

Reticulação de Matrizes Colagênicas com Diacetais de Glutaraldeído para a Preparação de novos Biomateriais

Sergio A. Yoshioka, Domingos M. Braile, Vladimir Ramirez e Gilberto Goissis

Resumo: Este trabalho descreve a reação de reticulação de matrizes colagênicas por meio de diacetais do glutaraldeído. Materiais preparados por este procedimento embora apresentem propriedades térmicas e mecânicas similares àqueles obtidos com a técnica com glutaraldeído, mostraram-se superiores do ponto de vista morfológico e quanto à estabilidade biológica. Em bases comparativas, a estabilidade biológica foi de 5 a 6 vezes superior. Estes resultados são devidos a uma distribuição mais homogênea e a natureza química bem mais definidas das ligações de reticulação, formadas pela reação dos acetais do glutaraldeído, após sua desproteção pelo tratamento com aminas terciárias. Este procedimento leva a uma impermeabilização menor da matriz, associada a uma toxicidade pós implante menor do que normalmente a apresentada por matrizes colagênicas tratadas com glutaraldeído. Como consequência, materiais com qualidades mecânicas e biológicas superiores são esperados, particularmente para a confecção de biopróteses valvulares cardíacas, com maior durabilidade e menos suscetíveis a processos de calcificação.

Palavras-chave: Colágeno, glutaraldeído, diacetais, reticulação, biopróteses

Introdução

O glutaraldeído (GA) foi introduzido inicialmente na área biológica, como agente de fixação de tecidos¹, para a sua observação através de microscopia eletrônica de transmissão. Sua função é reagir com ϵ -amino grupos de resíduos de lisina, presentes nas proteínas, para formar ligações cruzadas (Fig. 1) por meio de bases de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$). Sua aplicação estendeu-se posteriormente à outras áreas, que incluem técnicas de imobilização de enzimas² e a estabilização de matrizes colagênicas para vários tipos de

aplicações, tais como a confecção de válvulas cardíacas³ ou géis de colágeno injetáveis⁴. Entretanto seu uso na área cardiovascular, principalmente, tem sido frequentemente associado a processos de calcificação, citotoxicidade⁵ e com a deterioração das propriedades mecânicas pós-implante de válvulas biológicas⁶ confeccionadas com pericárdio bovino (PB), um tecido rico em colágeno. Apesar dos vários problemas detectados ao longo de mais de duas décadas de uso na área de biomateriais, o GA ainda continua sendo o método de escolha. A introdução de novos reagentes⁷⁻¹¹, ou mesmo variações metodoló-

Gilberto Goissis, Depto. de Química e Física Molecular - Instituto de Química de São Carlos - USP, Av. Dr. Carlos Botelho 1465, CEP 13560-250, São Carlos, SP; *Sergio A. Yoshioka*, Ciência e Engenharia dos Materiais, USP, São Carlos; *Domingos M. Braile* e *Vladimir Ramirez*, Braile Biomédica S.A. - S. J. Rio Preto - SP.

