

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
(PPGEB)

ANGELA MARIA PERUZZO

**AVALIAÇÃO MECÂNICA E HISTOLÓGICA DE PERICÁRDIO
BOVINO DESCELULARIZADO SUBMETIDO À PRESSÃO**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA
2013

ANGELA MARIA PERUZZO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. João Antônio de Palma Setti
Co-orientador: Prof. Msc. João Gabriel Roderjan

CURITIBA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P471a Peruzzo, Angela Maria
2014 Avaliação mecânica e histológica de pericárdio bovino
descelularizado à pressão / Angela Maria Peruzzo.--
2013.
78 f.: il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica, Curitiba, 2013
Bibliografia: f. 70-76

1. Pericárdio - Propriedades mecânicas. 2. Bovino.
3. Ensaio de tração. 4. Tecidos (Anatomia e fisiologia)
- Avaliação. 5. Histologia. 6. Válvulas cardíacas artificiais.
7. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Setti, João
Antônio Palma, orient. II. Mendonça, João Gabriel Roderjan,
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD 22 -- 610.28

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre iluminou meus caminhos e sempre esteve presente em minha vida.

Ao meu filho Paulo Matheus, que partilhou das dificuldades e problemas, estando sempre disposto a ouvir e apoiar com seu carinho.

Aos meus pais Edi e Luiz pelo apoio familiar.

Ao meu orientador João Setti, pelo incentivo à pesquisa, pela orientação, dedicação, paciência e confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador João Gabriel Roderjan, pela dedicação, suporte científico, paciência e companheirismo.

À UTFPR, por ter aberto as portas para uma profissional da área da saúde.

À empresa Cardioprótese, pela liberação dos horários para que eu pudesse participar das aulas, fornecer a matéria prima e estrutura física para desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores, pelo conhecimento compartilhado, paciência e incentivo.

Aos meus colegas Cesar A. Oleinik Luzia, Marlene Tomem, Júlio César Pereira Martinez e Marcos Maurício Ferreira pela ajuda e cooperação necessária para a concretização de minha pesquisa.

Aos professores e demais colaboradores do LaCEM PUCPR (Laboratório de Caracterização e de Ensaio Mecânicos) por terem cedido o espaço e equipamento para a realização do teste de tração.

RESUMO

PERUZZO, Angela Maria. **Avaliação Mecânica e Histológica de Pericárdio Bovino Descelularizado, submetido à pressão.** 2013. 77p. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Curitiba, 2013.

O pericárdio bovino é um tecido biológico utilizado na fabricação de vários produtos para a saúde e também em válvulas cardíacas desde o início da década de setenta, porém, ainda requer estudos mais aprofundados no que diz respeito às mudanças que os tratamentos químicos utilizados para confecção das válvulas ocasionam. Atualmente a engenharia de tecidos estuda a descclularização do pericárdio bovino como um processo para retirar os componentes celulares, mantendo intacta a matriz extracelular (MEC), preservando a integridade do colágeno e também pode atuar como anticalcificante. Porém, é necessário saber qual o impacto que o tratamento químico trará nas propriedades mecânicas do tecido, como tensão máxima, deformação específica e alongamento. Nos trabalhos observados, os testes mecânicos realizados nos pericárdios bovinos descclularizados foram feitos no tecido sem serem submetidos a uma pré-tensão, a qual é necessária na maioria das vezes, para formação das cúspides durante a confecção das válvulas cardíacas ou outro dispositivo médico. Por essa razão, foi realizado um estudo do efeito na propriedade mecânica que uma determinada pressão exerce sobre o pericárdio bovino, que passou pelo processo de descclularização. Em paralelo também foi feita uma avaliação histológica do tecido para verificar a ausência de células e a preservação das fibras de colágeno no tecido descclularizado. Foram preparados quatro grupos diferentes para a realização dos testes. O grupo I chamado de grupo controle. O grupo II, onde os pericárdios foram descclularizados com o método PUC I. O grupo III foi tratado como o grupo I, porém sob pressão de 240 mmHg. Já o grupo IV, os pericárdios foram descclularizados e em seguida submetidos à mesma pressão utilizando solução de glutaraldeído 0,2% e 0,5%. Após os tratamentos dos grupos, todas as amostras foram tingidas em solução de azul de metileno 0,03% para melhor visualização das fibras do tecido. Em seguida os tecidos foram cortados a laser para obtenção dos corpos de prova e submetidos ao ensaio de tração. Obteve-se a partir do ensaio, a tensão máxima das amostras, a deformação específica e o alongamento na ruptura. Foi observado que nos grupos onde foram submetidos à pressão tiveram uma tensão máxima menor do que os grupos sem pressão e um maior alongamento. Verificou-se que o efeito da pressão diminuiu a espessura dos tecidos. O processo de descclularização se mostrou eficaz uma vez que foi demonstrada a ausência de células e a preservação das fibras de colágeno após técnica utilizada.

Palavras chaves: Pericárdio bovino, pericárdio bovino sob pressão, descclularização, ensaio de tração.

ABSTRACT

PERUZZO, Angela Maria. **Mechanical and histological evaluation of decellularized bovine pericardium, subjected to pressure.** 2013. 77p. Dissertation. (Post-Graduate Program in Biomedical Engineering of the Federal Technological University of Paraná). Curitiba, 2013.

The pericardium is a biological tissue used in the manufacture of various products for medical advices and manufacture of heart valves since the early seventies, however, it still requires further study with regard to the changes that the chemical treatments used to manufacture the valves cause. Several studies show that the tissue often undergoes a process of calcification generated by mechanical stress of opening and closing of the leaflets, damaging the hydrodynamics making valvular replacement necessary. Currently tissue engineering study decellularization process of the bovine pericardium to remove cellular components while preserving the extracellular the matrix (ECM), preserving the integrity of collagen it and can also act as anti-calcification. However, one must know the impact that chemical treatment will bring on the mechanical properties of the tissue, such as tensile strength, strain and elongation percentage. In examined studies, the mechanical tests performed on bovine pericardium decellularized tissue was made without being subjected to a pre-tension which is necessary in most cases for formation of the leaflets during the manufacturing of heart valves. For this reason, a study of the effect on mechanical property that a certain pressure exerts on the pericardium, which passed the decellularization process was made. In parallel it was also made a histological evaluation of the tissue to verify the absence of cells and preservation of collagen fibers in decellularized tissue. Four different groups were prepared for test. The group I was called a control group. In group II, the pericardia were decellularized with the PUC method I. Group III was treated as group I, but under pressure of 240 mmHg. The group IV, the pericardia were decellularized and then subjected to pressure using glutaraldehyde 0.2% and 0.5%. After treatment of the groups, all samples were stained in a solution of blue methylene 0.03% for better visualization of the fibers of the tissue. Then the tissues were cut by laser to obtain the specimens and subjected to tensile test. It was obtained from the test, the tensile strength of the samples, the strain and elongation percentage at break. It is observed that the groups which underwent pressure had a lower tensile strength than those without pressure and on the other hand showed a greater elongation percentage. Thus, it can be verified that the effect of the pressure decreased the thickness of the tissues. The decellularization process has show efficient since it has demonstrated the absence of cells and preservation of collagen fibers after technique.

Key words: bovine pericardium, pericardial pressure, decellularization, tensile test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coração com as válvulas cardíacas (SOBOTTA, 2009).....	20
Figura 2: Válvula de gaiola (BRAUNWALD, 1998).....	21
Figura 3: Válvula de disco (BRAUNWALD, 1998).....	21
Figura 4: Válvula de duas folhas (BRAUNWALD, 1998).....	22
Figura 5: Válvula porcina da Carpentier - Edwards (BRAUNWALD, 1998).....	23
Figura 6: Válvula bovina da Cardioprótese.....	23
Figura 7: Pericárdio bovino.....	18
Figura 8: Diagrama mostrando o caráter molecular de uma fibrila de colágeno do tipo I.....	25
Figura 9: Representação esquemática da MEC com seus principais componentes (ROSS, 2012).....	26
Figura 10: Molécula do glutaraldeído.....	27
Figura 11: Reticulação das moléculas do colágeno com glutaraldeído.....	27
Figura 12: Diagrama ilustrativo da impermeabilização de matrizes de colágeno induzida pelo tratamento com soluções de glutaraldeído em concentrações elevadas (GOISSIS, 1998).	28
Figura 13: Curva tensão-deformação típica de colágeno mostrando distintas regiões.....	32
Figura 14: Fluxograma resumido das etapas químicas empregadas para cada grupo.....	34
Figura 15: PB no bastidor.....	36
Figura 16: PB nos bastidores.....	36
Figura 17: PB nos frascos com solução de SDS e EDTA.....	37
Figura 18: Placas de acrílico com PB fixadas com parafusos.....	39
Figura 19: Placas de acrílico com PB fixadas com parafusos e com furos vedados.....	39
Figura 20: Placas de acrílico com placas de acrílico submersas em solução.....	39
Figura 21: Dispositivo utilizado para moldagem do PB sob pressão.....	39
Figura 22: PB pós tingimento com azul de metileno.....	41
Figura 23: Corpo de prova com dimensões em milímetros.....	42
Figura 24: Visualização do sentido das fibras de PB.....	44
Figura 25: Corte a laser das amostras.....	44
Figura 26: Máquina universal EMIC DL – 500.....	45
Figura 27: Amostra fixada pelas garras (garra GR-001 – para polímeros).....	45
Figura 28: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB convencional.....	49

Figura 29: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB convencional com pressão	49
Figura 30: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB descelularizado	50
Figura 31: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB descelularizado com pressão.....	50
Figura 32: Gráfico da tensão máxima das amostras	51
Figura 33: Gráfico do alongamento percentual das amostras.....	51
Figura 34: Gráfico boxplot com dos valores da Tensão máxima das amostras	53
Figura 35: Gráfico boxplot com os valores obtidos para o percentual do alongamento das amostras.....	54
Figura 36: Gráfico da análise dos resíduos da tensão máxima.....	55
Figura 37: Gráfico da análise dos resíduos do alongamento percentual	56
Figura 38: Gráfico dos intervalos de confiança da tensão.....	57
Figura 39: Gráfico dos intervalos de confiança do percentual de alongamento.....	58
Figura 40: Fragmento de PB fresco, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.	62
Figura 41: Fragmento de PB do grupo I, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.	63
Figura 42: Fragmento de PB do grupo II, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.	64
Figura 43: Fragmento de PB do grupo III, corado por H&E visualizado com aumento de 100x.	65
Figura 44: Fragmento de PB do grupo IV, corado por H&E visualizado com aumento de 100x.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos resultados da tensão máxima e percentual de alongamento obtidos em outros trabalhos.....	59
Tabela 2: Espessura das amostras.....	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1:	41
Equação 2:	43
Equação 3:	43
Equação 4	43

ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
AV	Atrioventriculares
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação intraventricular
Descel.	Descelularização
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAGs	Glicosaminoglicanas
GDA	Glutaraldeído
H&E	Hematoxilina e Eosina
Hyl	Hidroxisilina
ISO	International Organization for Standardization
Lys	Lisina
MEC	Matriz extra celular
NEC	Núcleo de Enxertos Cardiovasculares
PB	Pericárdio bovino
PG	Proteoglicanas
pH	Potencial hidrogeniônico
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PVC	Cloreto de polivinila
S	Desvio Padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIF	Serviço de Inspeção Federal
V	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 PERICÁRDIO BOVINO.....	19
3.2 VÁLVULAS CARDÍACAS	20
3.2.1 Válvulas mecânicas	20
3.2.2 Válvulas de tecido biológico	22
3.3 UTILIZAÇÃO DAS VÁLVULAS BIOLÓGICAS	24
3.4 TRATAMENTOS QUÍMICOS.....	24
3.4.1 Colágeno:.....	25
3.4.2 Matriz extracelular:.....	26
3.4.3 Reação do glutaraldeído com o colágeno:	27
3.4.4 Descelularização:.....	29
3.4.5 Técnicas empregadas para descelularização:	29
3.4.6 Ensaio de tração:.....	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 PERICÁRDIO BOVINO.....	33
4.2 ESTRATÉGIA METODOLÓGICA	33
4.2.1 Preparo das amostras	35
4.2.1.1 Grupo I: Grupo controle	35
4.2.1.2 Grupo II: Grupo descelularizado	36
4.2.1.3 Grupo III: Grupo controle com pressão.....	37
4.2.1.4 Grupo IV: Grupo descelularizado, fixado com pressão	40
4.2.1.5 Coloração das amostras para a identificação das fibras	40
4.3 TESTE DE TRAÇÃO	41
4.3.1 Corpo de prova:	41

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	46
4.5 ANÁLISES COMPLEMENTARES	47
4.6 MÉTODO ESTATÍSTICO.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 GRÁFICOS:	49
5.1.1 Gráficos de curvas: Nos gráficos abaixo mostra-se a variação da tensão em função da deformação específica de cada grupo de amostras analisadas:	49
5.1.2 Gráficos de colunas: Também feitos no OriginPro 8, através dos gráficos de colunas pode-se visualizar o desvio padrão obtido em cada grupo.	51
5.1.2.1 Gráficos de colunas da tensão máxima para médias das amostras analisadas:	51
5.1.2.2 Gráficos de colunas da percentagem de alongamento para médias das amostras analisadas:.....	51
5.1.3 Gráfico <i>Boxplot</i> :	52
5.1.3.1 Gráfico <i>Boxplot</i> da tensão máxima para médias das amostras analisadas com os valores representados na figura:	53
5.1.3.2 Gráfico <i>Boxplot</i> da percentagem do alongamento para médias das amostras analisadas com os valores representados na figura:.....	54
5.1.4 Gráfico das análises dos resíduos:	55
5.1.4.1 Gráfico das análises dos resíduos da tensão máxima para médias das amostras analisadas:.....	55
5.1.4.2 Gráfico das análises dos resíduos do alongamento percentual para as médias das amostras analisadas:	56
5.1.5 Gráficos de intervalo de confiança:	57
5.1.5.1 Gráfico dos intervalos de confiança da tensão máxima para a média das amostras analisadas:.....	57
5.1.5.2 Gráfico dos intervalos de confiança do percentual de alongamento para a média das amostras analisadas:	58
5.2 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE TENSÃO MÁXIMA E PERCENTUAL DE ALONGAMENTO COM OUTROS TRABALHOS REALIZADOS:.....	59
5.3 ANÁLISES COMPLEMENTARES:.....	60
5.3.1 Temperatura de encolhimento:	60

5.3.2 Espessura das amostras:.....	60
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA:	62
6 CONCLUSÃO.....	68
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS.....	

1 INTRODUÇÃO

Na fabricação de produtos para a saúde a maior preocupação sempre foi a segurança aliada a eficácia dos mesmos. Em se tratando de biomateriais e tecidos biológicos a atenção é ainda maior, uma vez que muitos dos quais ainda estão em fase inicial de estudos se comparados a ampla diversidade de materiais sintéticos como o polietileno, fibras de carbono, prolipropileno, ligas de alumínio, titânio, aço inoxidável, liga de níquel e titânio a qual é utilizada em prótese vascular extensível, dentre outros a muito mais tempo testados em sua eficácia.

Os biomateriais são projetados especificamente para uso em aplicações biológicas, tais como membros artificiais e membranas para diálise, assim como ossos e músculos, por outro lado, os materiais biológicos são tecidos produzidos por seres vivos, incluindo o osso, o sangue, os músculos, a pele, as válvulas cardíacas e outros materiais (NEWELL, 2010).

O pericárdio bovino também chamado de tecido biológico e apesar de ser utilizado desde a década de setenta (IONESCU, 1972) na fabricação de válvulas cardíacas, ainda requer estudos mais aprofundados no que diz respeito aos seus benefícios em relação aos diferentes tratamentos químicos que o tecido recebe atualmente.

O glutaraldeído (GDA) utilizado desde então na fabricação de válvulas cardíacas tem a função de fixar e esterilizar o tecido biológico mantendo o alinhamento do feixe de colágeno, do qual é composto, de modo que não sofram alteração de sua ondulação (ANDERSON, 1967). Melhorando assim, suas propriedades mecânicas através das ligações de reticulação (ligações químicas que fixam o tecido impedindo a deterioração), também a redução das propriedades antigênicas por reagir com resíduos celulares, proteínas e outros materiais sensibilizantes (GOISSIS, 1998; COSTA, 2005).

Porém, estudos mostram que após 04 a 07 anos pós implante, principalmente em pacientes jovens, (GOISSIS, 1998; YOSHIOKA, 1999; MATHAPATI, 2013; LANZA, 2011) o tecido muitas vezes sofre um processo de calcificação ocasionado por micro trincas geradas pelo esforço mecânico de abertura e fechamento das cúspides, reduzindo sua hidrodinâmica podendo o paciente necessitar de troca valvular devido a falha definitiva da prótese. Isso ocorre pela impermeabilização do GDA em regiões parciais ou não totalmente reticuladas. E também as ligações cruzadas poliméricas podem pós-implante, liberar no sistema vascular o GDA na sua forma livre, resultando em manifestações de toxicidade sistêmica (GOISSIS, 1998; COSTA, 2004).

Na tentativa de solucionar esses problemas, outras soluções foram empregadas pré ou pós tratamento do tecido com o GDA como também reagentes para desintoxicação e diminuição da calcificação, todos com diferentes respostas.

Atualmente a engenharia de tecidos estuda a descelularização como um processo para retirar os componentes celulares, mantendo intacta a matriz extracelular (MEC), preservando a integridade do colágeno para oferecer um ambiente apropriado para a migração celular e ativar a reorganização do tecido além também de diminuir a resposta imunológica e em alguns estudos foi eficaz como método anticalcificante (LOPES, 2009; IONESCU, 1972).

