontram no Anexo I. Os modelos de curvas obtidos utilizando o Programa Mathlab estão ilustrados nas Figuras 11 a 16 (subseção 4.2.1).

Os valores médios dos ensaios com os diferentes grupos de membranas de PB estão relacionados na Tabela 3 (na cor azul, os valores na unidade internacional). As Figuras 8, 9 e 10, apresentam esses valores em forma de gráficos.

A seguir, encontram-se os significados das letras adotadas nas Tabelas mencionadas:

A = área da seção transversal em mm²

E = módulo de Young em kgf/mm²

R² = linearidade do trecho escolhido para o cálculo do módulo de Young

σ_{rup} = tensão de ruptura em kgf/mm²

ε_{rup} = deformação na ruptura em %

n = número de amostras de cada lote = 50

Tabela 3 Dados médios e seus desvios-padrão de ensaios mecânicos

Grupo de pericárdios	σ_{rup} (kgf/mm ²)	E (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)	R^2	A (mm ³)
	σ_{rup} (MPa)	E (MPa)			A (m ³)
F	1,75 ± 0,68	5,05 ± 1,93	41,16 ± 9,27	1,00 ± 0,00	0,75 ± 0,23
	17,16 ± 6,67	49,53 ± 18,93			(0,75 ± 0,23)10 ⁻⁶
F-FR-L	2,86 ± 1,05	6,87 ± 2,16	43,28 ± 10,55	1,00 ± 0,00	0,64 ± 0,20
	28,05 ± 10,3	67,37 ± 21,18			(0,64 ± 0,20)10 ⁻⁶
F-N-L	1,96 ± 0,89	4,35 ± 1,91	42,34 ± 7,96	1,00 ± 0,00	0,85 ± 0,43
	19,22 ± 8,73	42,66 ± 18,73			(0,85 ± 0,43)10 ⁻⁶
G	2,84 ± 1,32	7,58 ± 3,05	36,46 ± 7,29	1,00 ± 0,00	0,76 ± 0,24
	27,85 ± 12,94	74,34 ± 29,91			(0,76 ± 0,24)10 ⁻⁶
G-N-L	3,25 ± 1,47	6,07 ± 3,19	40,86 ± 7,09	0,99 ± 0,01	0,59 ± 0,29
	31,87 ± 14,42	59,53 ± 31,28			(0,59 ± 0,29)10 ⁻⁶
F-N-L-G	3,02 ± 1,15	6,44 ± 2,38	41,56 ± 7,45	0,99 ± 0,01	0,75 ± 0,15
	29,62 ± 11,28	63,16 ± 23,33			(0,75 ± 0,15)10 ⁻⁶

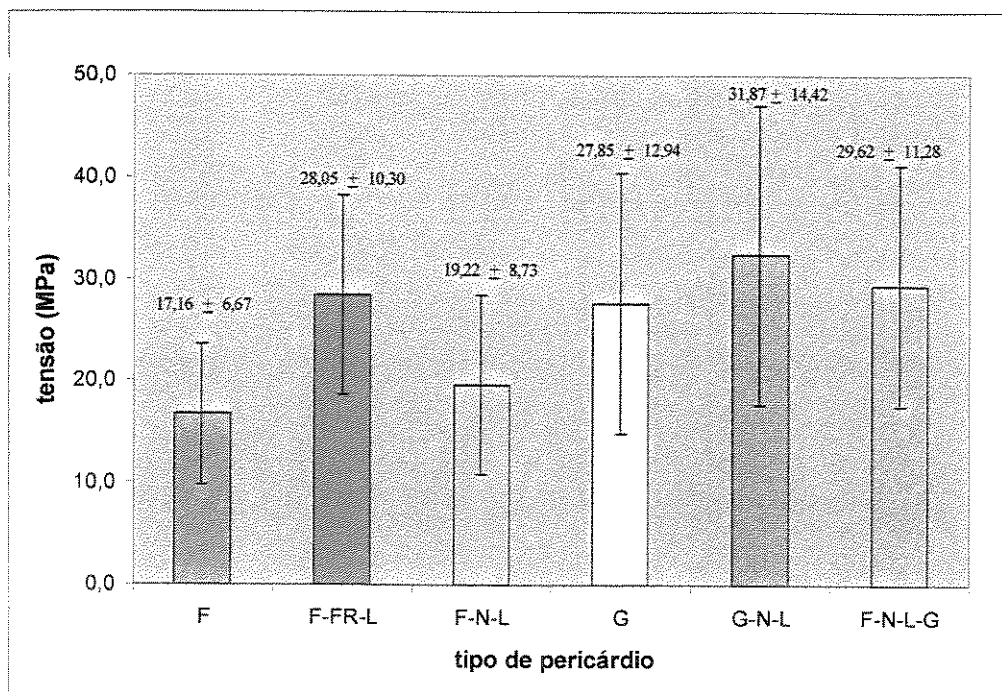


Figura 8 Tensão de ruptura média dos pericárdios bovinos. O gráfico apresenta os valores da média e do desvio-padrão de cada grupo pesquisado.

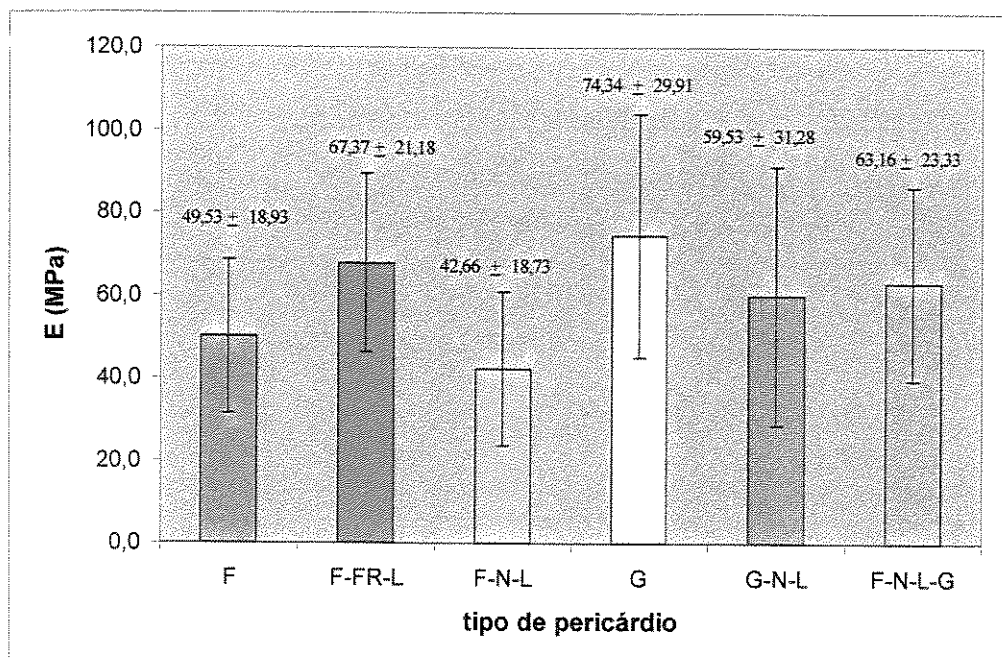


Figura 9 Módulo de Young médio dos pericárdios bovinos. O gráfico apresenta os valores da média e do desvio-padrão de cada grupo pesquisado.

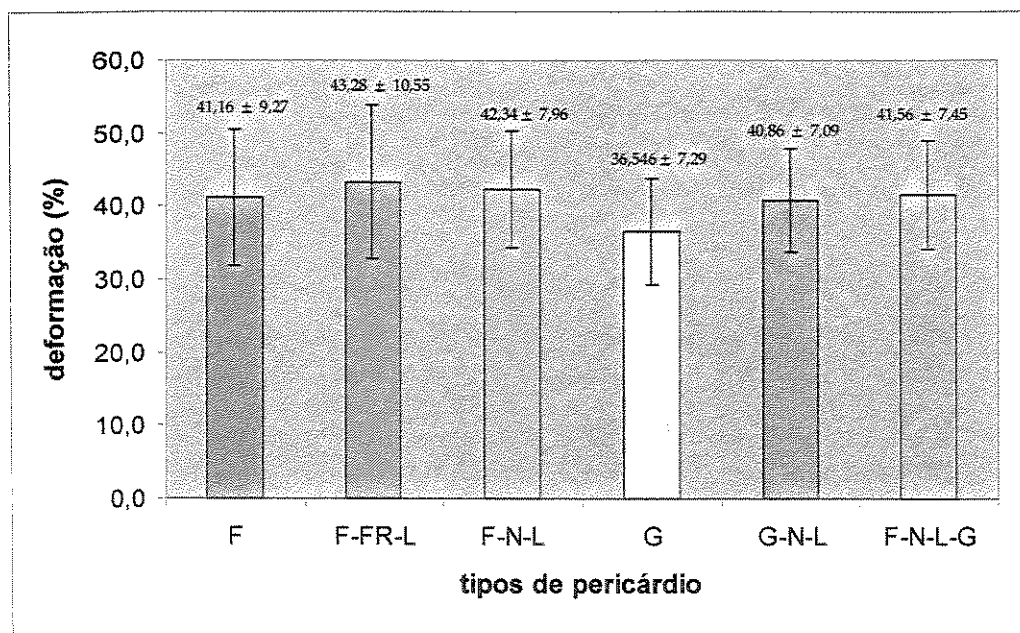


Figura 10 Deformação média na ruptura. O gráfico apresenta os valores da média e do desvio-padrão de cada grupo pesquisado.

4.2.1 Ilustração dos gráficos utilizando o Matlab

Os gráficos obtidos no processamento de dados, utilizando o Matlab, estão ilustrados nas Figuras 11 a 16, os modelos das curvas de cada grupo de ensaio de tração estão apresentados.

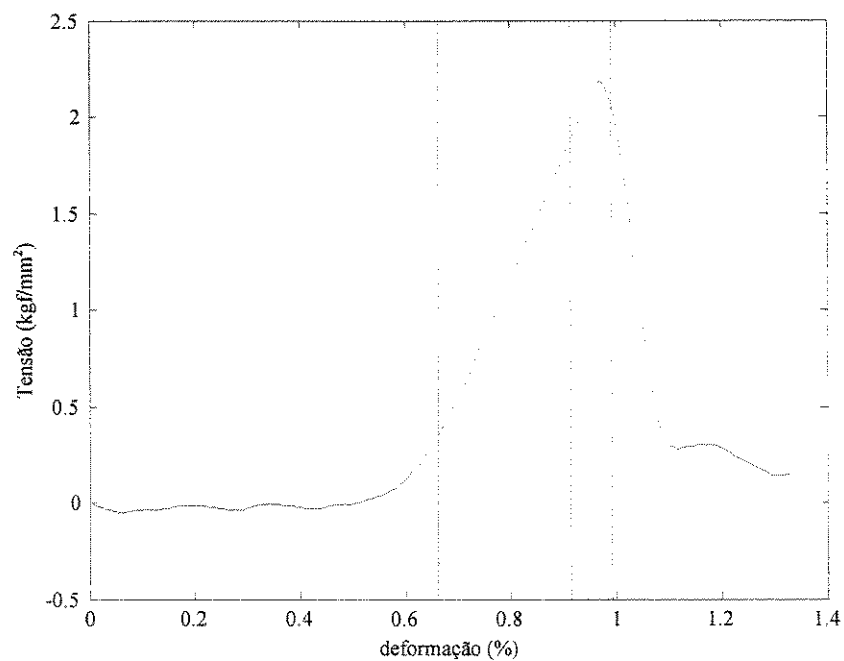


Figura 11 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F.

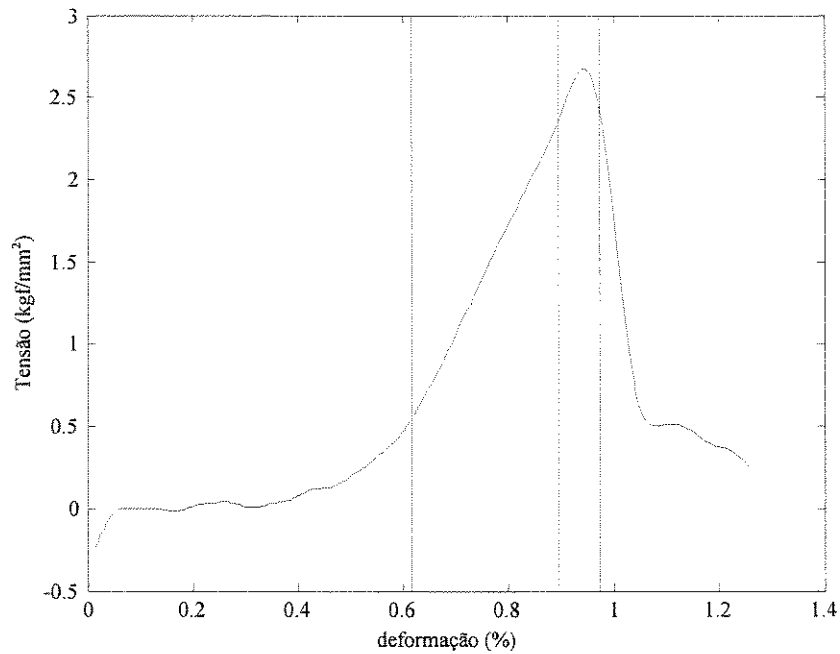


Figura 12 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-FR-L.

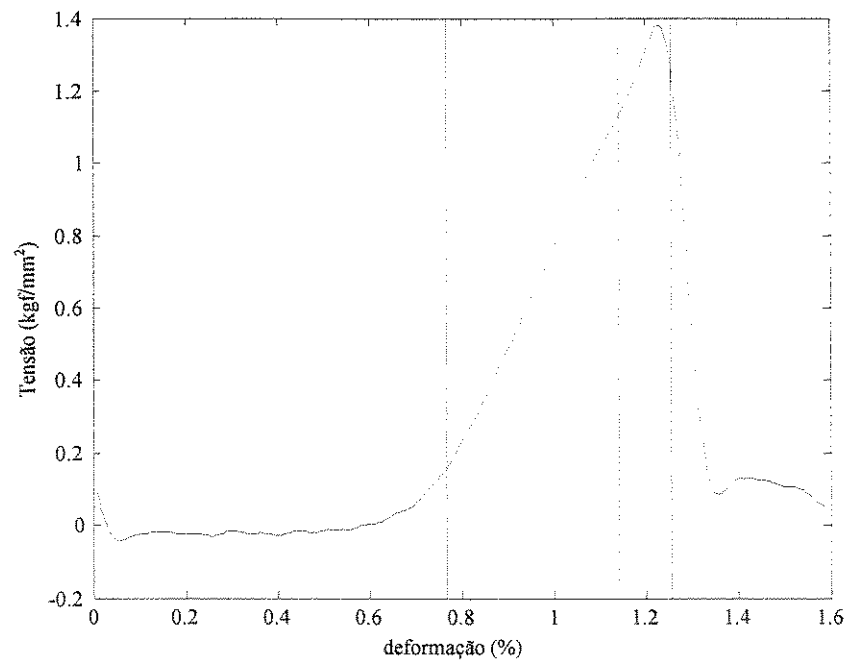


Figura 13 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-N-L.

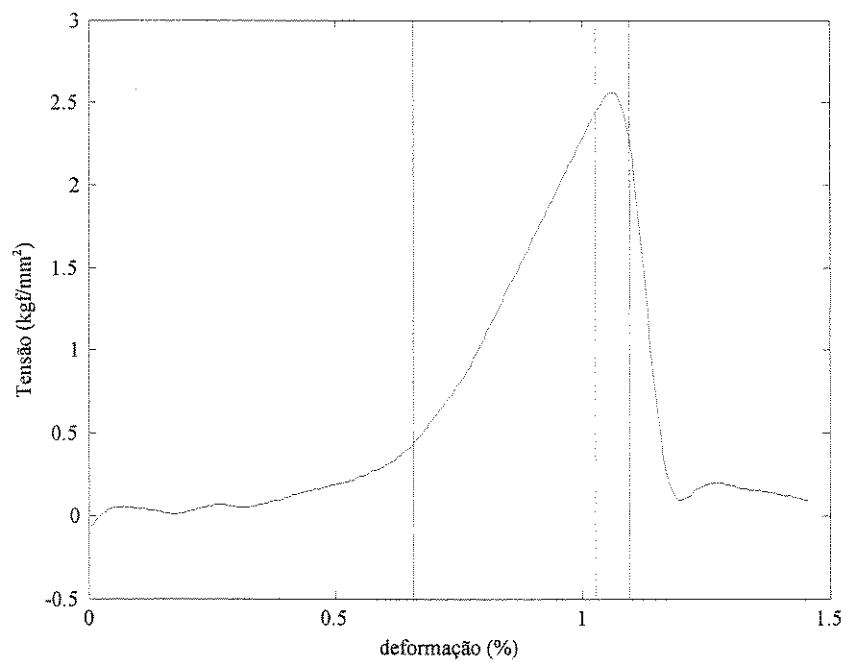


Figura 14 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino G.

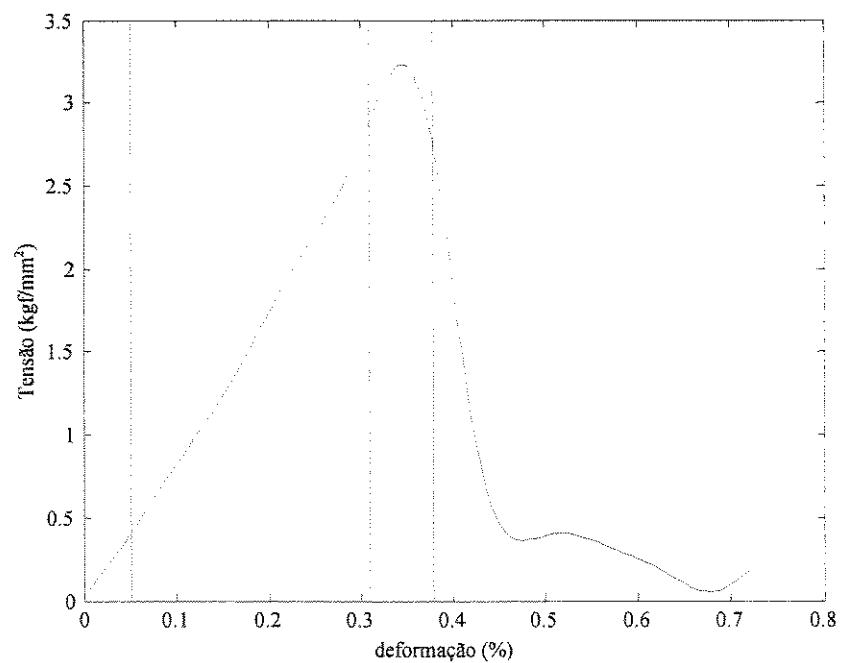


Figura 15 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino G-N-L.

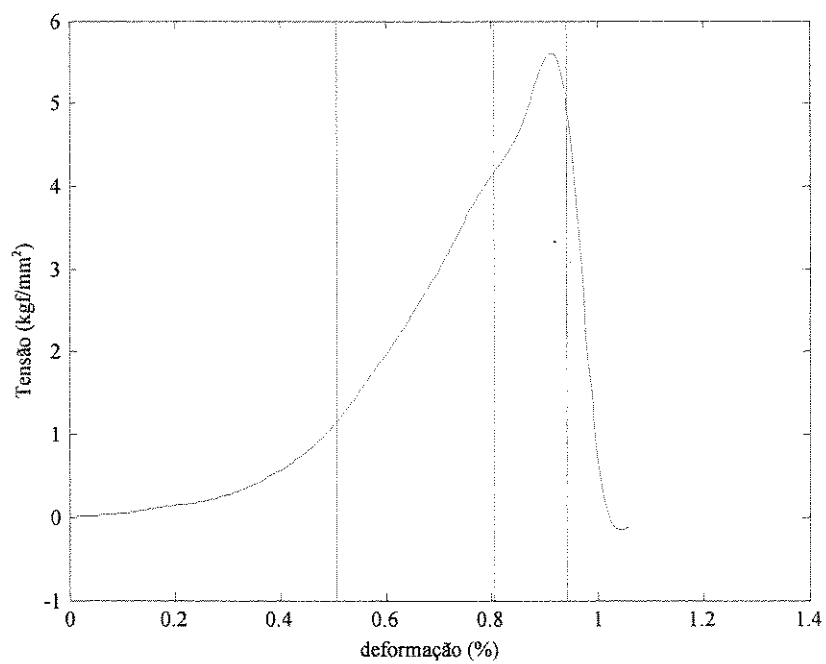


Figura 16 Gráfico do ensaio de tração de pericárdio bovino F-N-L-G.