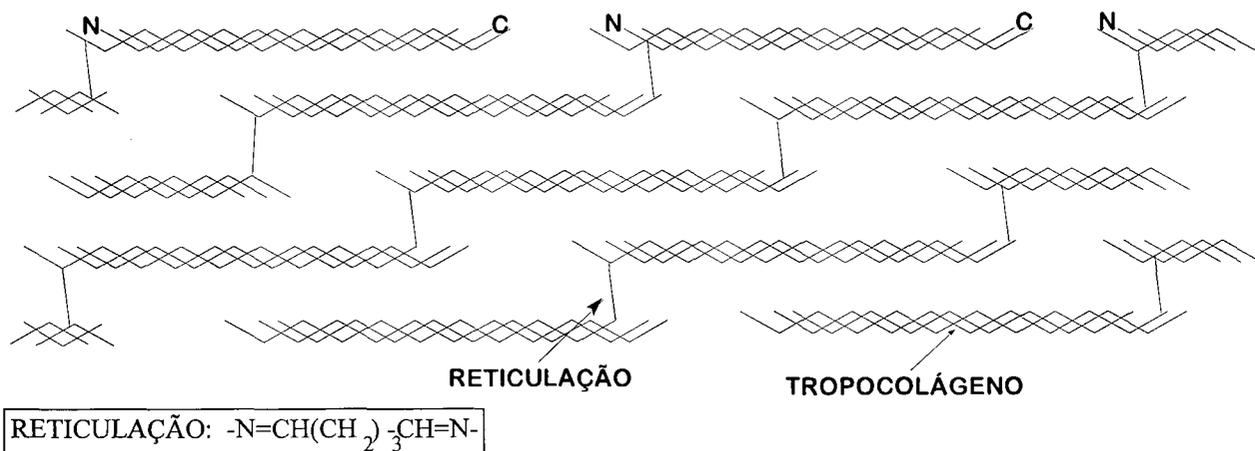


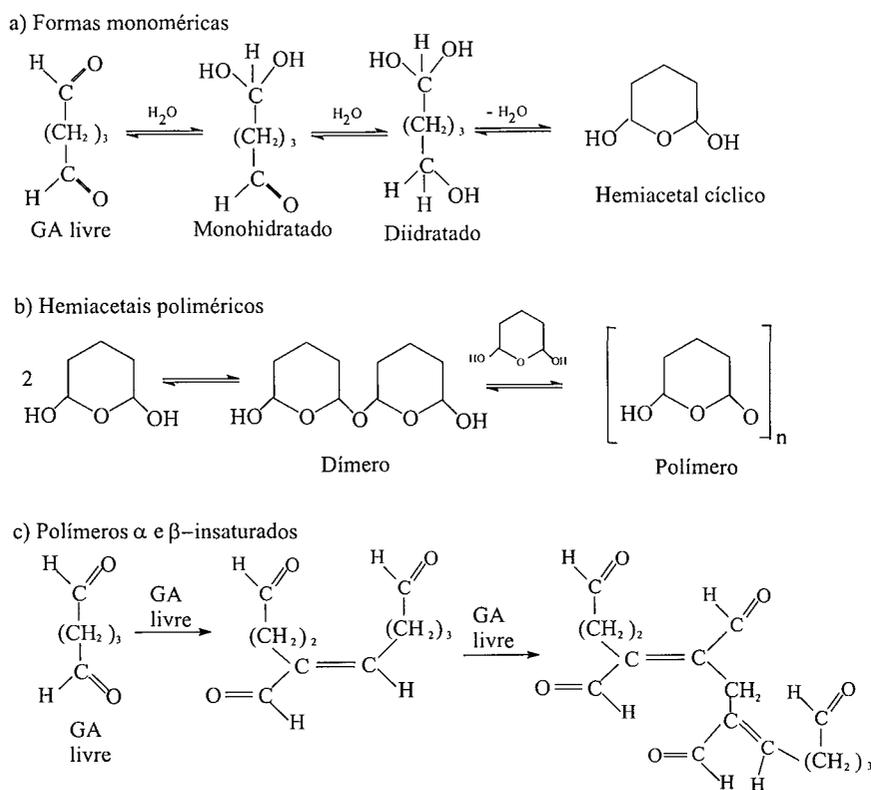
Figura 1. Representação esquemática de reticulação induzida por glutaraldeído em matrizes colagênicas.

gicas envolvendo o GA¹²⁻¹⁵, não apresentaram os resultados desejados, ou os resultados de suas aplicações ainda não têm uma estatística ou tempos suficientes de uso para uma avaliação mais rigorosa de suas performances, principalmente quando aplicados na área cardiovascular.

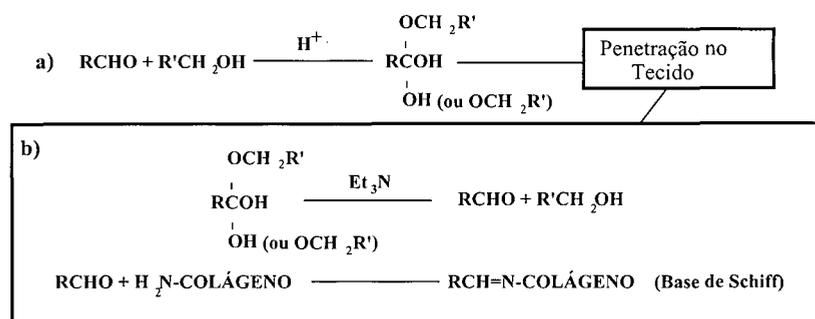
Além da sua toxicidade⁵, dois fatores impõem severas restrições à qualidade dos materiais obtidos com o uso do GA. O primeiro constitui-se na impermeabilização superficial que é induzida em matrizes

colagênicas, que impedem uma reação mais homogênea do reagente com os tecidos e o segundo, é a natureza complexa das soluções de GA empregadas como reagente (Esquema 1), que entre outros problemas propicia a formação de ligações cruzadas poliméricas. Como consequência são obtidos materiais com características estruturais extremamente variáveis.

Na realidade, soluções aquosas de GA são misturas complexas em equilíbrio (Esquema 1), que in-



Esquema 1. Espécies químicas prováveis, presentes em soluções aquosas de GA: (a) formas monoméricas; (b) hemiacetais poliméricos; (c) polímeros α e β -insaturados.



Equilíbrio no Tecido

Esquema 2. Esquema geral para a reação de reticulação de matrizes colagênicas via diacetais do glutaraldeído: a) formação de diacetais e hemiacetais; b) indução da reação de reticulação da matriz com Et_3N e formação da base de Schiff.

cluem além do GA livre, estruturas mono e di-idratadas, hemiacetais cíclicos monoméricos e poliméricos e vários polímeros α e β -insaturados¹⁶, presentes nas concentrações de 4, 16, 9 e 71%, em soluções aquosas de GA a 25% e 25 °C, concentrações essas, variáveis em função da concentração da solução e da temperatura⁶. Enquanto a concentração de GA livre à temperatura ambiente é de apenas 4%, a 50 °C ela alcança valores de 35%⁶. Como consequência, a purificação do reagente antes do seu uso, por processos de destilação ou tratamento por carvão ativado, não garante que biomateriais com características constantes possam ser obtidos, características estas fundamentais para o desempenho, principalmente na área cardiovascular. Além disso, nas condições de utilização do reagente, a contribuição significativa para o efeito citotóxico pós-implante pode estar relacionada com a liberação gradual de glutaraldeído livre¹⁷, a partir de ligações cruzadas formadas por unidades poliméricas do GA. Portanto, muitos dos problemas observados com a utilização de GA como um reagente de proteínas, principalmente na área de biomateriais, podem potencialmente estar associados à natureza complexa do reagente em solução aquosa¹⁶, aspecto nunca abordado pela literatura da área.