Variadas são as técnicas empregadas para a descelularização utilizando diferentes métodos químicos e também outros tecidos biológicos além do pericárdio bovino, como por exemplo, as válvulas porcinas e válvulas humanas.

Nos dias atuais a maioria das válvulas biológicas de pericárdio bovino são fabricadas sobre pressão manual desconhecida para moldagem de suas cúspides. Por essa razão, será iniciado um estudo do efeito mecânico que uma determinada pressão exerce sob o tecido biológico de pericárdio bovino que passou pelo processo de descelularização utilizando o SDS (dodesilfulfato de sódio) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), seguida da fixação pelo GDA e será comparado com o tecido que recebeu o mesmo tratamento químico sem pressão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, mecânica e histologicamente, pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a tensão máxima de pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas.
- Avaliar a deformação específica de pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas.
- Verificar a presença de células nos pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas.
- Verificar a preservação das fibras de colágeno em pericárdios bovino descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo tem como objetivo apresentar os temas importantes para a compreensão do estudo, como a preocupação da qualidade dos tecidos utilizados para a fabricação de válvulas cardíacas.

3.1 PERICÁRDIO BOVINO

O pericárdio bovino consiste na membrana que envolve o coração, formado de uma espessa camada de feixes de fibras colagenosas e elásticas. A cavidade pericárdica contém um líquido seroso que lubrifica as superfícies mesoteliais, permitindo um movimento sem atrito do coração, figura 7.

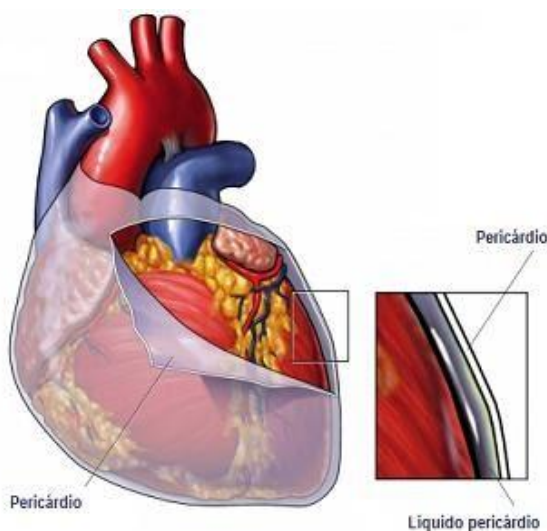


Figura 1: Pericárdio bovino

http://2.bp.blogspot.com/_1oJSjOaWsdU/Sra5gdcoTmI/AAAAAAAAAMA/iDUgu3edPE4/s400/camadas+cora%C3%A7%C3%A3o.bmp

Além da confecção de válvulas cardíacas o pericárdio bovino também é utilizado em outras cirurgias, como cirurgias reparadoras abdominais, vaginais, no fechamento de defeitos intracardíacos, tais como na comunicação intraventricular (CIV) e na comunicação interatrial (CIA), também para ampliação de artérias e veias. (NOVELO, 2011).

As vantagens de se utilizar o pericárdio bovino é por ser um tecido adquirido em abundância, o que possibilita uma maior seleção, baixo custo, melhor biocompatibilidade, baixa taxa de infecção e tromboembolismo, diminuição da hemorragia na linha de sutura (MATHAPATI, 2013).

3.2 VÁLVULAS CARDÍACAS

As válvulas cardíacas são estruturas mecânicas que permitem que o sangue circule em apenas um sentido, no sistema circulatório. As válvulas são formadas de folhetos (cúspides) finos e resistentes ancorados ao miocárdio. Os folhetos são formados de tecido fibroso, revestidos por células endocárdicas e na sua base formam o orifício valvular ou ânulo (estrutura parecida com um anel), onde o cirurgião fará a sutura e ancoragem da válvula de substituição (BARG, 2011; LANZA, 2011).

Existem quatro tipos de valvas:

As chamadas de válvulas atrioventriculares (AV), que controlam o fluxo sanguíneo do átrio para o ventrículo e impedem que o sangue flua no sentido contrário. A valva AV situada no lado direito do coração é chamada de tricúspide porque tem três cúspides. A valva situada no lado esquerdo do coração é chamada de valva mitral, a qual também é chamada de bicúspide porque tem duas cúspides, ver figura 1 (BARG, 2011).

As outras duas válvulas são a aórtica que está localizada na base do ventrículo esquerdo e a pulmonar que está localizada na base do ventrículo direito, ver figura 1 (BARG, 2011).

Uma das alternativas para resolver problemas de doenças valvulares cardíacas é a substituição das mesmas. As próteses valvulares usadas para substituir válvulas cardíacas naturais doentes existem em diferentes tamanhos e são confeccionadas com diversos materiais (BARG, 2011).

As válvulas mecânicas são feitas de material sintético e as de tecido biológico podem ser de origem animal como porcina ou bovina ou humana proveniente de cadáveres (BARG, 2011).

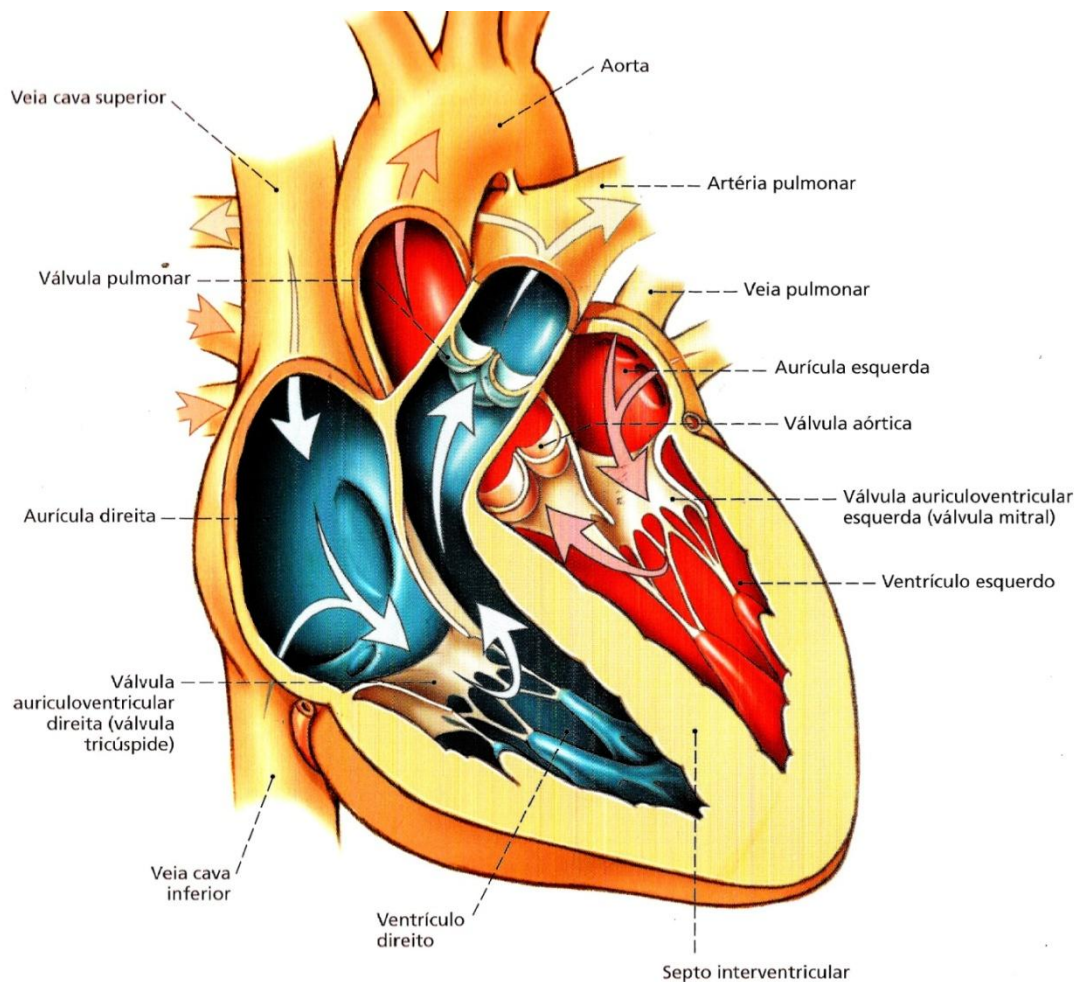


Figura 2: Coração com as válvulas cardíacas (SOBOTTA, 2009)

3.2.1 Válvulas mecânicas

Existem três tipos básicos de válvulas mecânicas, designadas segundo o tipo de componente de movimentação da válvula.

Relatos históricos descrevem que a primeira tentativa de resolver o problema de válvulas cardíacas foi a utilização de válvulas mecânicas em 1952 pelo Dr. Charles Hunfnagel, utilizando **válvulas de gaiola**, feita de acrílico como mostra a figura 2, para substituir válvulas aórtica defeituosas. A esfera original era feita de borracha de silicone. A esfera permite que haja fluxo em uma direção. Quando houver a pressão é reduzida, a esfera desce na gaiola e veda o orifício, evitando regurgitação (ocorre quando a válvula não veda adequadamente, permitindo que o sangue retorne para a câmara anterior) (NEWELL, 2010).



Figura 3: Válvula de gaiola (BRAUNWALD, 1998)

Outra válvula mecânica é a **válvula de disco**, como mostra a figura 3, têm um disco circular único, que regula o fluxo. A válvula é feita de titânio, tendo quatro hastes que regulam um disco plano recoberto de carbono, que pode se inclinar em 75° , tanto para as válvulas aórticas quanto para a mitral. O orifício é feito de carbonopirrolítico e é coberto por um anel de poliéster sem costura. O suportes de titânio sustentam e guiam o disco, que abre durante o fluxo, então, fecha para prevenir a regurgitação. O projeto dessa válvula basicamente não variou desde o início da década de 1980 (NEWELL, 2010).



Figura 4: Válvula de disco (BRAUNWALD, 1998)

A **válvula de duplo folheto**, mostrada na figura 4, representa duplo folheto que basculham independentemente quando a válvula está aberta e criam três regiões de fluxo separadas. O suporte da válvula consiste em carbono pirolítico depositado sobre grafite. Existem dois batentes no lado da entrada para controlar a abertura e o fechamento das folhas. O fluxo de sangue através de uma válvula de duas folhas se aproxima mais das condições hemodinâmicas do fluxo através de uma válvula cardíaca normal (NEWELL, 2010).

Porém, as válvulas mecânicas geram um nível elevado de turbulência no sangue e o paciente submetido à troca valvular deve continuar a tomar anticoagulantes para o resto de sua vida (COLLATUSSO, 2011). Assim as válvulas confeccionadas com tecido biológico tem a vantagem de não exigirem que o paciente receba terapia anticoagulante diminuindo a trombogenicidade. A desvantagem é a durabilidade limitada, tendem a se degradar e calcificar, fazendo com que o paciente seja submetido a uma nova troca valvar. (BARG, 2011).

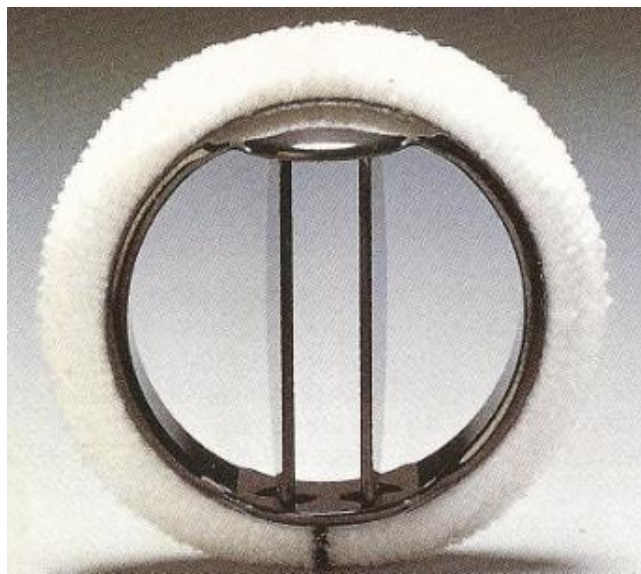


Figura 5: Válvula de duplo folheto (BRAUNWALD, 1998)

3.2.2 Válvulas de tecido biológico:

Os tecidos biológicos podem ser:

Autoenxerto: Válvula que foi transplantada de um lugar para outro, no mesmo indivíduo, isto é: a transferência da válvula pulmonar para a posição aórtica.

Tecido autólogo: Feito a partir do tecido do próprio paciente, como duramáter, pericárdio.

Homoenxerto ou Aloenxerto: Válvula humanas ou provenientes de cadáveres.

Heteroenxerto ou xenoenxerto: Válvulas ou tecido proveniente de animais, como as válvulas porcinas e as confeccionadas com pericárdio bovino.

Válvula porcina: É feita da válvula aórtica do porco e pode ser suturada em uma estrutura flexível ou semiflexível ou a raiz aórtica natural fica intacta e atua como estrutura, figura 5, (BARG, 2011).



Figura 6: Válvula porcina da Carpentier - Eduards (BRAUNWALD, 1998)

Válvula de pericárdio bovino: O caso das válvulas cardíacas feitas com pericárdio bovino, o mecanismo de válvula é construído através de moldagem do tecido biológico sobre um suporte de poliacetal configurando uma válvula tricúspide perfeitamente simétrica, cujo mecanismo de abertura e fechamento ocorre como resposta ao fluxo sanguíneo durante o ciclo cardíaco, figura 6 (CARDIOPRÓTESE, 2013).



Figura 7: Válvula bovina da Cardioprótese
(Fonte: Cardioprótese, 2006)

3.3 UTILIZAÇÃO DAS VÁLVULAS BIOLÓGICAS

A utilização das válvulas biológicas iniciou-se em 1955, quando Dr. Murray, utilizou homoenxertos valvares, no implante da valva aórtica fresca em aorta descendente de paciente com insuficiência aórtica grave (BRAILE, 1994).

Em 24 de julho de 1962, Dr. Donald Ross, em Londres, no Hospital Guys, implantou a válvula humana na posição aórtica (BRAILE, 1994; PERUZZO, 2006).

Em 1969 Carpentier *et. al.* descreveram o uso pela primeira vez de tecido heterólogo, válvula aorta porcina fixadas em glutaraldeído. Os pacientes apresentaram baixas taxas de tromboembolismo, trombose da prótese e ausência de complicações hemorrágicas, porém a durabilidade das válvulas eram limitadas devido à degeneração e ruptura do tecido, ocasionada pela calcificação e enrijecimento dos folhetos valvulares. No início da década de setenta, Ionescu desenvolveu a válvula de pericárdio bovino tratada com glutaraldeído. Assim, em 1976 com uma sociedade entre Ionescu e laboratórios Shiley, surgiu no mercado a primeira válvula produzida de pericárdio bovino (BRAILE, 1994; COSTA, 2005).

Paralelamente, em 1971, Puig *et al.*, desenvolveram uma válvula de tecido homólogo, duramáter tratada com glicerol a 98%. As válvulas apresentaram um rendimento hemodinâmico e da boa durabilidade, porém, estudos mostraram que o glicerol, embora conservasse os tecidos, não fazia ligações químicas de reticulação, não conseguia obter a total esterilização do tecido. Foi observada também a degeneração do colágeno após 23 meses de implante (BRAILE, 1994; COSTA, *et. al.*, 1986; COSTA, 2005).

Desde então, muitos estudos foram desenvolvidos e válvulas foram comercializadas utilizando o pericárdio bovino fixado em glutaraldeído.

3.4 TRATAMENTOS QUÍMICOS

O glutaraldeído, foi introduzido para a fixação do tecido biológico, em válvulas porcinas primeiramente por Carpentier *et. al.* com a finalidade de estabilizar a estrutura de colágeno existente no tecido biológico evitando sua rápida degeneração (BAUCIA, 2006).

3.4.1 Colágeno:

O colágeno é uma proteína fibrosa formada por tripla hélice, composta por três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, sendo duas cadeias α_1 idênticas e outra α_2 , são enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda super torcida. Cada uma destas três hélices são formadas quase inteiramente por glicina (que representa 1/3 da seqüência), prolina, lisina, hidroxiprolina e a hidroxilisina, figura 8 (ALBERTS, 1997; JUNQUEIRA, 2008; ROSS, 2012).

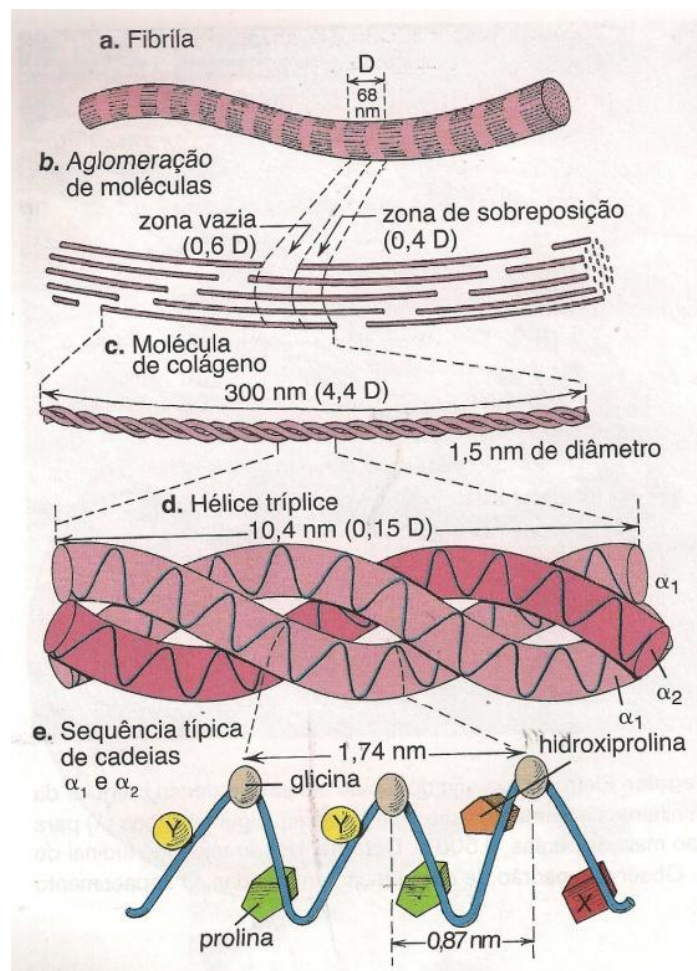


Figura 8: Diagrama mostrando o caráter molecular de uma fibrila de colágeno do tipo I.
a. Fibrila de colágeno. b. Fibrila de colágeno composta pó moléculas de colágeno escalonadas.
c. Cada molécula tem cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro.
d. Molécula de tripla hélice.
e. Tripla hélice com 3 cadeias α . Cada terceiro aminoácido da cadeia é uma glicina.
A posição X uma prolina e Y uma hidroxiprolina (ROSS, 2012).

