

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

ESTUDO EXPERIMENTAL DO COMPORTAMENTO MECÂNICO DE TENDÕES E  
SUAS CORRELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS ASSOCIADAS  
AO TECIDO

por

Ana Bárbara Krummenauer Formenton

Tese para obtenção do Título de  
Doutora em Engenharia

Porto Alegre, Maio de 2019

ESTUDO EXPERIMENTAL DO COMPORTAMENTO MECÂNICO DE TENDÕES E  
SUAS CORRELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS ASSOCIADAS  
AO TECIDO

por

Ana Bárbara Krummenauer Formenton  
Mestra em Engenharia

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Me-  
cânica, PROMEC, da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de

Doutora em Engenharia

Área de Concentração: Mecânica dos Sólidos

Orientador: Prof. Dr. Jakson Manfredini Vassoler

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Rodrigo de Mello Roesler

Aprovada por:

Prof. Dr. Eduardo Alberto Fancello ..... POSMEC / UFSC

Prof. Dr. Estevam Barbosa de Las Casas ..... PosEEs / UFMG

Prof. Dr. Rogério José Marczak ..... PROMEC / UFRGS

Prof. Dr. Fernando Marcelo Pereira  
Coordenador do PROMEC

Porto Alegre, 21 de Maio de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a elaboração desta tese.

Agradeço a parceria com o Laboratório de Engenharia Biomecânica (LEBm), onde foram realizados os procedimentos experimentais.

Agradeço também ao Grupo de Mecânica Aplicada (GMAp) e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

## RESUMO

O tecido tendinoso apresenta um comportamento mecânico dependente das fibras colágenas e do arranjo e da proporção de seus constituintes. O conhecimento do comportamento mecânico dessas estruturas pode ser importante em diversas aplicações, como na representação de próteses de joelho e em cirurgias por controle remoto, onde pode auxiliar cirurgiões ou projetistas a tomar decisões individualizadas para cada paciente. Entretanto existem diversas dificuldades técnicas associadas à caracterização de tecidos biológicos. Considerando que não existe uma metodologia experimental consolidada para tecidos biológicos, a presente tese realiza um estudo exploratório da correlação de parâmetros individuais que representem aspectos específicos ou mesmo estruturais do tipo de tecido com sua resposta mecânica. Múltiplos parâmetros individuais foram selecionados de modo a representar os principais constituintes do tendão e os diferentes níveis de sua estrutura, sendo possível avaliar sua correlação com a resposta mecânica quando obtida de diferentes indivíduos ou de diferentes posições do mesmo indivíduo. Análises estatísticas dos parâmetros escolhidos não mostraram diferenças entre machos e fêmeas, mas apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre tendões extensores e flexores. O módulo tangente e a temperatura de pico (parâmetro molecular) das amostras estudadas mostraram possuir uma correlação forte. O relacionamento das demais variáveis individuais se mostrou moderado ou não obteve-se uma correlação com a resposta mecânica estatisticamente significativa. Por fim, o presente trabalho foi capaz de demonstrar a correlação entre parâmetros mecânicos e individuais, evidenciando que o estudo da estrutura molecular pode fornecer maiores detalhes da função-estrutura do tendão na macroescala.

Palavras-chave: Tendões; Estudo experimental; Comportamento mecânico; Correlação; Características individuais.

## ABSTRACT

Tendon tissue presents a mechanical behavior dependent on collagen fibers and the arrangement and proportion of its constituents. The comprehension of the mechanical behavior of these structures may be relevant in a variety of applications, such as knee prosthesis representation and remote controlled surgeries, where surgeons or designers can make individualized decisions for each patient. However, there are several technical difficulties associated with the biological tissues characterization. Considering that there is no consolidated experimental methodology for biological tissues, this dissertation performs an exploratory study of the correlation of the individual parameters that represent structural or specific aspects for each tissue type with its mechanical response. Several individual parameters were selected to represent the main tendon constituents and the different levels of its structure, evaluating its correlation with the mechanical response when obtained from different individuals or different positions of the same individual. The parameters selected for the statistical analysis showed no differences between males and females, although statistically significant differences between extensor and flexor tendons were presented. The studied samples stiffness and peak temperature (molecular parameter) showed a strong correlation. Other individual variables relationship was moderate or did not correlate with the mechanical response. At last, the present work was able to demonstrate the correlation between mechanical and individual parameters, evidencing that the molecular structure study can provide more details of the tendon function-structure in the macroscale.

Keywords: Tendons; Experimental study; Mechanical behavior; Correlation; Individual characteristics.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivos	3
<b>2</b>	<b>TENDÕES - CARACTERÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES</b>	<b>4</b>
2.1	Tecidos Biológicos	4
2.2	Tendões	5
2.2.1	Comportamento Mecânico de Tendões	8
2.3	Influência de Características Individuais	10
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	Considerações preliminares	16
3.2	Amostras	17
3.2.1	Armazenamento das amostras	18
3.2.2	Obtenção dos tendões para ensaio	19
3.3	Aspectos Individuais	22
3.3.1	Liofilização	23
3.3.2	Histologia e Microscopia	24
3.3.3	Calorimetria Exploratória Diferencial	28
3.4	Ensaio Mecânicos	32
3.4.1	Célula de carga e taxa de deformação	32
3.4.2	Pré-condicionamento	33
3.4.3	Micrômetros digitais e Dispositivo	34
3.4.4	Fixação das amostras na garra	35
3.5	Análise Estatística	36
3.5.1	Análise de dados inicial	37
3.5.2	Teste <i>t</i> e teste de Mann-Whitney	37
3.5.3	Correlação e regressão	38

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>40</b>
4.1	Resultados dos parâmetros mecânicos	40
4.1.1	Alongamento	43
4.1.2	Tensão última e tensão última verdadeira	43
4.1.3	Módulo tangente e módulo tangente verdadeiro	43
4.1.4	Resumo dos parâmetros mecânicos encontrados	45
4.2	Influência do sexo e do tipo de tendão nos parâmetros mecânicos	45
4.3	Resultados dos aspectos individuais	48
4.3.1	Liofilização	49
4.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	49
4.3.3	Microscopia de luz	53
4.3.4	Calorimetria Diferencial de Varredura	57
4.3.5	Resumo dos parâmetros individuais encontrados	59
4.3.6	Influência do sexo e do tipo de tendão nos parâmetros individuais	59
4.4	Correlação entre parâmetros individuais e mecânicos	64
4.5	Regressão múltipla linear	68
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>72</b>
5.1	Sugestões para Trabalho Futuros	73
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE A Procedimento Experimental para Ensaio</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE B Protocolo Microscopia de Luz e Luz Polarizada</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE C Protocolo Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE D Medidas para Cada Tendão</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE E Modelo Material</b>	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Representação esquemática da classificação de tecidos . . . . .	5
Figura 2.2	Hierarquia do tendão [adaptado de Kastelic et al., 1978] . . . . .	6
Figura 2.3	Fibras colágenas do tendão em paralelo [adaptado de Nordin e Frankel, 2001] . . . . .	7
Figura 2.4	Estrutura fibrilar [adaptado de Orgel et al., 2006] . . . . .	8
Figura 2.5	Mudança das fibras do tendão durante o ensaio de tensão-deformação [adaptado de Wang, 2006] . . . . .	9
Figura 2.6	Ensaio cíclico de tração em tendões [adaptado Wilchez, 2012] . . . . .	10
Figura 2.7	Imagens microscópicas de seções transversais de fascículos [Hansen et al., 2010]. . . . .	11
Figura 2.8	Resposta de tensão-deformação de fascículos [adaptado de Hansen et al., 2010]. . . . .	11
Figura 2.9	Curva tensão-deformação . . . . .	12
Figura 3.1	Tendões escolhidos . . . . .	19
Figura 3.2	Pata dianteira intacta . . . . .	20
Figura 3.3	Pele divulsionada expondo os tendões extensores . . . . .	21
Figura 3.4	Tendões flexores . . . . .	21
Figura 3.5	Exemplificação dos cortes para cada tendão . . . . .	21
Figura 3.6	Esboço dos níveis de um tendão [adaptado de Harvey et al., 2009 e Zitnay e Weiss, 2018] . . . . .	22
Figura 3.7	Liofilizador TERRONI LS 3000D . . . . .	23
Figura 3.8	Amostras montadas em stubs . . . . .	28
Figura 3.9	DSC e panelinhas utilizadas nas análises . . . . .	29
Figura 3.10	Análise DSC [adaptado de Herod et al., 2016] . . . . .	30
Figura 3.11	Dispositivo e posicionamento dos micrômetros ópticos . . . . .	35
Figura 4.1	Aparato para ensaio mecânico . . . . .	40
Figura 4.2	Tendões utilizados . . . . .	41
Figura 4.3	Curva Tensão x Deformação . . . . .	42



Figura 4.4	Curva monotônica para cada tendão (em preto) e a região onde o módulo tangente foi calculado (em vermelho) . . . . .	44
Figura 4.5	Curva monotônica para cada tendão (em preto) e a região onde o módulo tangente verdadeiro foi calculado (em vermelho) . . . . .	44
Figura 4.6	Diagramas de caixa para parâmetros mecânicos entre machos e fêmeas . . . . .	47
Figura 4.7	Diagramas de caixa para os parâmetros mecânicos entre tendões extensores e flexores . . . . .	48
Figura 4.8	Ondulações presentes nos tendões . . . . .	49
Figura 4.9	Interferência dos cortes nas amostras . . . . .	50
Figura 4.10	Interferência dos cortes nas amostras . . . . .	50
Figura 4.11	Fibrilas de colágeno . . . . .	51
Figura 4.12	Medição do diâmetro ao longo de cada fibrila . . . . .	52
Figura 4.13	Cobertura da matriz nos tendões . . . . .	53
Figura 4.14	Coloração de tendão em HE . . . . .	54
Figura 4.15	Coloração de tendão em orceína . . . . .	55
Figura 4.16	Coloração de tendão em picrosiurs red . . . . .	55
Figura 4.17	Procedimento para quantificação de colágeno tipo I e colágeno tipo III . . . . .	56
Figura 4.18	Exemplo de curva obtida através do DSC (amostra S15TE) . . . . .	58
Figura 4.19	Diagramas de caixa e bigode para parâmetros individuais de machos e fêmeas . . . . .	61
Figura 4.20	Diagramas de caixa e bigode para parâmetros individuais de machos e fêmeas . . . . .	62
Figura 4.21	Diagramas de caixa para parâmetros individuais de tendões extensores e flexores . . . . .	63
Figura 4.22	Diagramas de caixa para parâmetros individuais de tendões extensores e flexores . . . . .	64
Figura 4.23	Diagramas de dispersão entre variáveis que apresentaram correlação	66
Figura 4.24	Diagramas de dispersão entre variáveis que apresentaram correlação	67
Figura 5.1	Dados extrapolados . . . . .	74

Figura A.1	Tendão extensor. . . . .	85
Figura A.2	Tendão flexor e extensor. . . . .	85
Figura A.3	Exemplificação dos cortes para cada tendão . . . . .	86
Figura A.4	Altura do corte (pata dianteira) . . . . .	87
Figura A.5	Altura do corte (pata dianteira) . . . . .	88
Figura A.6	Incisão a 60mm para o tendão extensor . . . . .	89
Figura A.7	Incisão a 20mm para o tendão flexor . . . . .	89
Figura A.8	Comprimento total do tendão extensor. . . . .	90
Figura A.9	Recipientes . . . . .	91
Figura A.10	Amostra presa por linha. . . . .	92
Figura A.11	Garras termoeletricas . . . . .	92
Figura A.12	Chiller e medidor de fluxo . . . . .	93
Figura E.1	Modelo Reológico . . . . .	101
Figura E.2	Direção das fibras . . . . .	102
Figura E.3	Modelo reológico para as fibras . . . . .	103
Figura E.4	Direção das fibras [adaptado de Frank et al., 1985] . . . . .	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Resultados obtidos para os parâmetros mecânicos . . . . .	45
Tabela 4.2	Médias e desvios padrões dos parâmetros mecânicos divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão . . . . .	46
Tabela 4.3	Resultados obtidos para os parâmetros individuais . . . . .	59
Tabela 4.4	Parâmetros individuais divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão . . . . .	60
Tabela 4.5	Correlações entre os parâmetros individuais e os parâmetros mecânicos . . . . .	67
Tabela 4.6	Correlações entre os parâmetros individuais (variáveis independentes)	68
Tabela 4.7	Resultado para regressão múltipla linear considerando somente os os parâmetros significantes . . . . .	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC	Coeficiente de Correlação
DE	Desvio Padrão
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FWHW	Largura total no meio do pico
HE	Hematoxilina e Eosina
IMC	Índice de Massa Corporal
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LEBm	Laboratório de Engenharia Biomecânica
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
OsO4	Tetróxido de ósmio
PROMECC	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## LISTA DE SÍMBOLOS