Uma alternativa para o uso do GA como reagente de reticulação de proteínas, sob uma forma química melhor definida, está associada à propriedade que aldeídos têm de reagir com álcoois para formar acetais ou hemiacetais¹⁸, formas estáveis em meio ácido, mas que não são estruturas químicas reativas com aminas para a formação da base de Schiff. Portanto o GA na forma de seus diacetais (GADA) corresponde estruturalmente a uma forma quimicamente protegida da função aldeídica, que pode ser ativada pela adição de base e de modo rápido (Esquema 2). Nesta forma protegida, a reatividade do GA pode ser

facilmente controlada, permitindo ao reagente uma difusão mais homogênea no interior da matriz, introduzindo portanto, ligações de reticulação melhor definidas quimicamente e com uma distribuição mais homogênea no interior da matriz. Um outro efeito, com atuação simultânea sobre o controle da reação de reticulação com GADA e que funcionaria como uma segunda proteção, é a protonação dos grupos aminos da proteína, pois sendo formados em meio ácido, estes grupos básicos em função do seus pK_{as} estão presentes na forma de sais que não são reativos em relação às funções aldeídicas para a formação da base de Schiff. Com este procedimento, efeitos de impermeabilização observados em matrizes colagênicas tratadas com GA pelo método convencional seriam minimizados. Provavelmente, uma redução na manifestação dos efeitos citotóxicos provocados pós-implante por biomateriais estabilizados pelo GA¹⁷, também deve ser observada em função da diminuição da densidade de reticulações poliméricas que, em virtude de sua instabilidade, são as responsáveis pela liberação gradual do GA resultando em toxicidade de efeitos localizados e sistêmicos.

Com base no exposto acima, os objetivos deste trabalho foram os estudos de reatividade química, estabilidade, propriedades morfológicas e qualidade de materiais obtidos a partir de matrizes colagênicas reticuladas com GA na forma de seus diacetais. Na presente pesquisa, como exemplo de matriz colagênica, foi empregado o pericárdio bovino (PB), matéria-prima básica na confecção de próteses cardíacas valvulares (biopróteses).

Materiais e Métodos

Todos os reagentes e solventes empregados neste trabalho foram de grau PA e utilizados como tal, excetuando-se o GA (Union Carbide) que foi purifi-

cado por tratamento com carvão ativado imediatamente antes de seu uso.

Preparação da solução de diacetais do glutaraldeído: este reagente foi preparado pela adição de um volume de solução de glutaraldeído, recém purificado por tratamento com carvão ativado, a álcool etílico (EtOH) contendo uma concentração de HCl de 3×10^{-3} M, para dar uma concentração final de GA de 1% (m/v). Estudo do comportamento desta solução foi realizado por espectroscopia de ultravioleta (UV), por comparação com soluções aquosas de GA, tampão fosfato, pH 7,40; 0,14M (TF) e em EtOH a temperatura ambiente e a 40 °C, nas mesmas concentrações de GA.

Reações de reticulação

Com diacetais do glutaraldeído (GADA): os fragmentos de PB de 2 cm², coletados de acordo com procedimentos e técnicas como descritos para a confecção de válvulas cardíacas¹⁹, foram tratados com soluções aquosas de EtOH, de concentrações progressivamente crescentes em intervalos de 10%, até 100%(v/v) em EtOH. Neste estágio, os fragmentos foram transferidos para uma solução de EtOH acidificada pela adição de HCl concentrado para uma concentração final de 3×10^{-3} M, e finalmente equilibrados em uma solução de EtOH contendo 3×10^{-3} M HCl e GA a uma concentração final de 1% (m/v) por períodos de 48 e 96 h. Após estes períodos, os fragmentos foram removidos da solução e expostos a vapores de trietilamina (Et₃N) por um tempo de 24 h. A solução ácida de GA em EtOH foi deixada equilibrar durante 24 h antes do tratamento do PB.

Com GA: as reticulações foram realizadas pelos procedimentos convencionais¹⁹ também com fragmentos de 2 cm², com soluções de GA a 0,05% em tampão fosfato a pH 7,40 e 0,14M (TF).

Caracterização dos materiais

Temperatura de encolhimento (Ts): foram determinados em um equipamento para determinação de ponto de fusão da Quimis, Mod. Q-340-13, adaptado para medidas de Ts. Amostras de pericárdio bovino de cerca de 20 mm de comprimento x 2 mm de largura x 0,4 mm de espessura foram fixadas na parte interior de um tubo graduado em mm (4 mm de diâmetro interno e 0,4 mm de parede) contendo TF. A velocidade de aquecimento foi de 1,5 - 2,0 °C. O valor de Ts foi determinado pela temperatura média entre o

início do encolhimento até uma redução de 20% do comprimento total da amostra.

Embebição (W): parâmetros de embebição foram determinados em amostras de PB submetidas ao tratamento com em concentrações crescentes de 0, 30, 70 e 100% de EtOH. Estas medidas foram realizadas após a redução sequencial de EtOH até o equilíbrio de todas as amostras em TF, seguidos de lavagens exaustivas com água e liofilização das amostras até peso constante. Resultados obtidos correspondem a uma média de três determinações independentes.