4.3 Ensaios de temperatura de encolhimento

Os dados completos coletados durante os ensaios de estabilidade térmica estão apresentados na Tabela A-7 que se encontra no Anexo II.

A Tabela 4 apresenta as médias dos valores das temperaturas de encolhimento. Os resultados das temperaturas médias em que os pericárdios sofreram encolhimento com os seus respectivos desvios estão representados sob forma de gráfico na Figura 17.

Nas Tabelas mencionadas foram adotadas:

ST = temperatura de encolhimento em °C

n = número de amostras estudadas para cada grupo = 50

Tabela 4 Médias e desvios-padrão dos valores do ensaio de temperatura de encolhimento

Grupos de pericárdios	ST(°C)
F	73,4 ± 1,4
F-FR-L	74,0 ± 1,2
F-N-L	73,7 ± 1,6
G	85,9 ± 2,9
G-L	86,5 ± 2,7
F-N-L-G	86,2 ± 2,7

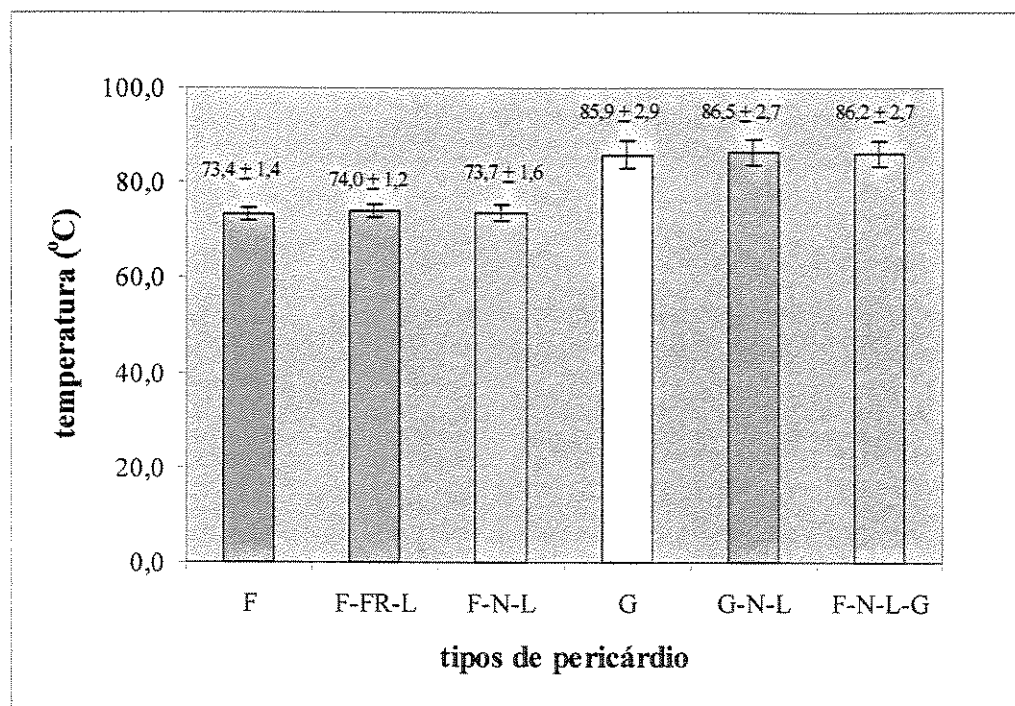


Figura 17 Temperatura média de encolhimento dos pericárdios bovinos. O gráfico apresenta os valores da média e do desvio-padrão de cada grupo pesquisado.

4.4 Resultados da microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 18 a 21 ilustram as vistas em corte e vistas de superfície lado rugoso e lado liso dos pericárdios bovinos obtidas pela MEV.

4.4.1 Influência da velocidade de congelamento na estrutura do pericárdio bovino

Por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas análises de cortes dos pericárdios frescos que foram congelados lentamente em freezer, antes da liofilização (Figura 18) e os pericárdios frescos congelados rapidamente em nitrogênio líquido (Figura 19).

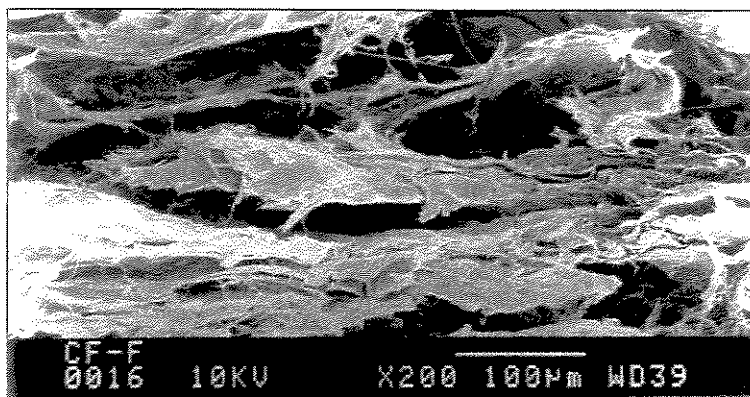


Figura 18 MEV de membrana de pericárdio bovino liofilizado (vista em corte), que foi submetido a congelamento lento em freezer.

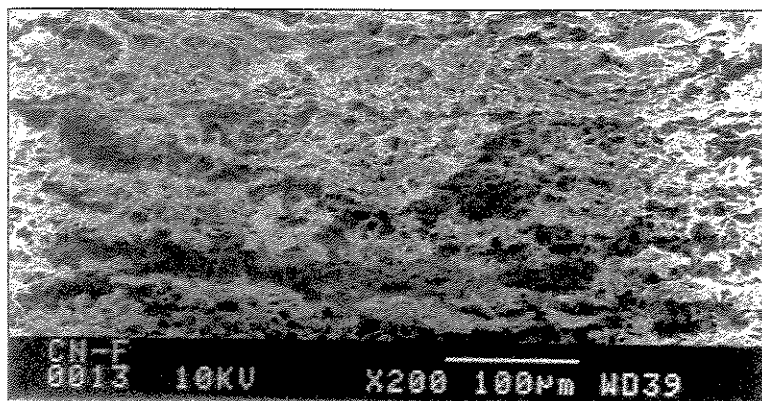
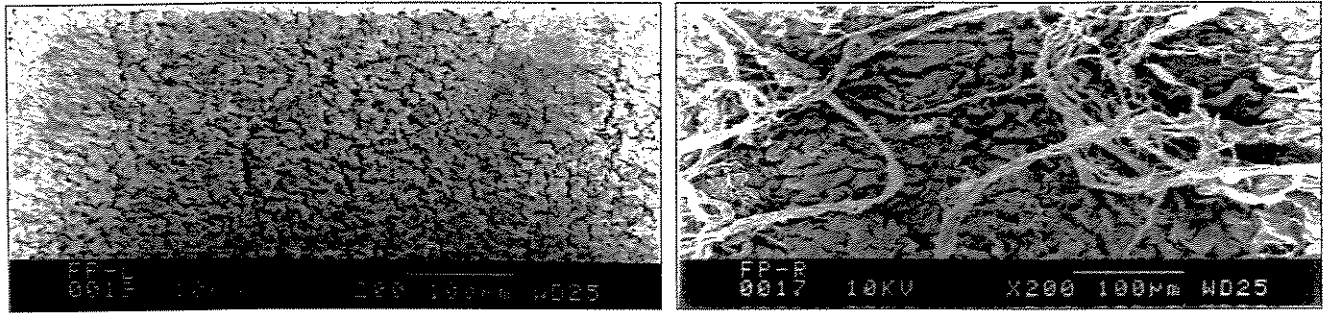


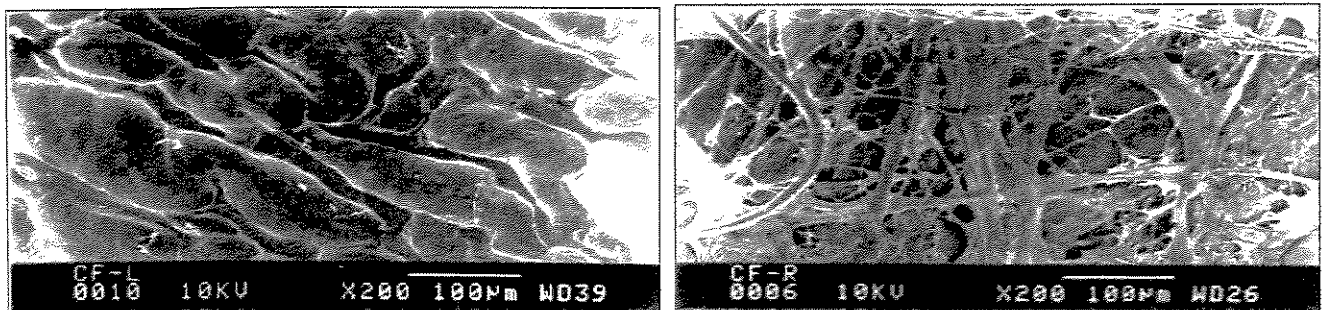
Figura 19 MEV de membrana de pericárdio bovino liofilizado (vista em corte), que foi submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido.

4.4.2 Análises das superfícies dos pericárdios bovinos

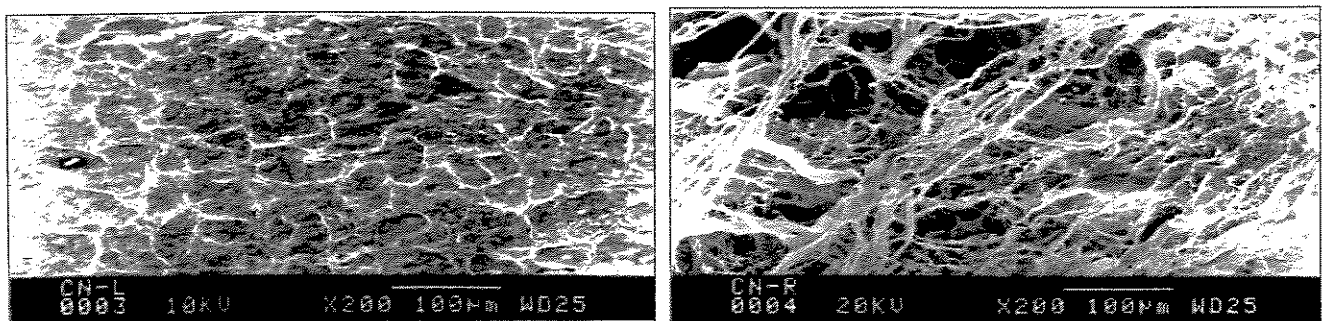
A Figura 20 mostra 6 fotos extraídas da MEV em procedimentos diferentes (a, b c), sem tratamento químico.



(a) F + ponto crítico + MEV



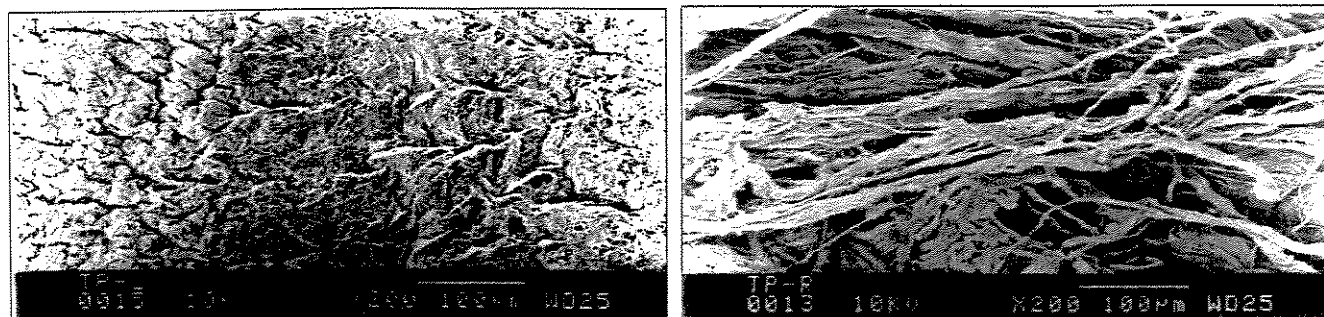
(b) F-FR-L + MEV



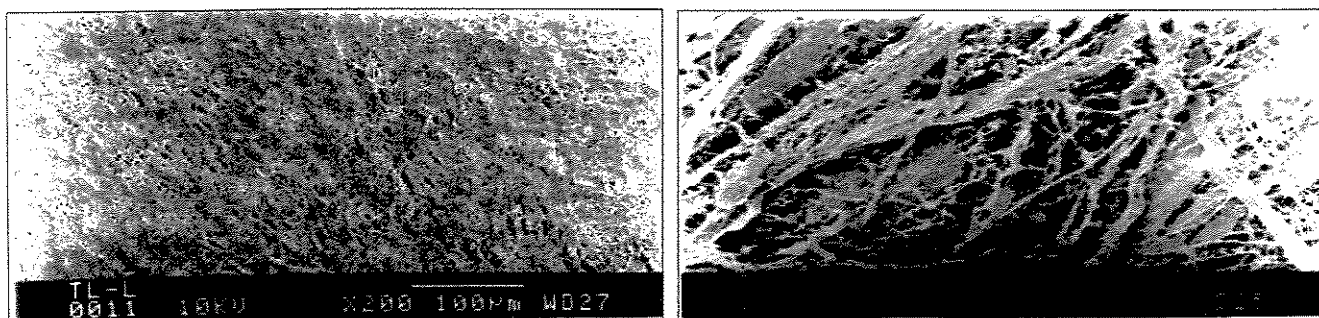
(c) F-N-L + MEV

Figura 20 MEV das superfícies lisas e rugosas dos pericárdios bovinos, sem tratamento químico: fotografias do lado esquerdo mostram a superfície lisa e as do lado direito mostram a superfície rugosa.

A Figura 21 mostra 4 fotos extraídas da MEV das membranas com tratamento químico.



(a) G + ponto crítico + MEV

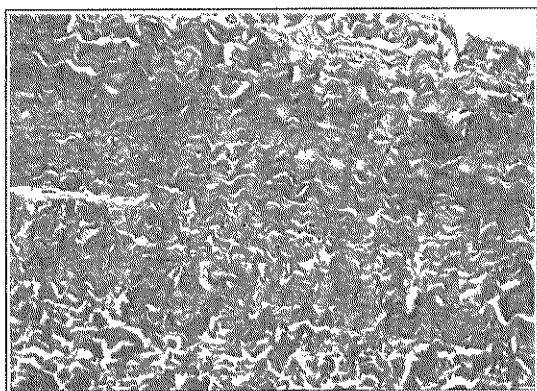


(b) G-N-L + MEV

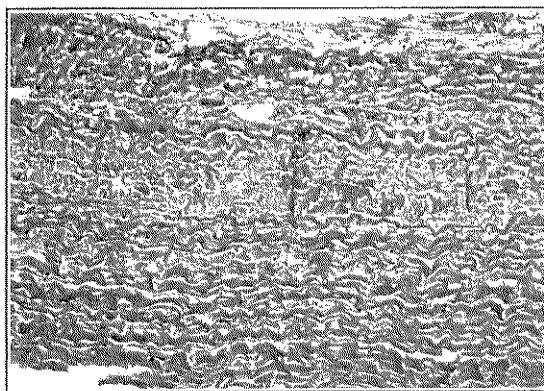
Figura 21 MEV das superfícies lisas e rugosas dos pericárdios bovinos tratados quimicamente: as fotografias do lado esquerdo mostram a superfície lisa e as do lado direito mostram a superfície rugosa.

4.5 Análises histológicas

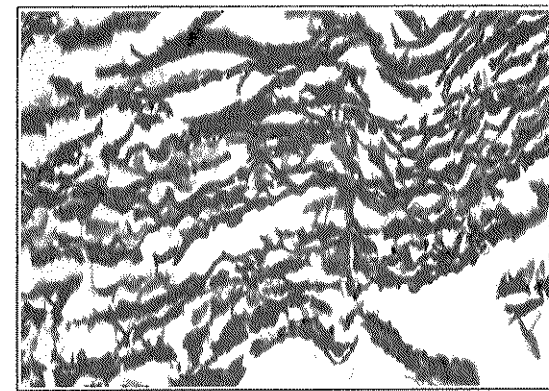
As Figuras 22 e 23 ilustram as lâminas das análises histológicas, nas quais podem ser visualizados os aspectos da morfologia das fibras de colágeno das membranas de pericárdio bovino antes e após a liofilização.



(a)



(b)



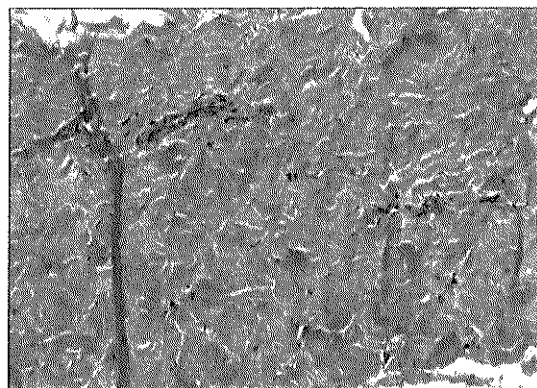
(c)

Figura 22 Morfologia das fibras de colágeno do pericárdio bovino (aumento de 20 vezes).

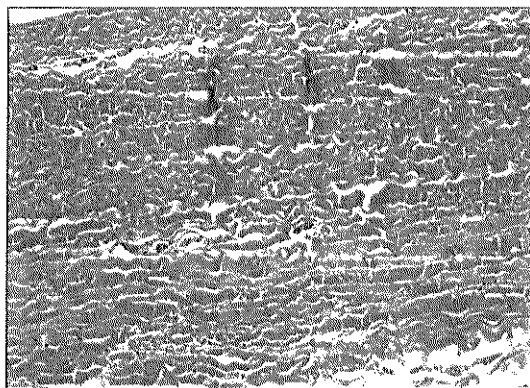
(a) Grupo F.

(b) Grupo F-N-L.

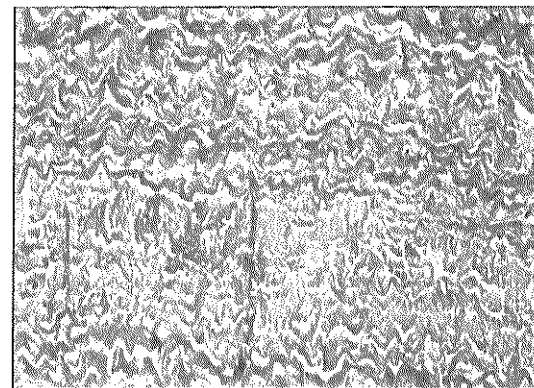
(c) Grupo F-FR-L.



(d)



(e)



(f)

Figura 23 Morfologia das fibras de colágeno do pericárdio bovino (aumento de 20 vezes).

(d) Grupo F-N-L-G.

(e) Grupo G.

(f) Grupo G-N-L.

4.6 Teste de citotoxicidade

Ao utilizar a taxa de $3,0\text{cm}^2/\text{ml}$ de líquido de extração, foi obtido um extrato muito concentrado de resíduos tóxicos, não sendo possível visualizar o crescimento de colônias.

Com taxa de $0,5\text{cm}^2/\text{ml}$ de líquido de extração foi possível visualizar o crescimento de colônias. A Tabela 5 apresenta a média e o desvio-padrão do crescimento de colônias e o gráfico da Figura 24 ilustra a curva de supressão de colônias.

O Apêndice H apresenta os dados do crescimento de colônias CHO.