### Símbolos Latinos

$\mathbf{A}_f$	Tensor estrutural
$\mathbf{a}_f$	Vetor unitário da orientação da fibra
$\hat{\mathbf{C}}$	Cauchy-Green a direita isocórico
$\hat{\mathbf{C}}^e$	Cauchy-Green a direita isocórico elástico
$c_i$	Autovalor
$c_i^e$	Autovalor elástico
$D$	Periodicidade da molécula
$\mathbf{D}^v$	Tensor de alongamento viscoso
$d_i^v$	Autovalores do tensor de alongamento viscoso
$d_f^v$	Taxa de deformação viscosa da fibra
$\mathbf{E}_i$	Autoprojeção
$\mathbf{E}_i^e$	Autoprojeção elástica
$\mathbf{F}$	Gradiente de deformação
$\hat{\mathbf{F}}$	Gradiente de deformação isocórico
$\hat{\mathbf{F}}^e$	Gradiente de deformação isocórico elástico
$\hat{\mathbf{F}}^i$	Gradiente de deformação isocórico inelástico
$g(\beta)$	Função $g$ dependente do parâmetro individual
$I_4$	Pseudo-invariante
$K$	Fator de penalidade
$L$	Comprimento inicial da amostra
$\mathbf{M}_i^v$	Autoprojeções do tensor de alongamento viscoso
$n$	Número de amostras
$\mathbf{P}$	Tensor tensão de Piola-Kirchhoff
$p$	Significância estatística
$T_{onset}$	Temperatura <i>onset</i> , °C
$T_{peak}$	Temperatura de pico, °C
$U$	Contribuição volumétrica
$W$	Energia livre

$W_{iso}$  Energia livre isotrópica

$W_f$  Energia livre da fibra

### Símbolos Gregos

$\alpha$  Parâmetro do material

$\beta$  Parâmetro individual

$\Delta H$  Entalpia de desnaturação

$\lambda_f$  Alongamento da fibra

$\lambda_f^e$  Alongamento da fibra elástico

$\lambda_f^v$  Alongamento da fibra viscoso

$\mu$  Parâmetro do material

$\varphi$  Potencial

$\varphi_N^e$  Potencial elástico

$\varphi_f$  Potencial das fibras

$\varphi_f^e$  Potencial elástico das fibras

$\Psi$  Potencial incremental

$\Psi_{iso}$  Potencial incremental isotrópico

$\Psi_f$  Potencial incremental da fibra

$\psi_N$  Potencial pseu-dissipativo

$\psi_f$  Potencial pseu-dissipativo das fibras

## 1 INTRODUÇÃO

Tecidos biológicos tem recebido atenção de vários pesquisadores devido a possibilidade de prever a resposta mecânica de sistemas biológicos que possuam funcionalidade estrutural [Muñoz-Rojas, 2016]. O conhecimento do comportamento dessas estruturas pode ser importante em diversas aplicações. Pode-se citar, por exemplo, a simulação da interação artéria/*stent* [Ragkousis et al., 2014], prótese de joelho/sistema músculo-esquelético [Kia et al., 2014], cirurgias por controle remoto [Beyar et al., 2006], entre outros, onde uma estimativa do comportamento mecânico pode auxiliar o cirurgião ou projetista a tomar decisões individualizadas para cada paciente. Uma limitação na individualização do tratamento de pacientes está relacionada principalmente às várias dificuldades técnicas associadas a caracterização experimental de tecidos biológicos.

Devido a características inerentes deste tipo de material, não existe procedimento experimental consolidado para ensaios mecânicos, sendo esta temática ainda hoje uma importante área de pesquisa. O desenvolvimento de protocolos de ensaio configura uma das linhas de pesquisa desta área. Uma particularidade no ensaio destes materiais é que a sua resposta pode ser influenciada por fatores incomuns à outros materiais, como por exemplo, o procedimento de obtenção das amostras (homogeneidade ao longo da geometria das amostras e uniformidade geométrica), no armazenamento (umidade, temperatura, tempo de degradação), na fixação para ensaio (fenômeno de escorregamento), na medição de deformações (material muito flexível e úmido), nas condições de ensaio (*in vitro* ou *in vivo*), entre outros. Outra linha de pesquisa correlata, onde existe um número significativo de trabalhos sendo desenvolvido, é voltada a caracterização numérico-experimental de materiais, através da identificação de parâmetros de modelos. Estes, por sua vez, buscam caracterizar o comportamento mecânico observado em tecidos biológicos, através de ensaios que capturem respostas não lineares, anisotrópicas, danificação das fibras durante deformações excessivas, e ainda com sensibilidade a velocidade de deformação, umidade e temperatura. Nestes casos é possível encontrar trabalhos usando diferentes metodologias, sendo as mais usadas a multiescala e a fenomenológica.

Seja o enfoque no desenvolvimento de protocolos experimentais, ou na caracterização numérico-experimental destes materiais, ambos acabam lidando com problemas na repetitividade da resposta mecânica do ensaio e na confiabilidade dos resultados. Alguns

trabalhos acabam se limitando a representações de tendências do comportamento mecânico dadas por apenas uma única curva observada experimentalmente. Os trabalhos que apresentam resultados de mais de um ensaio, tem que lidar com grandes dispersões na curva tensão-deformação. Este problema está associado principalmente ao fato que os tecidos biológicos podem mudar significativamente seu comportamento mecânico segundo sua origem, seja esta de diferentes indivíduos ou do mesmo tipo de tecido (classificação) em diferentes posições no mesmo indivíduo [Learoyd e Taylor, 1966, Maher et al., 2012, Herod et al., 2016]. Em outras palavras, um tendão extensor pode não possuir o mesmo comportamento mecânico de um tendão flexor do mesmo indivíduo, que por sua vez pode também não possuir o mesmo comportamento do mesmo tendão extensor de outro indivíduo. Esta característica impõe uma severa limitação na aplicação em problemas reais de caracterizações experimentais ou numérico-experimentais de tecidos biológicos, inviabilizando uma tratativa individualizada, como por exemplo, uma simples simulação de um tecido tendinoso específico de um indivíduo. Sem sombras de dúvidas, se não for possível avançar cientificamente nas formas de individualizar/especializar a caracterização de tecidos biológicos, a aplicação de modelos avançados em problemas reais individualizados estará muito longe de uma realidade próxima, apesar dos esforços em desenvolvimentos de protocolos de ensaios e de modelos de material cada vez mais complexos capazes de representar simultaneamente não linearidade, anisotropia, viscosidade, dano, etc.

Vários estudos, principalmente da área de saúde, mostram com sucesso algum tipo de correlação de parâmetros físicos, fisiológicos, histológicos ou até mesmo patológicos, com algum tipo de resposta de interesse (seja mecânica ou não). As respostas destes estudos vão desde o simples sucesso ou não em uma intervenção cirúrgica [Veras et al., 2003], até respostas mecânicas de tecidos de diferentes características, contém ainda informações sobre os indivíduos ou particularidades da amostra [Veras et al., 2003, Camhi et al., 2011, Gasperin et al., 2002], sendo a literatura muito ampla neste sentido. Porém, infelizmente, a grande maioria destes estudos se baseia em informações que não são úteis para correlações com o comportamento mecânico, ou não informam todos os dados necessários, ou mesmo procedimentos de obtenção de parâmetros fisiológicos ou histológicos que nem sempre podem ser reproduzidos em outros laboratórios.

As dificuldades e justificativas aqui apresentadas abrem várias possibilidades de desenvolvimento de metodologias experimentais para caracterizar o tecido, necessitando



ensaios que forneçam informações úteis para uma correlação.

A literatura fornece evidência suficiente para justificar a continuação do estudo de metodologias experimentais para caracterizar tecidos biológicos incorporando aspectos individuais/especializados.

## 1.1 Objetivos

Neste trabalho tem-se como principal objetivo realizar um estudo exploratório de caracterização experimental de tecidos biológicos segundo as características individuais do tecido, onde pretende-se buscar correlações destas características individuais com parâmetros mecânicos obtidos de ensaios. Aqui, entende-se como característica individual algum parâmetro que quantifique aspectos específicos ou mesmo estruturais do tipo de tecido. Além disso, pretende-se estudar e apresentar uma metodologia experimental que consiga fornecer todas as informações necessárias para as análises.

Para a realização deste primeiro trabalho do grupo de pesquisa, o estudo será realizado com tecido tendinoso (não limitando-se a apenas um tipo de tendão), que necessita de menos testes experimentais para sua caracterização experimental quando comparado a outros tecidos.

## 2 TENDÕES - CARACTERÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES

Neste capítulo será apresentada a morfologia, hierarquia e comportamento mecânico do tecido tendinoso, objeto de estudo desta tese, além de realizar uma revisão do estado da arte da correlação do tecido com sua resposta mecânica e das influências de parâmetros individuais. Informações mais detalhadas podem ser encontradas em Cowin e Doty, 2007, Mescher, 2013, Junqueira et al., 2004 e nos artigos mencionados.

### 2.1 Tecidos Biológicos

Tecidos biológicos são compostos por uma coleção de células e de uma matriz extracelular [Junqueira et al., 2004]. A matriz extracelular é constituída de fibras (proteínas colágenas e elastina) e de substância fundamental, a qual é composta de proteoglicanos [Cowin e Doty, 2007]. Os tecidos moles são divididos em quatro grandes grupos: conectivo, epitelial, muscular e nervoso, sendo o tipo conectivo o objetivo deste estudo.

O tecido conectivo é dividido em duas classes: frouxo e denso. O tecido conectivo frouxo suporta estruturas normalmente sujeitas a pressão e atritos pequenos, sendo encontrado na mucosa de diversos órgãos e envolvendo vasos sanguíneos, nervos e músculos, não existindo predominância de qualquer componente estrutural [Junqueira et al., 2004]. O tecido conjuntivo denso é adaptado para oferecer resistência e proteção aos tecidos, na sua estrutura existe uma clara predominância de fibras colágenas, sendo menos flexível [Junqueira et al., 2004].

O tecido conectivo denso ainda é subdividido em irregulares e regulares, onde no primeiro a orientação das fibras é aleatória e no segundo as fibras são arranjadas em feixes paralelos [Cowin e Doty, 2007]. Citam-se os tendões como exemplo de tecido conectivo denso regular.

A Figura 2.1 apresenta a divisão dos tecidos biológicos mencionados.

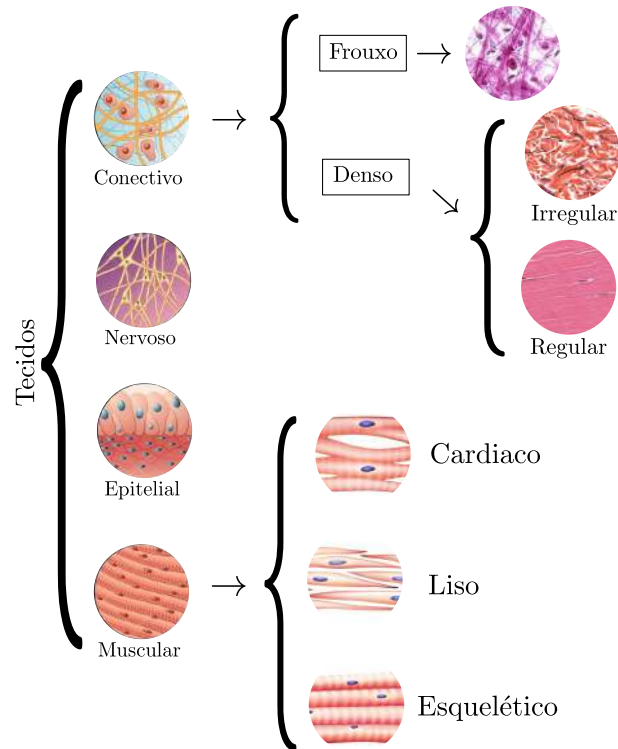


Figura 2.1 – Representação esquemática da classificação de tecidos

## 2.2 Tendões

Os tendões possuem a função de unir o músculo ao osso e transmitir forças trativas do músculo ao osso, produzindo assim o movimento articular [Kannus, 2000]. A forma e o tamanho dos tendões variam consideravelmente, os quais podem ser achatados, cilíndricos, em forma de fita ou leque [Franchi et al., 2007]. O maior constituinte dos tendões, considerando o peso total, é a água (65-70%). Se for considerado somente o peso seco, livre de gordura, as fibras colágenas representam 75-80%, a elastina menos de 3% e os proteoglicanos variam entre 1-1,5% [Schmid-Schönbein et al., 1986], sendo que o tendão é composto predominantemente dos colágenos tipo I, III e V [Zitnay e Weiss, 2018].

O tendão pode ser descrito hierarquicamente em vários níveis, da anatomia macroscópica até a organização molecular. A Figura 2.2 ilustra essa hierarquia (níveis). Segundo Baer et al., 1992, os tendões possuem seis níveis de organização, onde o primeiro nível é a molécula de colágeno e o sexto é o tendão em si, entre esses níveis se encontram as microfibrilas, as fibrilas, as fibras e os fascículos.

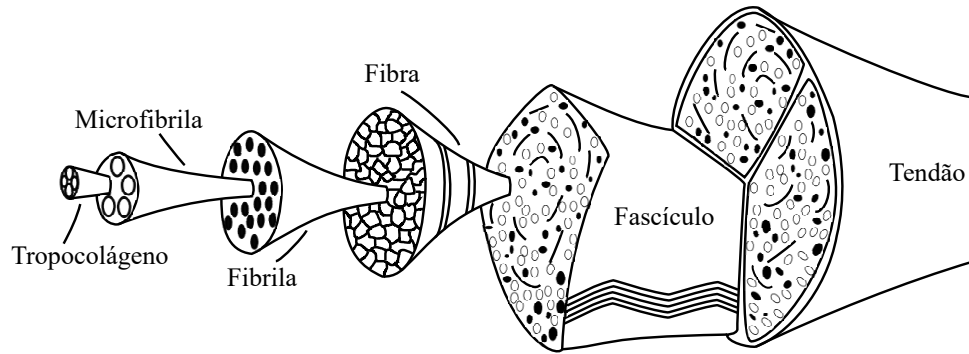


Figura 2.2 – Hierarquia do tendão [adaptado de Kastelic et al., 1978]

O tendão também é revestido por um tecido conjuntivo frouxo, chamado de paratendão, o qual protege o tecido e aumenta o deslizamento entre o tendão e outros tecidos próximos. Em alguns tendões o paratendão percorre todo seu comprimento, em outros é encontrado apenas no ponto onde o tendão se dobra em conjunto com a articulação [Cowin e Doty, 2007]. Logo abaixo do paratendão encontra-se uma fina membrana de tecido conectivo chamada epitendão, sendo esta uma rede fibrilar relativamente densa [Kannus, 2000]. Ainda existe outra rede reticular fina chamada endotendão, a qual envolve e une as fibras do tendão [Kannus, 2000].