Microscopia Eletrônica de Varredura: fotomicrografias dos materiais foram obtidos em microscópio eletrônico de varredura (M.E.V.), da marca Zeiss®, modelo DSM 960 operado com um feixe de elétrons primários de 20 keV, em amostras circulares, recobertas com uma camada de ouro cerca de 30 nm de espessura.

Estabilidade biológica: estas medidas foram realizadas com auxílio da enzima colagenase (colagenase bacteriana do tipo V da Sigma, 435 UI/mg - C-9263). O colágeno na sua forma nativa é um substrato específico para esta enzima e sua ação, sobre matrizes colagênicas, é inversamente proporcional ao grau de reticulação. Estes estudos foram realizados com materiais reticulados pela técnica convencional e por GADA, em comparação com a estrutura nativa. A extensão da solubilização foi acompanhada pela liberação dos peptídeos solúveis que foram determinados via hidroxiprolina²⁰, em triplicatas.

Resultados e Discussão

Os espectros de UV da Fig. 2 são aqueles para soluções de GA em tampão fosfato a pH 7,40 e 0,14M (Fig. 2-I), água (Fig. 2-II), EtOH (Fig. 2-III) e em EtOH com 3×10^{-3} M de HCl (Fig. 2-IV), após 1 hora da preparação da solução (Fig. 2a), 22 h (Fig. 2b) e após 22 h seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C (Fig. 2c). Todos os espectros foram caracterizados pela presença de dois máximos de absorções em 280 e 235 nm, correspondentes às absorções de GA livre e GA polimérico, respectivamente¹⁷. Os espectros de UV da Fig. 2 mostram para todos os casos de alterações nas curvas de absorção das soluções de GA. Variações significativas no entanto só foram observadas para as soluções de GA em soluções de TF (Fig. 2cI), cuja característica foi um aumento significativo da

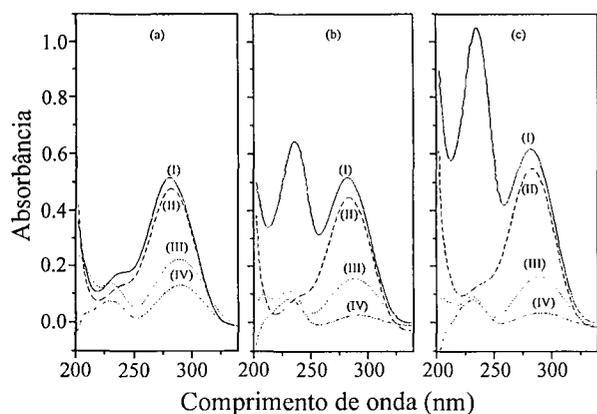


Figura 2. Espectros de UV para soluções de GA a 1% em solução TF (I), água (II), EtOH (III) e EtOH, 3×10^{-3} M de HCl (IV): (a) 1 h de reação; (b) 22 h; (c) após 22 h seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C.

absorbância em 235 nm, e para soluções de GA em EtOH acidificada com HCl a 3×10^{-3} M, onde praticamente desapareceu o pico correspondente à banda com λ_{max} igual a 280 nm (Fig. 2b e 2c).

Tendo em vista que a relação 280/235 é uma medida da variação das concentrações relativas do GA livre em relação as formas poliméricas¹⁷, as variações destas relações em função do tempo e das condições da solução também foram avaliadas (Tabela 1).

Para soluções aquosas de GA, os valores observados para a relação de 280/235 nm após 1 h (Fig. 2aII), 22 h (Fig. 2bII) e 22 h de reação seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C (Fig. 2cII) foram de respectivamente 3,8; 5,2 e 4,2, o que sugere que sob temperatura ambiente as soluções de GA têm o seu equilíbrio deslocado no sentido da forma de GA livre. No entanto este equilíbrio é desfavorecido pelo aquecimento da solução, como mostrado pelo decréscimo da relação 280/235 (Tabela 1) para um valor de 4,2. Para o caso das soluções tamponadas de GA, os valores observados para a relação 280/235 para tempos de equilíbrio de 1 h (Fig. 2aI), 22 h (Fig. 2bI) e 22 h de reação seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C (Fig. 2cI) foram de respectivamente 3,0; 0,8 e 0,6. Estas diminuições das relações sugerem que, diferente das soluções aquosas de GA, em soluções tamponadas a concentração de estruturas poliméricas aumenta constantemente em função do tempo e das condições empregadas na reação. Tendo em vista que a preparação de biopróteses valvulares são reticuladas em soluções tamponadas de GA, por tempos variáveis entre 3 h e 13 dias, estes resultados, que mostram a instabilidade química das soluções de GA, sugerem que essa instabilidade pode estar relacio-