Tabela 5 Crescimento de colônias

Concentração de extrato (%)	Número de colônias (%)			
	Controle positivo - fenol 0,05 % -	Controle negativo - HDPE -	G	G-N-L
100	0	$94,44 \pm 9,83$	0	0
50	$15,17 \pm 2,06$	$95,63 \pm 4,27$	0	$36,54 \pm 4,20$
25	$42,52 \pm 2,06$	$93,16 \pm 2,25$	0	$82,91 \pm 3,87$
12,5	$66,88 \pm 2,89$	$95,30 \pm 4,85$	0	$93,59 \pm 2,94$
6,25	$82,48 \pm 1,62$	$100 \pm 3,20$	$24,15 \pm 1,62$	$98,93 \pm 5,81$

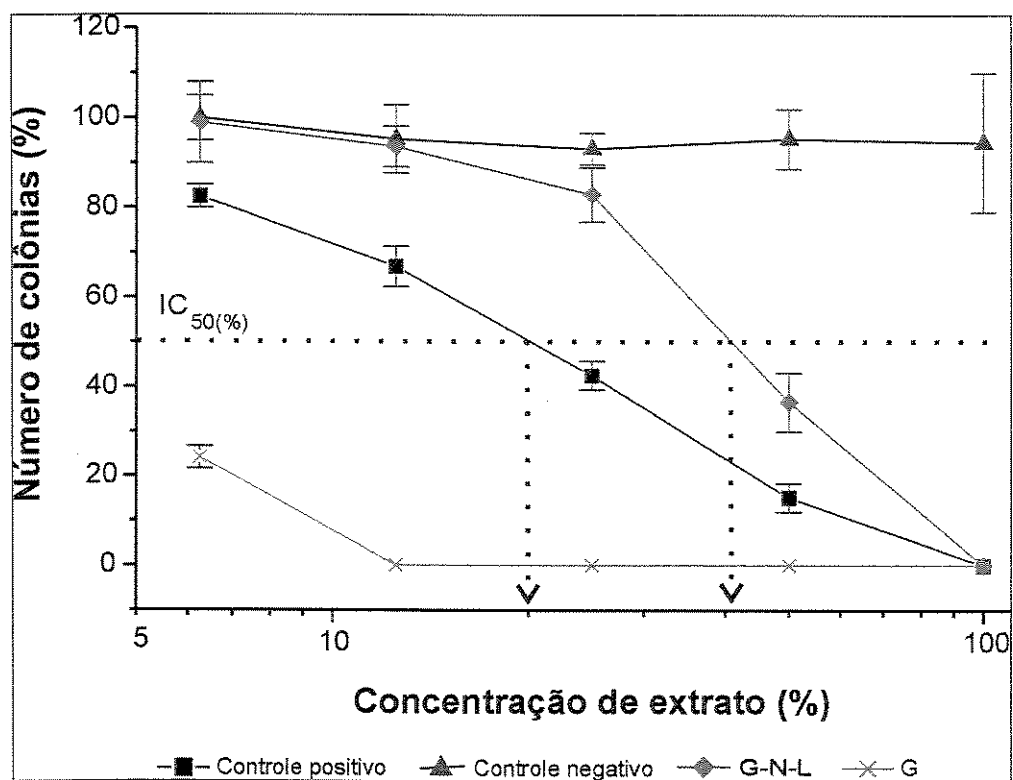


Figura 24 Curva de supressão de colônias. As setas indicam os valores do $IC_{50(\%)}$ do controle positivo e da amostra G-N-L.

4.7 Análises de aldeídos em HPLC

Os gráficos resultantes das análises em HPLC para a detecção de aldeídos estão apresentados nas Figuras 25 a 39.

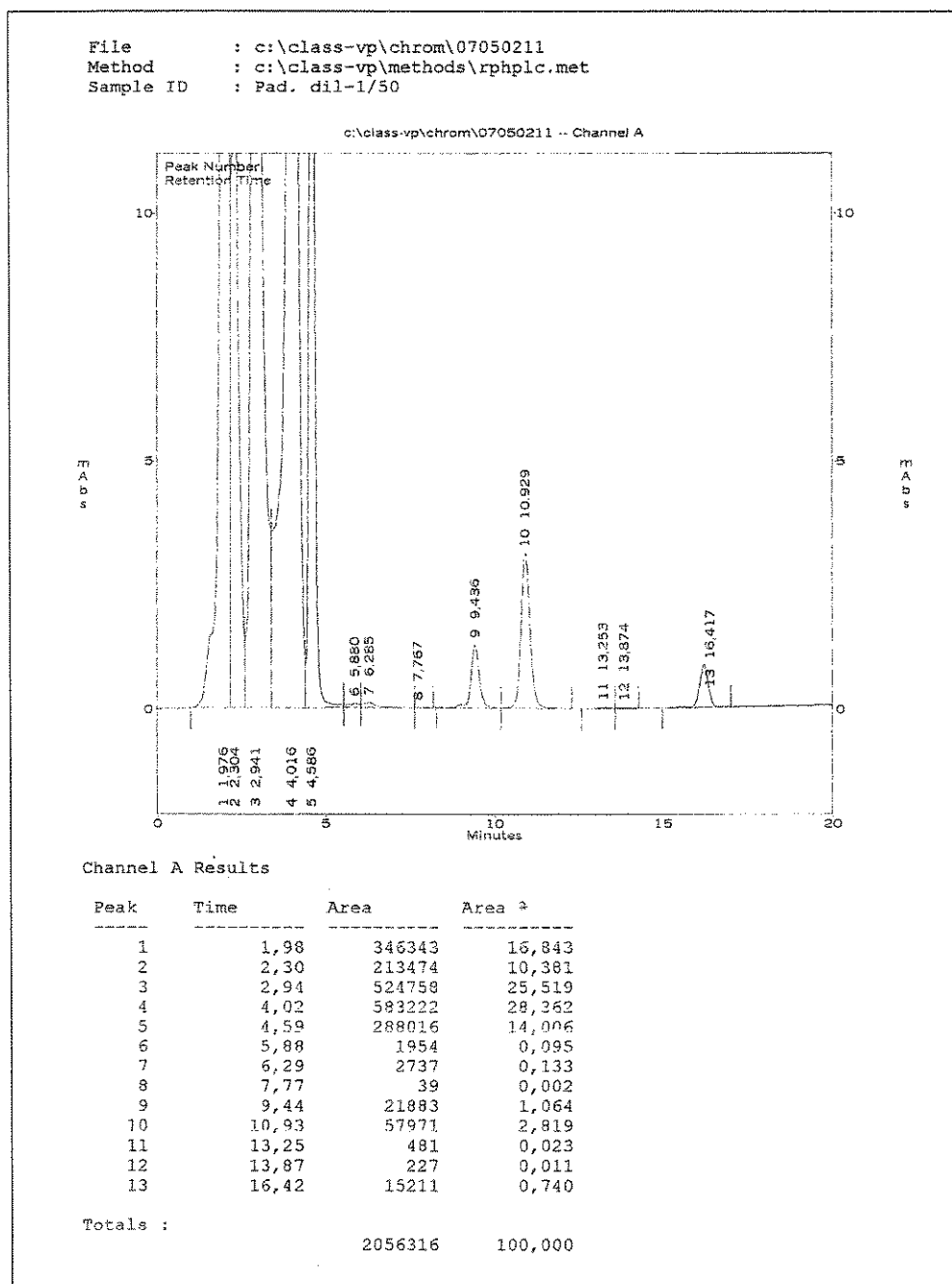
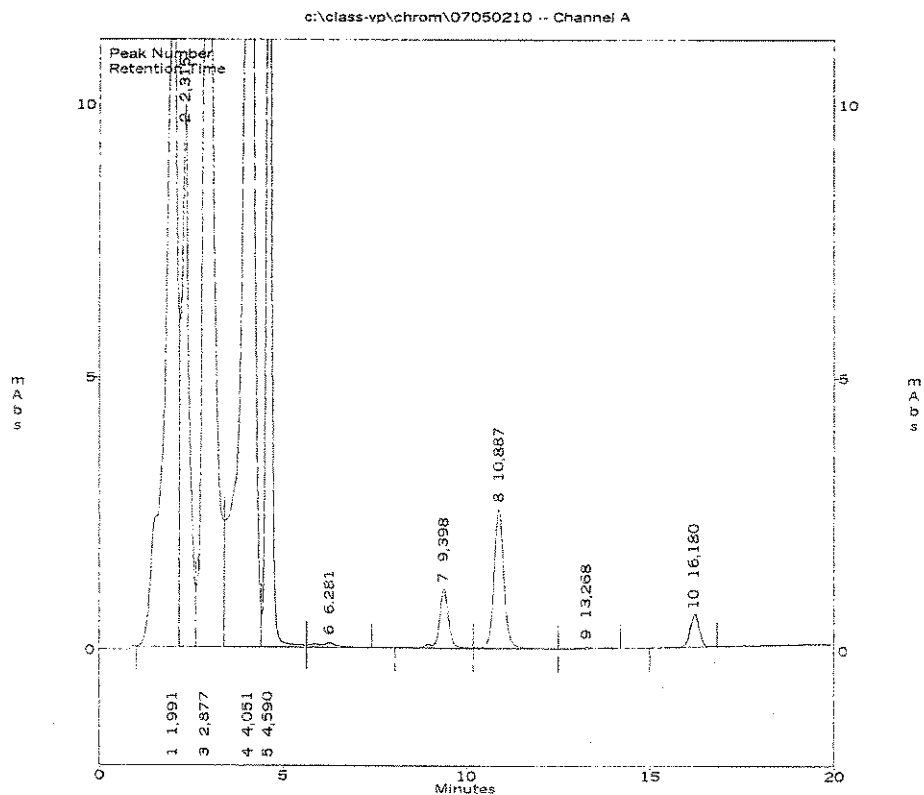


Figura 25 Curva-padrão de GA, diluição 1:50.

File : c:\class-vp\chrom\07050210
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Pad.1/100



Channel A Results

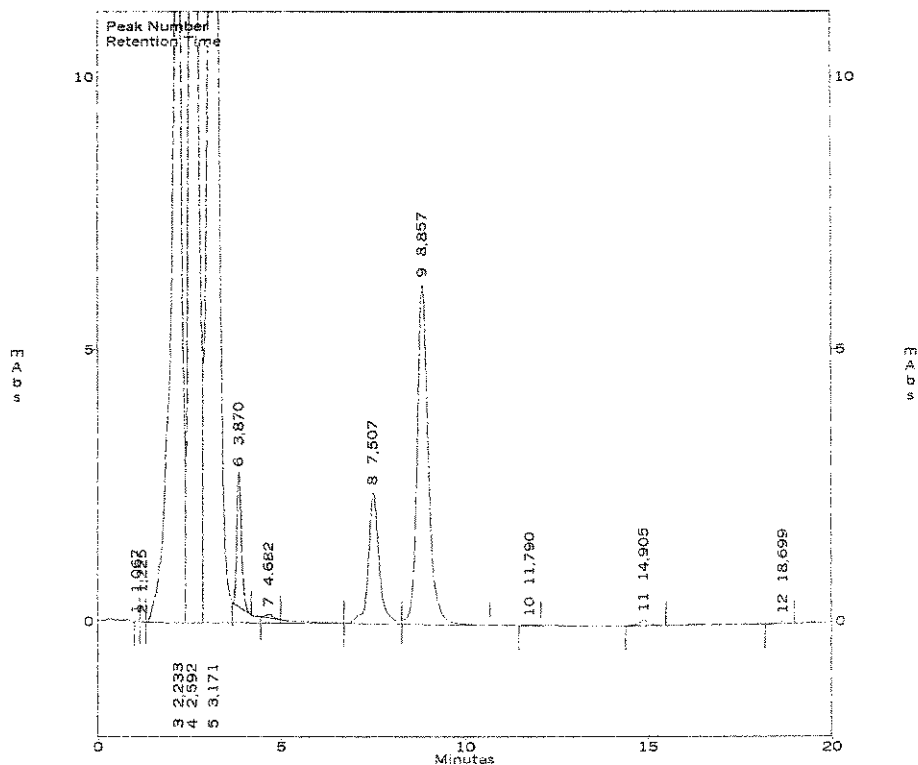
Peak	Time	Area	Area %
1	1,99	300523	20,620
2	2,31	137344	9,424
3	2,88	356640	24,470
4	4,05	402252	27,600
5	4,59	180981	12,418
6	6,28	3003	0,206
7	9,40	18757	1,287
8	10,89	46825	3,213
9	13,27	859	0,059
10	16,18	10265	0,704

Totals :
 1457449 100,000

Figura 26 Curva-padrão de GA, diluição 1:100.

File : c:\class-vp\chrom\07050212
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Pad.Dil.1/200

c:\class-vp\chrom\07050212 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,07	17	0,001
2	1,23	53	0,004
3	2,23	286533	19,864
4	2,59	425838	29,522
5	3,17	521152	36,129
6	3,87	21980	1,524
7	4,68	792	0,055
8	7,51	50174	3,478
9	8,86	133092	9,227
10	11,79	254	0,018
11	14,90	2052	0,142
12	18,70	521	0,036

Totals :
 1442458 100,000

Figura 27 Curva-padrão de GA, diluição 1:200.

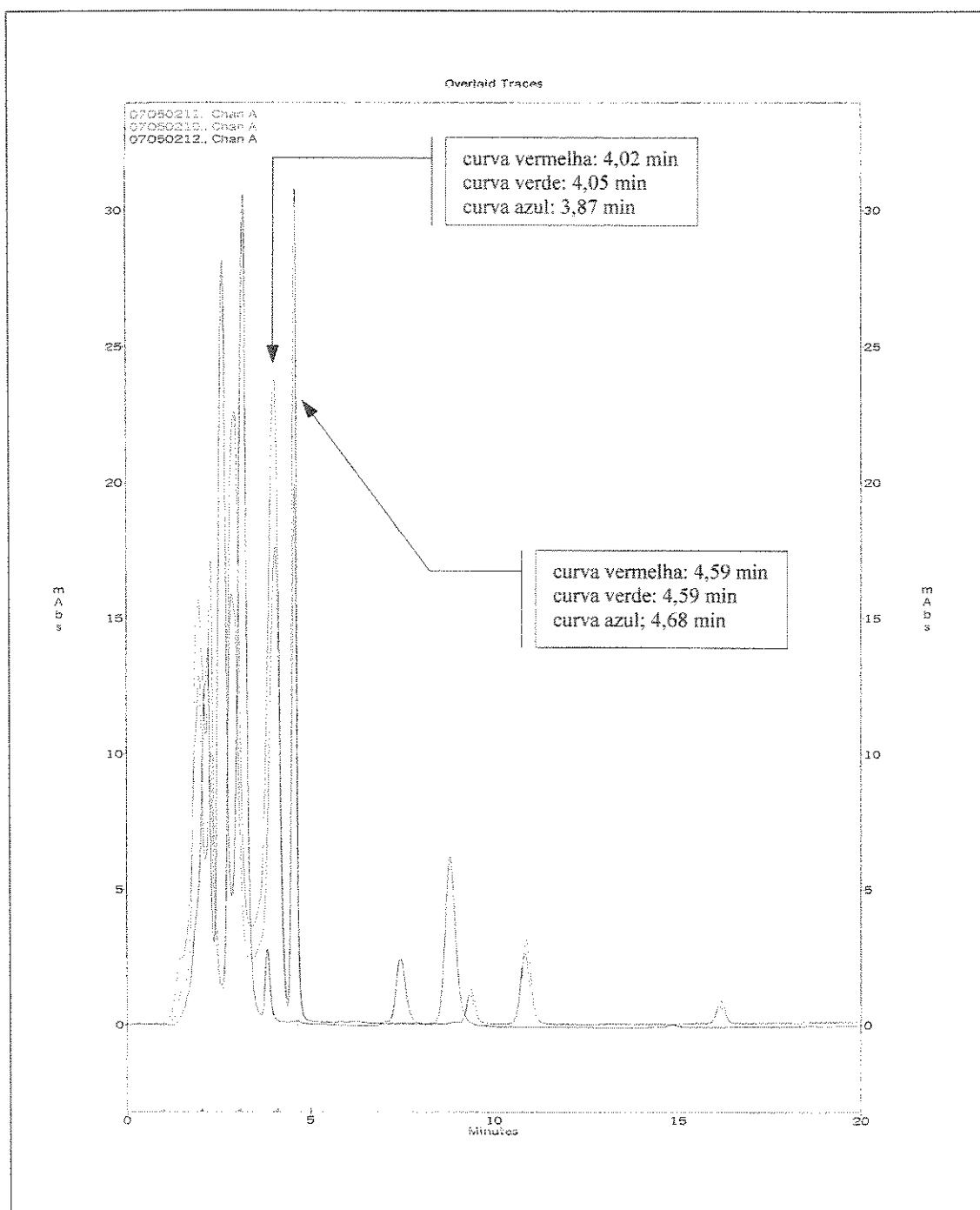
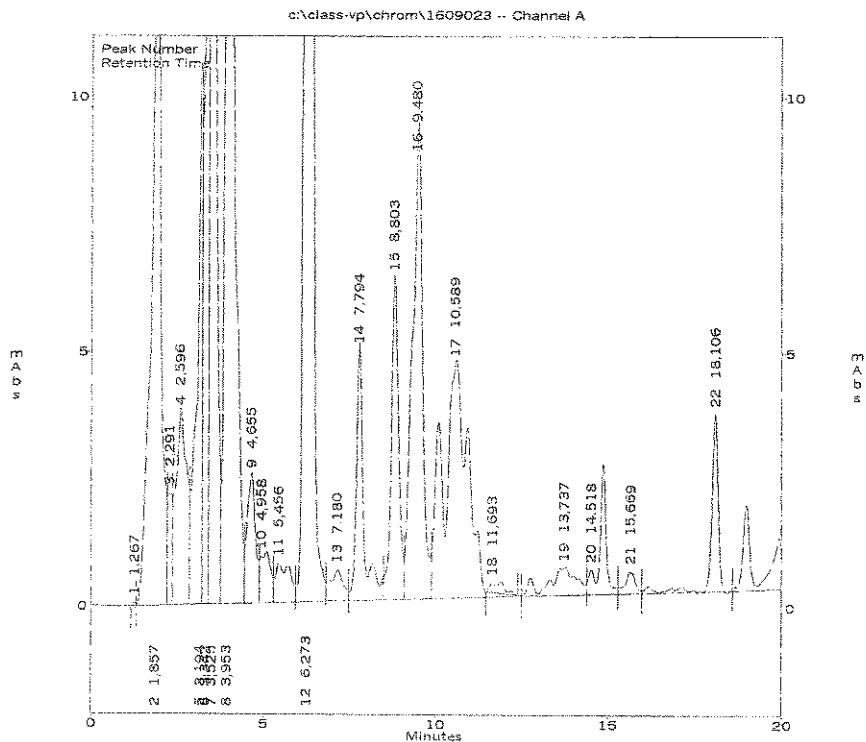


Figura 28 Gráfico comparativo das diluições de GA.

- Vermelho corresponde à diluição 1:50.
- Verde corresponde à diluição 1:100.
- Azul corresponde à diluição 1:200.

File : c:\class-vp\chrom\1609023
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Formaldeido 1:50

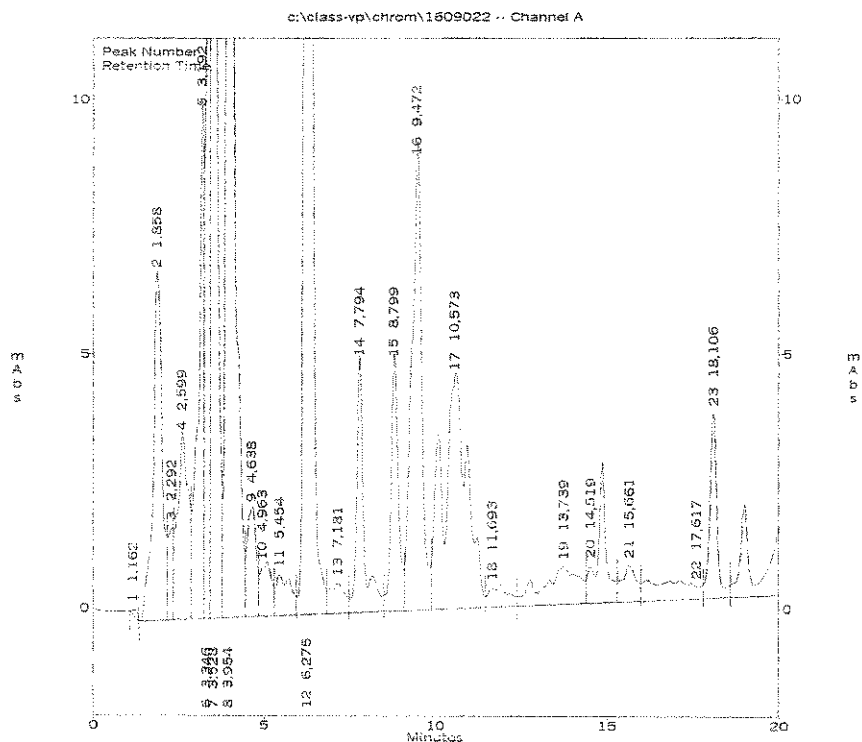


Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,27	316	0,005
2	1,86	277566	5,048
3	2,29	19584	0,356
4	2,60	85778	1,560
5	3,19	122299	2,224
6	3,34	132768	2,414
7	3,53	225254	4,096
8	3,95	978624	17,797
9	4,65	44775	0,814
10	4,96	19315	0,351
11	5,46	22402	0,407
12	6,27	2032313	36,958
13	7,18	15469	0,281
14	7,79	72827	1,324
15	8,80	93583	1,702
16	9,48	190398	3,462
17	10,88	238780	4,250
18	13,74	31590	0,574
19	14,52	34632	0,630
20	15,67	8924	0,162
21	18,11	46243	0,841
22	21,03	805050	14,640
Totals :		5498922	100,000

Figura 29 Curva-padrão de FA, diluição 1:50.