A descrição geral da estrutura dos tendões é de que as fibras de colágeno que compõe o tecido são arranjadas em paralelo, conforme representado na Figura 2.3. Essa descrição é razoável para tendões que estão sujeitos a carregamentos uniaxiais, sendo geralmente considerados transversalmente isotrópicos [Cowin e Doty, 2007].

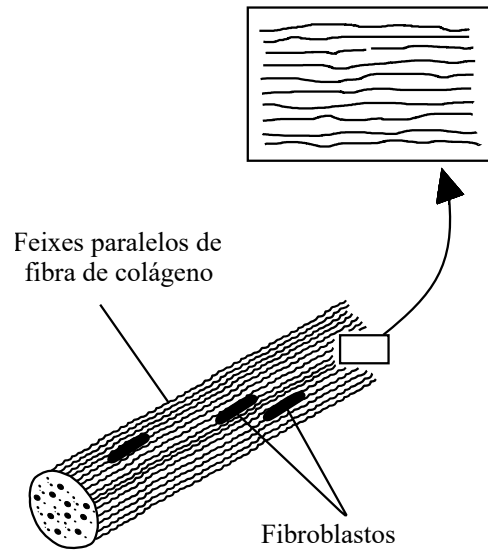


Figura 2.3 – Fibras colágenas do tendão em paralelo [adaptado de Nordin e Frankel, 2001]

O tendão é composto de muitas fibrilas quase-alinhadas, as quais possuem um comprimento que excede muito o pequeno diâmetro que apresentam [Cowin e Doty, 2007]. Além disso, a estrutura das fibras em tendões que não estão tensionados, exibe uma ondulação conhecida como *crimp* do colágeno [Wang, 2006, Cowin e Doty, 2007, Franchi et al., 2007, Connizzo et al., 2013]. Segundo Starborg et al., 2013, essa ondulação é decorrência da natureza helicoidal das fibras em meio a uma matriz predominantemente de células.

As fibrilas são consideradas unidades básicas do tendão, sendo que um feixe de fibrilas forma uma fibra de colágeno [Kannus, 2000]. As fibrilas são constituídas por moléculas de colágeno alinhadas em formato de tripla hélice [Cowin e Doty, 2007] e possuem periodicidade. Essa frequência entre as moléculas é chamada de periodicidade D e é relatada em alguns trabalhos [Orgel et al., 2006, Franchi et al., 2007, Svensson et al., 2017]. Na Figura 2.4 é possível ver com mais detalhes a fibrila, onde a periodicidade da molécula (D) é medida e a tripla hélice demonstrada.

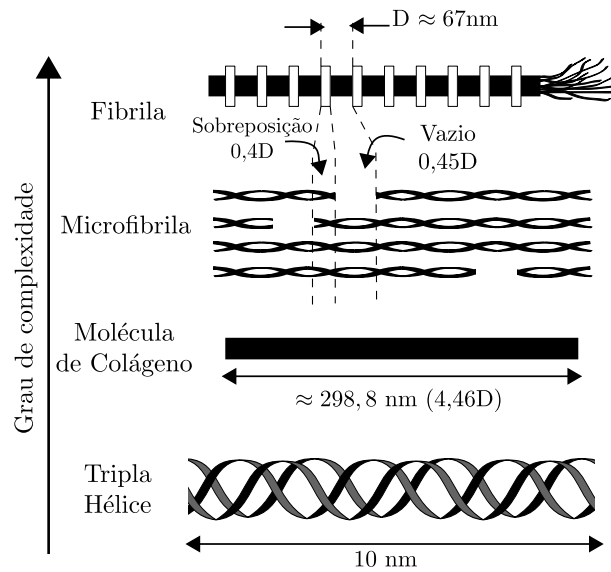


Figura 2.4 – Estrutura fibrilar [adaptado de Orgel et al., 2006]

Os tendões também são considerados altamente anisotrópicos, devido sua estrutura fibrosa orientada unidirecionalmente [Cowin e Doty, 2007].

### 2.2.1 Comportamento Mecânico de Tendões

As propriedades mecânicas dos tendões dependem fortemente das fibras colágenas, mas também do arranjo e da proporção de seus constituintes, particularmente do colágeno e da elastina [Cowin e Doty, 2007].

Os ensaios de tração em tendões geralmente são realizados ao longo do eixo das fibras de colágeno, tratando-se da direção de carregamento predominante *in vivo*, sendo o comportamento resultante não-linear [Cowin e Doty, 2007].

Uma curva típica de tensão-deformação do tecido tendinoso apresenta uma região inicial, conhecida como *toe*, onde o tecido está inicialmente ondulado e sujeito a um alongamento do tecido com pequeno aumento de carga, seguida de uma segunda região, conhecida como região linear, onde as fibras se realinham e a rigidez da amostra aumenta rapidamente [Connizzo et al., 2013], o que está representado na Figura 2.5. Segundo Wang, 2006, a região inicial chega até 2% de deformação e a região linear prologa-se até 4% de deformação, caso o tendão seja deformado acima de 4% ocorre o rompimento microscópico de fibras e além de 8-10% de deformação, ocorrem rompimentos macroscópicos (Figura 2.5). Entretanto o estudo de Devkota e Weinhold, 2003, mostrou que tendões flexores de aves podem deformar elasticamente acima dos valores reportados em estudos anteriores

(4%). Tais observações indicam que tendões de espécies distintas podem ter características mecânicas diferentes.

A Figura 2.5 apresenta a mudança das fibras durante o ensaio, desde a região sem carga, onde existe o *crimp* das fibras, até a região onde ocorre a ruptura. As fibras colágenas mudam sua orientação em relação ao eixo de carga, diminuindo a distribuição de ângulos das fibras [Connizzo et al., 2013], este comportamento ocorre quando a amostra é tracionada. Wilmlink et al., 1992 realizaram um estudo sobre o ângulo do “friso”, mostrando que existe diferenças entre as fibras periféricas e as centrais em tendões de cavalos com mais idade, o que não acontece em cavalos jovens.

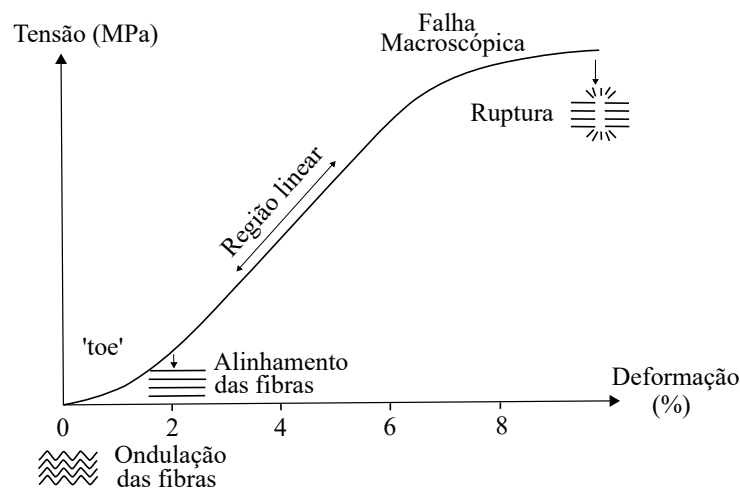


Figura 2.5 – Mudança das fibras do tendão durante o ensaio de tensão-deformação [adaptado de Wang, 2006]

Quando os tendões são submetidos a ensaios cíclicos de tração apresentam um comportamento diferenciado, o que pode ser visto na Figura 2.6, onde observa-se histereses no carregamento e descarregamento. Essa característica se deve ao comportamento viscoelástico do tendão [Pioletti e Rakotomanana, 2000], ou seja, que o tecido tendinoso dissipa energia. Este comportamento é tipicamente observado durante testes de tração de tendões e é resultado tanto da viscoelasticidade da fase sólida quanto da interação da água com a matriz de substância fundamental [Cowin e Doty, 2007].

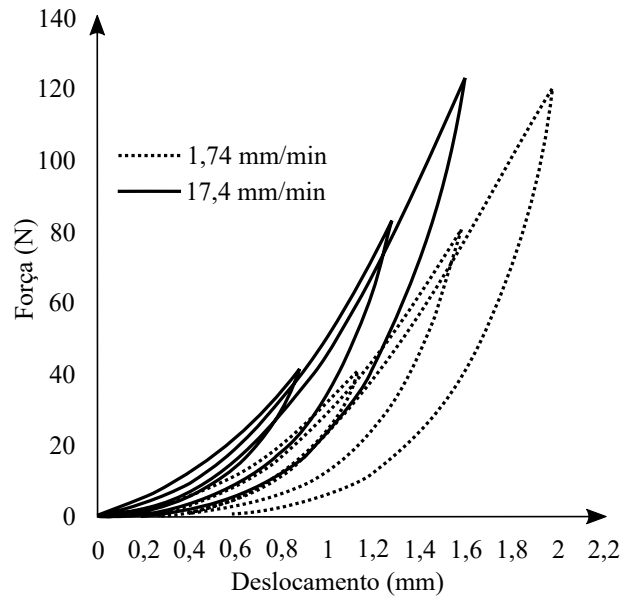


Figura 2.6 – Ensaio cíclico de tração em tendões [adaptado Wilchez, 2012]

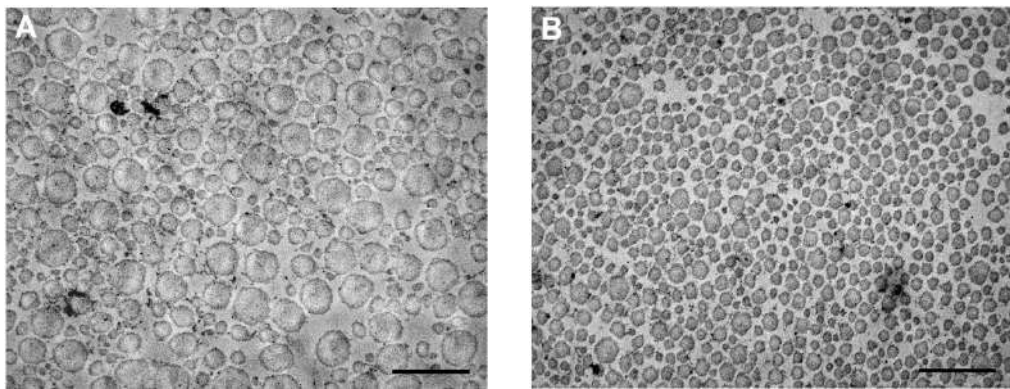
Estas observações experimentais do comportamento mecânico de tecidos biológicos tem sido descritas matematicamente através de diversos modelos. O tecido tendinoso pode ser tratado como: viscoelástico [Holzapfel e Gasser, 2001, Holzapfel et al., 2002, Johnson et al., 1994, Pioletti et al., 1998, Ciarletta et al., 2006, Duenwald et al., 2009, Vassoler et al., 2012], hiperelástico [Holzapfel, 2000, Fancello et al., 2008], elasto-plásticos [Gasser e Holzapfel, 2002], poroelásticos [Tomic et al., 2014], poroviscoelásticos [Khayyeri et al., 2015], considerando dano [Hokanson e Yazdani, 1997, Vassoler et al., 2016], com uma abordagem variacional [El Sayed et al., 2008a, El Sayed et al., 2008b, Fancello et al., 2006, Fancello et al., 2008, Vassoler et al., 2012, Vassoler et al., 2016], entre outros. Estes são apenas alguns exemplos de trabalhos que tem despendido muitos esforços para melhorar a capacidade preditiva do comportamentos de tecidos biológicos. Todos estes modelos devem ser alimentados com dados experimentais úteis para sua utilização em aplicações reais.

### 2.3 Influência de Características Individuais

A caracterização do comportamento mecânico de um tecido biológico específico possui diversas dificuldades. Uma das principais dificuldades está relacionada com a mudança de comportamento mecânico que o mesmo tipo de tecido biológico pode apresentar para diferentes indivíduos ou de diferentes posições do mesmo indivíduo [Learoyd e Tay-



lor, 1966, Maher et al., 2012]. Este aspecto não é considerado em muitos modelos de material encontrados em literatura e ainda tem poucos estudos a ponto de estabelecer quais fatores podem ser correlacionados com a resposta mecânica. Em Hansen et al., 2010, foram encontradas diferenças na distribuição de fibrilas colágenas entre a região do tendão anterior e posterior, mas nenhuma correlação com as propriedades mecânicas do fascículo. As Figuras 2.7 e 2.8 apresentam as diferenças entre os aspectos do tendão patelar anterior e posterior de um homem jovem e saudável juntamente com o seu comportamento mecânico.



(a) Região do tendão patelar anterior (b) Região do tendão patelar posterior

Figura 2.7 – Imagens microscópicas de seções transversais de fascículos [Hansen et al., 2010].