nada aos problemas de disfunção valvular, principalmente aquele devido ao processo de calcificação, que está associado ao comprometimento das propriedades mecânicas da válvula. As soluções de GA em EtOH, no entanto, mostraram um comportamento bem diferenciado quando comparadas com soluções aquosas ou tamponadas de GA. Nos dois casos, as soluções de GA em EtOH e EtOH/HCl (Fig. 2aIII, 2bIII, 2cIII e 2aIV, 2bIV e 2cIV), foram caracterizadas pela presença de duas bandas bem definidas de absorções em 235 e 280 nm, com uma característica comum, que foi a redução significativa das absorbâncias em 280 nm, indicativa de uma redução nas concentrações de GA livre nos dois casos. Este efeito foi muito mais pronunciado para a solução ácida, cujos valores de absorbância para tempos de 22 h foi praticamente zero, provavelmente em função da catálise promovida pela espécie H^+ (Esquema 2). As relações 280/235 para EtOH e EtOH/HCl após 1 h, 22 h e 22 h seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C, foram de respectivamente 1,66; 1,33; 1,75 e 1,67; 0,26 e 0,41. Diferentemente dos perfis de UV observados para soluções aquosas e tamponadas de GA, as diminuições das absorbâncias observadas em 280 nm não foram acompanhadas por aumentos simultâneos das absorbâncias em 235 nm, sugerindo que o desaparecimento do GA livre nas soluções de EtOH não estão associadas à formação de espécies poliméricas. Nestas condições - devido à alta concentração de EtOH - que não favorecem a formação dos hemiacetais, o diacetal deve ser a forma química predominante para o GA. Nos dois casos, os aumentos de temperatura favoreceram a forma livre de GA, como sugerido pelos aumentos observados para as relações 280/235.

Os resultados de estabilidade térmica e variações estruturais para a matriz colagênica, determinados através da avaliação de T_s e embebição, em função das variações da concentração de EtOH no intervalo entre 0 e 100% (Tabela 2), mostraram não ocorrer variações estruturais significativas ao longo de todo o processamento necessário para o tratamento de PB via GADA. Enquanto para PB nativo, equilibrado em soluções de TF, o valor determinado foi de $63,6 \pm 0,5$ °C, o valor de T_s para PB equilibrado progressivamente até uma concentração de EtOH absoluto, seguido de reequilíbrio progressiva até tampão fosfato foi de $65,3 \pm 0,4$ °C. Nas mesmas condições, as variações observadas para a embebição (W) foram de respectivamente $76,6 \pm 1,0$ e

Tabela 1. Variações das absorvâncias e valores da relação 280/235 nm para soluções de GA em solução aquosa, solução tamponada (pH 7,4) e solução etanólica acidulada ou não antes e após o aquecimento a temperatura de 40 °C.

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

(a) estes dados são referentes aos espectros da Fig. 2; (b) tempo de reação de 22 h seguidas de 1 h a temperatura de 40 °C.

78,5 ± 1,0 °C, para 0% EtOH e EtOH absoluto. Como Ts e W são reflexos de variações estruturais do tecido em termos de matriz colagênica, os valores de Ts e W sugerem que a transferência de meio aquoso para meio alcoólico não induz a variações significativas na estrutura do tecido, condição essencial para o bom desempenho de uma bioprótese.

Os resultados da Tabela 3 são aqueles referentes aos valores de Ts determinados para PB dentro das várias etapas pelas quais passa a rotina estabelecida para reticulação de PB por meio de GADA, em comparação com o procedimento convencional. Os valores de Ts para PB exposto à solução de EtOH 3 x 10⁻³ M HCl, seguido pela exposição do mesmo material a vapores de Et₃N, foram de respectivamente 64,9 ± 0,2 e 67,3 ± 0,2 °C, que não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para PB nativo (63,6 ± 0,2 °C) ou equilibrado em EtOH absoluto (65,3 ± 0,1 °C). Estes resultados sugerem que as exposições de PB a soluções de EtOH/HCl e Et₃N de modo sequencial, por tempos superiores a 24 h também não produzem alterações significativas na estrutura da matriz, como determinado pela sua estabilidade térmica.

O tratamento de PB com soluções de GA a 0,05% nas condições convencionalmente utilizadas para confecção de válvulas cardíacas, deu origem a materiais com valores de Ts de 85,2 ± 0,3 e 86,2 ± 0,3 °C, para tempos de reação de 48 e 96 h, respectivamente. Para os casos de PB equilibrados previamente em

solução de GADA por tempos de 48 e 96 h seguidas da exposição a vapores de Et₃N por tempo de 24 h, os valores de Ts determinados foram de respectivamente 84,5 ± 0,2 e 87,0 ± 0,4 °C, bastante próximos àqueles obtidos pelo tratamento convencional. Estes valores são aceitos como típicos, dentro da rotina convencional para preparação de materiais para a confecção de válvulas cardíacas a partir de pericárdio bovino¹⁹. O tratamento do material exposto a soluções de GADA ou GADA por 96 h, com soluções de GA pela metodologia convencional, por tempos de 48 h, não induziram a um aumento substancial do valor de Ts, o qual foi de 89,0 ± 0,5 °C em comparação com um valor de Ts de 87,0 ± 0,4 °C. Amostras de PB equilibrados previamente em solução de GADA (concentração nominal de GA a 1%). A seguir lavadas exaustivamente com EtOH e expostas a vapores de Et₃N, deram origem a materiais com um valor de Ts de 67,8 ± 0,4 °C, que é muito próximo àqueles obtidos para o material nativo ou aqueles equilibrados em EtOH, EtOH/HCl ou EtOH/HCl/Et₃N, todos com valores de Ts entre 63,6 e 65,5 °C (Tabela 3). Estes resultados mostram que a lavagem do PB com EtOH, anterior ao tratamento com Et₃N, removeu a forma reativa do GADA do interior da matriz e que, portanto, nenhuma ação da base poderia ser esperada, como mostrado pelo valor de Ts observado.