Foram identificados 28 tipos de colágeno, o tipo I formado é o mais importante dos tipos dos colágenos e também abundante no pericárdio bovino, responsável não apenas pela manutenção da integridade dos tecidos em função das suas propriedades mecânicas como também pela sua participação ativa na funcionalidade dos tecidos em função de sua interação com as células presentes na matriz extracelular (COSTA, 2005; GOISSIS, 2007, PEDROSO, 2009; ROSS, 2012).

3.4.2 Matriz extracelular:

A MEC é formada por glicoprotéínas, colágeno, glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanas (PG) como componentes estruturais majoritários mais importantes os quais unem as células. Estes componentes são excretados pelas próprias células e se organizam no meio extracelular por meio de interações com receptores situados na membrana citoplasmática. Além da função estrutural, controlam a pressão oncótica e as propriedades mecânicas do tecido, figura 9, (GOISSIS, 2007).

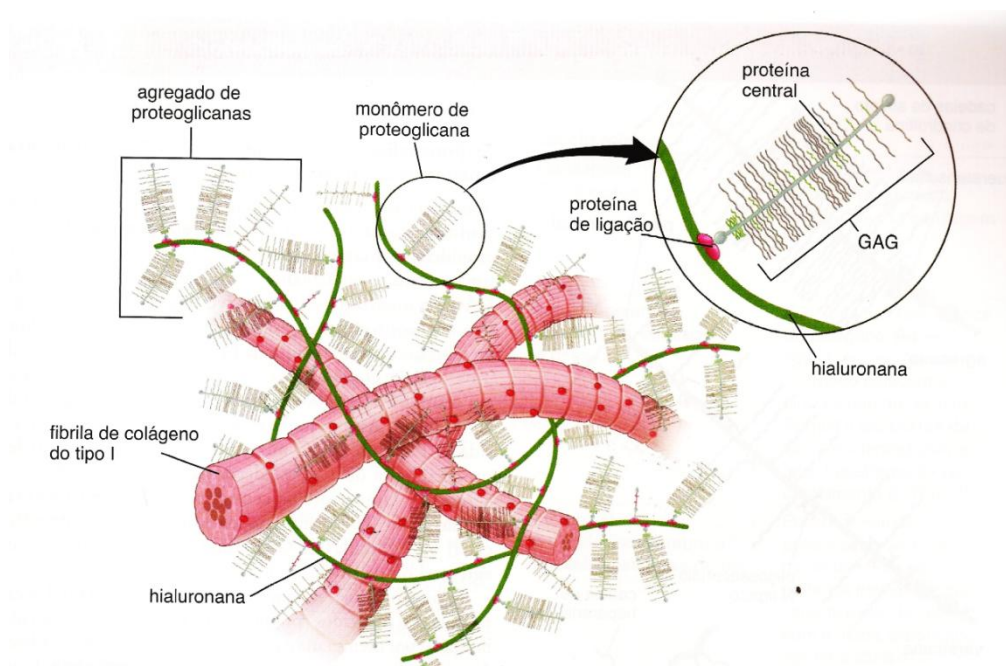


Figura 9: Representação esquemática da MEC com seus principais componentes (ROSS, 2012).

3.4.3 Reação do glutaraldeído com o colágeno:

O glutaraldeído cuja fórmula pode ser visualizada na figura 10, reage com os grupos ϵ - amino dos aminoácidos lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) de moléculas adjacentes de colágeno para formar as ligações cruzadas (reticulação) do tipo base de Schiff (-CH=N-), figura 11, (WOODROF, 1978; PIZA, 1997). No entanto, as reações do GDA com o colágeno não são homogêneas devido à heterogeneidade do tecido e à química complexa do GDA em soluções aquosas. O que pode resultar a impermeabilização superficial do tecido, e a formação de ligações de reticulação poliméricas do tipo poli-GDA (WOODROF, 1978; GOISSIS, 1998).

Estudos demonstram que a reticulação do colágeno é concentração dependente de GDA. Concentrações mais altas de GDA induzem à formação de reações cruzadas na superfície das fibras, não levando a reticulação das regiões mais internas da matriz colagênica. Isso ocorre com algumas das soluções habitualmente empregadas, figura 12. Já concentrações menores progressivamente crescentes, tendem a reticular as regiões mais internas (COSTA, 2005).

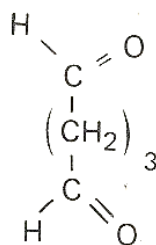


Figura 10: Molécula do glutaraldeído.
(WOODROF, 1978)

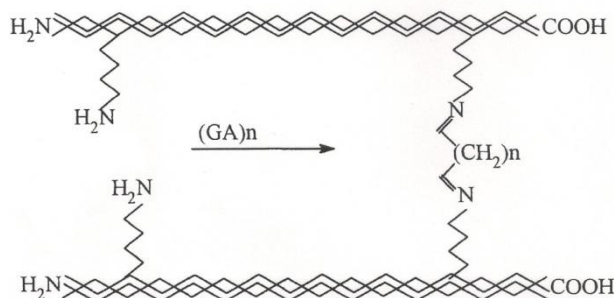


Figura 11: Reticulação das moléculas do colágeno com glutaraldeído.
Reação de Schiff (PIZA, 1997)

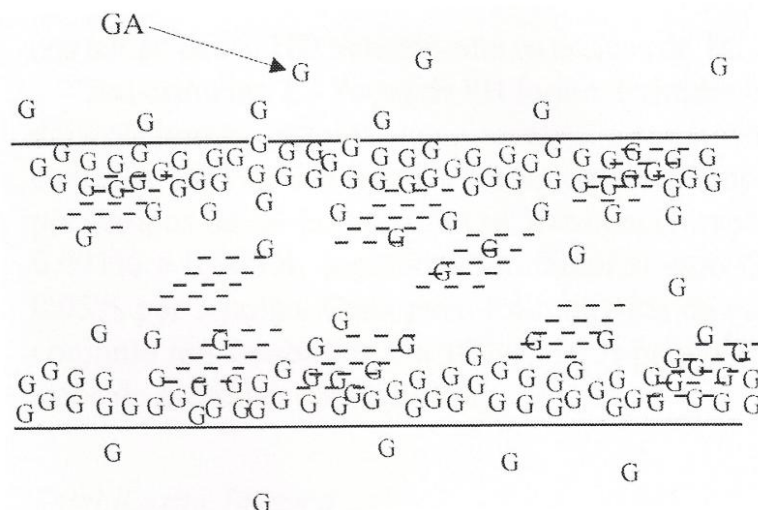


Figura 12: Diagrama ilustrativo da impermeabilização de matrizes de colágeno induzida pelo tratamento com soluções de glutaraldeído em concentrações elevadas (GOISSIS, 1998).

A impermeabilização para o pericárdio bovino é um processo rápido resultando regiões internas da matriz não reticuladas e com menor biocompatibilidade em relação ao material superficial. Estas regiões parciais ou totalmente não reticuladas, após exposição formam trincas e funcionam como sítios primários de calcificação. Além desta impermeabilização, as ligações cruzadas poliméricas tendem pós-implante, a liberar no sistema vascular o GDA na sua forma livre, resultando em manifestações de toxicidade sistêmica (GOISSIS, 1998; COSTA, 2005).

Outro fator a se levar em consideração é que o saco pericárdico bovino não é formado de uma malha homogênea de colágeno e elastina, mas é constituído por regiões de espessura variável, com maior ou menor riqueza de fibras, infiltrados ou degenerações. Assim é claramente visível a dificuldade de se obter um material com espessura homogênea e adequadamente fixado com o GDA na confecção de válvulas cardíacas (COSTA, 2005).

Vários trabalhos foram desenvolvidos como método alternativo para diminuir o efeito nocivo da reticulação do colágeno com a utilização de reagentes como prociamidinas, triglicidilamina, corante mediado pela fotooxidação como carbodiimidas, cianimidina e 1-etil-3-(3-dimetil-aminipropil) carbodiimida (EDC) e azida de alginato. Para a desintoxicação do GDA reticulado foi utilizado o boro-hidreto de sódio, ácido cítrico, L-lisina, ácido glutâmico, L- glutamina ou L-arginina, ácido α – amino oleico, resultou numa redução da calcificação da parede da aorta e aumentou o repovoamento da célula hospedeira (GRIMM, 1991; FERREIRA, 2007; MATHAPATI, 2013).

É empregada também a liofilização do pericárdio tratado com GDA, porém não se obteve alteração significativa nas propriedades mecânicas do mesmo, mas, melhorou as propriedades imunogênicas e reduziu significativamente a quantidade de aldeídos residuais (MATHAPATI, 2013). Outras soluções também foram testadas como o pré - tratamento como álcool em válvulas porcinas para diminuir a calcificação (ROSA, 2006), dentre outros. Porém, todos com diferentes graus de resposta. (GOISSIS, 1998).

Muitos ainda são os desafios a serem superados para se obter um tecido com características ideais a ser implantado, livre de respostas imunológicas insatisfatórias, tromboembolismo, calcificação, isento de liberação tóxica dos agentes químicos utilizados, dentre outros. Com esse intuito, inúmeros pesquisadores vêm ao longo da última década se dedicando arduamente ao estudo da descelularização.

3.4.4 Descelularização:

A descelularização é um método utilizado em engenharia de tecidos para remover componentes celulares e debris (restos celulares após o rompimento da célula – lise celular) tais como, por exemplo, ácidos nucleicos, membranas celulares, estruturas citoplasmáticas, e ao mesmo tempo manter as propriedades funcionais da matriz extracelular (LANZA, 2004; MATHAPATI, 2011). Reduzindo, em teoria, a imunogenicidade. Também se observou que tecidos descelularizados depois de implantados tem o processo de calcificação distrófica reduzido, (COLLATUSSO, 2012; KASIMIR, 2003).

3.4.5 Técnicas empregadas para descelularização:

Várias técnicas são utilizadas para fazer a descelularização, incluindo métodos físicos, como agitação mecânica, ultra – som, pressão ou congelamento; já métodos químicos empregam-se detergentes, sais, ácidos e bases, alcoóis e quelantes. Muitas vezes combinados a estes métodos são empregadas enzimas específicas, constituindo um elemento biológico no processo de descelularização.

Tratamentos enzimáticos, como a utilização da tripsina, endonucleases e exonucleases, cuja exposição prolongada pode alterar a estrutura da MEC, removendo fibronectina, elastina e GAGs. Em contra partida as enzimas podem interagir com as proteínas da MEC sendo resíduos de difícil remoção, induzindo a uma resposta imunológica, devido ao seu caráter biológico (KASIMIR, 2003; RIEDER, 2005; GILBERT, 2006).

Tratamento químico, tal como soluções de **detergentes iônicos**, (SDS) que rompem as membranas celulares e as ligações responsáveis pelas ligações intercelulares e células - matriz extracelular. Também são utilizados outros tratamentos químicos como o **detergente não iônico**: Triton X -100 que interrompem as interações lipídios e proteínas, deixando as interações proteína – proteína intactas, removendo as GAGs, em alguns tipos de tecido biológico descelularizado. E também métodos utilizando soluções alcalinas e ácidas que solubilizam os componentes citoplasmáticos das células e degradam ácidos nucleicos, porém removem as GAGs, foram testados como agentes descelularizantes (SCHMIDT, 2000).

O objetivo da descelularização é obter uma matriz extracelular íntegra e livre de células, mantendo suas propriedades biológicas para serem utilizadas como arcabouço de um novo tecido (STEINHOFF, 2000; SCHENKE-LAYLAND, 2003; OSWAL, 2007).

No atual trabalho a descelularização foi realizada empregando o método PUCPR I, desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, no Núcleo de Enxertos Cardiovasculares (NEC – PUCPR), que utiliza o detergente aniônico o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e (EDTA-quelante de cálcio), o qual solubiliza a membrana, evitando alterações na arquitetura e composição da MEC.

O efeito pretendido do processo é remover elementos celulares, células e debris, sem causar desnaturação das proteínas da MEC e perda dos glicosaminoglicanos, essenciais para conservação das propriedades mecânicas. Embora o SDS seja um agente desnaturante de proteínas a concentração de uso no processo PUC-PR I é o suficiente para remover células e manter a composição e arquitetura da MEC.

Após o processo a avaliação microscópica do tecido em cortes histológicos corados em H&E. (Hematoxilina e Eosina: corante de tecidos biológicos que evidencia células e matriz extracelular) comprovam a ausência de células e que as fibras colágenas e elásticas do tecido ainda mantém características similares ao tecido não descelularizado.

3.4.6 Ensaio de tração:

O ensaio de tração nos permite avaliar algumas propriedades mecânicas do material entre elas:

- Módulo de elasticidade;
- Tensão de escoamento;
- Limite de resistência à tração;
- Alongamento percentual até a Fratura;
- Porcentagem de redução à fatura.

Porém, no atual trabalho serão analisados três itens:

Resistência à tração ou última tensão de tração ou tensão máxima: É a tensão no ponto máximo da curva tensão – deformação de engenharia. Esse ponto corresponde a tensão máxima suportada por uma estrutura sobre tração. (SMITH, 2012; CALLISTER, 2013).

Deformação específica total (ϵ_U): É expressa como a mudança no comprimento do corpo de prova até o rompimento (na direção da aplicação da carga) dividida pelo comprimento original (CALLISTER, 2013).

Alongamento (Al %): O alongamento é obtido pelo produto da deformação específica total por 100 (CALLISTER, 2013).

Estudos realizados no comportamento mecânico em tecidos de colágeno, como ligamento cruzado anterior e posterior (joelho), tendão patelar (joelho), ligamento colateral médio (joelho), tendão de aquiles (calcanhar), tendão do quadríceps (joelho) e ligamento longitudinal lombar anterior (coluna), mostram que devido à natureza “pregueada/enrugada” das fibrilas de colágeno a curva de tensão tem três regiões distintas como mostra a figura 13. Regiões 1 e 3 não lineares, e 2 é relativamente linear (SMITH, 2012).

Como nem todas as fibras são “pregueadas/enrugadas” com a mesma intensidade, nota-se um comportamento não linear no início da curva de tensão-deformação. Quando a carga aumenta, todas as fibrilas passam a suportar a carga se deformam elasticamente, comportamento responsável pela região relativamente linear na parte central da curva. Com um novo aumento de carga, as fibrilas individuais atingem sua resistência máxima e começam a falhar. A falha sequencial é responsável pela região não linear, próxima ao final da curva (SMITH, 2012).

As definições tradicionais de propriedades mecânicas como limite de resistência à tração e o percentual de alongamento na falha permanecem inalterados nos tecidos estudados (SMITH, 2012).

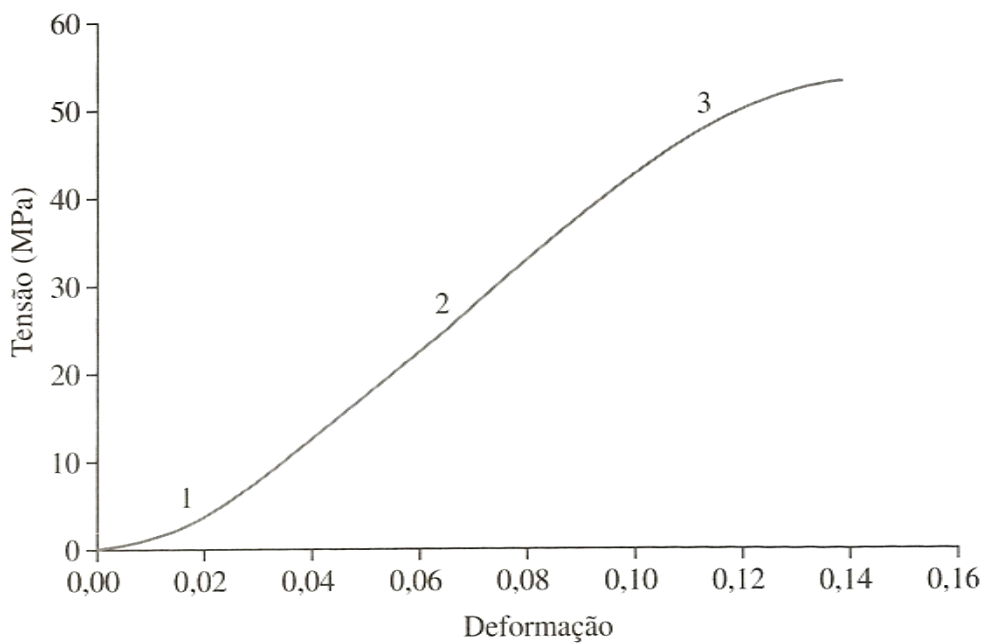


Figura 13: Curva tensão-deformação típica de colágeno mostrando distintas regiões não lineares (regiões 1 e 3) e relativamente linear (região 2).