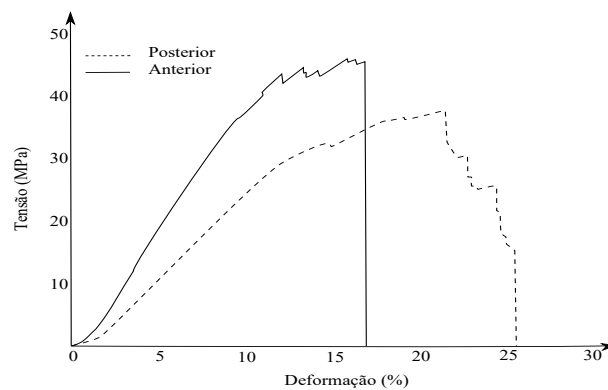


Figura 2.8 – Resposta de tensão-deformação de fascículos [adaptado de Hansen et al., 2010].

A representação do comportamento mecânico de tecidos biológicos também con-

figura uma dificuldade devido a grande dispersão de resultados. Através da Figura 2.9 pode-se visualizar a curva média tensão-deformação de tendões de aquiles de coelhos ( $n=10$ ) e a curva tensão-deformação de dois tendões patelares (um homem e uma mulher).

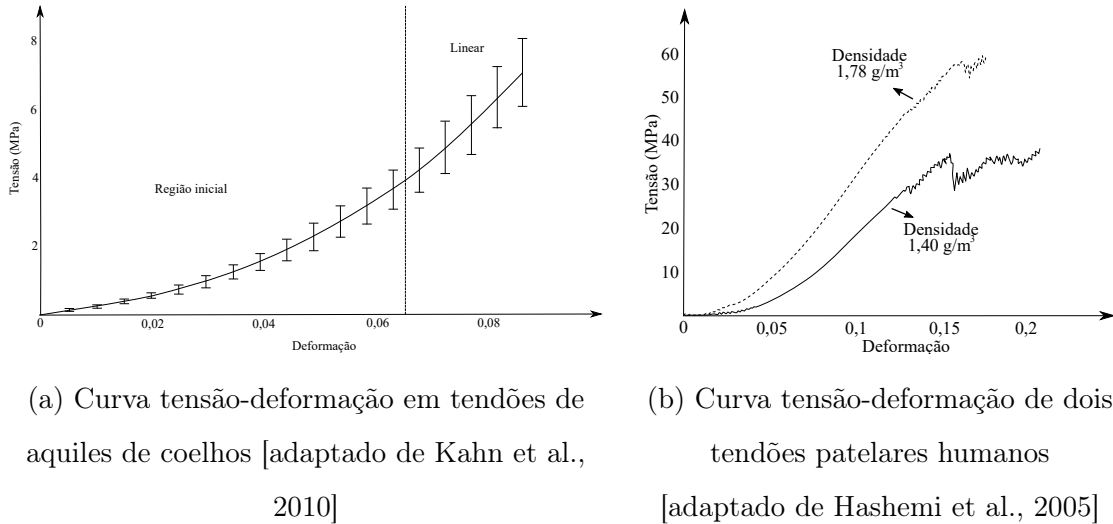


Figura 2.9 – Curva tensão-deformação

Para incorporar aspectos individuais do tecido/indivíduo no modelamento matemático torna-se necessário primeiramente conhecer quais parâmetros do tecido e/ou indivíduo seriam pertinentes ao comportamento mecânico do tecido de interesse.

O estudo de aspectos individuais, tem sido feito segundo características físicas, fisiológicas, histológicas ou até mesmo patológicas. Tais tipos de aspectos são comumente relatados em estudos da área da saúde e, em alguns casos, os estudos apresentam correlações diretas e indiretas com algum tipo de resposta mecânica (não necessariamente a parâmetros de materiais ou curvas de tensão e deformação). Doenças, peso, gênero, IMC (Índice de Massa Corporal), idade e quantidade de fibras são alguns exemplos dos parâmetros que poderiam ter correlação com a resposta mecânica do tecido. Entretanto, alguns dos parâmetros podem ter influência de diversos fatores, o que pode acarretar na inviabilidade de seu uso.

Na literatura também se encontram artigos que procuram correlacionar parâmetros do tecido e/ou indivíduo com sua resposta mecânica, mesmo que em termos de tendência de comportamento. A grande maioria não avalia correlações quantitativamente, apenas qualitativamente. Porém, existem algumas exceções que comprovam algum tipo de rela-

ção. Por exemplo, Sokolis et al., 2011, estudou artérias e realizou uma análise quantitativa de alguns constituintes do material (porcentagem de colágeno, porcentagem de elastina, e suas respectivas ondulações), correlacionando estes com parâmetros do modelo, onde observa que a elastina atua principalmente em baixas tensões, sendo correlacionada com parâmetros do modelo que correspondem a rigidez em baixas tensões. Assim, no trabalho de Sokolis et al., 2011, é feita a correlação de elastina com a rigidez do material. Em Herod et al., 2016, a relação entre a estrutura nanoescalar de fibrilas de colágeno e resposta funcional macroescalar do tecido colagenoso foi investigada, sendo apontado que a resistência do tendão pode estar relacionada à plasticidade da fibrila (presente nos tendões que foram submetidos a 1000 ciclos de carga em fadiga) e que a resistência a fadiga da fibrila pode estar relacionada com a reticulação e estabilidade molecular.

A literatura, para todos tipos de tecidos biológicos, é muito vasta no tema da análise da relação entre algum aspecto e/ou parâmetros e observações de alguma resposta de interesse mecânico. Assim, aqui são apresentados apenas alguns trabalhos relacionados com o comportamento de tendões, os quais foram julgados importantes do ponto de vista experimental-estatístico.

A idade é tida como um fator relevante neste tecido, indicando que pode ter alguma correlação indireta com a resposta mecânica, mas na literatura pode-se encontrar contradições. Conforme Dunkman et al., 2013, os tendões diminuem a rigidez e reduzem a capacidade de transmitir forças com o envelhecimento, e isso também pode ser associado ao decréscimo do alinhamento das fibras, redução da fração de área das fibrilas e aumento da fragilidade. Além disso, Haut et al., 1992, mostraram que a quantidade total de colágeno, no tendão patelar, decresceu e o módulo elástico tendeu a aumentar com a idade. Já o estudo de O'Brien et al., 2010, concluiu que existem diferenças entre o tendão patelar de adultos e crianças (antes da puberdade), pois o tendão patelar em adultos é maior, mais rígido e tem módulo de elasticidade mais alto do que em crianças. Para mulheres o aumento de rigidez no tendão patelar pode ser atribuído a um aumento relativo na área da seção transversal do tendão e a um aumento no módulo de elasticidade, mas em homens essa diferença é atribuída somente ao aumento do módulo de elasticidade. Além dos estudos mencionados, Oryan e Shoushtari, 2009, afirmaram que com o envelhecimento a rigidez aumenta significativamente, assim como a porcentagem de peso seco. Já a tensão de escoamento e a deformação máxima diminuem. Porém, Danielsen e

Andreassen, 1988, não encontraram diferenças em relação a amostras proximais/distais e idade, demonstrado que ainda não há consenso em certos aspectos.

Além do artigo de O'Brien et al., 2010, o qual afirma que entre homens e mulheres ou meninos e meninas a rigidez e o módulo de elasticidade não diferem, outros artigos analisam se existem diferenças entre os sexos. O estudo de Varadarajan et al. 2010, (*in vivo*) indicou que o gênero influencia na orientação do tendão patelar, principalmente a baixos ângulos de flexão, já Hashemi et al., 2005, (*in vitro*) não encontraram diferenças nas propriedades mecânicas do tendão patelar de homens e mulheres, mas encontraram que a densidade de massa do tendão patelar pode variar significativamente de um doador para outro, o que influencia diretamente na resposta mecânica do tecido. Outro estudo realizado por Mikic et al., 2010, demonstrou que fêmeas (de camundongos) apresentam níveis mais baixos de proteoglicanos e de colágenos se comparado com machos, o que fez a composição do tendão de aquiles diferir entre machos e fêmeas.

Propriedades da estrutura do tecido também podem ser levadas em consideração. Danielsen e Andreassen, 1988, afirmaram que os tendões são heterogêneos ao longo do comprimento em relação a propriedades mecânicas (carregamento máximo, inclinação máxima da curva de força-deslocamento e absorção de energia) e conteúdo de colágeno, além disso mostraram que os parâmetros mecânicos são linearmente correlacionados com o conteúdo de colágeno. Haut, 1986, indicou que a tensão de ruptura não muda consideravelmente com o comprimento da amostra. Segundo Lake et al., 2009, exista uma forte correlação entre as propriedades mecânicas de tração do tendão supra-espinhal humano e o alinhamento das fibras, sendo que as fibras se tornam mais alinhadas quando se encontram sob carregamento.

Os tendões de um mesmo animal também podem ser analisados para avaliar se possuem correlação entre si. Em Baker et al., 2004, foi concluído que a conexão entre tendões de um mesmo animal não é forte para a maioria dos fatores (os dados sugeriram que a variação entre cães é tipicamente menos de 50% da variância total de um dado parâmetro), entretanto o colágeno (considerado como um dos fatores) possui uma correlação considerável.

Uma revisão de literatura feita por Scott et al., 2015, afirma que existe uma correlação do índice de massa corporal (ou peso corporal ou circunferência da cintura) com a ocorrência de patologias nos tendões. Este observou que esta correlação acontece na

população em geral mas não em atletas de elite.

Fatores externos ao tecido também podem ser analisados no âmbito de comportamento mecânico. Hansen et al., 2013, testaram as propriedades mecânicas do tendão patelar em mulheres (atletas) que usam métodos contraceptivos orais (pílula) e mulheres que não usam. Não observaram diferenças na composição estrutural do tendão patelar, nem nas propriedades biomecânicas entre os grupos testados. Haut e Haut, 1997, investigaram a sensibilidade do tendão patelar humano para taxas de deformação em banhos hipotônicos e hipertônicos. Encontraram que tendões imersos em soluções hipotônicas relaxam mais rápido do que amostras imersas em soluções hipertônicas.

Como pôde ser visto através da literatura, inúmeros aspectos e/ou parâmetros podem ser considerados relevantes, diretamente ou indiretamente, para com o comportamento mecânico. Os aspectos e/ou parâmetros considerados nestes estudos podem ser quantitativos ou classificações. De forma resumida, estes representavam: idade; alinhamento das fibras; fração de área das fibrilas; porcentagem de colágeno; porcentagem de elastina; porcentagem de peso seco; sexo; densidade de massa; índice de massa corporal; localização distinta do tecido; comprimento; comprimento, circunferência, direção e ondulação das fibras. Para viabilizar um estudo coerente do ponto de vista de metodologia científica, se faz necessária a seleção de alguns dos parâmetros apresentados.

Com o intuito de facilitar o entendimento do desenvolvimento deste trabalho, deve-se ressaltar que a fundamentação teórica das técnicas utilizadas, bem como do tratamento estatístico necessário para identificar as correlações de interesse, serão apresentadas ao longo do capítulo de Materiais e Métodos, onde fundamentos serão oportunamente apresentados e discutidos frente ao seu propósito.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações preliminares

Como já apresentado, diversos são os fatores que podem apresentar correlação com a mecânica do tecido ou do indivíduo (relembrando: idade; sexo; localização distinta do tecido; % colágeno; % de elastina; densidade de massa; comprimento; comprimento, circunferência, direção e ondulação das fibras). A diversidade de resultados e conclusões encontradas na literatura está vinculada com a grande variação de animais considerados nos estudos (coelhos, cachorros, porcos, humanos, etc.), além da maior ou menor diferença de idade entre as amostras, ao tipo de teste (*in vivo* ou *in vitro*), a localização do tecido (tendão patelar, de aquiles, supra-espinhal, digital, etc.), entre outros. Para que se possa ter um banco de dados sem interferência dessa diversidade, torna-se necessária a realização do próprio ensaio, onde é possível controlar a maior quantidade possível de parâmetros e suas respostas mecânicas.

Baseando-se no que foi encontrado na literatura, pôde-se observar que os parâmetros de fácil acesso (como altura, peso corporal, circunferência da cintura, IMC, etc) geralmente não tem sido associados diretamente com um parâmetro de material ou com a resposta mecânica do tecido (com exceção do sistema músculo-esquelético), mas sim com a ocorrência de patologias e lesões. Apesar da facilidade de obtenção destes parâmetros em alguns estudos, principalmente com humanos, o estudo em humanos provou-se inviável e a possibilidade de mensuração desses dados antes do abate dos animais selecionados não foi possível.

A idade e o sexo são fatores acessíveis, mas os artigos pesquisados apresentaram contradições quanto sua influência. Portanto, tratando-se do sexo, procurou-se abranger ambos para realizar análises entre machos, entre fêmeas e entre ambos. A idade não pôde ser avaliada como um parâmetro que influencia a mecânica do tecido, já que no abatedouro que forneceu as peças os animais são abatidos com aproximadamente a mesma idade ( $\pm$  seis meses), tanto machos quanto fêmeas.

A localização do tecido no corpo é de extrema importância, já que diversos estudos mostraram que a estrutura do tecido varia conforme a sua localização. Neste estudo é benéfico definir o projeto experimental onde os parâmetros que serão medidos tenham variabilidade a ponto de permitir correlações com a variabilidade de propriedades mecâ-

nicas. Para avaliar a correlação entre o tecido do mesmo indivíduo e a correlação do tecido em diferentes indivíduos foram selecionados dois tipos de tendões (extensores e flexores), com funções diferenciadas, e diversos indivíduos, onde espera-se que esta escolha já permita obter valores com uma ampla variação. Neste contexto, a resposta mais próxima do ideal para este estudo seria que através de apenas um parâmetro, ou conjunto destes, fosse possível prever o comportamento mecânico de um tecido, independentemente se este fosse proveniente de um macho ou fêmea, ou se fosse de diferente classificação, como extensor ou flexor. Porém, também buscar-se-á possíveis relações separadas para machos ou fêmeas.