Os resultados mencionados mostram que o GA quando em EtOH acidificado tem seus grupos aldeídicos efetivamente protegidos. Sob a forma na qual se encontram, provavelmente diacetais, não são capazes de reagir com os grupos amino da proteína para a formação da base de Schiff. Essa ligação só é formada de modo tão eficiente quando comparada com os métodos convencionais, após a exposição do material a vapores de Et₃N (Tabela 3).

A eficiência da reação dos diacetais fica demonstrada, quando comparamos volumes e concentrações

Tabela 2. Valores de embebição e Ts^(a) para pericárdio bovino submetido a diferentes concentrações de EtOH.

| Propriedade | EtOH (%) | | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 | 30 | 70 | 100 |
| Embebição (%) | 76,6 ± 1,0 | 79,2 ± 1,4 | 78,5 ± 2,1 | 78,5 ± 1,0 |
| Ts (°C) | 63,6 ± 0,5 | 64,5 ± 1,2 | 65,5 ± 0,4 | 65,3 ± 0,4 |

(a) valores determinados após equilibração do material em TF a pH 7,40 e 0,14M.

Tabela 3. Valores de estabilidade térmica determinada como $T_s^{(a)}$ de matrizes colagênicas tratadas com GA em comparação com matrizes tratadas com diacetais de GA.

| Nat. | Pericárdio nativo | | | Pericárdio Reticulado | | | | | |
|------|---------------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | EtOH | | | GA | | GADA | | | |
| | EtOH ^(b) | HCl | HCl/Et ₃ N | 48 | 96 | TF ^(d) | 48 ^(c) | 96 ^(c) | |
| | 63,6 ± 0,2 | 65,3 ± 0,2 | 64,9 ± 0,2 | 63,6 ± 0,2 | 85,2 ± 0,3 | 86,2 ± 0,3 | 67,8 ± 0,4 | 84,5 ± 0,2 | 87,0 ± 0,4 |

(a) as temperaturas de encolhimento (°C) foram obtidos após equilíbrio em TF por 24 h; (b) valores determinados após equilíbrio do pericárdio bovino apenas em EtOH; (c) valores determinados após 24 h de exposição a vapores de Et₃N, após tratamento com GADA; (d) valores determinados após lavagens exaustivas com EtOH e exposição em Et₃N.

efetivas utilizados para a reação com PB, em comparação com o procedimento convencional. Considerando que os volumes de embebição para PB em EtOH são similares àqueles determinados para tampão fosfato (Tabela 2), o volume efetivo de reagente disponível para a reação por grama de PB (g PB) seria de cerca de 0,77 mL. Esse volume corresponderia a uma concentração efetiva de GA cerca de 108 μ moles/g PB em comparação com 271 μ moles/g PB, para o caso da solução de GA a 0,05% (volume total de 5 mL). Como o número estimado de micromoles de grupos amino nos resíduos de lisinas/g PB é de 30,8 μ moles/g PB, considerando-se a similaridade dos valores de T_s obtidos nos dois casos, em bases molares, o GA na forma de GADA é cerca de 2,5 vezes mais eficiente do que o GA (processo convencional). Este resultado pode ser confirmado por testes de estabilidade frente à ação da collagenase (Fig. 3).

As curvas da Fig. 3 mostram os ensaios da estabilidade biológica frente à collagenase, de PB nativo (Fig. 3a) em comparação com os PB tratados com soluções tamponadas de GA a 0,05% (Fig. 3b), solu-

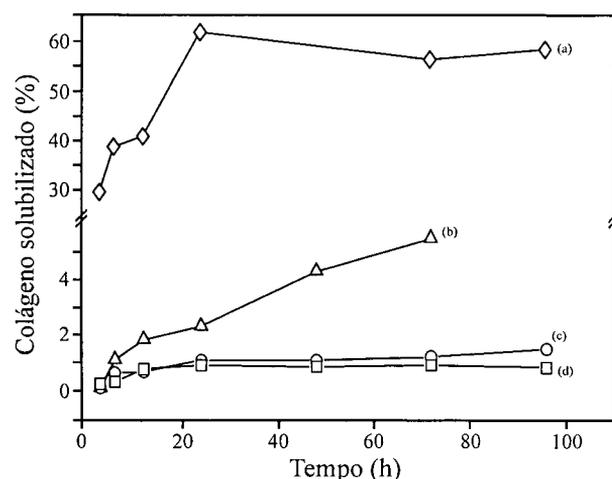


Figura 3. Estabilidades relativas à hidrólise por collagenase para: (a) PB nativo; (b) tratado com soluções de GA a 0,05%, pH 7,4; 0,14M; (c) 1% GA na forma de diacetais; (d) idem, seguido do tratamento convencional com GA a 0,05%.