File : c:\class-vp\chrom\1609022
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Formaldeido 1:100



Channel A Results

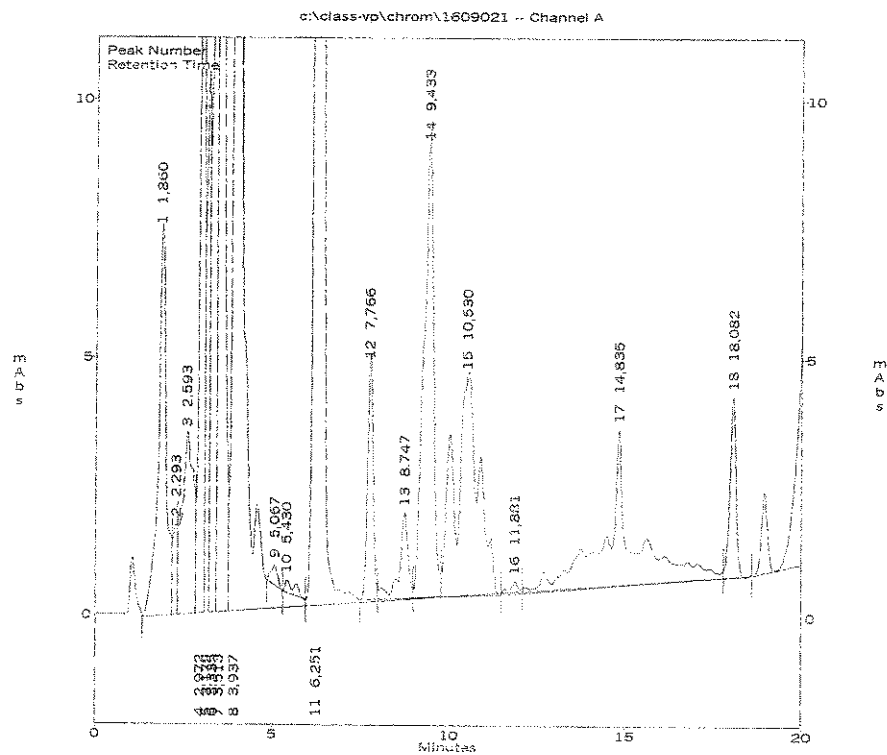
Peak	Time	Area	Area %
1	1.16	1086	0.020
2	1.86	127867	2.359
3	2.29	19377	0.357
4	2.60	81154	1.497
5	3.19	126714	2.338
6	3.35	124175	2.291
7	3.53	219909	4.057
8	3.95	1001399	18.473
9	4.64	39009	0.720
10	4.96	23379	0.431
11	5.45	23750	0.438
12	6.27	1961298	36.181
13	7.18	17933	0.331
14	7.79	74274	1.370
15	8.80	69044	1.284
16	9.47	188156	3.471
17	10.57	229359	4.231
19	13.74	55350	1.021
20	14.52	49049	0.905
21	15.66	21064	0.389
22	17.62	35204	0.649
23	18.11	51771	0.955
24	20.99	858526	15.837

Totals :

5414865 100.000

Figura 30 Curva-padrão de FA, diluição 1:100.

File : c:\class-vp\chrom\1609021
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : formaldeido 1:200



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,86	120515	1,536
2	2,29	16766	0,214
3	2,59	77838	0,992
4	2,97	163332	2,081
5	3,17	75006	0,956
6	3,33	164316	2,094
7	3,51	212070	2,702
8	3,94	1032596	13,157
9	5,07	4728	0,060
10	5,43	4482	0,057
11	6,25	1982094	25,255
12	7,77	52317	0,667
13	8,75	28937	0,369
14	9,43	172033	2,192
15	10,53	200946	2,560
16	11,88	4541	0,058
17	14,84	178669	2,277
19	20,96	2933541	37,378
20	23,89	381311	4,858

Totals : 7848372 100,000

Figura 31 Curva-padrão de FA, diluição 1:200.

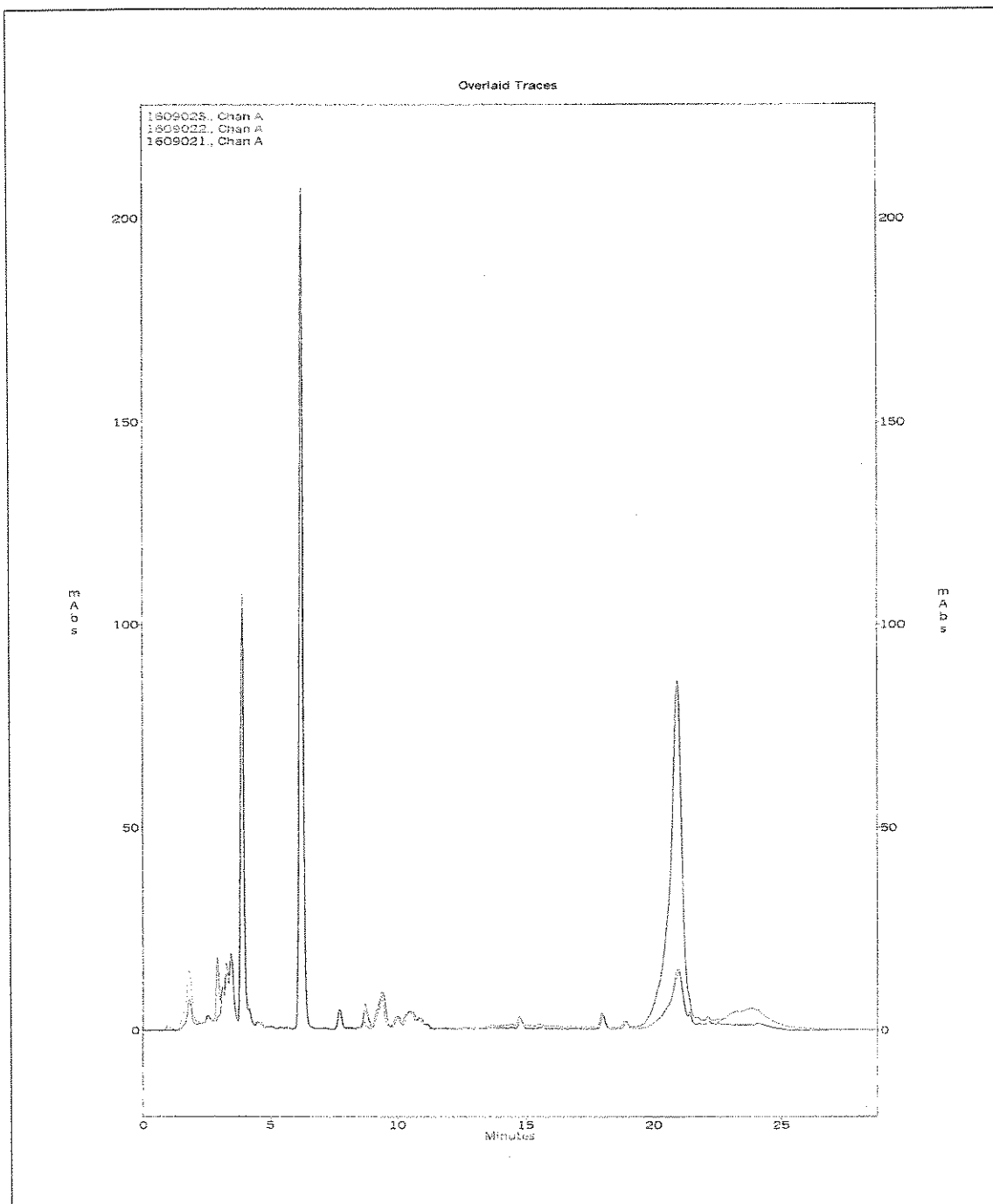


Figura 32 Comparação das curvas-padrão de FA.

- Vermelho corresponde à diluição 1:50.
- Verde corresponde à diluição 1:100.
- Azul corresponde à diluição 1:200.

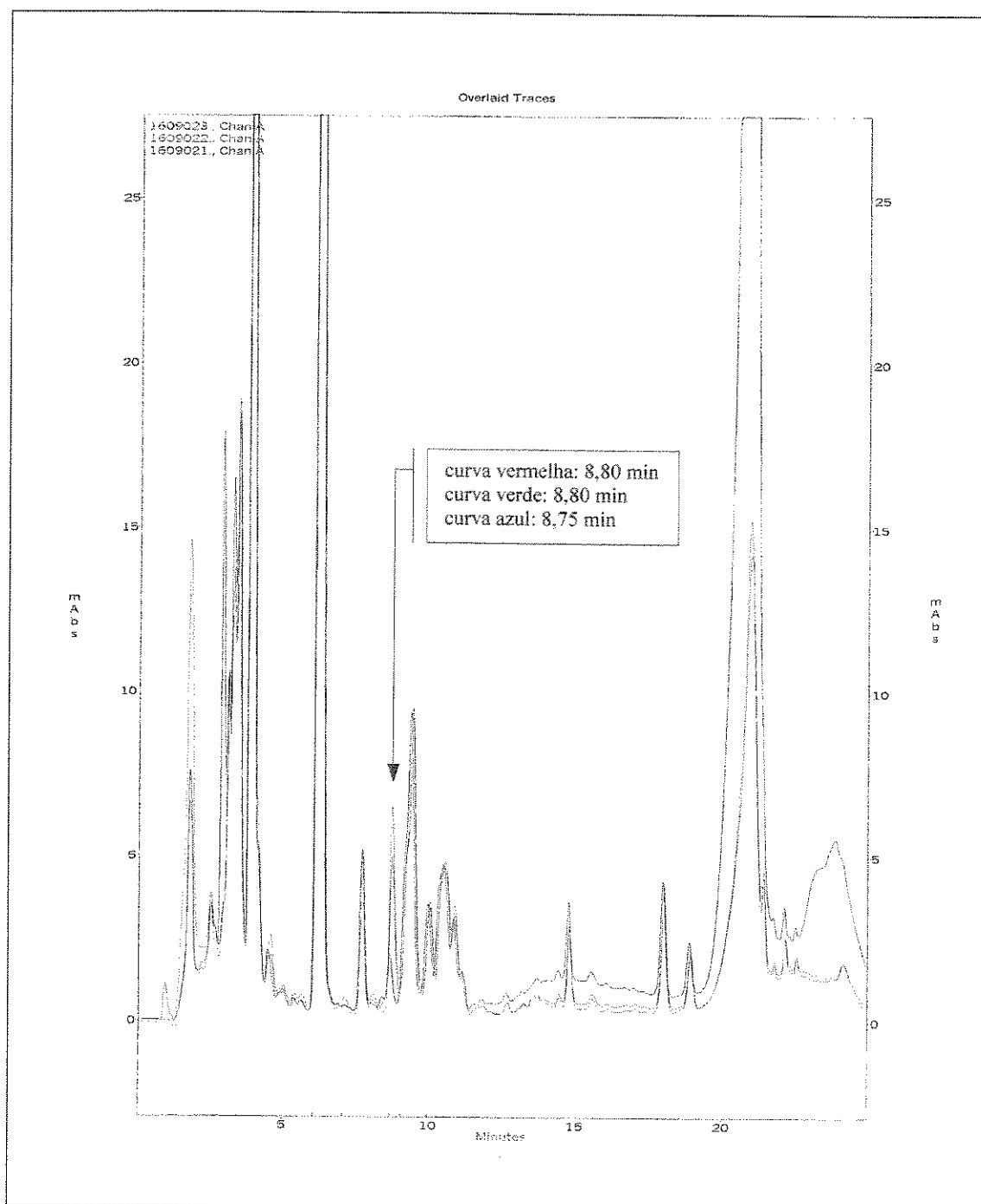
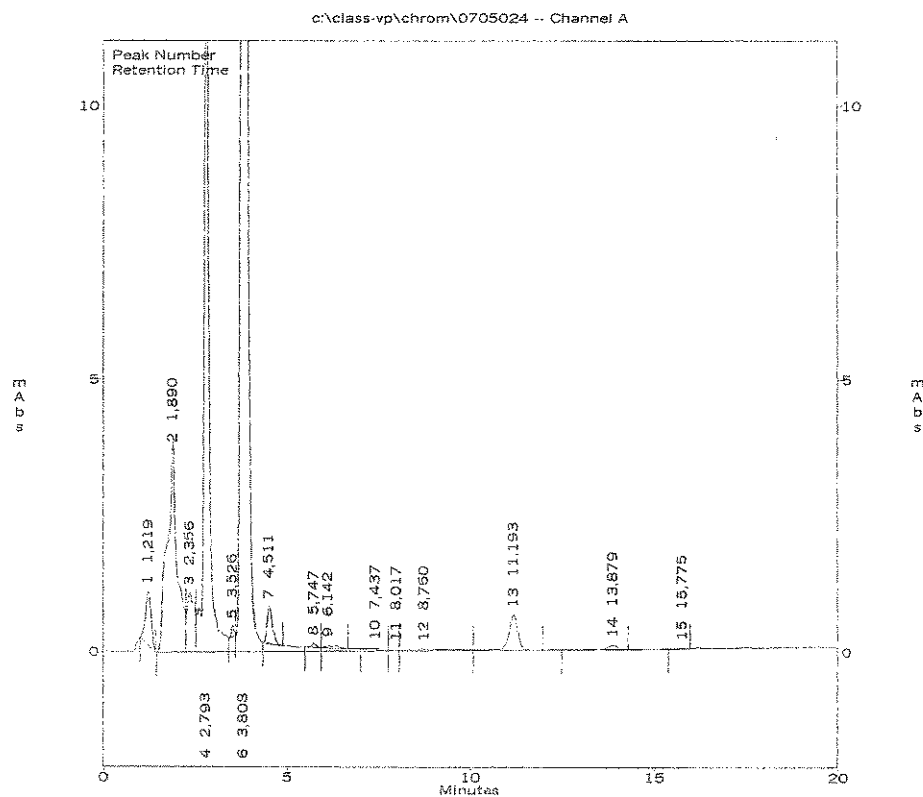


Figura 33 Comparação das curvas-padrão de FA (vista ampliada).

- Vermelho corresponde à diluição 1:50.
- Verde corresponde à diluição 1:100.
- Azul corresponde à diluição 1:200.

File : c:\class-vp\chrom\0705024
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : GA-1 após1sem.



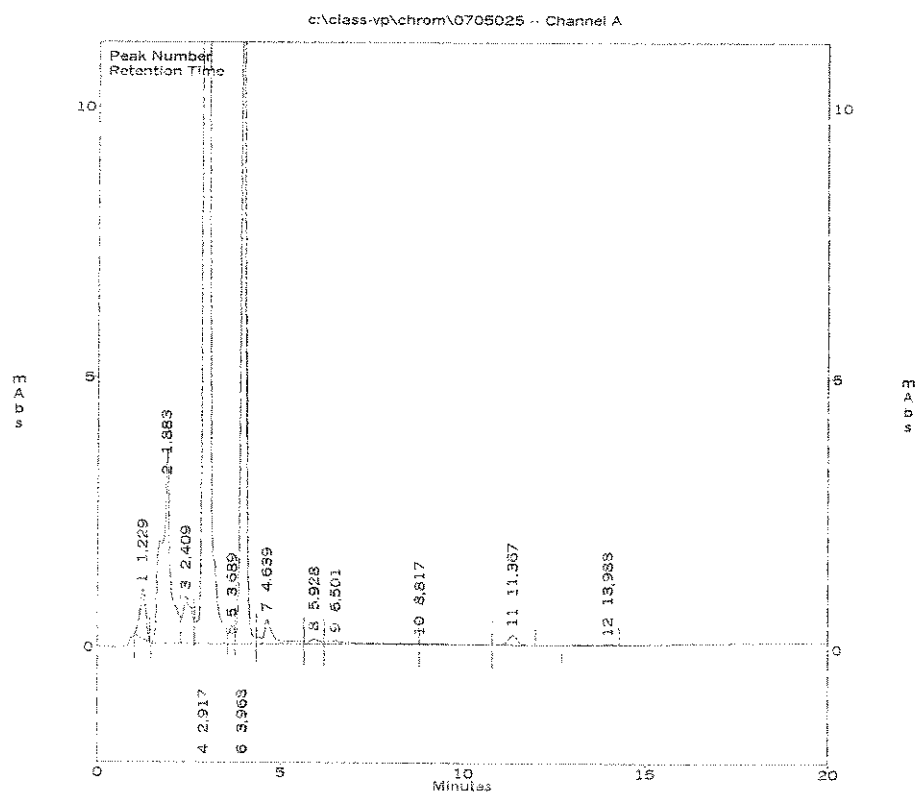
Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,22	10433	0,969
2	1,89	72743	6,754
3	2,36	15165	1,408
4	2,79	138416	12,851
5	3,53	1110	0,103
6	3,81	816480	75,806
7	4,51	6979	0,648
8	5,75	754	0,070
9	6,14	1002	0,093
10	7,44	146	0,014
11	8,02	13	0,001
12	8,76	511	0,047
13	11,19	11149	1,035
14	13,88	2021	0,188
15	15,78	150	0,014

Totals : 1077072 100,000

Figura 34 Curva da amostra 1: G.

File : c:\class-vp\chrom\0705025
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : G2 após 1sem.



Channel A Results

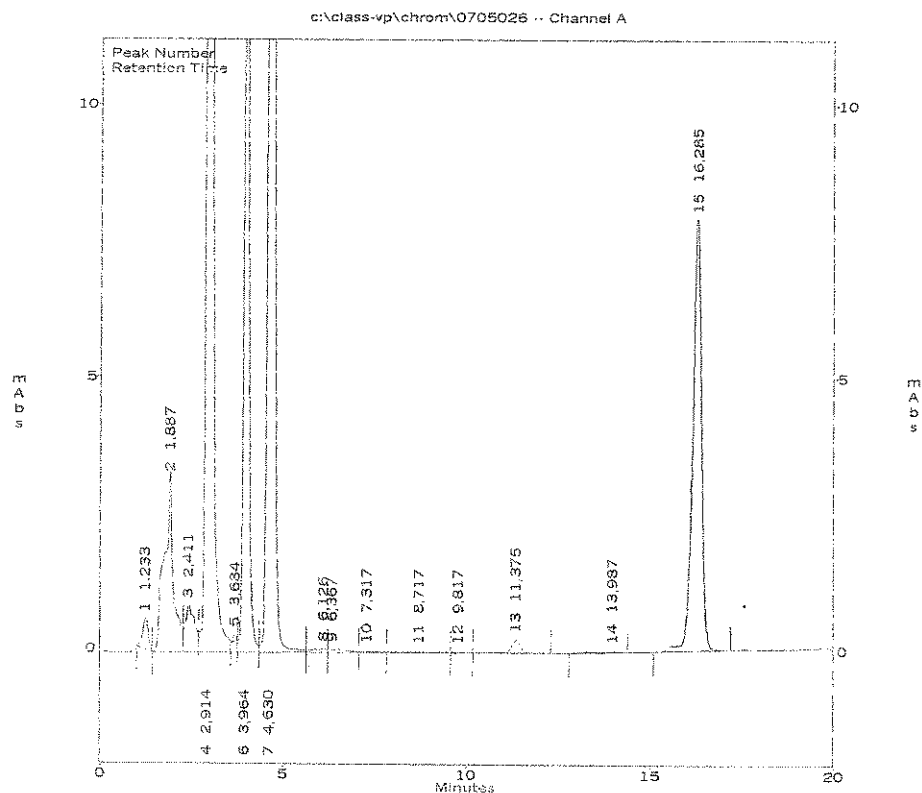
Peak	Time	Area	Area %
1	1,23	9048	0,957
2	1,88	61712	5,998
3	2,41	13867	1,348
4	2,92	598658	58,184
5	3,69	840	0,082
6	3,97	325039	31,591
7	4,64	8783	0,854
8	5,93	1927	0,187
9	6,50	3796	0,369
10	8,82	780	0,076
11	11,37	3076	0,299
12	13,99	577	0,056

Totals :

1028913 100,000

Figura 35 Curva da amostra 2: G.