Inúmeros artigos descrevem que os parâmetros histológicos são os que mais apresentam correlação com o comportamento mecânico. Pretende-se então focar na obtenção destes fatores, como % de elastina, % de colágeno, diâmetro das fibrilas de colágeno e peso seco.

A realização de grupos de controle para investigação e comparação de tecidos “saudáveis” com aqueles que apresentam algum tipo de doença no tecido não foi possível, já que em um abatedouro o animal precisa estar saudável para ser abatido.

A determinação dos aspectos individuais a serem quantificados foi definida conforme a viabilidade de execução, baseando-se na logística e infraestrutura adequada.

### **3.2 Amostras**

Diferentes animais são utilizados para o estudo de tendões, como cachorros [Haut et al., 1992, Baker et al., 2004], suínos [Ciarletta et al., 2008], ratos [Danielsen e Andreassen, 1988, Mikic et al., 2010, Grasa et al., 2013, Dunkman et al., 2013], entre outros. Os tendões utilizados também são diversos, como o flexor superficial dos dedos [Baker et al., 2004], patelar [Haut et al., 1992, Dunkman et al., 2013], flexor digital [Ciarletta et al., 2008], aquiles [Ciarletta et al., 2008], tendões do rabo de ratos [Danielsen e Andreassen, 1988, Grasa et al., 2013], etc. Dos artigos estudados, o que encontrou o menor número de tendões foi Ciarletta et al., 2008 com 8 tendões flexores suínos e o trabalho encontrado que utilizou o maior número de tendões foi Dunkman et al., 2013, com 102 tendões patelares de camundongos fêmeas. Outros trabalhos utilizaram 14 tendões bovinos, sendo 7 flexores e 7 extensores [Herod et al., 2016], 20 tendões patelares, sendo 10 machos e 10 fêmeas [Hashemi et al., 2005], etc.

Para o presente trabalho o animal escolhido foi o suíno, devido ao conhecimento prévio da anatomia deste animal e em virtude da facilidade de obtenção das amostras. O frigorífico Antônio Carlos (Antônio Carlos – SC) foi responsável pelo fornecimento das patas suínas. Optou-se pelas patas dianteiras, pois estas não sofrem nenhum dano durante o processo de abate, o que ocorre com as patas traseiras, já que em muitos frigoríficos (inclusive o frigorífico que forneceu as patas para este estudo) o animal é pendurado através dos tendões profundos (localizados nas patas traseiras). A altura do corte da pata tem que incluir toda a extensão do tendão (ver Apêndice A para detalhes da extração e localização dos tendões).

### **3.2.1 Armazenamento das amostras**

Tratando-se de tecidos biológicos questões como o armazenamento e condicionamento precisam ser avaliadas. Na literatura diversos autores fazem a comparação entre tecido congelado e não congelado para averiguar a influência do armazenamento [Hirpara et al., 2008, Giannini et al., 2008].

O trabalho de Giannini et al., 2008, analisou os efeitos do armazenamento de tendões humanos congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , quanto a histologia, estrutura e biomecânica. O tecido congelado foi comparado com aquele que não foi submetido ao armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As análises histológicas realizadas pelos autores mostraram diferenças significativas entre o tecido congelado e o não congelado, como o aumento no diâmetro médio das fibrilas, resultando em um número reduzido de fibrilas de colágeno por amostra. Além disso encontraram decréscimo da carga última. Em Tsuchida et al., 1997, foi relatada a separação dos feixes de colágeno após o congelamento, e que segundo os autores pode ser devido a formação de cristais de gelo.

Outros autores também encontraram diferenças na resposta do tecido após o congelamento. Clavert et al., 2001, encontraram alterações significativas na tensão de ruptura e no módulo de Young de tendões humanos frescos quando comparados com aqueles congelados. Ohno et al., 1993, observaram diferenças significantes na tensão última entre os tendões congelados e os não congelados.

Em contrapartida Woo et al., 1986, não encontraram diferenças significativas nas propriedades de tendões congelados se comparado com os tendões frescos e Hirpara et al., 2008, não encontraram diferenças significativas nos tendões frescos, resfriados, congelados



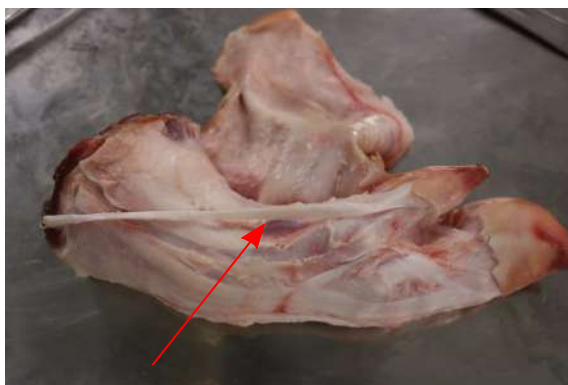
ou recongelados.

Pode-se afirmar que o armazenamento das amostras está vinculado com a maior flexibilização no protocolo de execução dos ensaios. Além disso, facilita a realização de testes subsequentes e possibilita uma dependência menor quanto a aquisição das amostras. Entretanto, como apresentado, o armazenamento pode acarretar em mudanças no tecido.

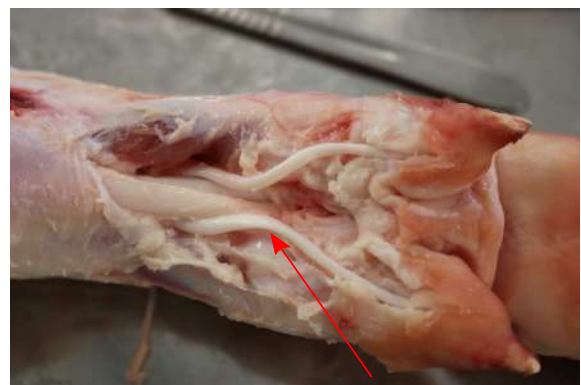
Para que possíveis mudanças no tecido não precisassem ser consideradas nas avaliações do presente trabalho, optou-se por utilizar amostras frescas, ou seja, as amostras utilizadas no presente estudo foram ensaiadas com no máximo 12 horas após o abate do animal e foram mantidas resfriadas (em uma caixa de isopor com gelo durante o transporte e após a dissecação em uma geladeira) até o momento do ensaio mecânico e das análises para obtenção dos parâmetros individuais. Desta maneira a estrutura do tecido se encontrava da maneira mais íntegra possível.

### 3.2.2 Obtenção dos tendões para ensaio

Os tendões, para o presente estudo, foram escolhidos com base na facilidade de acesso, devido ao maior comprimento e devido sua pequena variação ao longo do comprimento. Foram então escolhidos os ramos do tendão flexor digital profundo para dedos acessórios e o tendão do músculo extensor do dedo V, apresentados na Figura 3.1.



(a) Tendão do músculo extensor do dedo V



(b) Ramos do tendão flexor digital profundo para dedos acessórios

Figura 3.1 – Tendões escolhidos

Os tendões utilizados foram isolados, ou seja, foram extraídos de forma que não possuam inserções ósseas (se localizam próximas ao osso e podem apresentar cartilagem)

ou junções músculo-tendíneas (próximas ao músculo), o que poderia acarretar em mudança no comportamento do tecido.

Foram obtidas um total de 12 patas dianteiras direitas, sendo utilizado 2 tendões de cada pata (um flexor e um extensor).

Para a obtenção dos tendões em estudo, faz-se necessário realizar a dissecação das patas obtidas no frigorífico (Figura 3.2).



Figura 3.2 – Pata dianteira intacta

A dissecação se inicia através de um corte com bisturi no plano dorsal da pata, o qual não deve ser muito profundo para não cortar os tendões abaixo. Posteriormente a pele é divulsionada (separação da pele dos demais tecidos sem seccionar) e os tendões extensores são expostos (Figura 3.3). A altura anatômica das coletas foi mantida constante para todas as patas, sempre entre o osso e a junção músculo tendínea. O mesmo procedimento é repetido para a coleta do tendão flexor localizado no plano palmar (Figura 3.4). Observando que para a retirada do tendão flexor torna-se necessário seccionar o feixe espiral em torno dos tendões do dedo. Maiores detalhes sobre a dissecação e a anatomia suína podem ser vistos em Sisson et al., 1986.

A altura da incisão para a retirada do tendão também foi mantida constante para todas as patas.



Figura 3.3 – Pele divulsionada expondo os tendões extensores



Figura 3.4 – Tendões flexores

Para realizar os ensaios mecânicos e as análises de aspectos individuais cada amostra foi dividida conforme demonstrado na Figura 3.5. Os fragmentos do tendão obedeceram a mesma sequência de cortes para as análises, visando utilizar sempre a mesma região para todas as amostras.



Figura 3.5 – Exemplificação dos cortes para cada tendão

Maiores detalhes do procedimento de obtenção das amostras pode ser visto através do Apêndice A.

### 3.3 Aspectos Individuais

Como mencionado anteriormente alguns aspectos individuais do tecido foram pré-selecionados, sendo então verificada a disponibilidade de equipamentos e de técnicas para a obtenção destes.

Conforme descrito previamente o tendão pode ser descrito em diferentes níveis, da anatomia macroscópica até a organização molecular, além de possuir como maior constituinte a água, se considerar o peso total. Considerando somente o peso seco as fibras colágenas caracterizam o maior constituinte. Visando englobar os principais componentes e níveis do tendão, foram escolhidos os seguintes parâmetros individuais: sexo (classificação), porcentagem de colágeno, porcentagem de elastina, peso seco, diâmetro das fibrilas e propriedades a nível molecular (temperatura *onset*, a temperatura de pico, a entalpia de peso úmido e a entalpia de peso seco), que serão apresentadas posteriormente juntamente com a técnica para obtê-las.

Através da Figura 3.6 pode-se visualizar a estrutura hierárquica do tendão a partir da molécula até o tecido, assim como, a escala de cada um dos níveis.

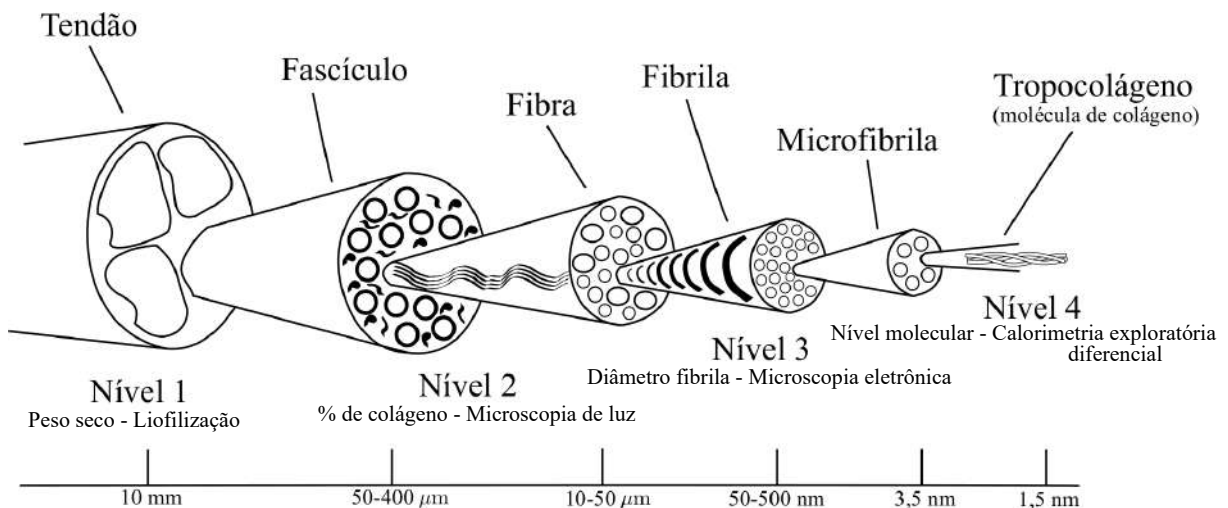


Figura 3.6 – Esboço dos níveis de um tendão [adaptado de Harvey et al., 2009 e Zitnay e Weiss, 2018]

### 3.3.1 Liofilização

A obtenção do parâmetro de peso seco foi feita por meio da liofilização [Terroni, 2013], processo que constitui na desidratação do tecido sem danificá-lo. Como o tendão é constituído principalmente por água, a obtenção da porcentagem de peso seco para cada amostra representa uma medida interessante considerando o tendão macroscopicamente (Nível 1 na Figura 3.6). Primeiramente o tecido é resfriado a uma temperatura baixa (geralmente  $-20^{\circ}\text{C}$ ), depois é submetido a uma pressão negativa (vácuo), quando a água do tecido passa diretamente da fase sólida para a fase gasosa sem passar pela fase líquida (sublimação).

O tempo de permanência das amostras no liofilizador é determinado através de testes preliminares, já que o valor de peso seco somente é obtido quando permanece constante ao longo do tempo [Oryan e Shoushtari, 2009]. Para isto neste estudo ficou estabelecido então que as amostras ficariam 24hrs dentro do liofilizador. Utilizou-se o liofilizador TERRONI LS 3000D (Figura 3.7) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Amostras de cada tendão foram pesadas logo após a dissecação e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 48 horas para então passar pelo processo de liofilização, sendo pesadas novamente ao final das 24 horas, obtendo-se assim um valor de peso seco para cada tendão.



Figura 3.7 – Liofilizador TERRONI LS 3000D

### 3.3.2 Histologia e Microscopia

Para a obtenção do parâmetro da quantidade de colágeno e do parâmetro diâmetro das fibrilas utilizou-se a microscopia de luz polarizada juntamente com a coloração picosirius red e a microscopia eletrônica de varredura. Estas técnicas se encaixam nos níveis 2 e 3 (Figura 3.6).