4 METODOLOGIA

4.1 PERICÁRDIO BOVINO

A matéria prima utilizada para os ensaios foi o pericárdio bovino coletado em frigorífico conforme normas do estabelecimento com registro no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e Supervisionado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), sendo todos os animais de origem nacional.

Após o abate dos animais foi feita a retirada do pericárdio por um colaborador do frigorífico. O mesmo foi limpo mecanicamente para a retirada da gordura epipericárdica. Em seguida foram colocados em caixa térmica contendo solução fisiológica a 0,9% com temperatura entre 2°C à 8°C.

Imediatamente foram transportados para a indústria onde passaram por mais um processo de limpeza e seleção, o qual consiste em retirar mecanicamente com compressas e solução fisiológica a 0,9% o resto de gordura e selecionar os pericárdios. Foram selecionados segmentos dos pericárdios com aspecto homogêneo que significa sem manchas e sem aspecto amarelado em sua textura; sem dilacerações, tecido com aspecto que “folhado”; sem gorduras ou ranhuras (arranhões).

4.2 ESTRATÉGIA METODOLÓGICA

A metodologia foi desenvolvida pelo próprio autor (a) e para melhor entendimento da mesma as amostras foram separadas em dois grupos: as que não receberam pressão, e as que receberam pressão. Dentro das que não foram submetidas à pressão tem-se:

Grupo I: Grupo controle: São as amostras de pericárdios submetidos ao tratamento químico utilizado por uma determinada instituição para fabricação de válvulas cardíacas e sem a utilização de pressão no processo.

Grupo II: Grupo descelularizado: São as amostras de pericárdios submetidos à descelularização e depois a fixação com GDA, também sem a utilização de pressão no processo.

Amostras submetidas à pressão:

Grupo III: Idem ao grupo I, porém, submetido à pressão: São as amostras de pericárdios submetidos ao tratamento químico controle com a utilização de pressão no processo.

Grupo IV: Grupo descelularizado submetidos à pressão: São as amostras de pericárdios descelularizadas sem pressão seguida da fixação com GDA com a utilização de pressão no processo.

O fluxograma abaixo mostra resumidamente as etapas químicas seguidas para cada grupo:

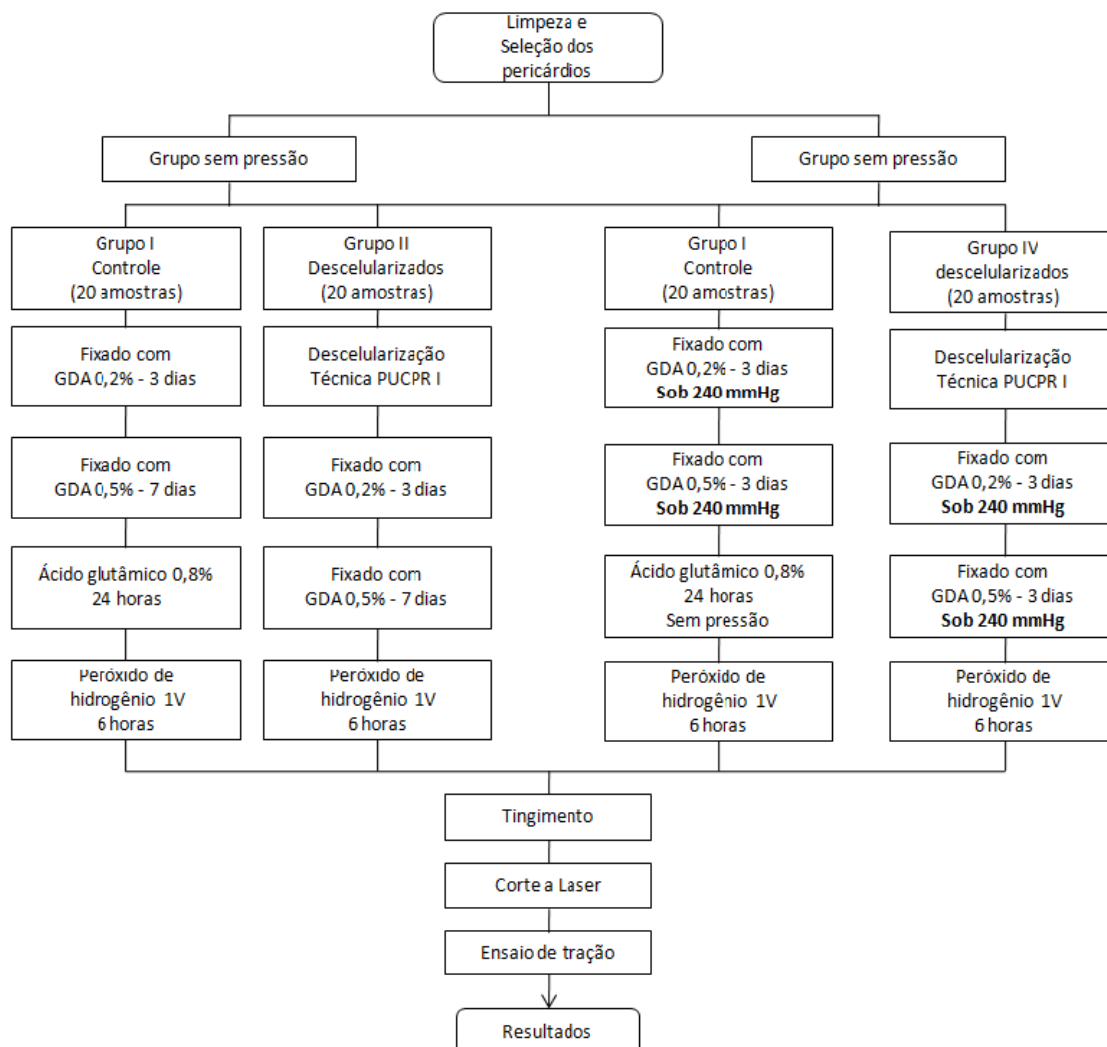


Figura 14: Fluxograma resumido das etapas químicas empregadas para cada grupo (Fonte: próprio autor)

4.2.1 Preparo das amostras

4.2.1.1 Grupo I: Grupo controle

Pericárdios submetidos ao tratamento químico controle.

Para o grupo controle foi seguido o tratamento químico descrito abaixo:

1ª Etapa: Os pericárdios foram colocados em bastidores para evitar dobras e acomodá-los de forma a ficarem mais fáceis para serem submetidos aos cortes do corpo de prova, figura 15. Em seguida, foram submersos em solução de glutaraldeído a 0,2% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 durante um período de 3 dias, figura 16.

2ª etapa: Os pericárdios foram submersos em solução de glutaraldeído a 0,5% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 durante um período de 7 dias.

3ª etapa: Transcorridos os sete dias, os pericárdios foram lavados com solução fisiológica 0,9% e foram submersos em solução de ácido glutâmico 0,8% pH: 3,5 por um período de 24 horas, com a finalidade de prevenir uma calcificação acelerada no tecido.

4ª etapa: Após as 24 horas, os pericárdios foram lavados em solução fisiológica 0,9% e foram submersos em solução de peróxido de hidrogênio 1,0V (Um volume de peróxido de hidrogênio) por um período de 6 horas.

5ª etapa: Transcorridas às 6 horas os pericárdios foram lavados três vezes com 500 mL de solução fisiológica 0,9% e submersos em solução de paraben pH: 7,0 a 7,4 (solução salina isotônica tamponada e preservada com metil-paraben e propil-paraben). Esses tratamentos químicos visam proporcionar uma constituição física adequada às membranas de pericárdio bovino, reduzir sua antigenicidade para níveis desprezíveis, diminuição da calcificação, além de assegurar a esterilidade final do produto.



Figura 15: PB no bastidor
(Fonte: Próprio autor)



Figura 16: PB nos bastidores submersos em solução de GDA
(Fonte: Próprio autor)

4.2.1.2 Grupo II: Grupo descelularizado

Pericárdios submetidos ao processo de descelularização.

1ª etapa: Os pericárdios previamente selecionados foram colocados em frasco de 500 mL e em seguida foi adicionada a solução SDS (0,1%) e EDTA (0,02%), sob agitação, fazendo a troca da mesma por três vezes no primeiro dia, figura 17.

2ª etapa: Após a primeira etapa foi desprezada a solução de SDS e EDTA e foi adicionado 200 mL de álcool 70% (com a finalidade de remover os fosfolipídios) em cada pericárdio, os quais permaneceram sob agitação por mais 24 horas.

3ª etapa: Transcorridas as 24 horas a solução de álcool 70% foi descartada e foi colocada solução fisiológica a 0,9%, fazendo a troca da mesma uma vez por dia durante 10 dias seguidos, ficando os pericárdios, sob agitação durante os dez dias.

4ª etapa: Após os 10 dias, os pericárdios foram colocados em bastidores para evitar dobras e acomodá-los de forma a ficarem mais fáceis para serem submetidos aos cortes do corpo de prova, figuras 15 e 16. Em seguida os bastidores com os pericárdios previamente descelularizados foram submersos em solução de glutaraldeído a 0,2% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 durante um período de 3 dias sem agitação.

5ª etapa: Transcorridos os três dias os mesmos foram submersos em solução de glutaraldeído a 0,5% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 durante um período de 7 dias sem agitação.

6ª etapa: Após os 7 dias, os pericárdios foram lavados em solução fisiológica 0,9% e foram submersos em solução de peróxido de hidrogênio 1,0V (1 volume de peróxido de hidrogênio) por um período de 6 horas.

7ª etapa: Após as 6 horas as amostras foram lavadas com 500 mL de solução fisiológica e foi acrescentada em uma solução de paraben pH: 7,0 a 7,4 (solução salina isotônica tamponada e preservada com metil-paraben e propil-paraben).



Figura 17: PB nos frascos com solução de SDS e EDTA no agitador Nova Ética – mod. 109. (Fonte: próprio autor)

4.2.1.3 Grupo III: Grupo controle sob pressão:

Pericárdios submetidos à pressão de 240 mmHg durante o processo químico controle.

Três segmentos de pericárdio bovinos foram selecionados. Cada um deles foram colocados entre duas placas de acrílico fixadas com 4 parafusos. Cada conjunto de placas possuía também 4 furos para retirada do ar ao serem colocadas as placas, pois o ar em contato com o pericárdio evita a sua fixação com GDA, secando o material. Após a retirada de ar os furos eram vedados com tampões de borracha. As placas também eram circundadas com borracha as quais serviram de vedação quando colocadas dentro do dispositivo, fazendo com que não houvesse troca de fluido entre as câmaras como mostra a figuras 18, 19 e 20. Em seguida, as placas com pericárdio foram introduzidas dentro de um dispositivo de PVC com uma torneira na parte de baixo para introduzir a pressão. Na parte de cima o dispositivo era

fechado com uma tampa CAP (Tigre) de PVC para esgoto com 200 mm de diâmetro na qual foi feito um furo para que quando colocada a tampa, o ar pudesse escapar, e depois de preencher completamente o dispositivo com solução o mesmo era vedado com um tampão de borracha. Para monitorar a pressão imposta ao tecido durante o processo químico foi fixado um manômetro analógico da marca Record com glicerina de capacidade para 1 kgf/cm². O dispositivo pode ser visualizado na figura 21. A pressão foi monitorada diariamente durante o processo, sendo necessário às vezes adicionar solução para corrigi-la, pois esta diminuía gradualmente após longo período, porém sem interferir significativamente na fixação do tecido.

Para o grupo III foi seguido o tratamento químico descrito abaixo:

1ª etapa: Com os pericárdios já dentro do dispositivo, foi completado com solução de glutaraldeído a 0,2% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 e foi introduzida uma pressão de 240 mmHg e mantida durante um período de 3 dias.

2ª etapa: Transcorridos os três dias a solução foi trocada por outra de glutaraldeído a 0,5% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 e assim permaneceu durante um período de 7 dias também dentro do dispositivo sob pressão de 240 mmHg.

3ª etapa: Transcorridos os sete dias, os pericárdios foram retirados do dispositivo e das placas, lavados com solução fisiológica 0,9% e submersos em solução de ácido glutâmico 0,8% pH: 3,5 por um período de 24 horas sem pressão, com a finalidade de prevenir uma calcificação acelerada no tecido.

4ª etapa: Após as 24 horas, os pericárdios foram lavados em solução fisiológica 0,9% e submersos em solução de peróxido de hidrogênio 1,0V por um período de 6 horas, também sem pressão.

5ª etapa: Transcorridas as 6 horas os pericárdios foram lavados 3 vezes com solução fisiológica 0,9% e submersos em solução de paraben pH: 7,0 a 7,4 (solução salina isotônica tamponada e preservada com metil-paraben e propil-paraben).

6ª etapa: Os pericárdios foram colocados em bastidores para evitar dobras e acomodá-los de forma a ficarem mais fáceis para serem submetidos aos cortes do corpo de prova, figuras 15 e 16.



Figura 18: Placas de acrílico com pericárdio fixadas com parafusos e com os furos sem tampa.
(Fonte: Próprio autor)

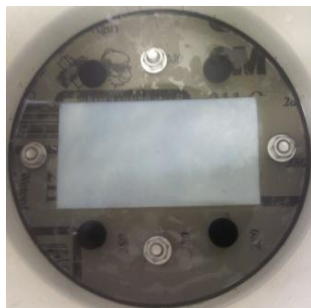


Figura 19: Placas de acrílico com pericárdio, fixadas com parafusos e com os furos vedados.
(Fonte: Próprio autor)



Figura 20: Placas de acrílico com pericárdio submerso em solução dentro do dispositivo.
(Fonte: Próprio autor)



Figura 21: Dispositivo utilizado para moldagem do PB sob pressão
(Fonte: próprio autor)

4.2.1.4 Grupo IV: Grupo descelularizado, fixado com pressão

Pericárdios descelularizados, submetidos à pressão de 240 mmHg durante a fixação com GDA.

1ª etapa: Três segmentos de pericárdio bovinos previamente descelularizados conforme descrito no grupo II foram cada um deles colocados entre duas placas de acrílico conforme descrito no grupo III e as placas com pericárdio foram introduzidas dentro de um dispositivo seguindo o mesmo procedimento do grupo III.

2ª etapa: Com os pericárdios já dentro do dispositivo, foi adicionada solução de glutaraldeído a 0,2% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 e foi introduzida uma pressão de 240 mmHg durante um período de 3 dias.

3ª etapa: Transcorridos os três dias a solução foi trocada por outra de glutaraldeído a 0,5% tamponada em pH: 7,0 a 7,4 e assim permaneceu durante um período de 7 dias também dentro do dispositivo sob pressão de 240 mmHg.

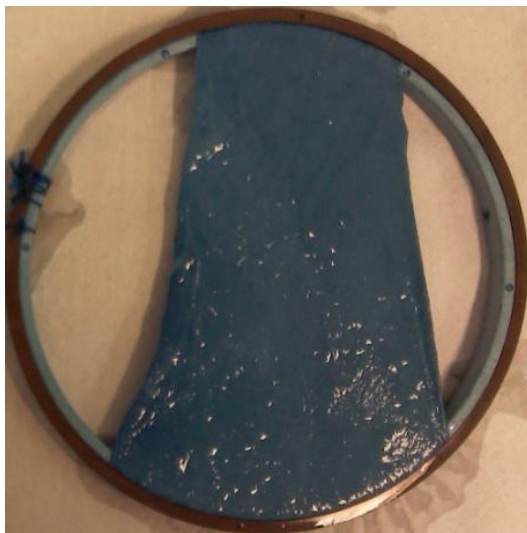
4ª etapa: Após os 7 dias, os pericárdios foram retirados do dispositivo, lavados em solução fisiológica 0,9% e então submersos em solução de peróxido de hidrogênio 1,0V (volume/volume) por um período de 6 horas.

5ª etapa: Transcorridas às 6 horas, os pericárdios foram lavados 3 vezes com solução fisiológica 0,9% e submersos em solução de paraben pH: 7,0 a 7,4 (solução salina isotônica tamponada e preservada com metil-paraben e propil-paraben).

6ª etapa: Os pericárdios foram colocados em bastidores para evitar dobras e acomodá-los de forma a ficarem mais fáceis para serem submetidos aos cortes do corpo de prova, figuras 15 e 16.

4.2.1.5 Coloração das amostras para a identificação das fibras

Para visualizar melhor as fibras dos pericárdios, os mesmos foram identificados e colocados em bastidores. Em seguida os bastidores foram submersos em uma solução tampão fosfato com pH entre 7,0 e 7,4 contendo azul de metileno na proporção de 0,03%, figura 22.



**Figura 22: PB pós tingimento com azul de metileno
(Fonte: próprio autor)**

4.3 TESTE DE TRAÇÃO

4.3.1 Corpo de prova:

A geometria do corpo de prova foi baseada no trabalho de SÁNCHEZ, 2010 e LUZIA, 2012 como representado na figura 23. O corpo de prova teve um tamanho total de 70 mm de comprimento. As extremidades onde as amostras foram presas ao equipamento possuíam 22,5 mm de comprimento e 15mm de largura, compondo a área de agarramento.

A área de teste foi considerada com um comprimento efetivo (l_0) de 25 mm e 5 mm de largura. A equação utilizada para calcular a área da seção do corpo de prova é apresentada na equação 1.

$$A = b(t)$$

Equação 1

Onde:

A = área, em mm^2 ;

b = largura, em mm;

t = espessura do pericárdio bovino, em mm.