File : c:\class-vp\chrom\0705026
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : GA-3 Após Isem.



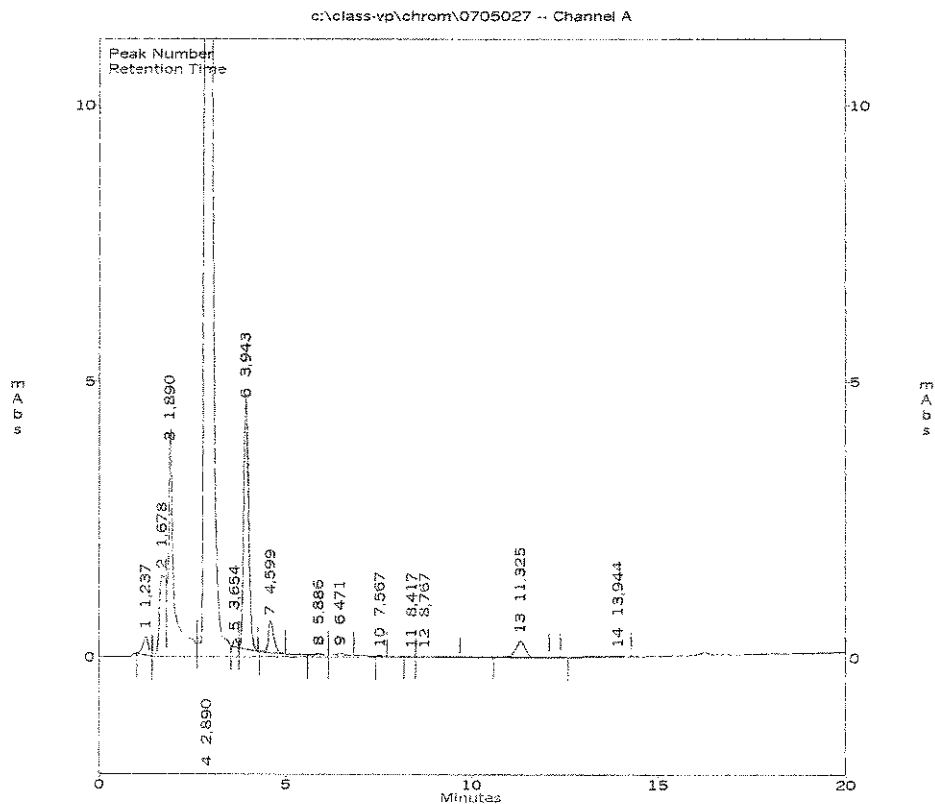
Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,23	5779	0,375
2	1,89	57502	3,727
3	2,41	15117	0,980
4	2,91	794728	51,506
5	3,68	708	0,046
6	3,96	157468	10,206
7	4,63	365879	23,713
8	6,13	1874	0,121
9	6,37	1929	0,125
10	7,32	1581	0,102
11	8,72	906	0,059
12	9,82	360	0,023
13	11,38	4571	0,296
14	13,99	903	0,059
15	16,29	133662	8,663

Totals :
 1542967 100,000

Figura 36 Curva da amostra 3: G.

File : c:\class-vp\chrom\0705027
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : LF-1Apóslsem.



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,24	3188	0,289
2	1,68	19649	1,779
3	1,89	42620	3,859
4	2,89	984187	89,103
5	3,65	1036	0,094
6	3,94	41173	3,728
7	4,60	5817	0,527
8	5,89	274	0,025
9	6,47	439	0,040
10	7,57	20	0,002
11	8,42	11	0,001
12	8,77	93	0,008
13	11,32	5265	0,477
14	13,94	774	0,070

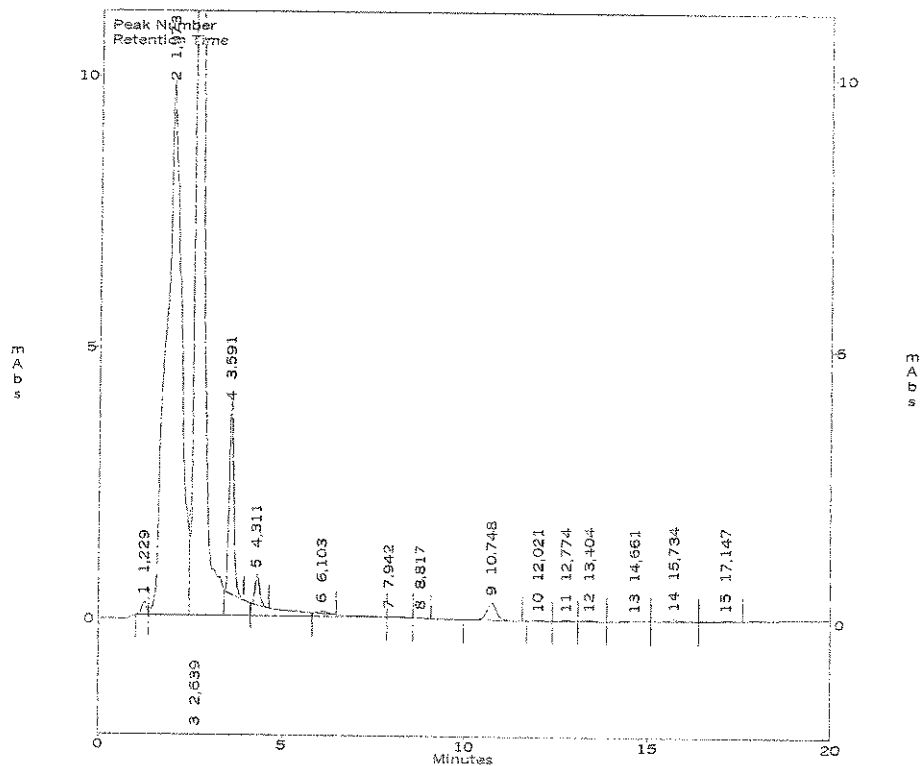
Totals :

1104546 100,000

Figura 37 Curva da amostra 4: G-N-L.

File : c:\class-vp\chrom\0705028
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Lf-02 Apóslsem.

c:\class-vp\chrom\0705028 -- Channel A



Channel A Results

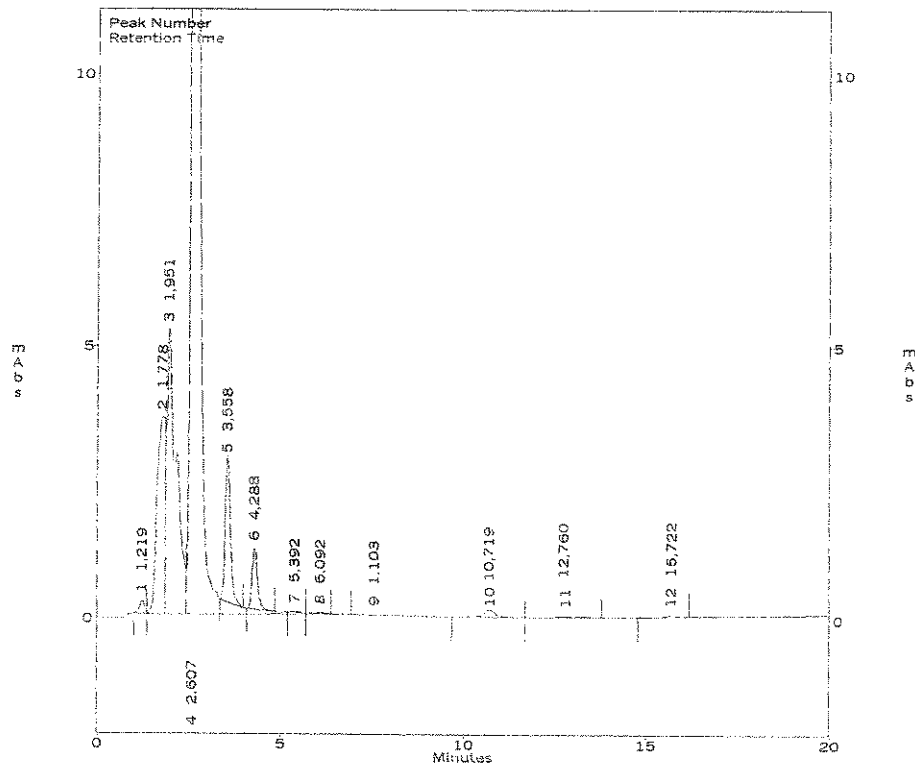
Peak	Time	Area	Area %
1	1,23	2332	0,215
2	1,97	281677	25,913
3	2,64	758015	69,735
4	3,59	31408	2,889
5	4,31	4904	0,451
6	6,10	670	0,062
7	7,94	90	0,008
8	8,82	3	0,000
9	10,75	5704	0,525
10	12,02	222	0,020
11	12,77	217	0,020
12	13,40	306	0,028
13	14,66	211	0,019
14	15,73	827	0,076
15	17,15	405	0,037

Totals : 1086991 100,000

Figura 38 Curva da amostra 5: G-N-L.

File : c:\class-vp\chrom\0705029
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met
 Sample ID : Lf-3 após lsem.

c:\class-vp\chrom\0705029 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	1,22	2157	0,203
2	1,78	59395	5,577
3	1,95	89874	8,440
4	2,61	871430	81,931
5	3,56	26049	2,446
6	4,29	11338	1,065
7	5,39	250	0,023
8	6,09	280	0,026
9	8,72	1	0,000
10	10,72	2702	0,254
11	12,76	719	0,068
12	15,72	723	0,068

Totals : 1064918 100,000

Figura 39 Curva da amostra 6: G-N-L.

A comparação das curvas-padrão das diferentes concentrações mostrou os tempos em que os reagentes foram detectados pela coluna do HPLC: GA (Figura 28) e FA (Figura 33).

A Figura 28 apresentou dois pontos em que as curvas-padrão de diferentes diluições de GA se sobrepõem em ordem decrescente de concentrações: primeiro ponto é detectado em 4,02; 4,05 e 3,87 min e o segundo em 4,59; 4,59 e 4,68 min, mostrando que diferentes frações de GA estão sendo detectadas em dois tempos distintos. Portanto, nas 6 amostras analisadas (Figuras 34 a 39), o GA deve estar sendo detectado pela coluna por volta dos 4 min e 4,6 min podendo haver alguns segundos de atraso ou antecipação no ponto de saída.

Para cada diluição, o valor da concentração de GA foi determinado por meio da densidade e da concentração do GA inicial utilizada. Através dos gráficos do HPLC das curvas-padrão de GA foram obtidas as respectivas áreas nos tempos de detecção de GA. Utilizando o programa Excel® foram traçados os gráficos de concentração em função da área (Figuras 40 e 41), determinando duas equações de reta (curvas de calibração) que serão utilizadas para calcular a quantidade de GA liberada nas amostras 1 a 6, levando-se em consideração o peso de cada amostra. Os valores liberados de GA nas amostras estão apresentados na Tabela 6.

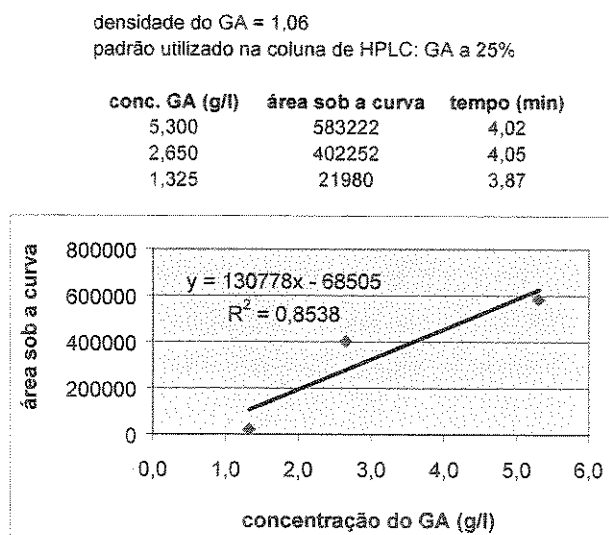


Figura 40 Curva de calibração do GA no tempo 1.

densidade do GA = 1,06
padrão utilizado na coluna de HPLC: GA a 25%

conc. GA (g/l)	área sob a curva	tempo (min)
5,300	288016	4,59
2,650	180981	4,59
1,325	792	4,68

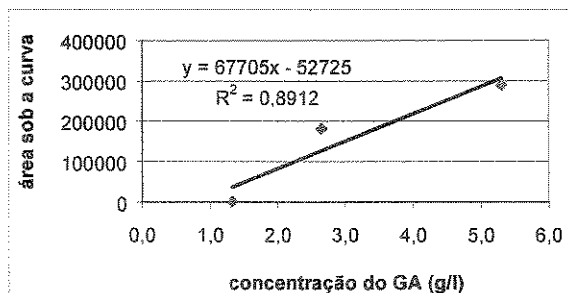


Figura 41 Curva de calibração do GA no tempo 2.

Como já foi apresentado na Figura 33, o tempo de concordância das curvas-padrão das diferentes concentrações de FA está em 8,80; 8,80 e 8,75 min. Como no GA, através do gráfico de HPLC, foram obtidas as respectivas áreas nos tempos de detecção de FA. Utilizando o programa Excel® foi traçado o gráfico de concentração em função da área, obtendo a curva de calibração (Figura 42), que será utilizada para calcular o valor de FA liberado nas amostras de 1 a 6, levando-se em conta a diferença de peso das amostras. As quantidades de FA liberado nas amostras estão apresentadas na Tabela 7.

densidade = 1,083
padrão utilizado na coluna de HPLC: FA a 4%

conc. FA (g/l)	área sob a curva	tempo (min)
0,870	93583	8,80
0,435	69044	8,80
0,218	28937	8,75

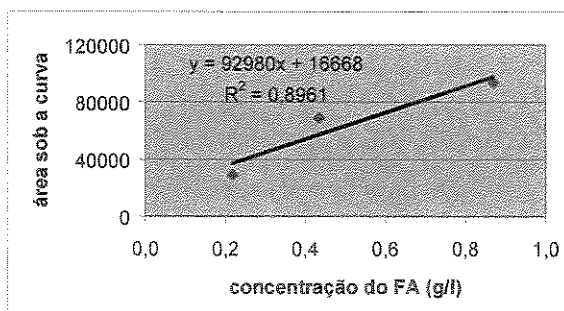


Figura 42 Curva de calibração do FA.

Tabela 6 Quantidade de GA liberada nas amostras

Dados obtidos utilizando-se a curva de calibração do GA (tempo 1), equação 1: $y = 130778x - 68505$, $R^2 = 0,85$

amostras	G			G-N-L		
	1	2	3	4	5	6
área sob a curva do gráfico HPLC (ua)	816480	325039	157468	41173	31408	26049
peso das amostras (g)	0,72	0,67	0,60	0,73	0,71	0,67
GA liberado pelas amostras (g/l)	9,40	4,52	2,88	1,14	1,08	1,08
tempo (min)	3,81	3,97	3,96	3,94	3,59	3,56

Dados obtidos utilizando-se a curva de calibração do GA (tempo 2), equação 2: $y = 67705x - 52725$, $R^2 = 0,89$

amostras	G			G-N-L		
	1	2	3	4	5	6
área sob a curva do gráfico HPLC (ua)	6979	8783	365879	5817	4904	11338
peso das amostras (g)	0,72	0,67	0,60	0,73	0,71	0,67
GA liberado pelas amostras (g/l)	1,22	1,36	10,30	1,18	1,20	1,41
tempo (min)	4,51	4,64	4,63	4,60	4,31	4,29

Total dos valores liberados de GA nos 2 tempos

amostras	G			G-N-L		
	1	2	3	4	5	6
Equação 1	9,40	4,52	2,88	1,14	1,08	1,08
Equação 2	1,22	1,36	10,30	1,18	1,20	1,41
Total	10,62	5,89	13,18	2,32	2,27	2,48

GA liberado pelas amostras (g/l)

	G	G-N-L
média ± DP	9,90 ± 3,70	2,36 ± 0,11

Tabela 7 Quantidade de FA liberada nas amostras

Dados obtidos utilizando-se a curva de calibração do FA: equação $y = 118524x$, $R^2 = 0,81$						
amostras	G			G-N-L		
	1	2	3	4	5	6
área sob a curva do gráfico HPLC (ua)	511	780	906	93	3	1
peso das amostras (g)	0,72	0,67	0,60	0,73	0,71	0,67
FA liberado pelas amostras (mg/l)	0,24	0,26	0,28	0,24	0,25	0,27
tempo (min)	8,76	8,82	8,72	8,77	8,82	8,72

FA liberado pelas amostras (mg/l)		
	G	G-N-L
média ± DP	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,01

5 Discussão

5.1 Padrão de congelamento

O processo de congelamento escolhido foi o congelamento rápido em nitrogênio líquido, pois as amostras pós-liofilização apresentaram características mecânicas, visuais e táteis mais próximas ao material original (sem liofilização) quando reconstituídas em solução fisiológica.

Foi verificado também que a velocidade de congelamento influencia no grau de formação dos interstícios provocados pela saída do líquido da estrutura do pericárdio. Quando a velocidade de congelamento é mais rápida, a formação desses interstícios é mais uniformemente distribuída, com menores dimensões. É importante observar que, quando são utilizados como *scaffold* para crescimento celular, os interstícios formados durante a liofilização, influenciam sobremaneira na ancoragem das células cultivadas, a fim de obter um bom crescimento celular, conforme Curtil et al. (1997).

Quando comparados ao pericárdio fresco, os pericárdios frescos congelados em freezer e liofilizados uma vez reconstituídos se apresentaram mais amarelados e rígidos do que os pericárdios frescos congelados rapidamente em nitrogênio e liofilizados.

Verificou-se então que a velocidade de congelamento é um fator importante quanto às características do material reconstituído. O material submetido a congelamento rápido apresentou maior semelhança com o material fresco.

5.2 Dados dos ensaios mecânicos: tensão de ruptura, módulo de Young e deformação

5.2.1 Grupos F, F-FR-L e F-N-L

Os dados obtidos de ensaios mecânicos, tensão de ruptura e módulo de elasticidade, dos grupos de pericárdio bovino F, F-FR-L e F-N-L, quando comparados e analisados pela ANOVA apresentaram diferenças estatisticamente significativas: $p \leq 0,001$.

Utilizou-se *Tukey Test* para analisar a tensão de ruptura e o módulo de Young comparando:

- ♦ grupo F com o grupo F-FR-L;
- ♦ grupo F-FR-L com o grupo F-N-L;
- ♦ grupo F com o grupo F-N-L.

Concluiu-se que a comparação entre os grupos (F e F-FR-L) e (F-FR-L e F-N-L) resultou em valores diferentes estatisticamente significativos, tanto para a tensão de ruptura quanto para o módulo de elasticidade: $p < 0,05$. A comparação entre os grupos (F e F-N-L) não resultou em valores diferentes estatisticamente significativas, tanto para a tensão de ruptura quanto para o módulo de elasticidade: $p > 0,05$.

Com esses dados, pode-se concluir que o congelamento lento sofrido em freezer pelo pericárdio bovino altera as suas propriedades mecânicas, enquanto que um congelamento rápido em nitrogênio líquido preserva melhor as características do material biológico, não resultando em diferenças significativas, tanto na resistência à ruptura quanto nos módulos de elasticidade quando comparados ao pericárdio fresco.

A análise estatística ANOVA *on Ranks* para os dados encontrados para a deformação, nos grupos estudados nessa subseção, resultou $p=0,469$ ou seja, diferenças não significativas: $p > 0,05$.

5.2.2 Grupos G, G-N-L e F-N-L-G

A análise estatística ANOVA dos dados obtidos de tensão de ruptura dos grupos G, G-N-L e F-N-L-G, não apresentou diferença significativa: $p = 0,300$

Os dados obtidos dos módulos de elasticidade quando analisados pela ANOVA *on Ranks* resultaram um $p = 0,061$, podendo ser considerados sem diferença significativa entre eles.

Os valores obtidos de deformação para esse grupo quando analisados pela ANOVA *on Ranks*, resultaram em diferenças significativas: $p \leq 0,001$. Razão pela qual, passou-se a efetuar um pós teste utilizando *Student-Newman-Keuls Method* comparando os dados dos grupos:

- ♦ G-N-L e F-N-L-G;
- ♦ G e G-N-L;
- ♦ G e F-N-L-G.