Técnicas histológicas e de microscopia conjuntamente fornecem informações visuais acerca da microestrutura das amostras [Doroski et al., 2007], abrangendo estruturas em níveis micrométricos e nanométricos. Essas técnicas são realizadas através de protocolos distintos, geralmente cada laboratório utiliza um protocolo guia e faz adaptações conforme o tecido a ser processado. Isto se faz necessário, pois cada estrutura biológica reage de uma maneira diferente, interferindo diretamente na qualidade do resultado.

Para a análise da microestrutura do tecido através da microscopia de luz é necessária a confecção de lâminas histológicas. Para confecção dessas lâminas faz-se necessário seguir algumas etapas: coleta do material, fixação do material (utilização de procedimentos físicos ou químicos para manter sua estrutura), inclusão (impregnação do tecido com uma substância de consistência firme que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas) e corte do espécime em seções finas usando um micrótomo. Uma vez que as seções são criados, elas podem ser coradas e montadas em lâminas histológicas.

A coloração do tecido é realizada para visualizar componentes específicos do tecido, como o tipo de célula ou o tipo de colágeno. Além da coloração, existem outras técnicas que permitem uma delimitação visual de substâncias dentro de um espécime, como a imunohistoquímica. A imunohistoquímica permite a visualização de constituintes através de uma ligação específica entre antígeno-anticorpo.

A microscopia de luz é a modalidade de imagem mais básica, onde a interação da luz com a amostra é avaliada para criar uma imagem microscópica [Halliday et al., 2010]. Existem outros métodos de imagem, como a microscopia eletrônica de varredura.

A microscopia eletrônica de varredura tem como principal vantagem examinar a morfologia e os detalhes da superfície de espécimes em altíssima resolução [Bozzola, 2014]. Na microscopia eletrônica de varredura, um feixe de elétrons é criado e varre a superfície da amostra ao invés de utilizar luz para produzir as imagens. Os passos para a preparação de espécimes biológicas envolvem a fixação do tecido, a pós-fixação em tetróxido de ósmio e a desidratação em etanol. Posteriormente as amostras são transferidas do etanol para

um aparato de secagem, são montadas em stubs, revestidas com um metal pesado para então serem examinadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Maiores detalhes sobre estas técnicas podem ser encontrados em Bozzola, 2014, e na coletânea de livros de Molinaro et al., 2012.

### 3.3.2.1 Microscopia de luz polarizada

Para obtenção do parâmetro porcentagem de colágeno (tipo I, tipo II, I/III) foi empregada a microscopia de luz polarizada juntamente com a coloração por picrosirius red.

Conforme mencionado anteriormente o peso seco do tendão é constituído de cerca de 75-80% de fibras colágenas, sendo que 95-99% é de colágeno tipo I e 1-5% é de colágeno tipo III [Riley, 2003]. Como trata-se de um constituinte importante do tendão este foi avaliado para o presente trabalho.

A quantificação de colágeno pode ser feita através de diferentes métodos, como por exemplo a imuno-histoquímica e colorações específicas. Cada método possui suas vantagens e limitações. Ainda deve-se ressaltar que as técnicas para identificação de porcentagem de colágeno podem ser bem diferentes segundo o tecido biológico de interesse. Neste caso foi necessário definir protocolo próprio. A imuno-histoquímica é a técnica mais utilizada, mas esse método é dependente da disponibilidade de anticorpos específicos [Cuttle et al., 2005]. Dentro das colorações específicas encontra-se o picrosirius red, o qual aumenta a birrefringência do tecido (sob luz polarizada), fornecendo um método simples, específico e sensível para a localização de colágeno [Junqueira et al., 1979], sendo possível distinguir entre os colágenos tipo I e III [Junqueira et al., 1978]. As fibras do tipo I são mais espessas e altamente birrefringentes sendo associadas as cores amarelo, laranja e vermelho, já as fibras do tipo III são mais finas e possuem uma birrefringência fraca associada com a cor verde [Junqueira et al., 1978]. Assim, a cor exibida através do picrisirius red é resultado da espessura da fibra, bem como do arranjo das moléculas de colágeno [Dayan et al., 1989]. Detalhes do fenômeno de birrefringência no tecido, utilizando picrosirius red e luz polarizada, pode ser visto em Rittié, 2017.

Portanto para o presente trabalho, foi utilizado a coloração picrosirius red e o microscópio de luz polarizada para a obtenção de colágeno tipo I e tipo III.

Para avaliar se o protocolo utilizado para microscopia de luz foi adequado (mais de-

talhes no Apêndice B) utilizou-se a coloração por hematoxilina e eosina (HE), sendo esta considerada um procedimento de rotina e permite a visualização de vários constituintes celulares (como o núcleo, citoplasma e tecido conjuntivo). O HE é a principal coloração em anatomia patológica e provavelmente a mais utilizada em histologia. A hematoxilina cora os núcleos de azul e a eosina cora o tecido conjuntivo e o citoplasma em diferentes tonalidades de vermelho ou rosa.

A amostra de cada tendão utilizada para a microscopia de luz polarizada seguiu o protocolo descrito no Apêndice B. O processamento das amostras até o álcool 70% foi realizado no LEBm/UFSC e a partir desta etapa o processamento foi realizado por um técnico, no laboratório Cellula de Florianópolis. As lâminas foram preparadas com uma espessura de  $5\mu\text{m}$ . O tendão estava posicionado longitudinalmente, sendo seccionado ao meio de forma que os cortes utilizados nas lâminas correspondessem ao centro do tendão.

Após a preparação as lâminas, estas foram verificadas em um microscópio com polarizador, onde o fundo do campo de visão foi mantido o mais escuro possível [Whittaker e Canham, 1991], ou seja, o polarizador foi mantido na mesma posição para todas as amostras. Esta leitura foi realizada no setor de patologia do Hospital Universitário da UFSC, utilizando um microscópio com luz polarizada (Nikon Eclipse 50i). Foi utilizado um aumento padronizado de 400x, o mesmo que foi utilizado para o HE. As lâminas foram digitalizadas através do software NIS-Elements F para posterior análise. Foram obtidas pelo menos três imagens por lâmina.

A quantificação de colágeno pode ser realizada de diferentes formas dependendo das ferramentas disponíveis e dos critérios adotados. No presente trabalho as imagens obtidas foram avaliadas no software livre ImageJ 1.52h, sendo extraído de cada imagem em RGB o canal necessário para a quantificação de colágeno [Rittié, 2017]. Aplicou-se a ferramenta *split channels* para a separação dos canais vermelho, verde e azul, sendo utilizado o canal vermelho para o colágeno tipo I e o canal verde para o colágeno tipo III. Em cada canal analisado foi realizada a segmentação da imagem através do método *threshold* [Rich e Whittaker, 2005], obtendo-se a sua binarização. Dessa forma a fração de colágeno tipo I e tipo III foi quantificada utilizando-se o *threshold* padrão. Foram examinados três campos por animal (três imagens por lâmina).

O conteúdo de colágeno foi calculado como uma porcentagem de área em cada imagem [Whittaker e Canham, 1991].



Além de quantificar os tipos de colágeno alguns trabalhos também calculam a razão de colágeno I:III [Cavallo et al., 2014 e Binnebösel et al., 2010]. A proporção de colágeno também foi empregada no presente trabalho.

Além da técnica onde utiliza-se a ferramenta de separação de canais, seguiu-se o método apresentado por Rich e Whittaker, 2005, onde a tonalidade (cor) de cada pixel dentro da imagem é separada. Nesse método a imagem é separada em matiz (*hue*), saturação (*saturation*) e valor/brilho (*value*), ou seja, o modelo de cor HSV. Nesta análise foi retirado primeiramente a influência do componente preto através do brilho, pois compromete a posterior quantificação, sendo subtraído o pico de concentração desta cor. O componente da matiz é então separado seguido as seguintes definições: 2-9 e 230-256 correspondem a cor vermelha, 10-38 a cor laranja, 39-51 a cor amarela e 52-128 a cor verde [Rich e Whittaker, 2005]. O intervalo 129-229 consiste de espaço intersticial e elementos de tecido não birrefringentes [Rich e Whittaker, 2005]. Deve-se notar que os parâmetros aqui obtidos valem para comparações com protocolos que usaram o mesmo procedimento. Caso tenham sido utilizados intervalos diferentes para definir as cores, os valores podem levar a tendências diferentes.

### 3.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

O parâmetro do diâmetro das fibrilas foi obtido através da microscopia eletrônica de varredura, a qual avalia o tendão com uma resolução maior. No nível estrutural nanométrico do tendão se encontram as fibrilas de colágeno (nível 3 da Figura 3.6), sendo o diâmetro dessas fibrilas mensurado. Conforme Herod et al., 2016, esse nível ultraestrutural do tendão pode ser avaliado através do MEV.

As amostras dos tendões foram então coletadas e processadas conforme descrito no Apêndice C. A Figura 3.8 mostra as amostras de tecido montadas em stubs. O revestimento metálico utilizado foi o ouro. As amostras foram então examinadas com magnificação de 20000X utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6701F, operando em 5kV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

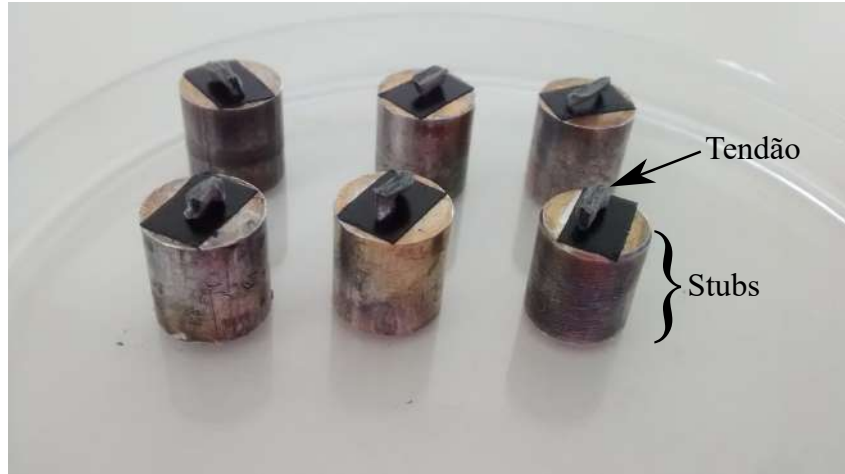


Figura 3.8 – Amostras montadas em stubs

Para cada amostra de tendão foram obtidas no mínimo 5 imagens através do MEV, correspondendo a 5 localizações diferentes de cada amostra. O diâmetro das fibrilas foi medido através do software livre ImageJ 1.52h, onde no mínimo 70 fibrilas diferentes tiveram seus diâmetros medidos, sendo que cada diâmetro foi medido em 5 localizações diferentes ao longo da mesma fibrila. Esse procedimento foi baseado no artigo de Herod et al., 2016.

### 3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

Para obtenção dos parâmetros: temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ), temperatura de pico ( $T_{peak}$ ), entalpia de desnaturação para peso úmido e entalpia de desnaturação de peso seco foi utilizado a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Este parâmetros estão associados ao Nível 4 da Figura 3.6.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) faz parte de um grupo de técnicas de análise térmica que medem as propriedades ou mudanças de propriedade dos materiais, consideradas eventos térmicos, em função da temperatura. Um dos eventos térmicos que pode ser medido através da DSC é a variação de entalpia, a qual quantifica o calor que flui para dentro ou para fora de um sistema sob pressão constante.

As técnicas de análise térmica podem ser afetadas por diversos fatores como a dimensão e massa da amostra (preferível que seja menor que 10mg), a taxa de aquecimento (precisa ser adequada, nem muito rápida, nem muito devagar), o histórico mecânico (deve ser o mesmo para todas as amostras), entre outras [Leng, 2009].

Existem dois sistemas de DSC amplamente utilizados: o DSC por fluxo de calor e o DSC por compensação de energia; ambos medem a diferença de fluxo de calor entre uma amostra e uma referência.

Para o presente trabalho foi utilizando a DSC por fluxo de calor, que mede diretamente a diferença de temperatura para então converter em variação de entalpia. Na Figura 3.9 é possível visualizar o equipamento utilizado. Nesse sistema, as amostras são colocadas em um único forno envoltas por um recipiente conhecido como panelinha. Esse recipiente fica sobre uma base de metal condutor. Antes de começar, a análise o compartimento interno é preenchido com gás inerte, o qual previne a amostra de reações de oxidação.