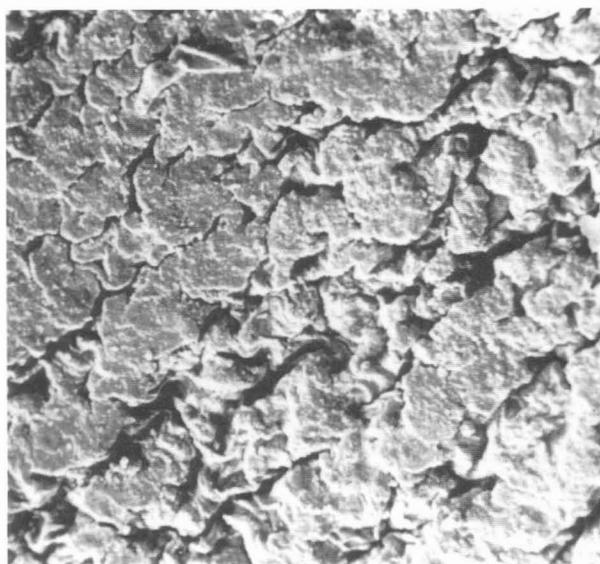
ções de GADA/Et₃N (Fig. 3c) e GADA/Et₃N após o tratamento convencional com GA a 0,05% (Fig. 3d). A ordem de estabilidade biológica crescente determinada foi: nativo < 0,05% GA < 1% GADA = 1% GADA + 0,05% GA. Enquanto após 80 h, a estabilidade dos materiais obtidos pelo método convencional apresentou uma extensão de hidrólise de cerca de 6% (m/m), para os materiais tratados com GADA, os níveis de hidrólise após 80 h se estabilizaram em cerca de 1%, estabilidade esta que não foi implementada por tratamento posterior com soluções de GA pelo método convencional (Fig. 3d). Esses resultados mostram que o GADA dá origem a estruturas mais estáveis à ação da enzima quando comparados com o procedimento convencional, pressupondo também uma maior estabilidade biológica pós-implante, visto que a collagenase é a única enzima existente nos tecidos a atuar eficientemente sobre matrizes colagênicas.

A microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) de PB tratado com GADA a 1% (Fig. 4a) mostrou que, exceto por uma maior compactação do tecido, o tratamento de PB com GADA/EtOH : HCl/Et₃N, não mostrou diferenças estruturais significativas quando comparado com aquela do pericárdio nativo (Fig. 4c), e também que a estrutura microfibrilar da matriz é preservada (Fig. 4b), o que não ocorre quando do tratamento de PB com soluções tamponadas de GA a 0,05% (Fig. 4d). Neste caso, o rompimento da matriz fibrilar pode ser nitidamente observado.

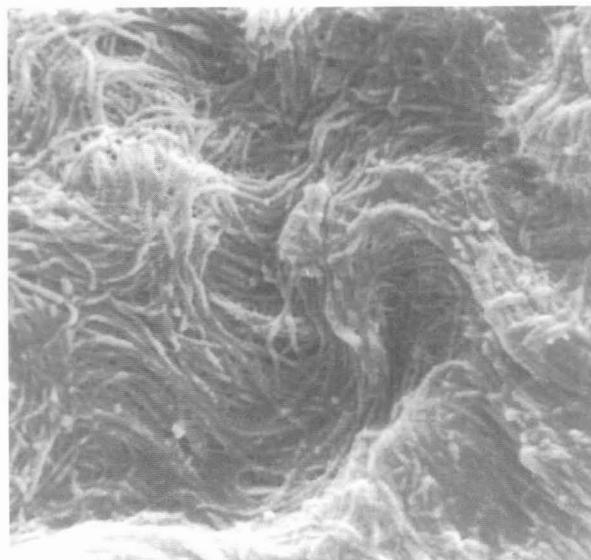
A tensão de ruptura e módulos de alongação na quebra determinados para PB reticulados com GADA foram de respectivamente 12,60 ± 2,0 N/mm² e 59,2 ± 6,8%, comparáveis àqueles para materiais obtidos pelo tratamento convencional e utilizados na confecção de válvulas cardíacas.

Conclusões

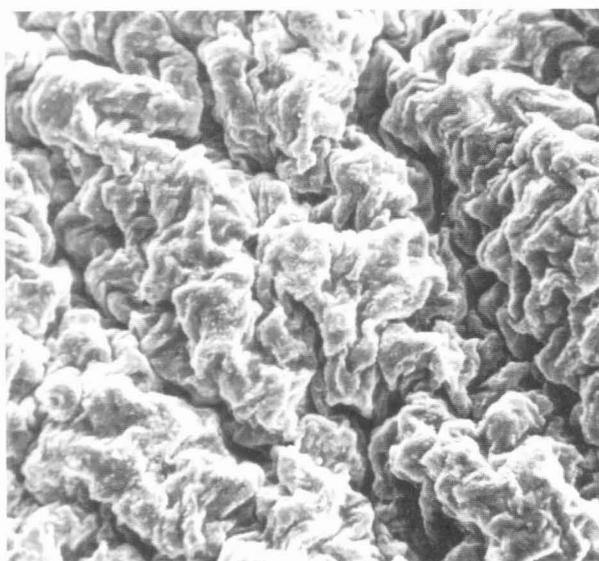
Os resultados acima, sugerem que a reticulação de matrizes colagênicas com GA, na forma de diace-