A comparação entre os grupos G-N-L e F-N-L-G não apresentou diferença significativa entre si: $p > 0,05$. Mas a comparação entre os grupos (G e G-N-L) e (G e F-N-L-G) apresentou diferença significativa: $p < 0,05$.

Os dados obtidos, mesmo sendo estatisticamente diferentes, apresentaram valores médios compatíveis com os preconizados por Braile (1992), como adequados na confecção de próteses cardiovasculares.

Os resultados sugerem uma adequação do material liofilizado e reconstituído em aplicações práticas.

5.3 Dados da temperatura de encolhimento

Estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas $p = 0,575$ entre os valores de temperatura de encolhimento nos estudos realizados nos pericárdios bovinos pertencentes ao grupos: G, G-N-L, F-N-L-G.

Entre os valores encontrados nos grupos F, F-FR-L e F-N-L o mesmo aconteceu, ou seja, não houve diferenças significativas $p = 0,154$.

Observou-se que as temperaturas de encolhimento não sofrem diferenças significativas em todos os grupos estudados, o que se faz supor que o processo de liofilização não interfere nas estruturas das ligações químicas dos pericárdios.

5.4 Análises em microscopia eletrônica de varredura

O corte transversal do material que é submetido a um congelamento lento (Figura 18), apresenta a formação de grandes interstícios, provocados pela saída de líquido durante o processo de liofilização. Diferente do que ocorre na Figura 18, o corte transversal do material que é submetido a um congelamento rápido (Figura 19) apresenta a formação de interstícios menores e mais uniformemente distribuídos, após a liofilização. Essa diferença no tamanho dos interstícios que se formam após a liofilização é explicado pelo tamanho do gelo formado durante a fase de congelamento das membranas.

Na Figura 20 são vistas as alterações ocorridas na superfície dos pericárdios bovinos dos grupos F-FR-L e F-N-L em comparação com o grupo F. O grupo F-FR-L teve a sua superfície totalmente alterada, ocorrendo uma deformação na superfície lisa do pericárdio. Essa deformação pode ter sido provocada pela sublimação do gelo de grandes dimensões, que se formaram durante o congelamento em freezer. A diferença observada entre o grupo F e F-N-L deve-se ao fato de o grupo F ter sofrido secagem por ponto crítico, provocando um ligeiro encolhimento nas fibras do pericárdio. Como no caso anterior (grupos F e F-N-L), de acordo com os resultados obtidos (Figura 21), os PB tratados quimicamente, G e G-N-L não apresentaram alterações importantes.

As fotografias feitas em MEV fazem supor que o congelamento em freezer provoca maiores alterações nas membranas de pericárdio bovino, enquanto o congelamento rápido em nitrogênio líquido mantém melhor a integridade do material. Esse resultado é corroborado por estudos feitos por Skrabanja et al. (1994) no qual afirmam que, apesar de não ser uma regra, um

congelamento mais rápido tende a preservar melhor o material, evitando perdas das características na sua reconstituição.

O resultado encontrado parece apontar para um paralelismo entre aspecto do material liofilizado e propriedade mecânica.

5.5 Análises histológicas

As fotografias das lâminas que serviram de material para a avaliação do patologista, encontram-se nas Figuras 22 e 23 e levaram às seguintes conclusões:

- ◆ Os grupos F e F-N-L apresentam morfologia do colágeno dentro dos padrões de normalidade de um pericárdio bovino;
- ◆ O grupo F-FR-L apresenta as fibras de colágeno muito alteradas, com aspecto encolhido e aglomerado, a morfologia deste grupo diferindo dos padrões da normalidade de um pericárdio bovino fresco;
- ◆ Os grupos G, G-N-L e F-N-L-G apresentam morfologia das fibras de colágeno dentro dos padrões da normalidade de um pericárdio bovino tratado.

A alteração verificada na morfologia das fibras de colágeno do grupo F-FR-L pode ser a explicação para o fato desse grupo, após sua reconstituição em solução fisiológica, ter-se tornado mais rígido, quando comparado ao pericárdio fresco.

5.6 Dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade

O extrato obtido pela imersão das membranas de pericárdio bovino tratadas em glutaraldeído (G) não liofilizadas, em meio extrator, foi diluído em diversas concentrações (Figura 7, subseção 3.10). Conforme Tabela 5 e Figura 24, observou-se discreto crescimento de colônias, somente nas placas de cultura que continham a concentração mais diluída (6,25%), mostrando ser o material bastante citotóxico. Note-se que nessa concentração, o material

liofilizado permitiu um crescimento de mais de 95% do total das células cultivadas. Pode-se deduzir, portanto, que a liofilização diminuiu a citotoxicidade do material tratado com aldeído.

O potencial citotóxico foi avaliado pelo índice de citotoxicidade $IC_{50(\%)}$. O controle negativo não deve produzir resposta citotóxica, isso foi verificado com o extrato do polietileno, resultando um $IC_{50(\%)} > 100$. O controle positivo deve produzir uma resposta citotóxica, isso foi verificado com a utilização da solução de fenol, que apresentou um $IC_{50(\%)}=20$, aumentando-se a concentração do extrato do controle positivo houve redução gradual do número de colônias formadas. O comportamento dos controles positivo e negativo ajuda no controle do teste de citotoxicidade, mostrando possíveis erros durante o decorrer do ensaio.

O extrato G-N-L mostrou um $IC_{50(\%)} = 41$, indicando que o material possui citotoxicidade. Por outro lado, o extrato G mesmo à concentração de 6,25%, em que houve um pequeno crescimento de colônias, manteve-se abaixo da linha de $IC_{50(\%)}$, indicando um potencial citotóxico elevado. Para que o extrato G consiga alcançar um $IC_{50(\%)}$ haveria necessidade de maiores diluições.

Comparando os dois grupos avaliados no ensaio de citotoxicidade, pode-se concluir que os resultados mostram a dependência do material ser liofilizado ou não. Supõe-se que a menor citotoxicidade observada no grupo G-N-L seja em decorrência da menor concentração de aldeídos, que realmente foi observado no ensaio por HPLC.

Para avaliação estatística mais rigorosa é necessário um número maior de ensaios, mas, uma comparação nos grupos G , G-N-L, controle positivo e controle negativo resultou em diferença significativa $p \leq 0,001$.

5.7 Dados obtidos pela análise em HPLC

Apesar do pequeno número de amostras analisadas em HPLC, fez se um tratamento estatístico com os resultados obtidos.

A avaliação estatística dos dados resultantes do ensaio em HPLC, utilizando o t-test para o GA liberado pelas amostras G e G-N-L, resultou em diferença estatisticamente significativa $p = 0,024$.

Para a quantidade de FA liberado pelas amostras, a comparação entre G e G-N-L resultou um $p = 0,677$ (não há diferença estatisticamente significativa).

Muitos estudos têm sido apresentados a respeito da resposta biológica das próteses fixadas com glutaraldeído, utilizando vários animais e culturas de células. Segundo Jayakrishnan e Jameela (1996), aldeídos que ficam retidos nos interstícios das ligações cruzadas nos tecidos biológicos têm sido apontados como responsáveis pelas reações inflamatórias, citotoxicidade, calcificação e falta de endotelização.

Analisando os resultados obtidos neste estudo, pode-se levantar a hipótese de que a liofilização promoveria a retirada de aldeídos que ficam retidos nos interstícios das ligações cruzadas no pericárdio durante o tratamento em GA, que não são extraídos pela simples lavagem em solução fisiológica. Tal fato justificaria a diminuição dos aldeídos residuais devido ao GA, no material liofilizado. Enquanto que os aldeídos residuais devido ao FA (na qual o pericárdio é armazenado após tratamento em GA), por estarem na superfície do material, são removidos durante a lavagem em solução fisiológica.

O resultado do ensaio em HPLC parece apontar que a liofilização promove a redução de aldeídos residuais nos PB tratados quimicamente.

6 Conclusões

1. O material submetido à liofilização com congelamento rápido em N_2 , quando comparado com o material congelado em freezer, apresentou características mecânicas mais próximas do material não liofilizado.
2. O material submetido à liofilização com congelamento rápido em N_2 , quando reconstituído, preservou o aspecto mais próximo do material não liofilizado.
3. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que o material congelado em freezer apresentou alterações na estrutura superficial mais expressiva que aquele congelado em N_2 .
4. O padrão histológico das fibras de colágeno do PB liofilizado apresentou grandes alterações após congelamento em freezer, enquanto que o PB liofilizado após congelamento em N_2 não apresentou alterações significativas.
5. A liofilização não alterou as ligações cruzadas do PB tratado quimicamente, já que sua temperatura de encolhimento permaneceu inalterada.
6. Neste estudo, a liofilização não alterou de forma significativa as características mecânicas do PB.
7. Os grupos G e G-N-L possuem potencial citotóxico, porém o grupo G-N-L apresentou citotoxicidade menor que o grupo G.
8. O processo de liofilização diminuiu a quantidade de aldeídos residuais, já que a diferença encontrada na quantidade de aldeídos residuais pelo ensaio em HPLC para os grupos G e G-N-L foi significativa. Isso pode significar que a liofilização pode melhorar a biocompatibilidade das membranas de pericárdio bovino.

Em suma: Pode-se concluir que a liofilização do PB não influenciou de forma significativa a maioria de suas características mecânicas, diminuiu sua citotoxicidade, diminuiu a concentração de aldeídos residuais e não alterou a morfologia das fibras de colágeno (quando a liofilização é processada utilizando um congelamento rápido).

Sugestões para trabalhos futuros:

Diante das conclusões apresentadas, parece acertado verificar a possibilidade da utilização do PB liofilizado e reconstituído nas aplicações hoje reservadas ao pericárdio bovino. Se confirmada essa utilização poderia resultar em aplicações semelhantes agregadas a vantagens relativas à conservação, ao transporte, à esterilização e, eventualmente, à calcificação.

Estudos de fadiga com produtos confeccionados em PB, liofilizados e reconstituídos devem ser realizados em trabalhos futuros, visto que o PB aplicado a próteses valvares requerem longa durabilidade.

Estudos de interações de velocidade de congelamento, utilizando outros meios que não foram aqui avaliadas, bem como diferentes processos de reconstituições dos pericárdios bovinos podem ser estudados para utilizações em engenharia de tecidos.

7 Referências Bibliográficas

- American Society For Testing And Materials. ASTM D 638-90; Standard test method for tensile properties of plastics. In: *Annual Book of ASTM Standards*, 1990, pp.157-168.
- Beauchamp, R.O., St.Clair M.B., Fennell T.R., Clarke D.O., Morgan K.L. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, v.22, n.3 e 4, pp.143-174, 1992.
- Braile, Domingo Marcolino. *Prótese vascular de pericárdio bovino. Desenvolvimento em posição mitral*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1990. 110p. Tese (Doutorado).
- Braile, D.M., Soares M.J., Souza D.R.S., Ramires, V.A., Sizigan. S., Lourenço, M. F. Expectativa funcional de biopróteses valvares I. Testes físicos e histopatológicos para aproveitamento de regiões de pericárdio bovino. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.59, pp.169-75, 1992.
- Curtil, A., Pegg, D.E., Wilson, A. Repopulation of freeze-dried porcine valves with human fibroblast and endothelial cells. *J. Heart Valve Dis.*, v.6, n.3, pp.296-306, 1997a.
- Curtil, A., Pegg, D.E., Wilson, A. Freeze-drying of cardiac valves in preparation for cellular repopulation. *Cryobiology*, v.34, pp.13-22, 1997b.
- Davies, H., Missen, G.A.K., Blandford, G., Roberts, C.I., Lessof, M.H., Ross, D.N. Homograft replacement of the aortic valve. A clinical and pathological study. *Am. J. Cardiol.*, v.22, n.2, pp.195-217, 1968.
- Eybl, E., Griesmacher, A., Grimm, M., Wolner, E. Toxic effect of aldehydes releases from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. *J. Biomed. Mat. Res.*, v.23, pp.1355-1365, 1989.

- Ferrans, V.J., Hilbert, S.L., Jones, M. Biomaterials In: Bodnar, E., Frater, R.W.M. (Ed.) *Replacement Cardiac Valves*. NY: Pergamon Press Inc., 1991. Chap.3, pp.49-76.
- Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.45, pp.221-229, 1998.
- Gatlin, L.A., Nail, S.L. Freeze Drying: A practical overview. *Bioprocess Technology*, v.18, pp.317-367, 1994.
- Gendler, E., Gendler, S., Nimni, E. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *J. Biom. Mat. Res.*, v.18, pp.727-736, 1984.
- Grabenwöger, M. Böck, P., Fitzel, F., Schmidberger, A., Grimm, M., Laufer, G., Bergmeister, H., Wolner, E. Acid Glycoproteins accumulate in calcified areas of bioprosthetic tissue. *J. Heart Valves Dis.*, v.7, n.2, pp.229-234, 1998.
- Grimm, M., Elby, E., Grabenwöger, M., Spreitzer, H., Jäger, W., Grimm, G., Böck, P., Müller, M.M., Wolner, E. Glutaraldehyde affects biocompatibility of bioprosthetic heart valves. *Surgery*, v.111, n.1, pp.74-78, 1992.
- Herrero, E.J., Fernández, P., Turnay, J., Olmo, N., Calero, P., García, R., Freile, I., Olivares, J.L.C. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*, v.20, pp.539-545, 1999.
- Hilbert, S.L., Ferrans, V.J., Jones, M. Tissue-derived biomaterials and their use in cardiovascular prosthetic devices. *Medical Progress through Technology*, v.14, pp.115-163, 1988.
- Ionescu, M.I., Tandon, A.P., Mary, D.A.S., Abid, A. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.73, pp.31-42, 1977.
- International Organization For Standardization. ISO 10993-5; Biological testing of medical and dental materials devices – part 5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Switzerland, 1992 15p.

- Jayakrishnan, A., Jameela, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, v.17, pp. 471-484, 1996.
- Jennings, T.A. Effect of formulation on lyophilization. *Medical Device Link: IVDT Archive*, 1997, 14 p.
- Khor, E. Methods for treatment of collagenous tissue for bioprostheses (Review). *Biomaterials*, v.18, pp.95-105, 1997.
- Kazakevich, Y., McNair, H. Basic liquid chromatography. Extraído on line <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, em janeiro, 2002
- Lipari, F. and Swarin, S.J. Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4 dinitrophenyl-hydrazine method. *J. Chromatography*, pp.247(2):297-306, 1982.
- Montgomery, D.C., Runger, G.C. *Applied statistics and probability for engineers*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994, Chap. 7: Interval estimation, pp. 323-369.
- Moore, C.H., Martelli, V., Al-Janabi, N., Ross, D.N. Analisis of homograft valve failure in 311 patients followed up to 10 years. *Ann. Thorac. Surg.*, v.20, pp.274-281, 1975.
- Moore, M.A., Wen-Min, C., Philips, R.E., Bohachevsky, I.K., McIlroy, B.K.S Shrinkage temperature versus protein extraction as a measure of stabilization of photooxidized tissue. *J. Biom. Mat. Res.*, v.32, pp.209-214, 1996.
- Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M. Radiation Vulcanized Natural Rubber Latex is not Cytotoxic. In: *Proceeding of Japan Atomic Research Institute JAERI-M 89-288*, Japan, 1989, pp.79-87.
- Occhiogrosso, M., De Tommasi A., Vailati G. Antigenic properties of fresh and lyophilised human dura mater. *J. Neurosurg. Sci.*, v.31, n.3, pp.129-31, 1987.

- Parízek, J., Mericka, P., Spacek, J., Nemecek, S., Eliás, P., Sercl, M. Xenogenic pericardium as a dural substitute in reconstruction of suboccipital dura mater in children. *J. Neurosurg.*, v.70, pp.905-909, 1989.
- Pate, J.W., and Sawyer, P.N. Freeze-died aortic grafts. A preliminary report of experimental evaluation. *Am. J. Surg.*, v.82, pp.3-13, 1953.
- Pereira, C.A., Lee, J.M., Haberer, S.A. Effect of alternative crosslinking methods on the low strain rate viscoelastic properties of bovine pericardial bioprosthetic material. *J. Biomedical Mat. Res.*, v.24, pp.345-361, 1990.
- Skrabanja, A.T.P., De Meere, A.L.J., Ruiter, R.A., Van Den Oetelaar, P.J.M. Lyophilization of biotechnology products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, v.48, n.6, pp.311-317, 1994.
- Wallin RF, Arscott EF. A practical guide to ISO 10993-5: Citotoxicity. Medical Device link. April 1998. Extraído on line <http://www.devicelink.com/mddi/archive/98/04/013.html>, em fevereiro, 2003.
- Woodroof, E. A. The chemistry and biology of aldehyde treated tissue heart valve xenografts. In: Ionescu, M.I. (Ed.) *Tissue Heart Valves*. London: Butterworth & Co Publishers Ltd, 1979, Chap. 10, pp.347-362.

8 Bibliografias Consultadas

- Blais, C., Pibarot, P., Dumesnil, J.G., Garcia, D., Chen, D., Durand, L.G. Comparison of valve resistance with effective orifice area regarding flow dependence. *Am.J.Cardiol.*, v.88, pp.45-52, 2001.
- Ferreira, A.B.H. Novo Aurélio - O dicionário da língua portuguesa. Século XXI. Dicionário eletrônico: <http://www.uol.com.br/aurelio/index.html>, 2002.
- Gabbay, S., McQueen, D., Yellin, E.L., Frater, R.W.M. In vitro hydrodynamic comparison of mitral valve prostheses at high flow rates. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, v.76, n.6, pp.771-787, 1978.
- Gabbay, S. Bortolotti, U., Wasserman, F., Factor, S., Strom, J., Frater, W.M. Fatigue-induced failure of the Ionescu-Shiley pericardial xenograft in the mitral position. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.87, pp.836-844, 1984.
- Gabbay, S., Kadam, P., Factor, S., Cheung, T.K. Do heart valve bioprotheses degenerate for metabolic or mechanical reasons? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 95, n.2, p.208-215, 1988.
- Hayashida, S.A., Pomerantzeff, P.M., Purchio, R.A., Oshiro, M.S., Leirner, A.A., Jatene, A.D. Simulador de próteses valvares em fluxo pulsátil – desenvolvimento e desempenho. *Rev. Bras.Eng.*, v.6, n.2, pp.518-525, 1989.
- International Organization For Standardization. ISO/DIS 5840; Cardiovascular implants – cardiac valve prostheses. Switzerland, 1988. 12p.
- Reul, H., Giersiepen, M., Knott, E. Laboratory testing of prosthetic heart valves. *Engineering in Medicine*, v.16, n.2, pp. 67-76, 1987.