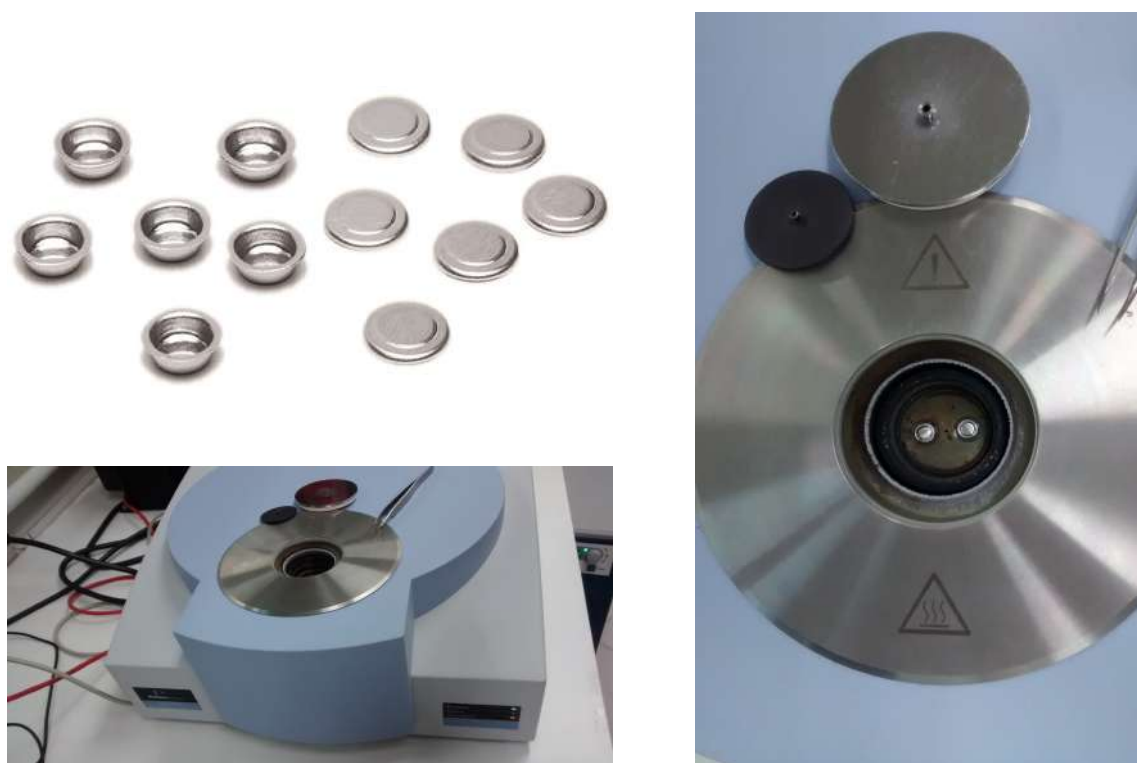


Figura 3.9 – DSC e panelinhas utilizadas nas análises

Na DSC, é comum utilizar painéis de alumínio pois a faixa de temperatura de operação é mais baixa ( $<500^{\circ}\text{C}$ ) que em outras técnicas de análise térmica. Além disso, as painéis são frequentemente seladas para evitar a mudança de massa da amostra durante a evaporação; o selamento ocorre através de uma prensa especial que solda mecanicamente a tampa e a panela [Leng, 2009]. Maiores detalhes sobre esta técnica podem ser encontrados em [Leng, 2009].

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é utilizada para acessar o nível molecular do tendão [Herod et al., 2016], fornecendo informações sobre o estado da estrutura do colágeno [Miles et al., 1994]. Lembrando que o tendão é formado principalmente por colágeno, cerca de 70-80 % do seu peso seco, e sua molécula é formada por uma hélice tripa constituída por três cadeias  $\alpha$  [Cowin e Doty, 2007].

Quando uma amostra de tendão é submetida a uma análise por DSC, as moléculas da hélice tripla do colágeno sofrem uma transição, dando origem a um pico endotérmico acentuado ao chegar em uma determinada temperatura [Miles e Bailey, 1999], ocorrendo a perda do arranjo tridimensional que é definido como desnaturação. A posição, altura, largura, área e simetria do pico do termograma fornecem informações valiosas sobre o processo de desnaturação [Miles e Bailey, 1999].

Miles et al., 1994, afirmaram que a entalpia de desnaturação está relacionada com a concentração da triple hélice da molécula de colágeno. Giannini et al., 2008, utilizaram o valor da entalpia de desnaturação ( $\Delta h$ ) para calcular o conteúdo médio da triple hélice de tendões congelados em relação aos tendões controle, sendo que a redução na entalpia de desnaturação foi associada com o decréscimo do conteúdo de tripla hélice por unidade de massa [Miles et al., 1994, Giannini et al., 2008]. A temperatura *onset* e a temperatura de pico possuem relação com o processo de desnaturação do tecido [Lepock et al., 1990].

Herod et al., 2016, obtiveram através das curvas do DSC, a temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ), a temperatura de pico ( $T_{peak}$ ), a largura total no meio do pico (FWHM) e a entalpia específica de desnaturação ( $\Delta h$ ), conforme pode ser visto na Figura 3.10.

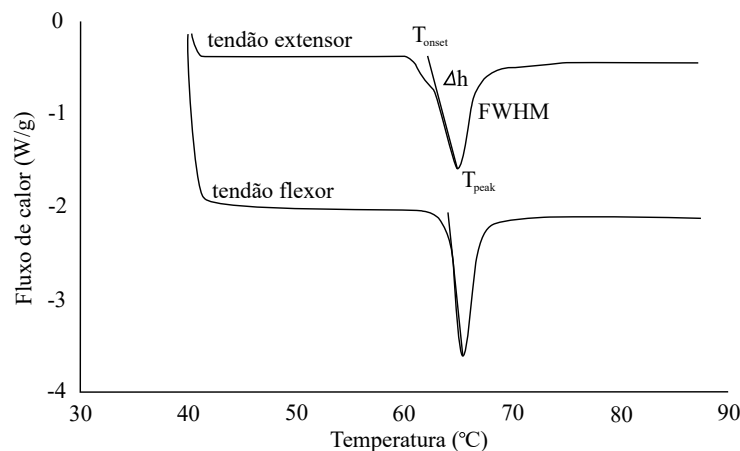


Figura 3.10 – Análise DSC [adaptado de Herod et al., 2016]

Como não existe uma padronização para o ensaio, as análises encontradas na litera-

tura apresentam diferenças, como a temperatura inicial e final da rampa de aquecimento, a velocidade de aquecimento, a massa das amostras, assim como os dados extraídos da curva.

Herod et al., 2016, utilizaram uma temperatura inicial de 40°C aquecendo até 90°C a uma velocidade de 5°C/min e Giannini et al., 2008, utilizaram uma temperatura inicial de -5°C aquecendo até 120°C a uma velocidade de 5°C/min, sendo realizado somente um ciclo, já Miles et al., 1994, utilizaram uma temperatura inicial de 5°C aquecendo até 100°C a uma velocidade de 10°C/min e fizeram dois ciclos. Os três trabalhos citados utilizaram panelinhas hermeticamente seladas.

Para o presente trabalho optou-se por utilizar somente um ciclo, já que o evento endotérmico é irreversível [Miles et al., 1994]. Pode-se citar como exemplo de evento endotérmico: fusão, perda de massa da amostra (vaporização de água, aditivos ou produtos voláteis de reação ou de decomposição), dessorção e reações de redução. Os picos endotérmicos são formados pela variação de entalpia.

Obteve-se um pico endotérmico através do uso de panelinhas hermeticamente seladas. Além disso, foram avaliados os procedimentos anteriores as análises. Giannini et al., 2008, secaram as amostras ao ar e posteriormente reidrataram o tecido em solução fisiológica a 37°C por 1h, Herod et al., 2016, armazenaram as amostras em temperatura de 4°C em tubos selados contendo solução salina tamponada de fosfato com antibiótico por 24-36 horas antes do teste com o DSC, já Miles et al., 1994, realizou as análises sem procedimento anterior. Para determinar se procedimentos anteriores seriam necessários comparou-se análises de amostras que ficaram por uma hora em solução salina com amostras do mesmo tendão que não foram submetidos a procedimentos prévios. Os resultados das análises onde a solução salina não foi empregada foram, em sua maioria, insatisfatórios, ou seja, não apresentaram picos endotérmicos.

Após a realização dos testes definiu-se pela utilização de solução salina por uma hora, em temperatura ambiente, antes das análises. A rampa de aquecimento utilizada foi de 20°C até 90°C a uma velocidade de 5°C/min. Estipulou-se que a massa das amostras seria de aproximadamente 5mg. Além disso, os demais procedimentos entre a coleta e análise das amostras foram mantidos constantes. O DSC utilizado foi da Perkin Elmer (Modelo Jade) da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, com vazão de gás de 20 ml/min e utilizando como gás

inerte o nitrogênio.

A entalpia de desnaturação pôde ser estipulada com base no peso obtido logo após o banho em solução salina (momentos antes de começar a análise) ou com o peso seco da amostra [Herod et al., 2016], obtido após perfurar as panelinhas e deixá-las por 24 horas em uma estufa a 100°C, obtendo-se assim seu peso seco.

Através das curvas do DSC foram obtidos os seguintes parâmetros: temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ); a temperatura de pico ( $T_{peak}$ ), a entalpia específica de desnaturação baseada no peso úmido e a entalpia específica de desnaturação baseada no peso seco. A posição inicial e final de medição do pico de termograma foi estipulada através da derivada da curva. O uso de parâmetros obtidos com DSC para correlação mecânica é utilizado em poucos trabalhos na literatura.

### 3.4 Ensaios Mecânicos

Os ensaios experimentais de tecidos biológicos podem ser realizados *in vivo* ou *in vitro*. Os testes *in vivo* podem observar o comportamento real do tecido, entretanto são de difícil concepção quando deseja-se utilizar seus resultados para caracterização do tecido.

Uma maneira mais simples de caracterizar o tecido é através de ensaios *in vitro*. Os carregamentos podem ser fisiológicos ou de maior magnitude (levando à ruptura). Estes são os testes mais utilizados e serão empregados no presente trabalho [Formenton et al., 2016].

Devido à característica de organização interna das fibras, preferencialmente na direção longitudinal, tendões se comportam como uma corda, necessitando apenas de um ensaio trativo (que está correlacionado principalmente com a resposta de suas fibras). As dimensões transversais puderam ser medidas durante o ensaio.

#### 3.4.1 Célula de carga e taxa de deformação

As células de carga geralmente são definidas conforme a carga máxima esperada durante o ensaio. Foram encontrados trabalhos que utilizaram células de carga de 5N [García et al., 2011, Grasa et al., 2013], 10N [García-Herrera et al., 2012, Dunkman et al., 2013], 50N [Gundiah et al., 2013, Karimi et al., 2013].

A taxa de deformação difere para cada ensaio reportado na literatura, sendo realizada frequentemente através de deslocamento constante. Dependendo do comportamento

que se quer capturar a velocidade de deformação muda. Foram encontradas taxas de carregamento de 0,1%/s [Lake et al., 2009, Dunkman et al., 2013], 0,5%/s [Haut e Haut, 1997], 1%/s [Ciarletta et al., 2008], 3%/s [Ciarletta et al., 2008], 6%/s [Ciarletta et al., 2008], 10%/s [Ciarletta et al., 2008], 100%/s [Haut et al., 1992, Hashemi et al., 2005, Mikic et al., 2010], além de 10mm/min [Danielsen e Andreassen, 1988, Baker et al., 2004] e 0,2L/100 mm/min [Grasa et al., 2013], sendo L o comprimento inicial da amostra.

Após alguns testes iniciais, a célula de carga selecionada para o presente trabalho foi de 500N e empregou-se uma única taxa de deformação de 0,1%/s, já que essa velocidade é tida como quase estática [Dunkman et al., 2013].

### 3.4.2 Pré-condicionamento

Existem diferentes metodologias para o pré-condicionamento do corpo de prova no ensaio de tração, que pode ou não ser utilizado. Não há consenso neste sentido, onde muitos estudos nem mesmo consideram o seu uso, porém é evidente que este tem papel importante no ensaio destes tecidos.

Os trabalhos encontrados na literatura indicam que deixaram as amostras pré-tensionadas em 5N [Haut e Haut, 1997] ou fizeram um pré-carregamento de 0,5N [Huang et al., 2009]. Os trabalhos encontrados que apresentam o pré-condicionamento, realizaram 10 [Baker et al., 2004, [Dunkman et al., 2013]] ou 20 ciclos de carga, anteriormente ao ensaio quase-estático [Haut et al., 1992, Hashemi et al., 2005, Huang et al., 2009].

Como o pré-condicionamento é realizado com o intuito de organizar as fibras e tentar restaurar, se necessário, o estado que a amostra possuía quando se encontrava *in vivo*, este é importante para deixar todas as amostras na mesma condição inicial e permitir comparações. Quando não se realiza um pré-condicionamento nas amostras por um tempo mínimo, é possível que estas se encontrem organizadas internamente de forma diferente, devido a viscosidade inerente do material. Assim, poder-se-ia ter erros de referencial das deformações devido ao estado inicial das ondulações das fibras.

Após testes preliminares, foi definido, uma pré-carga de 0,5N e um pré-condicionamento de 10 ciclos, com amplitude de 0,1N até 10N. Foi utilizada a mesma velocidade (0,1%/s) tanto para a pré-carga, como para o pré-condicionamento e para a rampa até a ruptura da amostra.

### 3.4.3 Micrômetros digitais e Dispositivo

Um dos maiores problemas em se medir dimensões transversais de amostras de tecidos biológicos é devido a sua baixíssima rigidez. Visando a obtenção da área da seção transversal das amostras, diferentes técnicas são utilizadas. Noyes et al., 1984, utilizaram um paquímetro para medir a área da seção transversal, sendo que entre quatro e seis posições foram medidas ao longo do tendão, calculando-se a média, já Giannini et al., 2008, fez uso de um micrômetro. Hamada et al., 1998, mediu a área da seção transversal de tendões semitendinosos e de ligamentos cruzado anterior com o uso de ressonância magnética.

No presente trabalho optou-se por uma técnica sem contato para medição da área transversal dos tendões, obtendo-se medidas mais precisas e com maior repetibilidade. Foram utilizados micrômetros digitais de alta velocidade e alta precisão LS-7070 da KEYENCE . Através dos micrômetros foi possível obter duas medidas transversais e aproximar por elipse para obtenção da seção transversal [LaCroix et al., 2013].