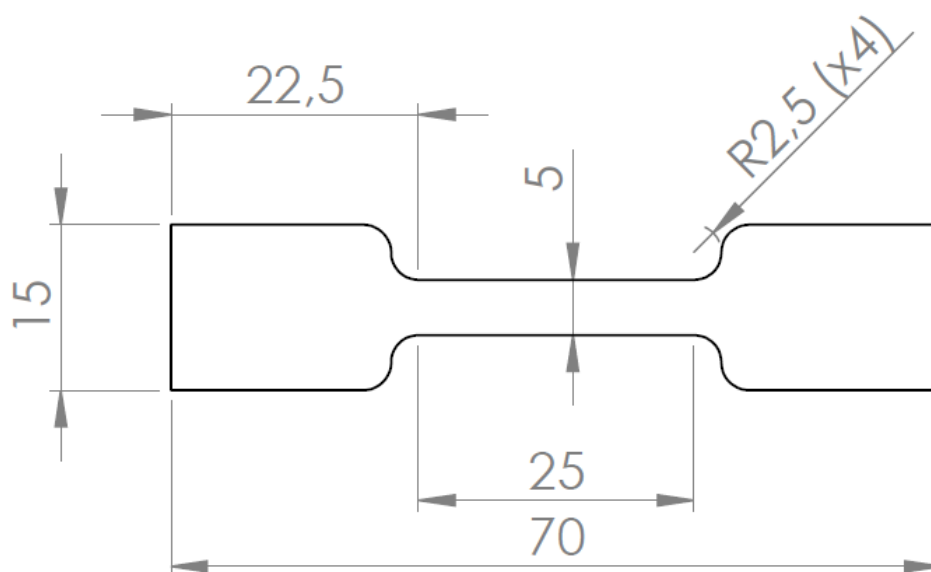


Figura 23: Corpo de prova com dimensões em milímetros.
(Fonte: próprio autor)

As 20 amostras de cada grupo foram cortadas a laser, na empresa Dynamiclaser, sempre no sentido longitudinal das fibras, figura 24. O corte a laser pode ser visualizado na figura 25. Em seguida as amostras foram submetidas ao teste de tração utilizando a máquina de teste universal EMIC, modelo DL – 500, com capacidade máxima de 5kN localizada no LaCEM PUCPR (Laboratório de Caracterização e de Ensaio Mecânicos), o qual pode ser visto na figura 26. Foi utilizada a célula de carga, tipo “S” com capacidade de 10 kg. A figura 27 mostra o corpo de prova no equipamento. Os cálculos de tensão, deformação específica e alongamento foram baseados na norma ASTM 638D (Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics).

Após os ensaios os resultados foram analisados através do gráfico tensão vs. deformação, para cada grupo estudado. Os dados para a construção dos gráficos foram obtidos através do software Vir Maq. 3.04 (Matteest), que no final de cada ensaio permitia exportar os dados na extensão .txt. No arquivo eram fornecidas as seguintes informações: tempo (s), força (N) e deformação (mm). Os dados de cada teste foram enviados ao software OriginPro 8, onde era possível obter a tensão e a deformação específica para a construção dos gráficos.

Para obter a tensão foi necessário dividir o valor da força, em cada instante do teste, pela área do corpo de prova, considerada como constante durante todo o ensaio, como mostra a equação 2

$$\sigma = F/A \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

σ = tensão, em MPa;

F = força, em Newton;

A = área do corpo de prova, em mm².

A deformação específica foi calculada pelo quociente entre a deformação a cada instante do ensaio e o comprimento efetivo de ensaio que foi de 25 mm, como mostra a equação 3.

$$\varepsilon = \Delta l/l_0 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

ε = deformação específica em, mm/mm;

Δl = variação do comprimento em cada instante, em mm;

l_0 = comprimento inicial do corpo de prova, em mm.

Para comparar os resultados de tensão máxima e alongamento entre os grupos foram feitos gráficos de coluna, também no software OriginPro 8, com média e desvio padrão de cada grupo.

A tensão máxima foi fornecida logo após o término de cada ensaio, porém na unidade kgf/mm², para converter em MPa o valor obtido foi multiplicado pela aceleração da gravidade, considerada 9,81 m/s².

O alongamento em percentual foi calculado pelo produto da deformação específica total por 100. A deformação específica total corresponde à deformação em que ocorre a falha do corpo de prova, também fornecida ao final do ensaio.

$$Al(\%) = \varepsilon_U(100) \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

Al (%) = alongamento percentual;

ε_U = deformação específica total, em mm/mm.



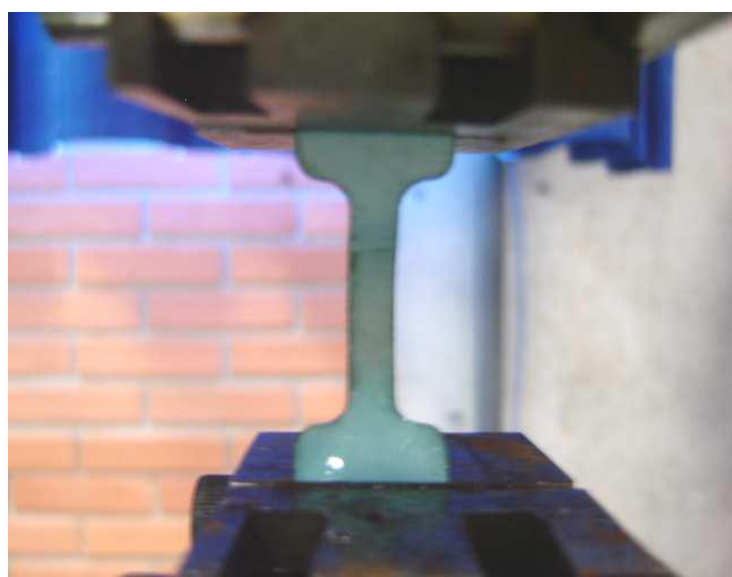
Figura 24: Visualização do sentido das fibras de PB
(Fonte: Próprio autor)



Figura 25: Corte a laser das amostras
(Fonte: Próprio autor)



**Figura 26: Máquina universal EMIC DL – 500
(Fonte: Próprio autor)**



**Figura 27: Amostra fixada pelas garras (garra GR-001 – para polímeros)
no equipamento para realização do teste de resistência à tração
(Fonte: Próprio autor)**

4.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

As amostras de pericárdio foram selecionadas aleatoriamente para a realização do teste. Foram cortados segmentos de aproximadamente 3,0 mm de largura por 20,0 mm de comprimento e colocados em cassetes identificados e submersos em formalina tamponada a 10% para fixação.

Após a fixação, os segmentos de pericárdio passaram por uma bateria de desidratação em série crescente de etanol sendo: 1º a 70%, 2º a 80%, 3º a 90%, 4 a 100%. Logo após os segmentos foram diafanizados em Xilol à temperatura ambiente e incluídos em parafina à 60°C. Terminado o processo de preparação os segmentos foram emblocados em parafina na posição longitudinal, sendo cortados na espessura de 8,0 µm e montados em lâminas de vidro.

As lâminas de vidro contendo os cortes foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em microscópio ótico Olympus BX-51, software cell Sens Standard. Foram capturadas imagens de áreas representativas da condição histológica desejada.

O estudo histológico tem a finalidade de demonstrar a integridade das fibras de colágeno e também no grupo descelularizado para observar a eficácia do método onde se visualiza a ausência de células.

4.5 ANÁLISES COMPLEMENTARES

4.5.1 Temperatura de encolhimento:

A temperatura de encolhimento serve para verificar se houve fixação do GDA sobre as fibras de colágeno.

Foi realizado o teste de temperatura de encolhimento por amostragem para todos os grupos.

Foram feitos cortes de 2x4 cm nas amostras testadas. A temperatura foi determinada no momento em que as fibras de colágenos se degradaram, contorcendo o tecido.

4.5.2 Espessura das amostras:

Foi feita a medição da espessura também para mostrar o comportamento heterogêneo do tecido biológico utilizando um medidor de espessura Mitotoyo.

4.6 MÉTODO ESTATÍSTICO

Foram feitos ensaios prévios que comprovaram a não influência da variabilidade das amostras nos resultados obtidos, nas medições de tração e alongamento. Desta forma optou-se por fazer ensaios não pareados, ou seja, as amostras foram retiradas aleatoriamente de diferentes segmentos de pericárdio bovino. O número de amostras ensaiadas foi de 20, para cada uma das condições.

Os gráficos das curvas e de colunas foram feitos utilizando o software OriginPro 8, no qual se obteve os valores de tensão e deformação específica.

Utilizando o software Minitab foi feita uma análise de variância ANOVA para verificar a igualdade entre as amostras testadas, o nível de confiança adotado foi de 95%. O critério usado para verificar se existe diferença entre as amostras, foi o valor-p obtido. O valor-p ou *p-value* é a probabilidade com que a hipótese nula não será rejeitada, assim valor-p menores do que 0,05%, significam que a hipótese nula (hipótese de igualdade entre as amostras) foi rejeitada. Isto para níveis de confiança de 95%, como foi considerado no presente estudo (Montgomery, 2003).

As análises foram feitas baseadas nos resultados da Análise de Variância, *boxplots* das amostras (que também indicam possíveis *outliers*), análise dos resíduos para validação da Análise de Variância (pontos, histograma e ajuste de curva de normalidade) e intervalos de confiança de 95% das amostras testadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização dos resultados referentes aos ensaios da tensão máxima, deformação específica e alongamento, foram representados em forma de gráficos, e logo em seguida discutidos.

5.1 Gráficos:

5.1.1 Gráficos de curvas: Nos gráficos abaixo mostra-se a variação da tensão em função da deformação específica de cada grupo de amostras analisadas:

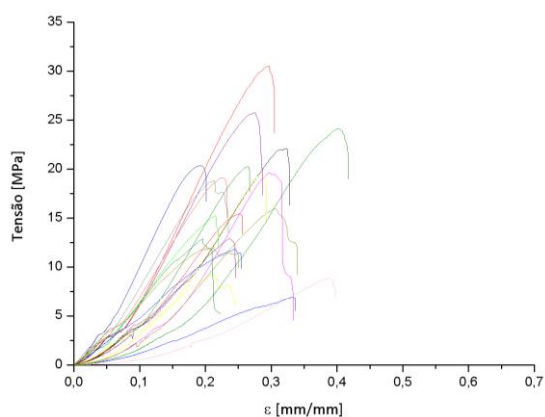


Figura 28: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB convencional
(Fonte: Próprio autor)

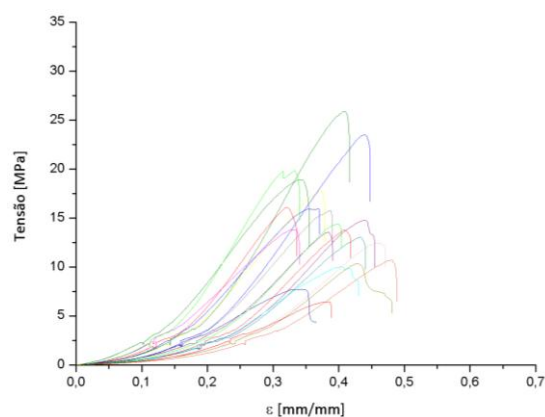


Figura 29: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB convencional com pressão
(Fonte: Próprio autor)

Na figura 28, estão representados os resultados das amostras de PB convencional sem pressão o qual mostrou uma deformação específica menor quando comparada a figura 29 das amostras de PB convencionais sob pressão.

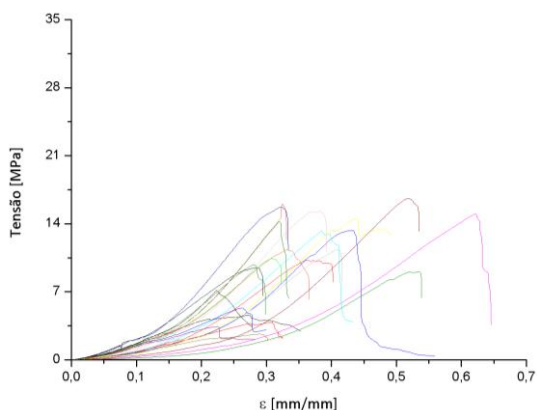


Figura 30: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB descelularizado (Fonte: Próprio autor)

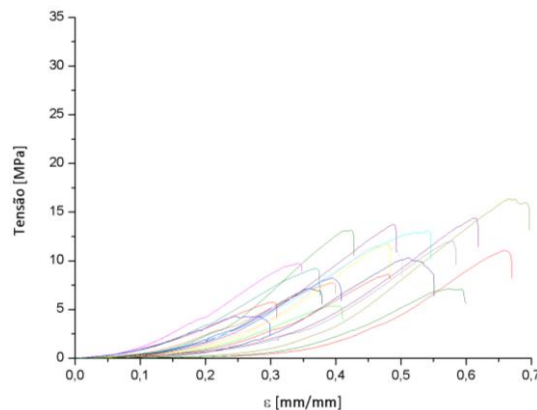


Figura 31: Gráfico das curvas da variação tensão em função da deformação específica das amostras de PB descelularizado com pressão (Fonte: Próprio autor)

Na figura 30, estão representados os resultados das amostras de PB descelularizado sem pressão o qual mostrou uma deformação específica menor quando comparada a figura 31 das amostras de PB convencionais sob pressão.

E quando os quatro gráficos são comparados entre si, observa-se que a deformação específica é maior nas amostras em que os PB foram descelularizados e posteriormente fixados em solução de GDA 0,2% e 0,5% sob pressão, representado pela figura 31.

É possível verificar também a semelhança das curvas tensão x deformação específica das amostras acima analisadas com a curva dos tecidos de colágenos já estudados, descritos por SMITH, 2012, onde se obtêm 3 regiões diferentes, no início onde se observa um comportamento não linear, seguida de uma região relativamente linear e finalizando com uma região não linear. Para melhor esclarecimento, ver figura 13.

5.1.2 Gráficos de colunas: Também feitos no OriginPro 8, através dos gráficos de colunas pode-se visualizar o desvio padrão obtido em cada grupo.

5.1.2.1 Gráficos de colunas da tensão máxima para médias e desvio padrão das amostras analisadas:

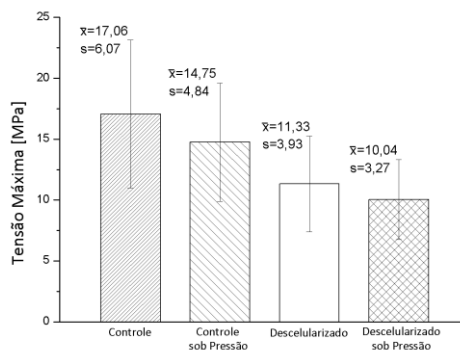


Figura 32: Gráfico da tensão máxima das amostras
(Fonte: Próprio autor)

No gráfico acima na figura 32, percebe-se que nas amostras de PB convencionais com pressão mostrou uma tensão máxima menor do que as amostras de PB convencionais sem pressão. O mesmo comportamento se dá quando comparamos as amostras dos PB descelularizados com e sem pressão.

5.1.2.2 Gráficos de colunas da percentagem de alongamento para médias e desvio padrão das amostras analisadas:

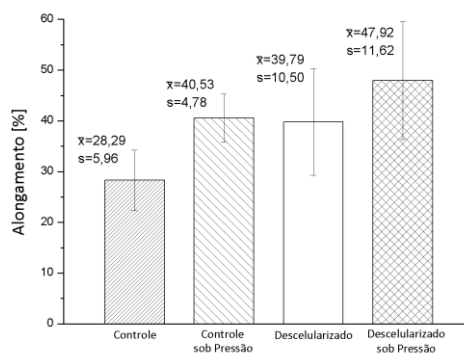


Figura 33: Gráfico do alongamento percentual das amostras
(Fonte: Próprio autor)

Como visualizado no gráfico acima na figura 33, pode-se notar que nas amostras de PB convencionais com pressão obteve-se um alongamento maior do que as amostras de PB convencionais sem pressão. O mesmo comportamento se dá quando comparamos as amostras dos PB descelularizados com e sem pressão.

5.1.3 Gráfico *Boxplot*:

No *boxplot* se pode observar informações sobre os quartis que representam a amostra, média e possíveis *outliers*. Na parte superior da caixa encontra-se o terceiro quartil (Q3), onde 25% das amostras estão acima deste valor, a parte inferior da caixa é representada pelo primeiro quartil (Q1) indicando que 75% das amostras estão acima deste valor. Já no meio da caixa é colocada o segundo quartil (Q2), ou mediana. As linhas que se estendem a partir da caixa são chamadas de *whiskers* ou bigodes e representam os intervalos do primeiro e terceiro quartil para os seus extremos dentro de seus respectivos limites inferiores e superiores. Não foram observados *outliers* (MONTGOMERY, 2003).