Anexos

Anexo I – Tabelas com os dados completos obtidos nos ensaios mecânicos

Tabela A-1 Ensaios de membranas de pericárdio bovino F

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F 1	0,68	2,22	0,99	0,69	30
F 2	0,49	6,91	1,00	1,87	30
F 3	0,64	3,68	1,00	0,82	25
F 4	0,53	5,01	0,98	1,18	25
F 5	0,64	6,11	1,00	2,18	35
F 6	1,16	1,62	0,99	0,63	40
F 7	0,63	10,73	1,00	3,92	45
F 8	0,93	5,16	1,00	1,58	35
F 9	0,98	2,95	1,00	1,57	55
F 10	0,94	4,61	1,00	1,60	40
F 11	0,44	3,42	0,99	1,13	30
F 12	0,58	3,02	1,00	0,56	25
F 13	0,69	2,93	1,00	0,99	45
F 14	0,27	8,70	1,00	3,01	40
F 15	0,61	5,32	1,00	2,45	55

Continua

Continuação da Tabela A-1

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F 16	1,09	6,05	1,00	2,27	45
F 17	1,03	5,68	0,99	2,26	50
F 18	0,88	4,61	1,00	1,53	45
F 19	1,14	4,51	1,00	2,09	60
F 20	0,43	7,34	1,00	1,12	25
F 21	0,51	4,25	1,00	1,21	35
F 22	0,45	7,31	1,00	1,69	35
F 23	0,57	4,31	1,00	1,43	35
F 24	0,71	5,70	1,00	1,87	40
F 25	0,58	5,98	1,00	2,34	47
F 26	1,25	3,10	0,99	1,38	65
F 27	1,00	4,91	1,00	1,54	40
F 28	0,62	3,36	0,99	1,57	60
F 29	0,90	1,77	1,00	0,64	60
F 30	1,10	2,56	1,00	1,97	55
F 31	0,46	2,49	0,98	0,96	45
F 32	0,53	4,55	0,99	1,51	40
F 33	0,64	2,28	0,99	1,73	45
F 34	0,92	6,61	1,00	2,64	40
F 35	0,95	5,14	1,00	1,74	40
F 36	0,64	8,03	0,99	2,42	40
F 37	0,76	3,71	0,99	1,54	40
F 38	0,62	4,99	0,99	1,37	40
F 39	1,09	4,56	1,00	1,76	45

Continua

Continuação da Tabela A-1

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F 40	0,58	4,05	1,00	1,13	45
F 41	0,89	4,57	1,00	1,59	40
F 42	0,64	8,08	1,00	2,34	37
F 43	0,80	6,67	0,99	2,27	40
F 44	0,89	7,14	0,99	3,37	44
F 45	0,77	4,66	1,00	1,59	35
F 46	0,63	5,06	1,00	1,65	35
F 47	1,03	6,22	1,00	2,24	40
F 48	0,80	6,86	1,00	2,08	35
F 49	0,75	6,06	1,00	2,10	40
F 50	0,89	7,17	1,00	2,33	40

Tabela A-2 Ensaios de membranas de pericárdio bovino F-FR-L

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F-FR-L 1	0,71	3,41	1,00	1,15	30
F-FR-L 2	0,83	5,38	1,00	2,37	57
F-FR-L 3	0,73	6,70	1,00	3,32	50
F-FR-L 4	0,55	8,80	1,00	3,24	30
F-FR-L 5	0,44	7,54	0,99	3,35	35
F-FR-L 6	0,71	3,19	1,00	0,84	25
F-FR-L 7	0,72	3,99	1,00	1,21	25
F-FR-L 8	0,60	7,10	1,00	2,32	30
F-FR-L 9	0,95	3,87	1,00	1,32	40

Continua

Continuação da Tabela A-2

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F-FR-L 10	0,52	8,93	1,00	3,35	35
F-FR-L 11	0,58	8,24	1,00	3,10	45
F-FR-L 12	0,89	5,91	1,00	2,68	45
F-FR-L 13	0,40	6,47	1,00	2,59	38
F-FR-L 14	0,55	5,05	1,00	1,33	20
F-FR-L 15	0,63	8,66	1,00	3,12	35
F-FR-L 16	0,62	10,01	1,00	5,22	40
F-FR-L 17	0,58	9,28	1,00	3,65	35
F-FR-L 18	0,96	2,79	1,00	1,53	36
F-FR-L 19	0,73	4,10	1,00	1,38	45
F-FR-L 20	0,51	9,21	1,00	4,51	32
F-FR-L 21	0,79	7,27	1,00	3,04	33
F-FR-L 22	0,73	5,97	1,00	2,31	60
F-FR-L 23	0,41	7,63	1,00	3,96	37
F-FR-L 24	0,42	7,79	1,00	2,92	36
F-FR-L 25	0,39	9,83	1,00	4,50	42
F-FR-L 26	0,83	7,53	1,00	2,97	50
F-FR-L 27	0,74	8,94	1,00	3,28	52
F-FR-L 28	0,47	8,58	1,00	3,68	55
F-FR-L 29	0,47	7,93	1,00	3,55	55
F-FR-L 30	1,14	5,77	1,00	2,66	60
F-FR-L 31	0,45	12,41	0,99	4,51	60
F-FR-L 32	0,81	5,75	1,00	2,71	44
F-FR-L 33	0,78	6,23	0,99	3,02	60

Continua

Continuação da Tabela A-2

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F-FR-L 34	0,44	13,07	1,00	6,23	55
F-FR-L 35	0,67	7,46	0,99	2,98	55
F-FR-L 36	0,98	5,20	0,99	2,20	35
F-FR-L 37	0,67	5,88	0,99	2,64	55
F-FR-L 38	0,64	7,42	0,99	2,29	48
F-FR-L 39	0,71	5,15	0,99	2,31	58
F-FR-L 40	0,51	8,67	1,00	3,89	44
F-FR-L 41	0,46	5,88	1,00	2,61	45
F-FR-L 42	0,44	7,01	1,00	2,25	35
F-FR-L 43	0,90	4,36	1,00	2,08	33
F-FR-L 44	0,59	5,64	1,00	2,45	55
F-FR-L 45	0,51	7,54	0,99	3,63	55
F-FR-L 46	0,39	6,13	1,00	2,37	45
F-FR-L 47	0,44	6,96	1,00	3,10	45
F-FR-L 48	1,11	3,97	1,00	2,39	41
F-FR-L 49	0,50	6,51	1,00	2,68	50
F-FR-L 50	0,34	6,50	1,00	2,06	38

Tabela A-3 Ensaios de membranas de pericárdio bovino F-N-L

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F-N-L 1	1,18	3,64	1,00	1,20	40
F-N-L 2	1,09	2,23	1,00	1,05	50
F-N-L 3	0,46	5,53	1,00	2,02	40

Continua

Continuação da Tabela A-3

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F-N-L 4	1,31	3,46	1,00	1,53	50
F-N-L 5	1,22	5,37	1,00	1,95	50
F-N-L 6	1,02	3,66	1,00	1,34	45
F-N-L 7	1,34	5,71	1,00	2,59	25
F-N-L 8	0,72	4,23	1,00	1,29	40
F-N-L 9	1,33	2,68	1,00	1,38	50
F-N-L 10	3,25	1,67	1,00	0,47	30
F-N-L 11	1,32	2,30	1,00	0,64	35
F-N-L 12	1,37	1,91	1,00	0,67	40
F-N-L 13	1,16	2,17	1,00	0,95	50
F-N-L 14	0,99	3,73	1,00	1,25	40
F-N-L 15	0,58	1,99	1,00	2,02	35
F-N-L 16	0,64	2,25	0,99	2,01	38
F-N-L 17	0,70	3,39	1,00	2,52	65
F-N-L 18	0,79	3,77	1,00	2,11	28
F-N-L 19	0,83	4,41	1,00	1,77	45
F-N-L 20	0,80	5,36	1,00	3,12	32
F-N-L 21	0,75	2,83	0,99	1,43	45
F-N-L 22	0,59	3,96	1,00	2,28	32
F-N-L 23	0,63	5,32	1,00	2,20	40
F-N-L 24	0,72	3,74	1,00	1,48	35
F-N-L 25	0,70	6,19	0,99	3,85	31
F-N-L 26	0,71	5,06	0,99	1,95	45
F-N-L 27	0,65	3,24	0,99	1,32	45

Continua

Continuação da Tabela A-3

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F-N-L 28	0,45	3,18	0,99	1,65	42
F-N-L 29	0,68	3,32	1,00	1,15	45
F-N-L 30	0,87	4,79	1,00	2,76	54
F-N-L 31	0,94	3,97	1,00	1,95	55
F-N-L 32	0,78	2,17	0,99	1,31	31
F-N-L 33	0,83	4,27	1,00	1,77	45
F-N-L 34	0,83	4,48	1,00	1,88	50
F-N-L 35	0,77	1,98	1,00	0,73	40
F-N-L 36	0,86	3,52	0,99	1,15	40
F-N-L 37	0,52	9,54	1,00	4,16	50
F-N-L 38	0,58	6,31	1,00	2,86	50
F-N-L 39	0,61	6,42	1,00	2,79	45
F-N-L 40	0,51	6,59	1,00	2,77	45
F-N-L 41	0,75	5,63	1,00	2,31	45
F-N-L 42	0,62	10,73	1,00	4,71	50
F-N-L 43	0,68	5,31	1,00	2,66	50
F-N-L 44	0,75	6,20	1,00	2,66	50
F-N-L 45	0,56	7,80	1,00	2,91	40
F-N-L 46	0,44	6,04	1,00	1,86	35
F-N-L 47	0,78	1,95	1,00	0,95	42
F-N-L 48	0,58	4,60	0,99	2,12	35
F-N-L 49	0,66	5,12	1,00	2,78	32
F-N-L 50	0,64	3,75	0,99	1,49	45

Tabela A-4 Ensaios de membranas de pericárdio bovino G

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
G 1	0,52	9,17	1,00	2,32	35
G 2	0,98	5,64	1,00	2,19	30
G 3	0,42	11,88	1,00	4,37	35
G 4	0,98	4,06	1,00	1,24	25
G 5	1,04	5,37	1,00	1,98	35
G 6	0,77	5,89	1,00	1,96	30
G 7	0,81	6,92	1,00	2,27	28
G 8	0,47	10,53	1,00	3,29	35
G 9	0,84	5,48	1,00	2,72	35
G 10	0,45	11,52	1,00	3,42	35
G 11	0,52	8,55	1,00	2,35	31
G 12	0,75	3,30	0,99	1,52	35
G 13	0,40	10,36	1,00	3,47	40
G 14	0,39	11,23	1,00	3,23	25
G 15	0,39	11,62	1,00	3,69	35
G 16	0,40	12,41	1,00	3,92	40
G 17	0,41	5,93	1,00	1,42	27
G 18	1,08	5,74	1,00	2,05	25
G 19	0,80	4,60	1,00	2,08	40
G 20	0,72	8,53	1,00	3,69	35
G 21	0,81	3,73	0,99	0,96	28
G 22	0,82	3,04	0,98	1,41	40
G 23	0,51	1,74	1,00	0,61	32
G 24	0,68	8,44	0,99	3,24	40

Continua

Continuação da Tabela A-4

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
G 25	0,78	7,34	0,99	3,23	40
G 26	0,61	16,35	0,99	8,33	35
G 27	1,25	9,00	1,00	4,19	40
G 28	0,64	5,43	0,99	2,22	40
G 29	0,93	7,97	1,00	4,08	35
G 30	1,15	9,83	1,00	4,77	33
G 31	0,63	8,65	1,00	2,75	26
G 32	0,81	6,33	0,98	2,15	45
G 33	0,66	5,66	0,99	2,52	31
G 34	0,85	9,26	1,00	2,86	35
G 35	0,71	4,50	1,00	1,56	35
G 36	0,81	3,55	0,99	0,96	45
G 37	0,45	7,87	1,00	3,21	35
G 38	0,56	9,75	1,00	3,40	32
G 39	0,57	15,09	1,00	5,67	45
G 40	0,60	5,99	1,00	2,01	35
G 41	1,00	8,74	1,00	3,16	43
G 42	1,13	5,97	1,00	2,94	55
G 43	0,81	8,46	1,00	2,90	28
G 44	0,92	5,59	1,00	2,50	50
G 45	0,99	4,72	1,00	1,52	35
G 46	0,91	5,63	1,00	2,56	52
G 47	0,91	9,55	1,00	3,49	41
G 48	0,82	6,06	1,00	1,99	36

Continua

Continuação da Tabela A-4

G 49	1,04	8,05	1,00	3,58	55
G 50	1,31	7,97	0,99	4,07	45

Tabela A-5 Ensaios de membranas de pericárdio bovino G-N-L

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
G-N-L 1	0,33	9,20	0,99	3,49	30
G-N-L 2	0,37	9,40	1,00	3,23	35
G-N-L 3	0,53	8,54	0,99	3,99	30
G-N-L 4	0,33	8,08	0,99	3,64	40
G-N-L 5	0,79	4,15	0,99	1,94	45
G-N-L 6	0,49	3,15	0,99	1,94	35
G-N-L 7	0,48	3,44	0,99	1,93	30
G-N-L 8	0,41	4,68	0,98	2,31	35
G-N-L 9	0,39	9,34	0,99	6,68	55
G-N-L 10	0,40	10,02	0,99	4,32	50
G-N-L 11	0,47	3,29	0,99	2,22	45
G-N-L 12	0,44	6,91	0,98	5,55	33
G-N-L 13	0,41	8,08	0,98	6,42	36
G-N-L 14	0,42	10,77	0,99	4,90	35
G-N-L 15	0,69	5,18	0,97	4,12	35
G-N-L 16	0,49	5,29	0,98	3,63	45
G-N-L 17	0,46	10,48	0,99	4,25	45
G-N-L 18	0,57	4,68	0,99	2,43	45
G-N-L 19	0,32	5,09	0,98	3,96	50

Continua

Continuação da Tabela A-5

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
G-N-L 20	0,30	5,92	0,99	1,28	32
G-N-L 21	0,29	11,61	0,99	3,51	35
G-N-L 22	0,40	4,33	0,99	2,05	40
G-N-L 23	1,12	3,43	0,99	1,54	45
G-N-L 24	0,59	1,56	0,97	1,94	36
G-N-L 25	1,73	1,63	0,97	1,57	32
G-N-L 26	0,62	3,33	1,00	2,22	44
G-N-L 27	0,59	3,81	1,00	1,79	45
G-N-L 28	0,55	3,60	1,00	1,65	50
G-N-L 29	0,38	10,41	1,00	3,48	35
G-N-L 30	0,78	3,14	0,97	2,92	36
G-N-L 31	0,69	8,45	0,99	3,86	50
G-N-L 32	0,62	4,68	1,00	1,95	48
G-N-L 33	0,55	11,91	0,99	5,11	40
G-N-L 34	0,69	2,63	1,00	1,17	40
G-N-L 35	0,48	4,85	0,98	3,74	55
G-N-L 36	0,47	8,34	0,99	3,53	38
G-N-L 37	0,59	11,94	0,99	5,55	45
G-N-L 38	0,94	11,39	1,00	4,36	40
G-N-L 39	0,69	4,07	0,98	3,20	41
G-N-L 40	0,58	10,81	0,99	6,19	57
G-N-L 41	0,77	6,82	1,00	2,81	40
G-N-L 42	0,43	7,75	1,00	4,13	45
G-N-L 43	0,45	2,24	0,97	2,17	39

Continua

Continuação da Tabela A-5

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
G-N-L 44	1,17	2,33	0,97	2,54	33
G-N-L 45	0,48	2,47	0,99	1,70	45
G-N-L 46	0,54	13,95	1,00	6,16	35
G-N-L 47	0,67	4,40	1,00	1,73	40
G-N-L 48	0,49	3,27	0,97	2,76	38
G-N-L 49	0,42	5,52	0,99	3,43	55
G-N-L 50	1,66	4,29	0,96	1,51	35

Tabela A-6 Ensaios de membranas de pericárdio bovino F-N-L-G

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F-N-L-G 1	1,05	5,48	0,97	2,83	45
F-N-L-G 2	0,74	2,67	0,99	1,01	33
F-N-L-G 3	0,83	5,43	0,98	1,93	40
F-N-L-G 4	0,70	7,15	0,98	4,16	45
F-N-L-G 5	0,69	3,30	0,99	1,31	40
F-N-L-G 6	0,69	3,47	0,98	1,58	29
F-N-L-G 7	0,62	9,02	1,00	4,72	45
F-N-L-G 8	1,02	4,14	0,98	1,85	45
F-N-L-G 9	0,66	6,39	0,99	2,98	39
F-N-L-G 10	0,64	6,38	0,98	3,91	32
F-N-L-G 11	0,84	1,62	0,99	0,85	52
F-N-L-G 12	0,73	2,16	0,99	1,19	51
F-N-L-G 13	0,53	7,19	0,95	5,10	45
F-N-L-G 14	0,84	8,94	0,98	5,61	36

Continua

Continuação da Tabela A-6

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ϵ_{rup} (%)
F-N-L-G 15	0,72	2,11	0,99	1,10	32
F-N-L-G 16	0,77	10,10	0,99	4,54	34
F-N-L-G 17	0,48	9,08	1,00	4,55	45
F-N-L-G 18	0,87	7,20	0,99	3,13	45
F-N-L-G 19	0,69	5,41	1,00	2,32	45
F-N-L-G 20	0,69	2,04	0,99	0,86	30
F-N-L-G 21	0,67	2,57	0,99	1,75	33
F-N-L-G 22	0,98	8,11	1,00	2,60	25
F-N-L-G 23	1,02	4,57	0,97	2,19	45
F-N-L-G 24	0,84	6,78	0,99	2,39	33
F-N-L-G 25	0,89	3,86	0,98	1,64	50
F-N-L-G 26	0,82	5,90	0,99	2,43	45
F-N-L-G 27	0,81	10,35	1,00	3,05	28
F-N-L-G 28	0,85	10,57	1,00	3,62	35
F-N-L-G 29	0,59	8,98	1,00	4,43	55
F-N-L-G 30	0,78	5,40	0,97	3,34	55
F-N-L-G 31	0,46	7,73	1,00	3,33	47
F-N-L-G 32	0,70	5,46	0,98	2,37	50
F-N-L-G 33	0,96	4,71	0,97	2,81	41
F-N-L-G 34	0,41	7,06	1,00	3,57	42
F-N-L-G 35	0,78	6,89	0,98	3,26	50
F-N-L-G 36	0,54	10,65	1,00	4,03	50
F-N-L-G 37	0,89	8,48	0,99	3,86	31

Continua

Continuação da Tabela A-6

amostra	A (mm ²)	E (kgf/mm ²)	R ²	σ_{rup} (kgf/mm ²)	ε_{rup} (%)
F-N-L-G 38	0,90	6,95	0,97	3,05	50
F-N-L-G 39	0,71	5,12	0,96	2,91	45
F-N-L-G 40	0,55	7,19	0,99	4,30	48
F-N-L-G 41	0,49	8,42	0,98	4,05	50
F-N-L-G 42	0,66	7,15	0,99	3,26	44
F-N-L-G 43	0,77	7,36	0,99	3,35	45
F-N-L-G 44	0,75	9,17	0,99	3,25	40
F-N-L-G 45	0,76	7,68	0,99	3,01	36
F-N-L-G 46	1,01	8,14	0,99	3,73	38
F-N-L-G 47	0,58	7,79	0,99	4,19	45
F-N-L-G 48	0,68	6,30	0,99	2,71	37
F-N-L-G 49	0,74	7,90	1,00	3,70	36
F-N-L-G 50	0,94	5,54	1,00	3,41	41

Anexo II – Tabela com os valores obtidos nos ensaios de temperatura de encolhimento

Tabela A-7 Ensaios de temperatura de encolhimento dos diversos grupos de PB

Ensaio de temperatura de encolhimento dos diversos grupos de PB						
amostra	F	F-FR-L	F-N-L	G	G-N-L	F-N-L-G
	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)
1	73,2	73,4	70,5	82,6	84,9	89,0
2	73,4	73,8	71,4	87,0	89,0	88,2
3	72,0	74,1	70,0	85,9	88,2	88,3
4	73,6	74,6	71,8	87,7	87,4	87,4
5	71,3	73,8	74,2	83,9	83,6	85,7
6	72,3	73,0	70,4	85,8	85,5	89,2
7	71,3	73,0	70,8	85,1	89,0	83,6
8	72,3	73,0	74,8	89,0	87,0	87,0
9	74,2	73,1	76,6	88,2	87,2	85,9
10	73,6	74,2	72,7	88,3	86,2	87,7
11	72,8	73,1	71,5	87,4	85,1	83,9
12	71,7	73,5	72,2	85,7	87,3	85,6
13	75,7	75,3	70,9	89,0	89,5	85,1
14	72,7	74,2	73,5	85,5	88,3	85,5
15	72,4	72,4	74,3	87,2	87,7	87,2
16	72,8	73,3	73,2	89,6	89,4	89,6

Continua

Continuação da Tabela 10

amostra	F	F-FR-L	F-N-L	G	G-N-L	F-N-L-G
	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)
17	73,7	75,2	75,0	86,6	85,8	87,6
18	76,2	76,8	72,1	87,3	89,6	87,3
19	72,8	74,2	74,0	89,5	82,4	89,1
20	71,3	72,0	72,9	89,4	85,9	88,2
21	74,5	72,1	73,6	86,6	85,7	85,8
22	74,9	73,4	73,6	89,4	86,8	84,5
23	74,9	73,9	76,2	86,8	89,4	89,5
24	72,5	73,5	74,0	82,4	87,8	88,4
25	72,9	74,2	73,9	81,9	84,5	86,6
26	74,1	75,2	75,1	86,4	80,2	89,4
27	73,0	74,0	73,6	89,2	81,3	86,8
28	71,7	73,4	74,5	85,8	88,7	82,4
29	72,2	75,2	73,9	84,5	89,5	81,9
30	74,2	74,3	75,7	80,2	81,9	88,7
31	75,3	74,7	74,9	81,3	89,1	88,7
32	72,8	72,6	75,0	89,5	89,2	83,0
33	74,8	75,2	74,5	88,7	81,4	88,6
34	73,9	73,6	74,8	84,1	86,2	88,1
35	75,1	73,9	73,6	82,1	90,1	88,2
36	74,2	74,0	74,2	81,4	80,2	80,2
37	72,2	75,1	74,7	88,7	86,0	89,0
38	72,9	75,4	74,2	88,7	88,7	86,0
39	73,8	76,4	75,5	83,0	84,2	83,4
40	76,7	74,1	72,2	88,6	87,1	86,1