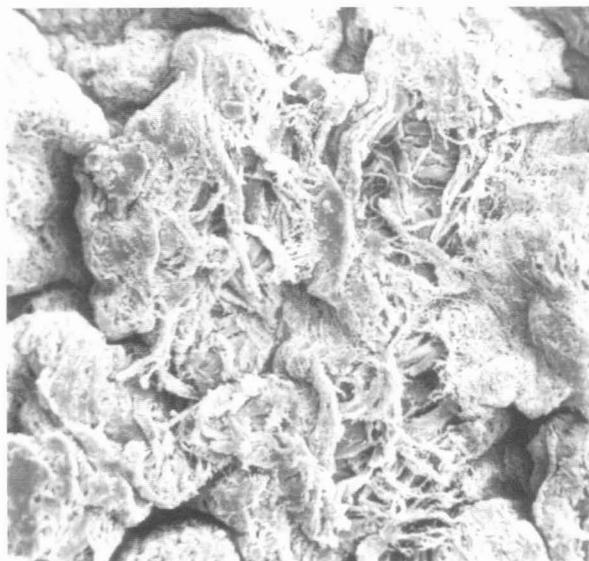
a) |—| : 20 μ m



b) |—| : 1 μ m



c) |—| : 20 μ m



d) |—| : 20 μ m

Figura 4. Fotomicrografias de M.E.V. do PB: PB tratado com soluções de GADA/Et₃N da superfície superior (a) e inferior (b) com aumentos de 500 e 10.000x, respectivamente nativo (c); tratado convencionalmente com GA a 0,05% (d), ambas com aumento de 500x.

tais, pode constituir-se num processo alternativo para a obtenção de biomateriais à base de colágeno, sem as desvantagens do procedimento convencional, que se utiliza do glutaraldeído como reagente de reticulação. Os materiais obtidos por esta técnica, embora apresentem propriedades mecânicas, elásticas e térmicas similares àqueles obtidos pelo tratamento convencional, mostraram-se superiores tanto do ponto de vista morfológico, quanto da sua estabilidade biológica que determinada via colagenase, revelou-se 5 a 6 vezes superior quando comparada ao tratamento

convencional com GA. As vantagens deste procedimento podem estar associadas a uma melhor distribuição das formas diacetálicas do GA na matriz colagênica, que diferentemente do GA, só promovem reticulação após exposição do material a aminas terciárias. Desta forma, materiais obtidos por este procedimento devem apresentar menor grau de impermeabilização e ligações cruzadas com características químicas melhor definidas, além de reduzir a citotoxicidade típicas, observadas pós-implante, para biomateriais. Estas características estão asso-

ciadas a uma redução da citotoxicidade pós-implante, observada com biomateriais tratados com GA, que está relacionada à decomposição das ligações de reticulações poliméricas de GA. Como consequência, biomateriais com melhores performances biológicas são esperados, particularmente para a confecção de biopróteses valvulares cardíacas com maior durabilidade e menor suscetibilidade a processos de calcificação.

Resultados preliminares de ensaios de fadiga *in vitro* mostraram que as válvulas confeccionadas via GADA apresentam uma durabilidade média de 310.000.000 de ciclos, correspondendo a uma duração *in vivo* de cerca de 7,5 anos, com uma performance hidrodinâmica comparável às válvulas cardíacas confeccionadas com materiais obtidos por tratamento de pericárdio bovino com procedimentos convencionais com GA.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Ézer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica prestada, e ao Sr. Marcelo A.P. da Silva pelos serviços de microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.).

Este trabalho foi financiado pelo programa PADCT/CNPq, contrato nº 620.228/91-1.

Referências Bibliográficas

1. Kok, L.P.; Boon, M.E. - Microwave cookbook for microscopists, Coulomb Press, Leiden (1992).
2. Chibata, I. - Immobilized enzymes: research and development, 1^a ed., Kobamsha Ltda, Tokyo (1978).
3. Ionescu, M.I.; *et al.* - J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 68, 361-379, (1974).
4. Rosenblatt, J.; Devereux, B.; Wallace, D.G. - Biomaterials, 15, 985-995, (1994).
5. Mcpherson, J.M.; Sawamura, S.; Armstrong, R. - J. Biom. Materials Res., 20, 93-107, (1986).
6. Ruijgrok, J.M.; De Wijn, J.R.; Boon, M.E. - J. Mat. Sci.: Mat. in Med., 5, 80-87, (1994).
7. Levy, R.J.; *et al.* - Biomaterials, 12, 707-714, (1991).
8. Petite, H.; Frei, V.; Huc, A.; Herbage, D. - J. Biom. Mat. Res., 28, 159-165, (1994).
9. Tu, R.; *et al.* - J. Biom. Mat. Res., 28, 677-684, (1994).
10. Ninark, W.A.; Pereira, C.A.; Tsang, K.; Lee, J.M. - J. Mat. Sci.: Mat. in Med., 6, 235-241, (1995).
11. Courtman, D.W.; *et al.* - J. Biom. Mat. Res., 28, 655-666, (1994).
12. Grabenwöger, M.; *et al.* - J. Biom. Mat. Res., 26, 1231-1240, (1992).
13. Hirsch, D.; *et al.* - Biomaterials, 14, 705-711, (1993).
14. Visser, C.E.; *et al.* - Biomaterials, 13, 34-37, (1992).
15. Jorge-Herrero, E.; *et al.* - Biomaterials, 12, 249-252, (1991).
16. Fieser, L.; Fieser, M. - Organic Chemistry, 3^a ed., Reinhold Pub. Corp., New York (1956).
17. Grimm, M.; *et al.* - Surgery, 111, 74-8, (1992).
18. Kawahara, J.; *et al.* - Anal. Biochemistry, 201, 94-98, (1992).
19. Braile, D.M. - Prótese Valvular de Pericárdio Bovino. Desenvolvimento e Aplicação Clínica na Posição Mitral, São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1990, 110p., (Doutorado).
20. Stegemann, H.H.; Stalder, K. - Clin. Chim. Acta, 18, 267-273, (1967).