5.1.3.1 Gráfico *Boxplot* da tensão máxima para médias das amostras analisadas com os valores representados na figura:

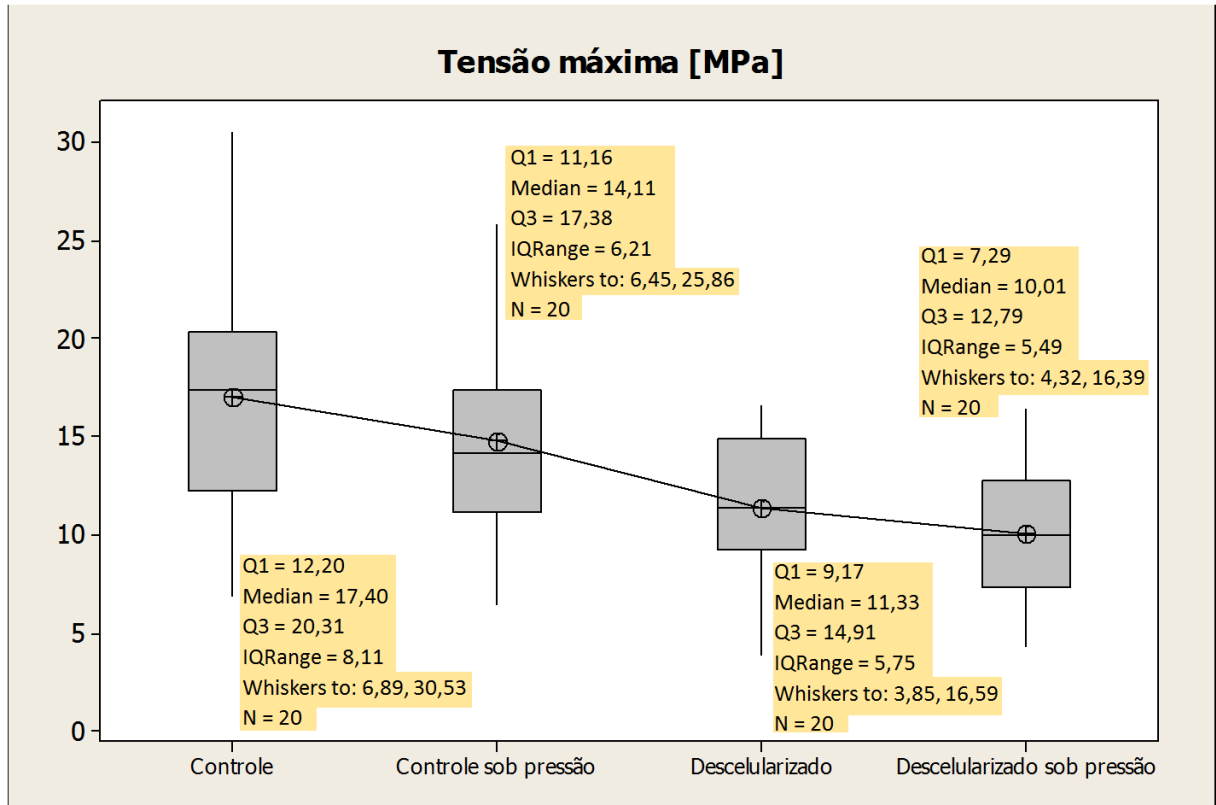


Figura 34: Gráfico *boxplot* com dos valores da Tensão máxima das amostras (Fonte: Próprio autor)

Na análise da variância da tensão máxima, o p – valor foi de 0,000 o qual é menor do que os 0,05%, valor mínimo para um nível de significância de 95%. O que indica que as amostras possuem valores para a tensão máxima significativamente diferentes.

5.1.3.2 Gráfico *Boxplot* da percentagem do alongamento para médias das amostras analisadas com os valores representados na figura:

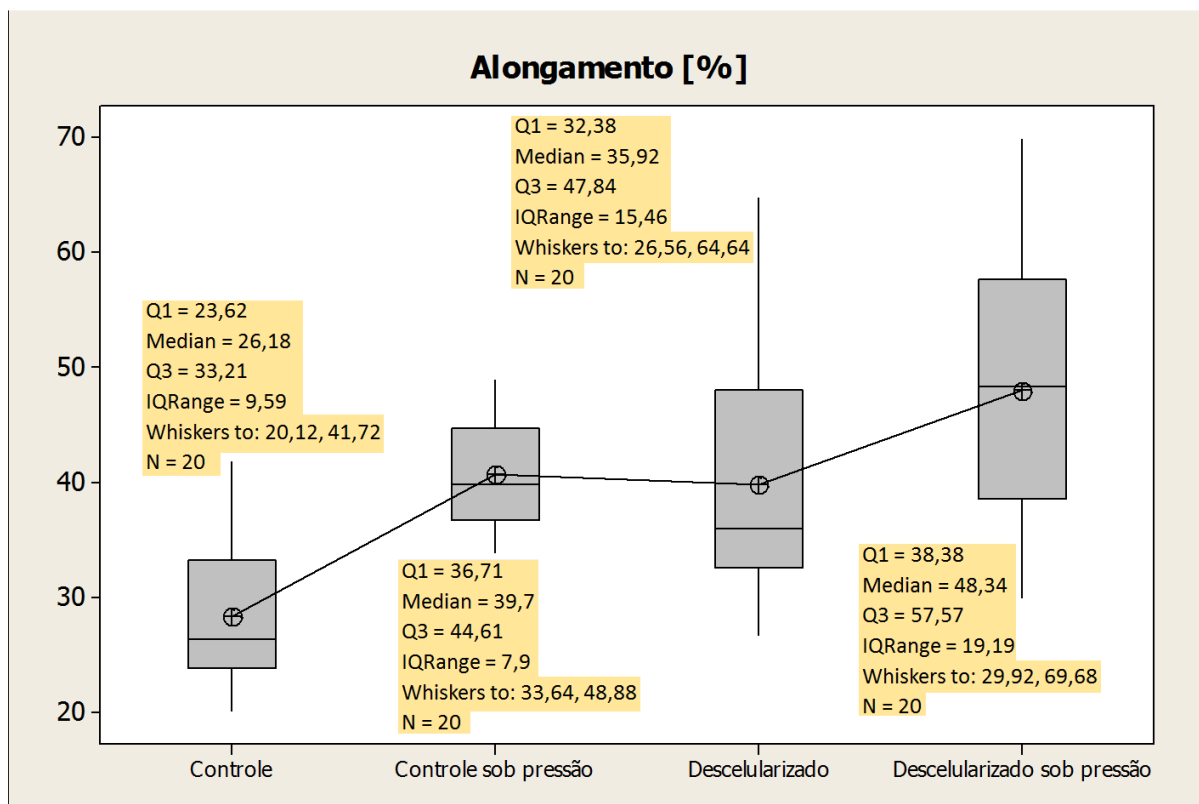


Figura 35: Gráfico *boxplot* com os valores obtidos para o percentual do alongamento das amostras (Fonte: Próprio autor)

Na análise da variância do percentual de alongamento, o p – valor foi de 0,000 o qual é menor do que os 0,05%, valor mínimo para um nível de significância de 95%. O que indica que as amostras possuem percentuais de alongamento significativamente diferentes.

5.1.4 Gráfico das análises dos resíduos:

5.1.4.1 Gráfico das análises dos resíduos da tensão máxima para médias das amostras analisadas:

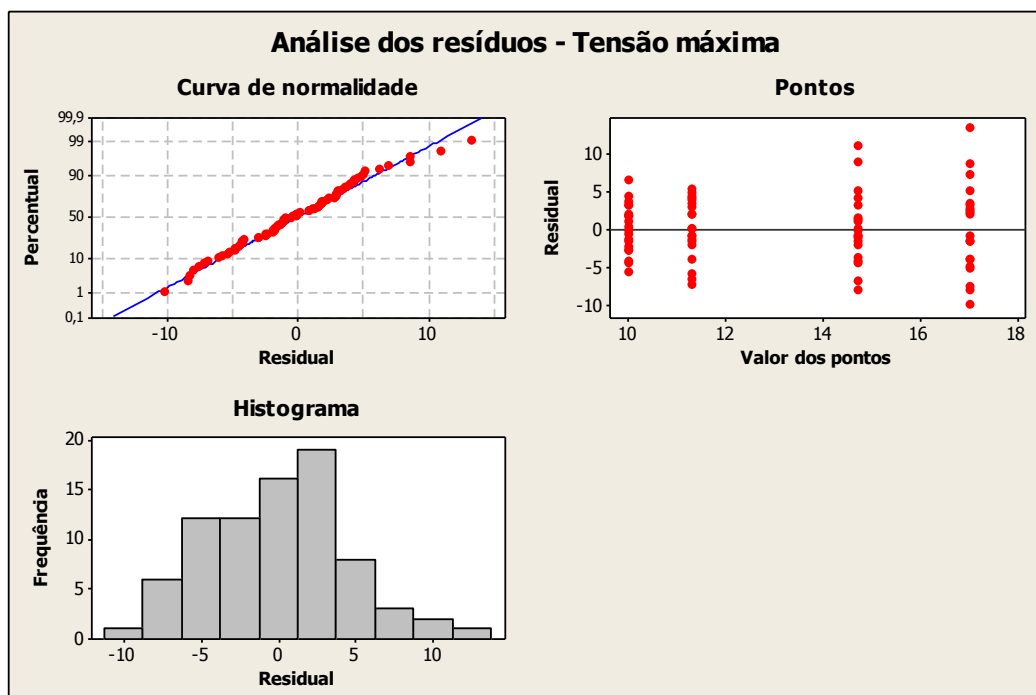


Figura 36: Gráfico da análise dos resíduos da tensão máxima para as médias das amostras analisadas (Fonte: Próprio autor)

A análise dos resíduos serve para validação do modelo matemático da análise da variância. Violações das suposições básicas a adequação ao modelo da análise da variância, podem ser investigadas pela análise dos resíduos. Os resíduos devem ser desestruturados não apresentando nenhum padrão. Analisando os gráficos dos resíduos não se observa nenhum padrão, os pontos estão aproximadamente distribuídos ao longo da curva da normalidade e os pontos estão simétricos em relação ao eixo zero.

5.1.4.2 Gráfico das análises dos resíduos do alongamento percentual para as médias das amostras analisadas:

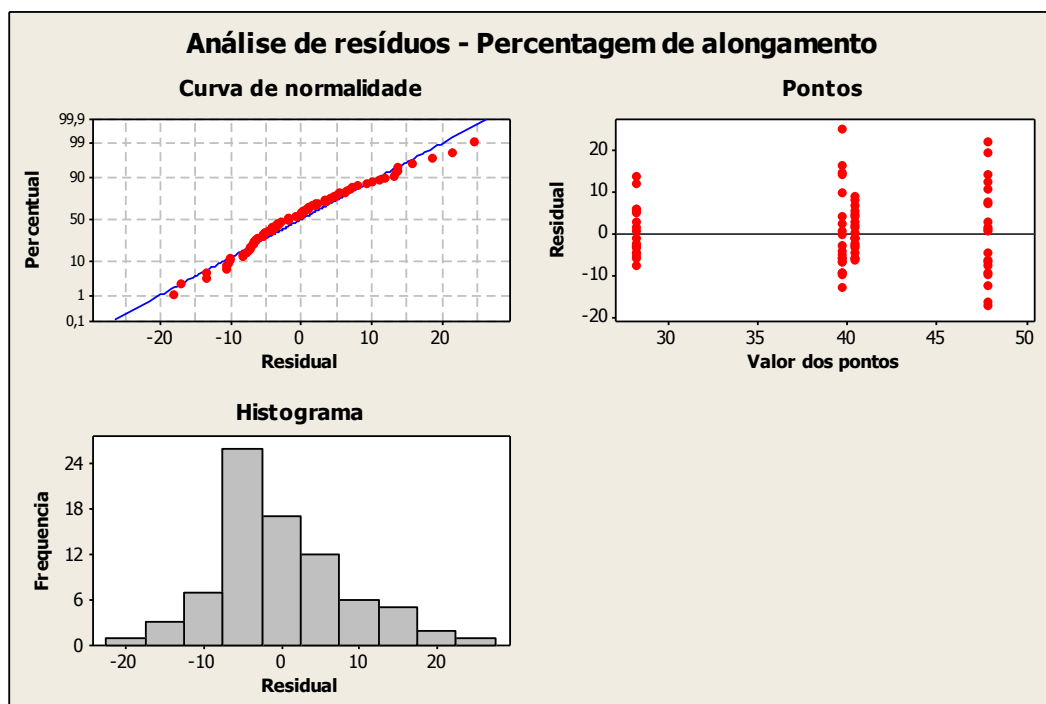


Figura 37: Gráfico da análise dos resíduos do alongamento percentual para as médias das amostras analisadas (Fonte: Próprio autor)

As mesmas análises feitas para os resíduos anteriores valem para os gráficos da figura 37.

5.1.5 Gráficos de intervalo de confiança:

5.1.5.1 Gráfico dos intervalos de confiança da tensão máxima para a média das amostras analisadas:

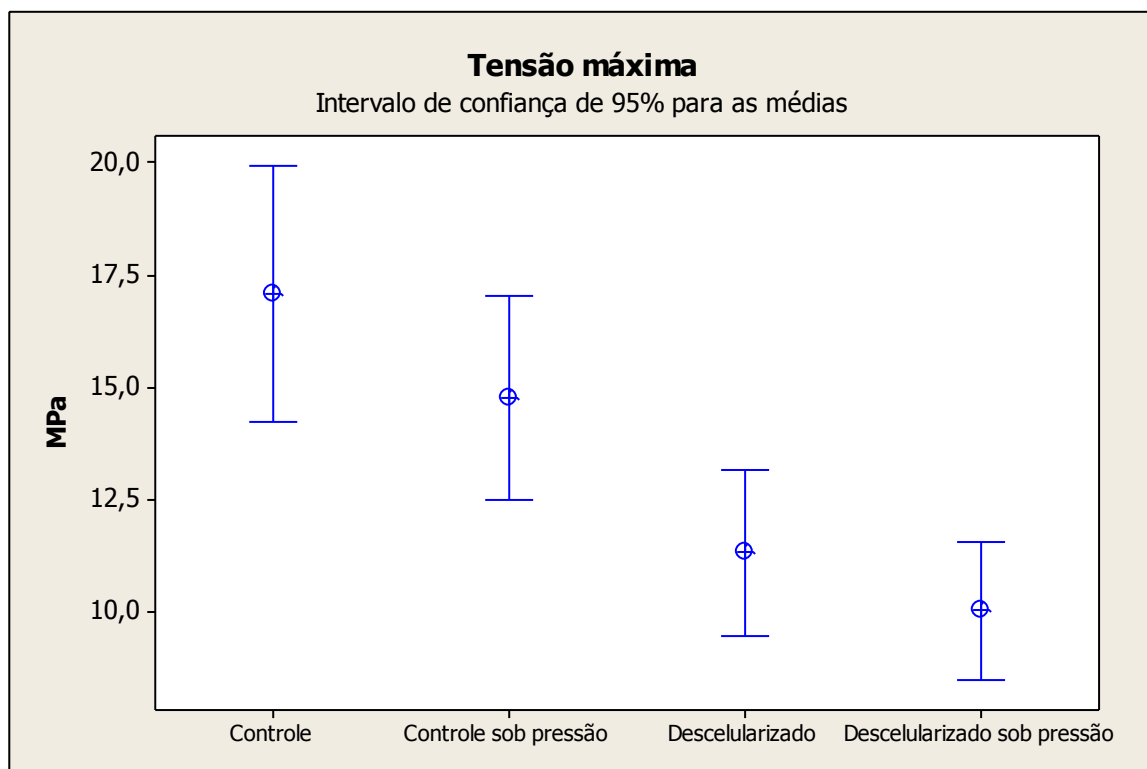


Figura 38: Gráfico dos intervalos de confiança da tensão máxima para as médias das amostras analisadas (Fonte: Próprio autor)

Pelos intervalos de confiança de 95% da média pode-se concluir que o tecido que recebeu o tratamento convencional apresentou valor superior aos demais. Pode-se concluir que os tratamentos convencionais com ou sem pressão apresentaram médias de tensão máxima superiores aos demais.

5.1.5.2 Gráfico dos intervalos de confiança do percentual de alongamento para a média das amostras analisadas:

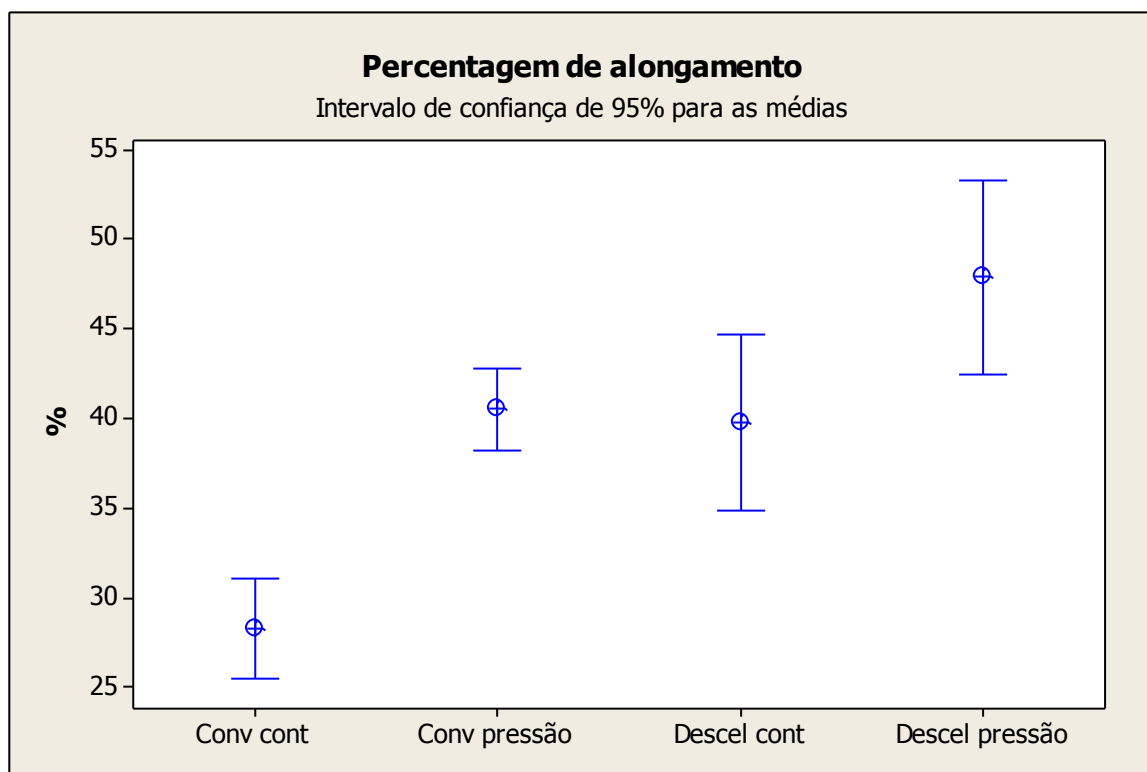


Figura 39: Gráfico dos intervalos de confiança do percentual de alongamento para as médias das amostras analisadas (Fonte: Próprio autor)

Pelos intervalos de confiança de 95% da média pode-se concluir que o tratamento descelularizado com pressão apresentou valores superiores aos demais. Pode-se concluir que os tratamentos descelularizados apresentam percentuais do alongamento superiores aos tratamentos controle.