Continua

Continuação da Tabela 10

amostra	F	F-FR-L	F-N-L	G	G-N-L	F-N-L-G
	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)	ST (°C)
41	75,3	75,1	74,8	90,1	86,1	84,2
42	76,0	75,7	75,2	88,2	88,7	87,5
43	72,1	75,3	75,4	80,2	88,7	86,7
44	72,3	74,2	73,5	85,8	85,3	80,2
45	75,2	74,9	73,1	81,2	80,2	81,3
46	72,2	72,6	75,9	83,4	88,2	89,5
47	73,0	70,7	76,3	86,1	86,1	88,7
48	74,2	71,8	73,0	84,2	87,7	84,1
49	72,9	74,8	73,6	87,1	88,6	82,1
50	72,8	74,0	75,8	79,8	89,0	81,4

Apêndices

Apêndice A - Programa Matlab para processamento de dados

```
function marina(fname,opt)

% marina          Calcula a elasticidade de ensaios de forca x deformacao

%

%                marina(opt)

%                onde:

%                opt == 0  calcula a elasticidade

%                opt == 1  mostra o calculo na tela

%                opt == 2  inclui dado no arquivo marina.txt (-ASCII)


if ~exist('opt')

    opt=0;

end


if opt==0

    eval(['load ' fname '.asc -ascii']);

    [b,a]=butter(3,0.08);
```

```

eval(['intemp=' fname ';'']);

if eval(['(exist("'"fname '.mat',"file"))'])

    eval(['load ' fname ])

end

if ~exist('A')

    eval(['load ' fname '.are -ascii']);

    eval(['A=' fname ';'']);

end

if ~exist('lo')

    lo=9.53; %mm

end

desloc=intemp(:,2);

kgf=intemp(:,3);

kgff=filtfilt(b,a,kgf);

deform=desloc/lo;

tensao=kgff/A;

if ~exist('xpos')

```

figure

```
plot([1:length(tensao)],tensao);
```

```
[xpos ypos]=ginput(3);
```

```
xpos=ceil(xpos);
```

```
eval(['save ' fname ' lo A xpos'])
```

```
plot(deform,tensao); xlabel('deformação [%]'); ylabel('Tensão [kgf/mm^2]');
```

```
v=axis;
```

```
hold on;
```

```
plot(ones(2,1)*deform(xpos(1)),[v(3) v(4)],...
```

```
ones(2,1)*deform(xpos(2)),[v(3) v(4)],...
```

```
ones(2,1)*deform(xpos(3)),[v(3) v(4)]);
```

```
eval(['title ' fname]);
```

```
[p,s]=polyfit(deform(xpos(1):xpos(2)),tensao(xpos(1):xpos(2)),1);
```

```
fname
```

```
E=p(1)
```

```
trup=max(tensao(xpos(2):xpos(3)))
```

```
eval(['save ' fname ' lo A xpos E trup'])
```

```
end
```

```
% if ~exist('R2')
```

```
if 1
```

```
R2=rsqr(deform(xpos(1):xpos(2))',tensao(xpos(1):xpos(2)))
```

```

if isnan(R2)

    fname

end

eval(['save ' fname ' lo A xpos E trup R2'])

end

```

```

elseif(opt==1)

    eval(['load ' fname '.asc -ascii']);

    [b,a]=butter(3,0.08);

    eval(['intemp=' fname ';'']);

```

```

if eval(['(exist("'"fname '.mat',"file"))'])

    eval(['load ' fname ])

end

```

```

if ~exist('A')

    eval(['load ' fname '.are -ascii']);

    eval(['A=' fname ';'']);

end

```

```

if ~exist('lo')

```

```

    lo=9.53; %mm

end

desloc=intemp(:,2);

kgf=intemp(:,3);

kgff=filtfilt(b,a,kgf);

deform=desloc/lo;

tensao=kgff/A;

figure

plot(deform,tensao); xlabel('deformação [%]'); ylabel('Tensão [kgf/mm^2]');

v=axis;

hold on;

    plot(ones(2,1)*deform(xpos(1)),[v(3) v(4)],...

         ones(2,1)*deform(xpos(2)),[v(3) v(4)],...

         ones(2,1)*deform(xpos(3)),[v(3) v(4)]);

    eval(['title ' fname]);

elseif(opt==2)

    if eval(['(exist(''fname '.mat','file'))'])

        eval(['load ' fname ])

        flag1=0;

```

```

if exist('marina.txt')

    flag1=1;

end

ftxt=fopen(['marina.txt'], 'a+');

if flag1==0

    fwrite(ftxt,['archivo A E R2 N trup inideform fimdeform fimtrup' setstr(10)]);

end

fwrite(ftxt,['fname ' ']);

if exist('A')

    fwrite(ftxt,[num2str(A) ' ']);

else

    fwrite(ftxt,'0 ');

end;

if exist('E')

    fwrite(ftxt,[num2str(E) ' ']);

else

    fwrite(ftxt,'0 ');

end;

if exist('R2')

    fwrite(ftxt,[num2str(R2) ' ']);

else

```

```

        fwrite(ftxt,'0 ');

    end;

    if length(xpos)==3

        fwrite(ftxt,[num2str(xpos(2))-xpos(1)) ' ']);

    else

        fwrite(ftxt,['0 ' setstr(10)]);

    end;

    if exist('trup')

        fwrite(ftxt,[num2str(trup) ' ']);

    else

        fwrite(ftxt,'0 ');

    end;

    if length(xpos)==3

        fwrite(ftxt,[num2str(xpos(1)) ' ' num2str(xpos(2)) ' ' num2str(xpos(2)) ' ' setstr(10)]);

    else

        fwrite(ftxt,['0 0 0 ' setstr(10)]);

    end;

    fclose(ftxt);

end;

end;

```

.....

```

function r2=rsqr (x,y)

%rsqr Returns the correlation coefficient r^2

%    R2=RSQR(X,Y)

%where    X is the input vector 1

%    Y is the input vector 2

%

%For more information see Biostatistics: a foundation for analysis

%    in the health sciences, 2nd Ed, Daniel, W.W., John Wiley & Sons,

cc=polyfit(x,y,1);

r2=cc(1)^2*(sum(x.^2)-(sum(x)^2/length(x)))/(sum(y.^2)-sum(y)^2/length(y));

```

.....

```

function maribat(opt)

% maribat      Arquivo autoexecutavel para calcular elasticidade de

%              uma lista de dados. Ver funcao 'marina.m' e 'maribat.m'

%

%              maribat(opt)

%              onde:

%              opt == 0  calcula a elasticidade

%              opt == 1  mostra o calculo na tela

%              opt == 2  cria arquivo marina.txt com

```

```
%      nome do arquivo | Area | Mod Young | R2 | N | trup | inideform | fimdeform | fimtrup |

%      exemplo: maribat(2)

%      resultado: ver arquivo marina.txt
```

```
if ~exist('opt')

    opt=0;

end

%marina('F4',opt);

%marina('F5',opt);

%marina('F6',opt);

..... (continuar para todos os valores do ensaio)

if opt==0

    maribat(1);

    maribat(2);

end
```

Apêndice B – Análise estatística de tensão de ruptura

◆ Grupos: F, F-FR-L e F-N-L

One Way Analysis of Variance

Tuesday, December 17, 2002, 12:27:12

Normality Test: Passed (P = 0.195)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.083)

Group	N	Missing
-------	---	---------

F	50	0
---	----	---

F-FR-L	50	0
--------	----	---

F-N-L	50	0
-------	----	---

Group	Mean	Std Dev	SEM
F	1.749E+000	6.847E-001	9.683E-002
F-FR-L	2.857E+000	1.048E+000	1.482E-001
F-N-L	1.955E+000	8.947E-001	1.265E-001

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	2	3.472E+001	1.736E+001	2.199E+001	<0.001
Residual	147	1.160E+002	7.893E-001		
Total	149	1.508E+002			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
F-FR-L vs. F	1.108E+000	3	8.819E+000	Yes
F-FR-L vs. F-N-L	9.016E-001	3	7.176E+000	Yes
F-N-L vs. F	2.064E-001	3	1.643E+000	No

◆ **Grupos: G, G-N-L e F-N-L-G**

One Way Analysis of Variance

Wednesday, December 18, 2002, 14:01:07

Normality Test: Passed ($P = 0.445$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.169$)

Group	N	Missing
G	50	0
G-N-L	50	0
F-N-L-G	50	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	2.840E+000	1.317E+000	1.862E-001
G-N-L	3.250E+000	1.465E+000	2.072E-001
F-N-L-G	3.022E+000	1.151E+000	1.628E-001

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.080

The power of the performed test (0.080) is below the desired power of 0.800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	2	4.212E+000	2.106E+000	1.214E+000	0.300
Residual	147	2.551E+002	1.735E+000		
Total	149	2.593E+002			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.300$).

Apêndice C – Análise estatística do módulo de Young

◆ Grupos: F, F-FR-L e F-N-L

One Way Analysis of Variance

Wednesday, December 18, 2002, 13:58:49

Normality Test: Passed (P = 0.121)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.642)

Group	N	Missing
F	50	0
F-FR-L	50	0
F-N-L	50	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
F	5.055E+000	1.926E+000	2.723E-001
F-FR-L	6.872E+000	2.164E+000	3.061E-001
F-N-L	4.349E+000	1.912E+000	2.704E-001

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	2	1.694E+002	8.471E+001	2.109E+001	<0.001
Residual	147	5.903E+002	4.016E+000		
Total	149	7.597E+002			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
F-FR-L vs. F-N-L	2.523E+000	3	8.902E+000	Yes
F-FR-L vs. F	1.818E+000	3	6.414E+000	Yes
F vs. F-N-L	7.052E-001	3	2.488E+000	No

♦ **Grupos: G, G-N-L e F-N-L-G**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Sunday, February 23, 2003, 20:48:10

Group	N	Missing
G	50	0
G-N-L	50	0
F-N-L-G	50	0

Group	Median	25%	75%
G	7.605	5.590	9.260
G-N-L	5.135	3.440	9.200
F-N-L-G	6.920	5.120	8.110

H = 5.601 with 2 degrees of freedom. (P = 0.061)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.061).

Apêndice D – Análise estatística da deformação

◆ Grupos: F, F-FR-L e F-N-L

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Monday, February 24, 2003, 08:24:51

Group	N	Missing
F	50	0
F-FR-L	50	0
F-N-L	50	0

Group	Median	25%	75%
F	4.000E+001	3.500E+001	4.500E+001
F-FR-L	4.400E+001	3.500E+001	5.500E+001
F-N-L	4.350E+001	3.500E+001	5.000E+001

H = 1.515E+000 with 2 degrees of freedom. (P = 0.469)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.469)

♦ **Grupos: G, G-N-L e F-N-L-G**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Monday, February 24, 2003, 08:26:27

Group	N	Missing
G	50	0
G-N-L	50	0
F-N-L-G	50	0

Group	Median	25%	75%
G	3.500E+001	3.200E+001	4.000E+001
G-N-L	4.000E+001	3.500E+001	4.500E+001
F-N-L-G	4.450E+001	3.600E+001	4.500E+001

H = 1.419E+001 with 2 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q	P<0.05
F-N-L-G vs G	1.526E+003	3	4.966E+000	Yes
F-N-L-G vs G-N-L	2.775E+002	2	1.353E+000	No
G-N-L vs G	1.248E+003	2	6.084E+000	Yes

Apêndice E – Análise estatística da temperatura de encolhimento

♦ Grupos: F, F-FR-L e F-N-L

One Way Analysis of Variance

Monday, February 17, 2003, 13:58:18

Normality Test: Passed (P = 0.738)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.226)

Group	N	Missing
F	50	0
F-FR-L	50	0
F-N-L	50	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
F	7.344E+001	1.364E+000	1.929E-001
F-FR-L	7.399E+001	1.190E+000	1.683E-001
F-N-L	7.374E+001	1.640E+000	2.319E-001

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.193

The power of the performed test (0.193) is below the desired power of 0.800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	2	7.538E+000	3.769E+000	1.895E+000	0.154
Residual	147	2.923E+002	1.989E+000		
Total	149	2.999E+002			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.154$).

◆ **Grupos: G, G-N-L e F-N-L-G**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Friday, February 28, 2003, 11:34:59

Group	N	Missing
G	50	0
G-N-L	50	0
F-N-L-G	50	0

Group	Median	25%	75%
G	8.650E+001	8.390E+001	8.860E+001
G-N-L	8.715E+001	8.530E+001	8.870E+001
F-N-L-G	8.690E+001	8.420E+001	8.840E+001

$H = 1.108E+000$ with 2 degrees of freedom. ($P = 0.575$)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.575$).

Apêndice F – Análise estatística do ensaio de citotoxicidade

◆ Concentração do extrato : 100%

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Monday, March 10, 2003, 09:27:05

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0
cont. pos.	3	0
cont. neg.	3	0

Group	Median	25%	75%
G	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
G-N-L	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
cont. pos.	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
cont. neg.	1.520E+002	1.355E+002	1.580E+002

H = 1.073E+001 with 3 degrees of freedom. (P = 0.013)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.013)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q	P<0.05
cont. neg. vs cont. pos.	1.800E+001	4	2.882E+000	No
cont. neg. vs G-N-L	1.800E+001	3	3.795E+000	No Test Needed
cont. neg. vs G	1.800E+001	2	5.555E+000	No Test Needed
G vs cont. pos.	0.000E+000	3	0.000E+000	No Test Needed
G vs G-N-L	0.000E+000	2	0.000E+000	No Test Needed
G-N-L vs cont. pos.	0.000E+000	2	0.000E+000	No Test Needed

♦ **Concentração do extrato : 50%**

One Way Analysis of Variance

Monday, March 10, 2003, 09:33:36

Normality Test: Passed (P = 0.435)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.470)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0
cont. pos.	3	0
cont. neg.	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
G-N-L	5.700E+001	6.557E+000	3.786E+000
cont. pos.	2.367E+001	3.215E+000	1.856E+000
cont. neg.	1.487E+002	6.658E+000	3.844E+000

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	3	3.829E+004	1.276E+004	5.227E+002	<0.001
Residual	8	1.953E+002	2.442E+001		
Total	11	3.848E+004			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
cont. neg. vs. G	1.487E+002	4	5.211E+001	Yes
cont. neg. vs. cont. pos.	1.250E+002	4	4.382E+001	Yes
cont. neg. vs. G-N-L	9.167E+001	4	3.213E+001	Yes
G-N-L vs. G	5.700E+001	4	1.998E+001	Yes
G-N-L vs. cont. pos.	3.333E+001	4	1.168E+001	Yes
cont. pos. vs. G	2.367E+001	4	8.296E+000	Yes

♦ Concentração do extrato : 25%

One Way Analysis of Variance

Monday, March 10, 2003, 09:35:54

Normality Test: Passed ($P = 0.323$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.358$)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0
cont. pos.	3	0
cont. neg.	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
G-N-L	1.293E+002	6.028E+000	3.480E+000
cont. pos.	6.633E+001	3.215E+000	1.856E+000
cont. neg.	1.453E+002	3.512E+000	2.028E+000

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	3	3.954E+004	1.318E+004	8.935E+002	<0.001
Residual	8	1.180E+002	1.475E+001		
Total	11	3.965E+004			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
cont. neg. vs. G	1.453E+002	4	6.554E+001	Yes
cont. neg. vs. cont. pos.	7.900E+001	4	3.563E+001	Yes
cont. neg. vs. G-N-L	1.600E+001	4	7.216E+000	Yes
G-N-L vs. G	1.293E+002	4	5.833E+001	Yes
G-N-L vs. cont. pos.	6.300E+001	4	2.841E+001	Yes
cont. pos. vs. G	6.633E+001	4	2.992E+001	Yes

◆ **Concentração do extrato : 12,5%**

One Way Analysis of Variance

Monday, March 10, 2003, 09:36:50

Normality Test: Passed (P = 0.098)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.809)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0
cont. pos.	3	0
cont. neg.	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	0.000E+000	0.000E+000	0.000E+000
G-N-L	1.460E+002	4.583E+000	2.646E+000
cont. pos.	1.043E+002	4.509E+000	2.603E+000
cont. neg.	1.487E+002	7.572E+000	4.372E+000

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	3	4.351E+004	1.450E+004	5.880E+002	<0.001
Residual	8	1.973E+002	2.467E+001		
Total	11	4.371E+004			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
cont. neg. vs. G	1.487E+002	4	5.185E+001	Yes
cont. neg. vs. cont. pos.	4.433E+001	4	1.546E+001	Yes
cont. neg. vs. G-N-L	2.667E+000	4	9.300E-001	No
G-N-L vs. G	1.460E+002	4	5.092E+001	Yes
G-N-L vs. cont. pos.	4.167E+001	4	1.453E+001	Yes
cont. pos. vs. G	1.043E+002	4	3.639E+001	Yes

◆ Concentração do extrato : 6,25%

One Way Analysis of Variance

Monday, March 10, 2003, 09:38:50

Normality Test: Passed (P = 0.435)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.463)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0
cont. pos.	3	0
cont. neg.	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	3.767E+001	2.517E+000	1.453E+000
G-N-L	1.543E+002	9.074E+000	5.239E+000
cont. pos.	1.287E+002	2.517E+000	1.453E+000
cont. neg.	1.560E+002	5.000E+000	2.887E+000

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	3	2.798E+004	9.326E+003	3.109E+002	<0.001
Residual	8	2.400E+002	3.000E+001		
Total	11	2.822E+004			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
cont. neg. vs. G	1.183E+002	4	3.742E+001	Yes
cont. neg.vs. cont. pos.	2.733E+001	4	8.644E+000	Yes
cont. neg. vs. G-N-L	1.667E+000	4	5.270E-001	No
G-N-L vs. G	1.167E+002	4	3.689E+001	Yes
G-N-L vs. cont. pos.	2.567E+001	4	8.117E+000	Yes
cont. pos.vs. G	9.100E+001	4	2.878E+001	Yes

Apêndice G – Análise estatística do ensaio de HPLC

◆ Glutaraldeído residual: grupos analisados G e G-N-L

t-test

Wednesday, December 18, 2002, 08:40:28

Normality Test: Passed (P = 0.054)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.083)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	9.897E+000	3.703E+000	2.138E+000
G-N-L	2.359E+000	1.099E-001	6.343E-002

Difference 7.538E+000

t = 3.524E+000 with 4 degrees of freedom. (P = 0.024)

95 percent confidence interval for difference of means: 1.600E+000 to 1.348E+001

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.024).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.721

The power of the performed test (0.721) is below the desired power of 0.800.

You should interpret the negative findings cautiously.

◆ **Formaldeído residual: grupos analizados G e G-N-L**

t-test

Wednesday, December 18, 2002, 08:18:39

Normality Test: Passed ($P = 0.470$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.263$)

Group	N	Missing
G	3	0
G-N-L	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
G	2.603E-001	2.120E-002	1.224E-002
G-N-L	2.540E-001	1.212E-002	7.000E-003

Difference 6.333E-003

$t = 4.492E-001$ with 4 degrees of freedom. ($P = 0.677$)

95 percent confidence interval for difference of means: -3.281E-002 to 4.548E-002

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ($P = 0.677$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Apêndice H – Crescimento de colônias CHO

Na Placa de Petri controle, em que só existiam células CHO e meio de cultura RPMI 1640-FCS, houve o crescimento de 156 colônias de CHO (100%).

Os dados abaixo mostram o crescimento de colônias para o controle positivo, controle negativo, grupo G e grupo G-N-L, em cada uma das concentrações dos extratos utilizados.

Concentração de extrato (%)	Controle positivo -fenol 0,05 % - (número de colônias)	Controle negativo -HDPE – (número de colônias)	G (número de colônias)	G-N-L (número de colônias)
100	0	160	0	0
	0	130	0	0
	0	152	0	0
50	20	143	0	63
	25	156	0	50
	26	147	0	58
25	65	145	0	130
	70	142	0	135
	64	149	0	123
12,5	109	152	0	147
	100	154	0	150
	104	140	0	141
6,25	126	151	38	158
	129	161	40	144
	131	156	35	161