5.2 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE TENSÃO MÁXIMA E PERCENTUAL DE ALONGAMENTO COM OUTROS TRABALHOS REALIZADOS:

Comparando-se os valores obtidos com os dados de alguns outros autores que também estudaram as propriedades mecânicas do PB podemos verificar:

MATHAPATI, 2013 utilizou SDS 0,5% para descelularização do PB e não utilizou pressão em suas amostras, obteve um resultado de tensão máxima de $7,48 \pm 0,41$ MPa e percentagem de alongamento de $24,74 \pm 1,13$ %.

LUZIA, 2012 em seu trabalho também comparou o PB convencional sem pressão e utilizou o mesmo tratamento químico utilizado no trabalho atual para os pericárdios convencionais, obteve um resultado médio de tensão máxima de 25,20 MPa com desvio padrão de 4,47 MPa e para a percentagem de alongamento uma média de 26,03% com desvio padrão de 3,48%. Para as amostras descelularizadas sem pressão utilizando também a mesma solução para a descelularização obteve valores de tensão máxima de 12,99 MPa com um desvio padrão de 5,03 MPa e para a percentagem de alongamento uma média de 40,26% com desvio padrão de 7,81%.

SÁNCHEZ, 2010 trabalhou com o PB liofilizado após reticulação do mesmo com GDA e obteve uma tensão máxima em primeiro teste para as fibras também no sentido longitudinal de aproximadamente 17 MPa.

COSTA, 2005 que para o grupo controle fez uso do GDA 0,5% para fixação do PB, obteve um valor médio para tensão máxima em torno de 28,44 MPa e a percentagem de alongamento próximo de 19%. Para o grupo que foi descelularizado com DMSO 6% teve uma tensão máxima de 9,81 MPa e alongamento em torno de 23%. Na tabela abaixo se pode visualizar os resultados obtidos dos trabalhos acima citados.

Tabela 1: Comparação dos resultados da tensão máxima e percentual de alongamento obtido em outros trabalhos.

Autor	Ano	PB fixado com GDA	% GDA utilizada	Tensão máx. [MPa]	Alongamento [%]	PB descel.	Solução utilizada	Tensão máx. [MPa]	Alongamento [%]
PERUZZO	2013	Sem pressão	0,2% 0,5%	$\bar{x}=17,06$ $s=6,07$	$\bar{x}=28,29$ $s=5,96$	Sem pressão	PUC-PR I	$\bar{x}=11,33$ $s=3,93$	$\bar{x}=39,79$ $s=10,50$
PERUZZO	2013	Com pressão	0,2% 0,5%	$\bar{x}=14,75$ $s=4,84$	$\bar{x}=40,50$ $s=4,79$	Com pressão	PUC-PR I	$\bar{x}=10,04$ $s=3,27$	$\bar{x}=47,92$ $s=11,62$
MATHAPATI	2013	—	—	—	—	Sem pressão	SDS 0,5%	$\bar{x}=7,48$ $\pm 0,41$	$\bar{x}=24,74$ $\pm 1,13$
LUZIA	2012	Sem pressão	0,2% 0,5%	$\bar{x}=25,20$ $s=4,47$	$\bar{x}=26,03$ $s=3,48$	Sem pressão	PUC-PR I	$\bar{x}=12,99$ $s=5,03$	$\bar{x}=40,26$ $s=7,81$
SÁNCHEZ	2010	Liofilizado sem pressão	0,5%	$\bar{x}=17,00$	—	—	—	—	—
COSTA	2005	Sem pressão	0,5%	$\bar{x}=28,44$	$\bar{x}=19,00$	Sem pressão	DMSO 6%	$\bar{x}=9,81$	$\bar{x}=23,00$

Fonte: (COSTA, 2005; SÁNCHEZ, 2010; LUZIA, 2012)

Os parâmetros físicos analisados como tensão máxima e percentual de alongamento do PB sem pressão, quando comparados aos resultados obtidos de outros autores, mesmo que utilizando concentrações de GDA diferentes, pode-se dizer que os mesmos são semelhantes.

O mesmo se dá quando comparados os resultados obtidos no atual trabalho com o trabalho de LUZIA, 2012 que utilizou o mesmo processo para descelularização.

5.3 Análises complementares:

5.3.1 Temperatura de encolhimento:

A temperatura de encolhimento serve para verificar se houve fixação do GDA sobre as fibras de colágeno.

Foi realizado o teste de temperatura de encolhimento por amostragem para todos os grupos.

Foram feitos cortes de 2x4 cm nas amostras testadas. A temperatura foi determinada no momento em que as fibras de colágenos se degradaram, contorcendo o tecido. Foi considerada a temperatura acima de 82°C para garantia da fixação do tecido. Os valores obtidos foram de 82°C à 84°C. Os valores de referência para a fixação do tecido variam de 82°C entre 86°C.

5.3.2 Espessura das amostras:

Na tabela abaixo estão as espessuras do pericárdio bovino pós tratamento em cada grupo:

Tabela 2: Espessura das amostras

Espessuras em mm	Amostras PB convencionais sem pressão	Amostras PB convencionais com pressão	Amostras PB descel. sem pressão	Amostras PB descel. com pressão
Média	0,39	0,34	0,51	0,44

Fonte: (Próprio autor)

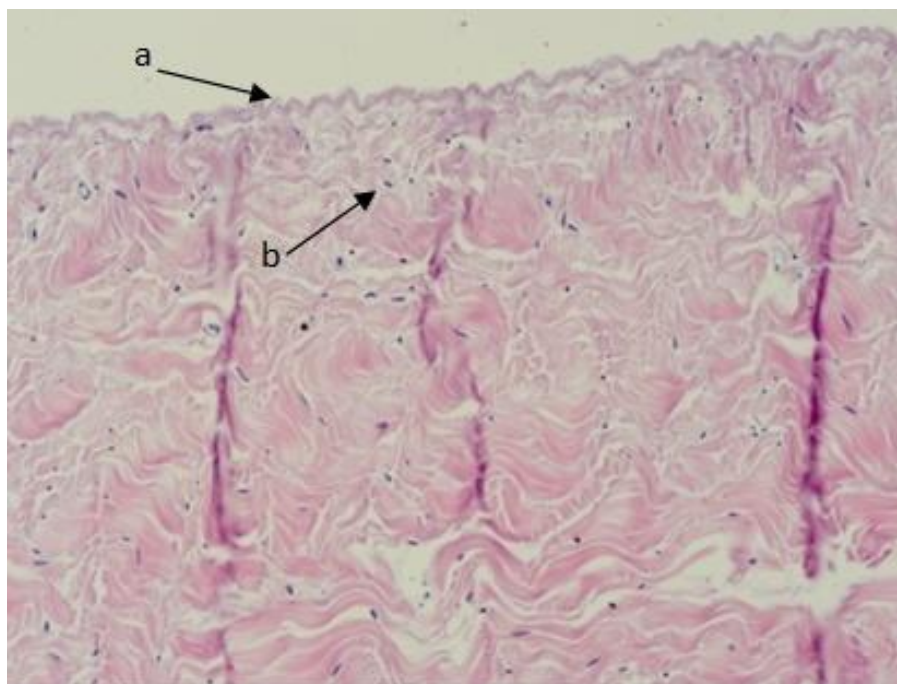
Foi observada a diferença entre as médias das espessuras dos PB descelularizados com e sem pressão. Onde se percebe que após o procedimento com pressão as espessuras diminuem aproximadamente 13%. Isso é devido ao edemaciamento do tecido quando submetido ao processo químico e quando no mesmo é feito com pressão ocorre a saída do excesso de líquido do tecido.

No PB submetido à descelularização a espessura é maior devido a retirada das células e demais componentes restando quase que apenas as MEC onde o edemaciamento é maior do que no PB não descelularizado.

Este fator deve ser considerado no momento da fabricação das válvulas, uma vez que as mesmas são submetidas a um processo de pressão mecânica, embora com valor desconhecido.

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA:

Na figura 40, tem-se um fragmento de PB fresco (sem tratamento químico) corado em H&E, onde se observa a integridade das fibras de colágeno (a) e a presença de células em todo o tecido (b)



**Figura 40: Fragmento de PB fresco, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.
a: preservação da ondulação das fibras de colágeno. b: Presença de células
(Fonte: Próprio autor)**

Na figura 41, tem-se um fragmento de PB do grupo I, o qual foi submetido ao tratamento químico convencional sem pressão, corado em H&E, onde se observa a preservação das fibras de colágeno já fixado pelo GDA (a) e a presença de células em todo o tecido (b).

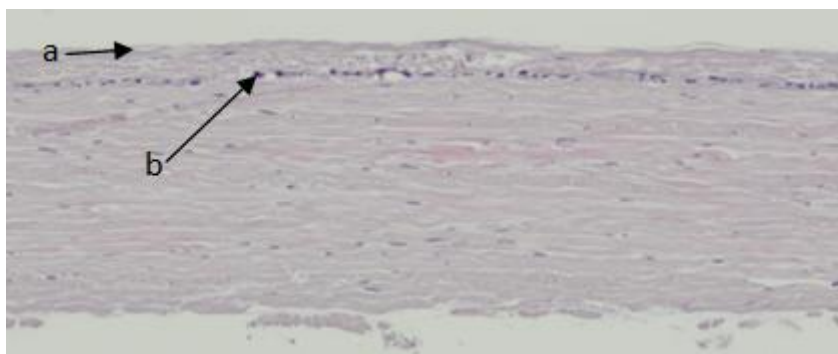


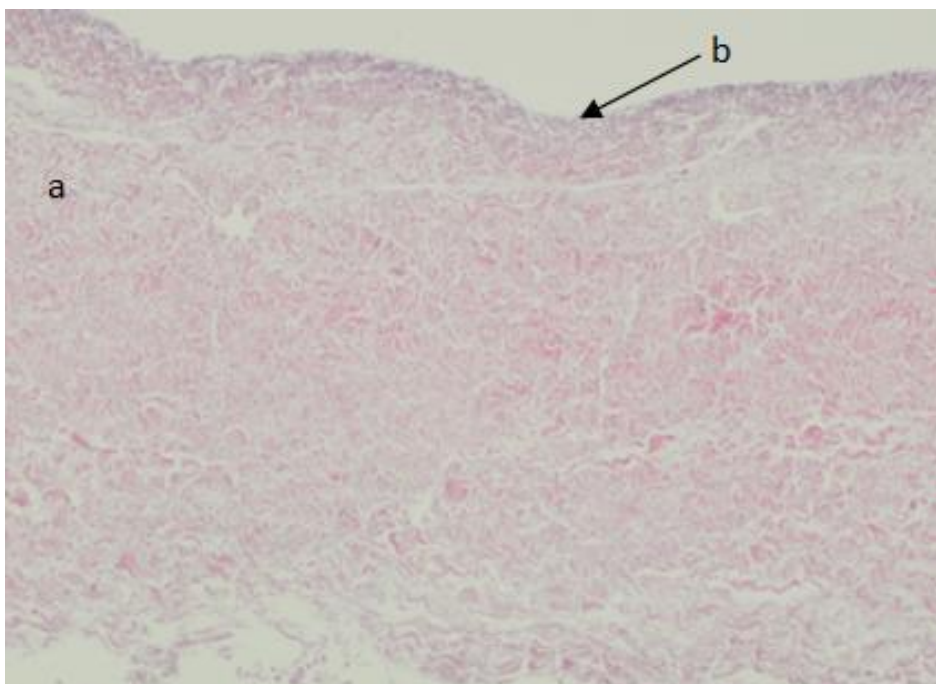
Figura 41: Fragmento de PB do grupo I, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.

a: preservação da ondulação das fibras de colágeno

b: presença de células após processo químico convencional sem pressão.

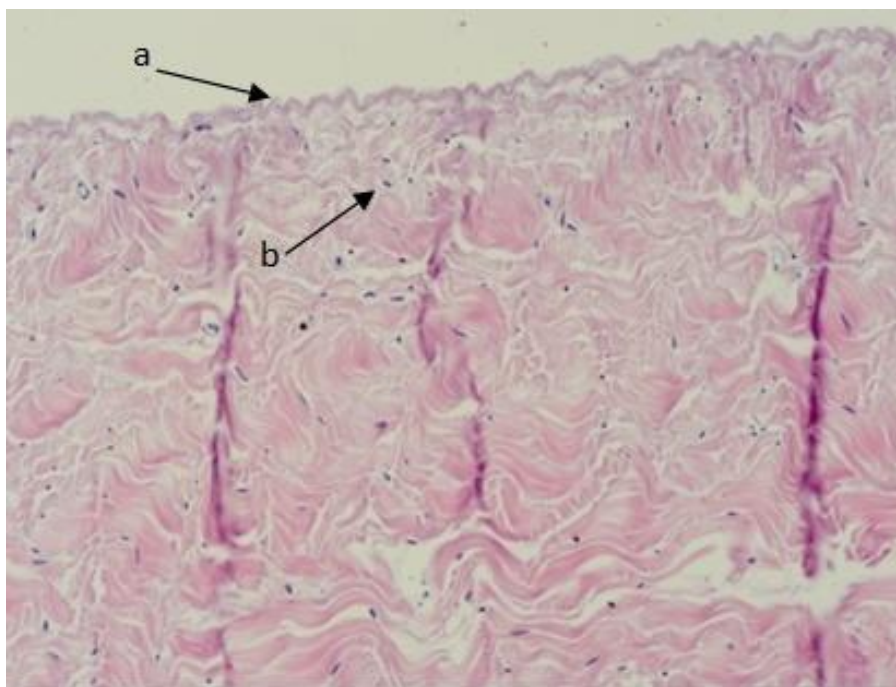
(Fonte: Próprio autor)

Na figura 42, é possível visualizar um fragmento de PB do grupo II, o qual foi submetido ao processo de descelularização sem pressão, onde nota-se a ausência de células em todo o segmento (a) e a preservação das ondulações das fibras de colágeno (b).



**Figura 42: Fragmento de PB do grupo II, corado por H&E visualizado com aumento de 200x.
a: ausência de células após processo de descelularização em todo segmento.
b: preservação das ondulações das fibras de colágeno
(Fonte: Próprio autor)**

Na figura 43, tem-se um fragmento de PB do grupo III, o qual foi submetido ao processo de convencional com pressão de 240 mmHg, onde nota-se a presença de células em todo o segmento (a), a preservação das ondulações das fibras de colágeno (b) e uma compactação parcial na porção média do tecido (c).



**Figura 43: Fragmento de PB do grupo III, corado por H&E visualizado com aumento de 100x.
a: presença de células após processo convencional, b: preservação da ondulação das fibras de colágeno.
c: uma compactação parcial na porção média do segmento.
(Fonte: Próprio autor)**

A figura 44 representa um fragmento de PB do grupo IV, o qual foi submetido ao processo de descelularização e em seguida fixação com GDA com pressão de 240 mmHg. É possível observar a ausência de células em todo o segmento (a), a preservação das ondulações das fibras de colágeno (b) e uma compactação parcial na porção média do tecido (c).

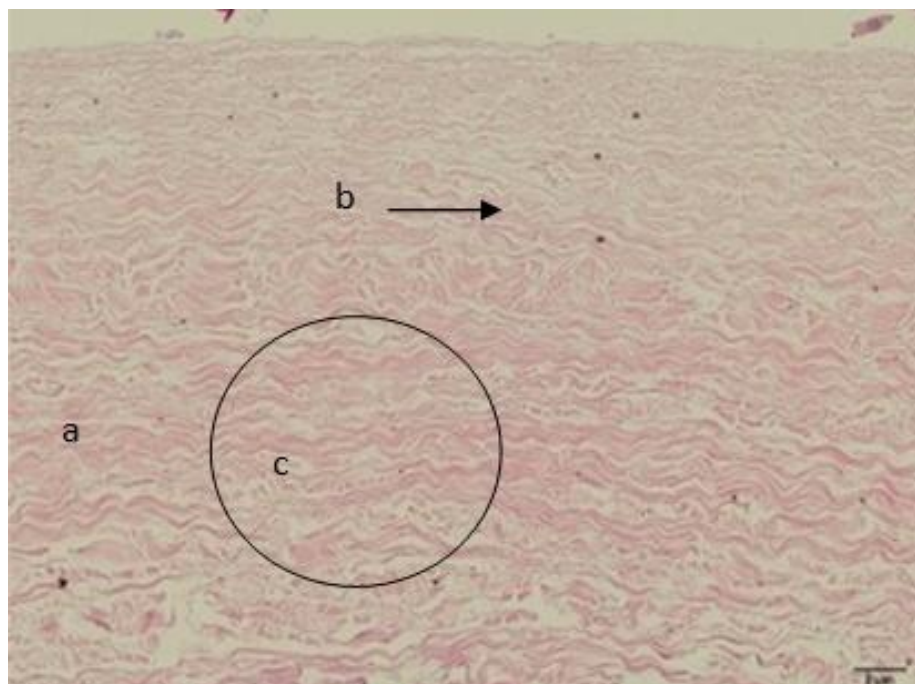


Figura 44: Fragmento de PB do grupo IV, corado por H&E visualizado com aumento de 100x.
a: ausência de células após processo de descelularização em todo segmento.
b: preservação das ondulações das fibras de colágeno.
c: uma compactação parcial na porção média do segmento após pressão de 240 mmHg.
 (Fonte: Próprio autor)

As fibras colágenas dos pericárdios submetidos ao tratamento convencional e os descelularizados ambos submetidos à pressão de 240 mmHg sofrem uma compactação parcial na porção média do segmento. Esta alteração embora evidente não gera danos significativos ao tecido do pericárdio, o qual mantém sua histoarquitetura.

Um dos fatores fundamentais para ser levado em consideração a respeito dos resultados obtidos é a heterogeneidade do tecido biológico em estudo, o qual não tem propriedades mecânicas exatas.

Em relação ao dispositivo de medição mesmo que seja preciso, calibrado, o ensaio controlado e operador treinado, sempre ocorrerá alguma dispersão ou variabilidade dos dados coletados a partir de diferentes amostras do mesmo tecido (CALLISTER, 2013).

A norma ISO 5840 de 2005 e 2009 sobre implantes cardiovasculares – próteses

cardíacas se refere ao teste de tração como um dos itens de ensaio a ser realizado se possível, porém não há valores de referência definido.

Cabe lembrar que os resultados dos ensaios obtidos são apenas uma pequena etapa para avaliação de um tecido biológico para introdução de novas técnicas na confecção de válvulas cardíacas ou outro dispositivo implantável que venha a utilizar o PB descelularizado. É necessário enfatizar a importância de outros ensaios conforme norma estabelecida para fabricação de válvulas, incluindo ensaios de hidrodinâmica, durabilidade, toxicidade entre outros ensaios *in vitro*, também os estudos pré – clínicos experimentais em animais onde é possível demonstrar a eficácia da prótese antes de partir para estudos clínicos (COSTA, 2005; PERUZZO, 2012).

6 CONCLUSÃO

A tensão máxima de pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas foi menor do que os demais grupos estudados.

A deformação específica de pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas foi maior em relação aos demais grupos e o mesmo foi observado para o percentual de alongamento.

A presença de células nos pericárdios bovinos descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas não foi verificada.

Foi verificada a preservação das fibras de colágeno em pericárdios bovino descelularizados, submetidos à pressão, para aplicação em válvulas cardíacas e também nos demais grupos estudados.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista a variação do alongamento e tensão máxima principalmente nas amostras que foram submetidas à pressão, é sugerido um estudo na variação das pressões para verificar a constância dos resultados.

Também se sugere um estudo mais aprofundado no comportamento mecânico do tecido uma vez que não se tem valores normalizados para o ensaio de tração em pericárdio bovino para utilização em válvulas cardíacas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE, Inc. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, **International Standardization Organization 5840** (2005), “Cardiovascular implants” – Cardiac valve prostheses”.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard test Method for Tensile Properties of Plastics. **ASTM D-638-10**. West Conshohocken, PA, USA. 2012.

ALBERTS, Bruce. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 978 – 979.

ANDERSON, J. PAUL. Purification and Quantitation of Glutaraldehyde and its effect on several enzyme activities skeletal muscle. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.15, n.11, p 652-654, sep. 1967.

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA. Núcleo de Enxertos Cardiovasculares Francisco D. A. Costa, Eduardo D. Vieira, João Gabriel Roderjan. Método para tornar um tecido biológico acelular, receptivo a novas células e pouco imunogênico. BR n. PI800603-2, 10 abr. 2008.

BARG, Nelson. **Palestra: Válvulas: Anatomia e fisiologia, o coração, válvulas cardíacas, válvula mitral e aórtica**. Rio de Janeiro: Auditório Prof. José Lessa – Biocárdio, 2011.

BRAUNWALD, Eugene. **Atlas de doenças cardiovasculares**. Porto Alegre: Artmed, 1998. Não paginado.

BAUCIA, J.A., *et. al.* Anti-calcifying treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: comparisons and evaluation of possible synergic effects. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** v.21, n.2, São José do Rio Preto. Abril/Junho, 2006.

BRAILE, D. M., GODOY, M. F., SOUZA, D. R. S., M. L. OLIVEIRA, A.P. M. L., LEAL, J. C., ARAÚJO, R. B., GOISSIS, GILBERTO. Estudo comparativo in vitro entre biopróteses de pericárdio bovino e porcino. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v.11, n.4, p.270-3, 1996.

BRAILE, D. M., SOARES, M.J.F., D.R.S. SOUZA, V.D.A. RAMIREZ, SUZIGAN, S. Mapping of Bovine pericardium: physical and histopathologic tests. **J. Heart Valve Dis.**, v.7, n.2, p. 202-6, 1998.

BRAILE, D. M., VOLPE, M. A., RAMIN, S. L. Tratamento cirúrgico das valvopatias. Parte 1. **Rev. Brás. Cir. Cardiovasc.**, v.9, n.2, p.113-22, 1994.

BRITISH STANDARDS. BS EM ISO 5840:2009 – Cardiovasculares Implantes – Cardiac valve prostheses. Approved by CEN on April 2009.

CALLISTER, WILLIAN D., RETHWISCH, DAVID G. **Ciência e engenharia de materiais uma introdução**. Rio de Janeiro: LTC, 2013. Cap6, p.128-168.

CARDIOPRÓTESE LTDA. **Documentação interna, não disponível para consulta**. 2006.

CARDIOPRÓTESE LTDA. **Documentação interna, não disponível para consulta**. 2013.

CARPENTIER A., LEMAIGRE G., ROBERT L., CARPENTIER S. M., DUBOST C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. **J. Thorax. Cardiovasc. Surg.** v.58, p.467-483, 1969.

CARPENTIER, S.M. *et al.* Heat treatment mitigates calcification of valvular biopróteses. **Ann Thorax. Surg.** v. 66(6 Suppl), p.264-6. 1998.

COLLATUSSO, C. Descelularização como método de anticalcificante em próteses valvares de pericárdio bovino sem suporte: estudo em ovinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular.** v.26, n.3, p.419-26. 2011.

COLLATUSSO, C., RODERJAN, J.G., VIEIRA, E.D., COSTA, F.D., NORONHA, L., FORNAZARI, D. de F. Effect of SDS-based decellularization in the prevention of calcification in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium: study in rats. **Revista brasileira de cirurgia cardiovascular** : órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular. v.27, n.1, p.88-96, 2012.

COSTA, F. D. A. *et. al.* Resultados iniciais com a bioprótese de pericárdio bovino cardioprótese. **Rev. Méd.** Curitiba, Paraná, v.44, n.1/2, p.14-23, jan/jun. 1986.

COSTA, F. D. A. *et. al.* Estudo experimental com heteroenxertos valvares descelularizados – a prótese do futuro. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular.** v.19, n.1, p.74-82. 2004.

COSTA, J. N. L., et.al. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado a confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Rev. Bras. Cardiovasc.** v.20, n.1, p.14-22. 2005.

COSTA, J. N. L. **Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado a confecção de biopróteses valvares cardíacas.** 2005. 133f. (Tese de Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://ebookbrowse.com/tese-jean-newton-lima-costa-pdf-d347932842>>. Acesso em: 25 de julho de 2013.

COURTMAN, D. W., PEREIRA, C.A., KASHEF, V., MCCOMB, D., LEE, J.M., WILSON, G.J. development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. **J. Biomedmater Res.**, v. 28, n. 6, p. 655-66, 1994.

FERREIRA, A. D. A, et. al. Glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats. **Rev. Bras. Crir. Cardiovasc.** São José do Rio Preto. v.22, n.3, [s.n.], July/Sep. 2007.

GILBERT, T.W., SELLARO, T.L., BADYLAK, S.F., Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials.** v.27, p. 3675-83, 2006.

GOISSIS, G. G. et. al. Reticulação progressiva de pericárdio bovino com glutaraldeído para confecção de válvulas cardíacas biológicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São José do Rio Preto, 9p., abr/Jun. 1998.

GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno tipo I: correlação estrutura: atividade biológica.** 2007. 122f. (Tese de Mestrado m Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.google.com.br/#sclient=psy-ab&q=tese+de+doutorado+ana+Paula+abdalla+goissis>>. Acesso em: 25 de agosto de 2013.

GRIMM, M., et.al. Biocompatibility of aldehy-fixed bovine pericardium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** v.102, p.195-201, 1991.

HORST-DIETER, Dellmann. **Histologia Veterinária de Dellmann.** Barueri - São Paulo: Manole, 2012. 6ª ed., Cap.7, p.130.

IONESCU, M.I., PAKRASHI, B.C., HOLDEN, M.P., MARY,A., WOOLER,H.G. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia late and pericardial grafts. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** v.64, n.3, p.340-53. 1972.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica.** 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. xv, p104-105.

KASIMIR, M.T., RIEDER, E., SEEBACHER, G., SILBERHUMER, G., WOLNER, E., WEIGEL, G., et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **The International journal of artificial organs**. v.26, n.5, p.421-7 2003.

LANZA, R., Langer, R., Vacanti, J. P. **Principles of tissue engineering**. Copyrighted Material, 2011. 2^aed., Cap. 4, p. 585-601.

LOPES, S.A.V. et al. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. **Ver Bras. Cir. Cardiovasc.** v. 24, n. 1, p. 15-22. 2009.

LUZIA, C. A. O. **Análise da resistência à tração do pericárdio bovino descelularizado com método PUC I**. 2012. 47f. (Trabalho de conclusão do curso de graduação em engenharia mecânica) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

MATHAPATI, S., VERMA, R.S., CHERIAN, K.M., GUHATHAKURTA, S. Inflammatory responses of tissue-engineered xenografts in a clinical scenario. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**. v.12, n.3. p.360-5, 2011.

MATHAPATI, S., et. al. Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering. **Materials Science and Engineering**,v.33, p.1561-72, 2013.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC, 2003. 463p.

NEWELL, James. **Fundamentos da moderna engenharia e ciência dos materiais**. Rio de Janeiro: LTC, 2010. Cap.9, p.234-253.

NOVELO, B.M., et. al. Decellularization of pericardial tissue and its impact n tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. **Acta Biomaterialia**. v.7, p.1241-48, 2011.

NUMATA S, FUJISATO T, NIWAYA K, ISHIBASHI-UEDA H, NAKATANI T, KITAMURA S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: comparison with cryopreservd allograft. **J. Heart Valve Dis**. v.13, n.6, p.984-90, 2004.

PERICÁRDIO BOVINO. Disponível em:

http://2.bp.blogspot.com/_1oJSjOaWsdU/Sra5gdcoTmI/AAAAAAAAAMA/iDUgu3edPE4/s400/camadas+cora%C3%A7%C3%A3.bmp. > Acesso em: 08 set. 2013.

PERUZZO, A.M., COSTA, F.D.A., ABRAHÃO, W.M. Controle microbiológico em valvas cardíacas humanas. **Arq. Bras. Cadiol.** v.86, n.6, p.778-82, 2006.

PERUZZO, A. M., et. al. avaliação da durabilidade em válvulas cardíacas de pericárdio bovino submetidas ao processo químico de descélularização. CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS. 7., 2012, Natal. <http://www.colaob.com.br/anais>.

PEDROSO, M. G. V. P. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA.** (Tese de Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.google.com.br/?gws_rd=cr#output=search&sclient=psy-ab&rlz=1C2BLWB_enBR546BR546&q=Estudo+comparativo+de+col%C3%A1geno+hidrolisado+e+comercial>. Acesso em: 28 de julho de 2013.

PIZA, M. A. **Reticulação de pericárdio bovino com glutaraldeído: efeito da temperatura, tempo de reação e concentrações.** 1997. 81f. (Tese de Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.google.com.br/#output=search&sclient=psyab&q=tese+de+doutorado+marcos+antonio+piza>>. Acesso em: 25 de julho de 2013

PUIG, L. B.; VERGINELLI, G. ; BELLOTTI, G. ; KAWABE, L.; FRACK, C. C. R.; PILEGGI, F.; DÉCOURT, L. V.; ZERBINI, E. J. - **Homologous dura mater cardiac valves: preliminary study of 30 cases.** J. Thorac. Cardiovasc. Surg. v., p 64154-160, 1972.

OSWAL, D., KOROSSIS S., MIRSADRAEE, S., WILCOX, H., WATTERSON, K., FISHER, J., et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. **The Journal of heart valve disease.** v.16, n.2, p.165-74,2007.

RIEDER, E., SEEBACHER, G., KASIMIR, M.T., EICHMAIR, E., WINTER, B., DEKAN, B, et al. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. **Circulation.** v.111, n.21, p.2792-7, 2005.

ROSA, G. R. S., et. al. Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. **Bras. J. Cardiovasc. Surg.** v.23, n.3, p.304-14. 2006.

ROSS, Michael H.; PAWLINA, Wojciech. **Histologia:** texto e atlas : em correlação com biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap 6, p. 170-183.

SANCHEZ, A.F.M. The micromechanical behavior of lyophilized glutaraldehyde - treated bovine pericardium under uniaxial tension. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v.3, p.640-6, 2010.

SCHENKE-LAYLAND, K., VASILEVSKI, O., OPITZ, F., KONIG, K., RIEMANN, I., HALBHUBER, K.J., et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. **Journal of structural biology**. v.143, n.3, p:201-8, 2003.

SCHMIDT, C.E, BAIER, J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. **Biomaterials**. v.21, n.22, p.2215-31, 2000.

SEEBACHER, G., GRASL, C., STOIBER, M., RIEDER, E., KASIMIR, M. T., DUNKLER, D., et al. Biomechanical properties of decellularized porcine pulmonary valve conduits. **Artificial organs**. v.32, n.1, p.28-35, 2008.

SOBOTTA, Johannes; PAULSEN, Friedrich; WASCHKE, Jens. **Sobotta**: atlas de anatomia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 219 e 227.

STEINHOFF G., STOCK U., KARIM N., MERTSCHING H., TIMKE A., MELISS R.R., et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. **Circulation**. v.102, n.19, Suppl 3, p.50-5,2000.

STOCK, U.A, NAGASHIMA, M., KHALIL, P.N., NOLLERT, G.D., HERDEN, T., SPERLING, J.S., et al. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.119, n.4, p.732-40, 2000.

SMITH, W. F., HASHEMI, J. **Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais**. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012. Cap6 e 17, p162, 640-642.

VICENTE, Castro Sebastião. **Anatomia Fundamental**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1985.ap.5, p.204-218.

YOSHIOKA , S. A., GOISSIS, ARAÚJO, G., R. B., RAMIREZ, V. D. A., GODOY, M. F., BRAILE, D. M. Performance hidrodinâmica de bioprótese valvulares cardíacas de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído. **Rev. Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.15, n. 1-2, p. 5-10, jan /ago. 1999.

YOSHIOKA, S. A. **Caracterização *in vitro* do pericárdio bovino reticulado com acetais de glutaraldeído para manufatura de biopróteses valvulares cardíacas**. 2000. 122f. (Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) Universidade de São Paulo, 2000. Disponível em: <<http://www.google.com.br/#sclient=psy->

[ab&q=tese+de+doutorado+S%C3%A9rgio+Akinobu+Yoshioko](#)>. Acesso em 25 de agosto de 2013.

WOODROF, E. A. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue to valves. **J. Bioen.** 1978. v.2, p. 1-9.

ANEXOS

Dados analisados da tensão máxima [MPa] para cada grupo

N° da amostra	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	7,15	4,56	18,92	7,15
2	5,76	10,25	15,79	5,75
3	4,32	10,43	17,80	4,31
4	5,37	13,30	10,74	5,37
5	9,21	15,03	23,51	9,21
6	9,74	9,50	16,11	9,74
7	16,38	13,29	25,86	16,38
8	13,03	15,74	14,79	13,03
9	11,05	7,13	12,43	11,05
10	10,29	9,81	13,54	10,29
11	13,71	15,29	7,72	13,71
12	11,75	11,31	13,80	11,75
13	14,45	5,32	10,05	14,42
14	7,12	3,85	10,36	7,12
15	8,63	9,06	13,84	8,63
16	8,32	11,34	13,06	8,32
17	11,64	14,55	19,87	11,64
18	7,71	16,60	15,97	7,71
19	13,12	14,22	6,45	13,12
20	12,04	16,07	14,39	12,04

Dados analisados da percentagem de alongamento para cada grupo

Nº da amostra	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	32,76	35,28	35,52	37,88
2	30,52	40,20	38,96	31,00
3	22,00	32,32	37,80	29,92
4	33,68	56,00	48,88	41,24
5	33,36	64,64	44,80	37,52
6	24,40	29,48	33,64	34,80
7	22,40	43,40	41,56	69,68
8	33,92	33,36	45,52	54,60
9	20,12	26,56	47,08	66,96
10	24,52	29,84	39,04	55,08
11	41,72	39,24	36,60	49,20
12	39,72	36,56	41,88	50,16
13	28,56	30,04	43,04	61,84
14	25,20	32,56	48,04	60,04
15	25,64	53,84	33,96	48,40
16	24,84	41,68	44,04	40,84
17	23,20	49,32	34,04	48,28
18	29,20	53,44	37,04	39,88
19	23,36	33,56	38,88	42,72
20	26,72	34,48	40,36	58,40