Para adaptar os micrômetros ópticos na máquina de ensaio utilizada, um dispositivo de sustentação para estes se fez necessário. Na Figura 3.11 o dispositivo produzido aparece em azul e os micrômetros digitais em verde, a estrutura da máquina aparece em cinza, além disso uma parte do aparato experimental é apresentado.



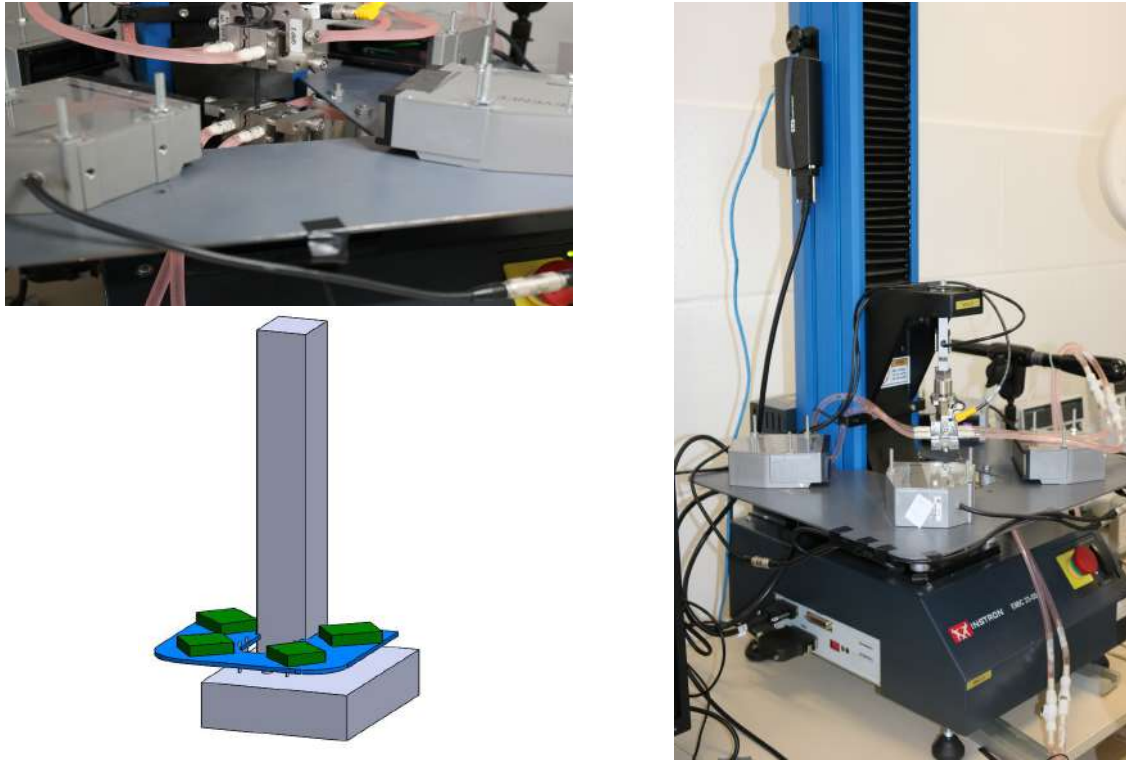


Figura 3.11 – Dispositivo e posicionamento dos micrômetros ópticos

#### 3.4.4 Fixação das amostras na garra

Em tecidos biológicos é comum o fenômeno de escorregamento das amostras durante o ensaio. Isto ocorre devido à textura mole, úmida e muitas vezes devido ao tamanho do tecido. Para tentar contornar este problema, diferentes tipos de garras e métodos de fixação distintos são utilizados, como em Dunkman et al., 2013, onde acessórios personalizados foram empregados, em Herod et al., 2016, as garras de esmagamento foram forradas com lixa. Em Hu et al., 2009, foram usadas garras criogênicas.

No presente trabalho optou-se por utilizar garras termoelétricas para tecidos moles (Thermoelectric Cooled - TEC) da ElectroForce/TA. Estas garras utilizam módulos termoelétricos para resfriar e congelar o tecido que se encontra dentro da área dos mordentes. O tecido congelado assume a forma dos mordentes da garra, prevenindo o escorregamento do tecido [ElectroForce/TA].

Os módulos termoelétricos se localizam atrás de cada um dos mordentes da garra. Uma fonte de alimentação é utilizada para fornecer energia necessária para cada módulo termoelétrico, transferir energia da face em contato com a amostra e para o dissipador de calor. O dissipador de calor constitui um fluido que passa pelo lado quente de cada módulo

termoelétrico, sendo este fundamental para obter as temperaturas de congelamento nos mordentes da garra e evitar danos ao equipamento. Os parâmetros que determinam a eficácia do dissipador são a taxa de vazão e a temperatura do fluido refrigerante. Além do conjunto de garras fazem parte do sistema um chiller de recirculação, um medidor de vazão, uma fonte e a tubulação.

Para o funcionamento adequado das garras existem algumas restrições a serem obedecidas: a taxa de fluxo deve se encontrar entre 1200-2000 mL/min, temperatura do chiller deve estar entre 5-10 °C e a fonte deve se encontrar a 10,0V e 6,60A quando for ligada. Além disso, a amostra precisa estar dentro de algumas especificações. As garras possuem capacidade de 2250N e são construídas em titânio.

Para o presente trabalho foi utilizada uma temperatura de 7,5°C e uma taxa de fluxo de 1600ml/min. Esses valores foram definidos após testes iniciais.

Para averiguar se o congelamento se estendeu ao longo da amostra, um pirômetro infravermelho laser foi utilizado durante a pré-carga e no final do ensaio para avaliar a mudança de temperatura da amostra.

#### **3.4.4.1 Parâmetros mecânicos**

Na literatura diferentes propriedades são obtidas através da curva de ensaio de tecidos biológicos, como em Mikic et al., 2010, onde foram extraídas a força máxima, o módulo de elasticidade, densidade de energia de deformação, entre outras. Em Robinson et al., 2004, e Derwin e Soslowsky, 1999, a primeira derivada (inclinação) da curva na região linear foi calculada como o módulo tangente.

Através das curvas monotônicas de cada amostra foi possível extrair parâmetros mecânicos. Para o presente trabalho foram escolhidos o alongamento, a tensão última, a tensão última verdadeira, o módulo tangente e o módulo tangente verdadeiro da curva monotônica. O parâmetro módulo tangente, associado a rigidez do tendão, corresponde a inclinação da curva tensão-deformação e foi obtido na região central da curva, que representa a região linear, conforme apresentado na Figura 2.5.

### **3.5 Análise Estatística**

Após a obtenção de dados experimentais, é necessário analisá-los através de métodos estatísticos. Desse modo pode-se determinar se existem diferenças estatisticamente

significantes entre os grupos, se um fator ou interação é significativo, se existe ou não correlação, entre outras conclusões de interesse.

Na literatura diversos são os testes utilizados, tais como: Kolmogorov-Smirnov [Azadani et al., 2012], teste t pareado e/ou individual [Azadani et al., 2012, Geest et al., 2006], teste t de Student [García-Herrera et al., 2012, Geest et al., 2006, Haskett et al., 2010, Karimi et al., 2013, Billaud et al., 2012], ANOVA [Sokolis, 2010, Haskett et al., 2010, Karimi et al., 2013, Billaud et al., 2012, Stephen et al., 2014], Bonferroni [Sokolis, 2010, Haskett et al., 2010, Gundiah et al., 2013], método de Tukey [Sokolis et al., 2011], entre outros.

No presente trabalho, têm-se como principal objetivo avaliar a correlação entre parâmetros mecânicos e parâmetros individuais. Além disso, a influência do sexo e do tipo de tendão também é de interesse. Um breve apanhado sobre os métodos utilizados é realizado, assim como a descrição da metodologia empregada. Para maiores detalhes, veja-se, por exemplo, Field, 2009, Devore, 2011, e Callegari-Jacques, 2009.

### 3.5.1 Análise de dados inicial

Primeiramente os dados obtidos precisam ser explorados, ou seja, precisam ser examinados de forma apropriada antes de começar a análise estatística propriamente dita. Dessa forma pode-se verificar a distribuição dos dados, se existem valores atípicos (*outliers*), se os dados são normais, etc. Neste caso o principal ponto de interesse é avaliar se a distribuição dos parâmetros é normal, pois algumas análises partiram do princípio de que a distribuição é normal.

No presente trabalho a normalidade de cada grupo de dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Este teste compara escores de uma amostra com uma distribuição normal modelo de mesma média e variância dos valores encontrados na amostra. Se o teste não for significativo, ou seja,  $p > 0,05$ , os dados da amostra não diferem significativamente de uma distribuição normal. Caso  $p < 0,05$  a distribuição é significativamente diferente de uma distribuição normal, ou seja, é não-normal.

### 3.5.2 Teste *t* e teste de Mann-Whitney

Para verificar se existem diferenças estatisticamente significantes entre tendões de machos e fêmeas e entre extensores e flexores utilizou-se o teste *t*. O teste *t* é um teste

paramétrico usado para testar diferenças entre duas médias. Testes paramétricos precisam satisfazer alguns pressupostos, como a distribuição normal.

No teste  $t$  duas médias são comparadas e se  $p < 0,05$  as médias dos dois grupos de dados são significativamente diferentes. Outro pressuposto dos testes paramétricos é a homogeneidade da variância, ou seja, a variância de uma variável deve ser estável em relação a todos os níveis da outra variável. Para testar a hipótese de variâncias homogêneas utiliza-se o teste de Levene. Se o teste de Levene é significativo ( $p \leq 0,05$ ) as variâncias são significativamente diferentes, ou seja, a suposição de variâncias homogêneas foi violada. Se o teste de Levene não for significativo ( $p \geq 0,05$ ) as variâncias são aproximadamente iguais, ou seja, assume-se que existe homogeneidade da variância.

Caso a distribuição de dados das variáveis não seja normalmente distribuída pode-se primeiramente corrigir a distribuição usando uma transformação, mas se isso não funcionar utiliza-se um teste não-paramétrico.

No presente trabalho o teste não-paramétrico utilizado, equivalente ao teste  $t$ , é o teste de Mann-Whitney. Nesse teste a mediana dos dois grupos são significativamente diferentes se  $p < 0,05$ .

### 3.5.3 Correlação e regressão

O estudo de correlação entre variáveis pode ser realizados de diferentes formas segundo o interesse. Esta pode ser considerada linear ou não linear e pode ser feita entre duas ou mais variáveis. A correlação, caso exista, entre as variáveis individuais e as variáveis mecânicas é medida através de um parâmetro de correlação. As variáveis podem estar positivamente correlacionadas, podem não estar relacionadas ou podem estar negativamente relacionadas. A intensidade de associação entre duas variáveis é medida através do coeficiente de correlação, o qual varia de -1 a +1.

O coeficiente de correlação mais utilizado para analisar dados é chamado de coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), caso os dados violem as suposições paramétricas utiliza-se o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ).

Apesar de cada área poder utilizar valores diferentes para avaliar a qualidade da correlação, um critério bem aceito é quando as correlações são consideradas fortes para  $r > 0,8$ , moderadas para  $0,5 < r \leq 0,8$  e fracas para  $r \leq 0,5$  [Devore, 2011].

A regressão múltipla é utilizada para prever um resultado a partir de diversas

variáveis previsoras. Se aplica a situações onde existe razões para se supor relação de causa e efeito entre variáveis e se quer expressar matematicamente essa relação.

Na regressão múltipla, os previsores incluídos e a forma que são colocados podem ter um grande impacto, sendo de suma importância selecionar os mais adequados [Field, 2009]. Existem diversos métodos de regressão, como o hierárquico, entrada forçada e passo a passo.

No presente trabalho, os modelos de regressão múltipla linear são utilizados para quantificar a relação entre cada uma das variáveis dependentes (variáveis mecânicas) e as variáveis preditoras (variáveis individuais), ajustando (corrigindo) pelas demais variáveis presente no modelo, assim como foi realizado por Robinson et al., 2004. Com esta análise é possível indicar se a correlação com os parâmetros mecânicos melhora quando considerados dois ou mais parâmetros individuais ao mesmo tempo.

Será utilizada a regressão passo a passo através do método de eliminação retroativa. Esse método começa com o modelo no qual são usados todos os preditores em avaliação, sendo então calculada a contribuição de cada preditor verificando sua significância estatística ajustada pelos demais preditores. O previsor mais distante de uma contribuição estatisticamente significativa é eliminado e a contribuição dos demais previsores é então reavaliada objetivando a melhor estimativa utilizando o menor número de variáveis possível. Esse método foi selecionado pois o estudo é exploratório, já que as escolhas das variáveis serão realizadas com base em um critério estatístico, tirando do pesquisador decisões metodológicas [Field, 2009].

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS 18.0.3 e o nível de confiança considerado para o estudo será de 95%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo os resultados obtidos através das técnicas experimentais detalhadas anteriormente serão descritos e discutidos. Assim como enfatizado na literatura, buscou-se a padronização dos procedimentos de ensaios a fim de reduzir possíveis erros [García et al., 2011]. Todos os ensaios experimentais foram realizados pela mesma pessoa e com o mesmo intervalo de tempo para todas as baterias. Os protocolos, inclusive com a indicação de tempos a serem controlados, são apresentados no Apêndice A e no Apêndice D.

### 4.1 Resultados dos parâmetros mecânicos

Visando a caracterização do tecido tendinoso, foram realizados ensaios mecânicos trativos *in vitro*. As dimensões transversais foram controladas através de micrômetros digitais ópticos, durante todo o ensaio. Detalhes de todo o procedimento podem ser encontrados no capítulo três e no Apêndice A. Na Figura 4.1 é possível visualizar o aparato projetado especificamente para este trabalho.

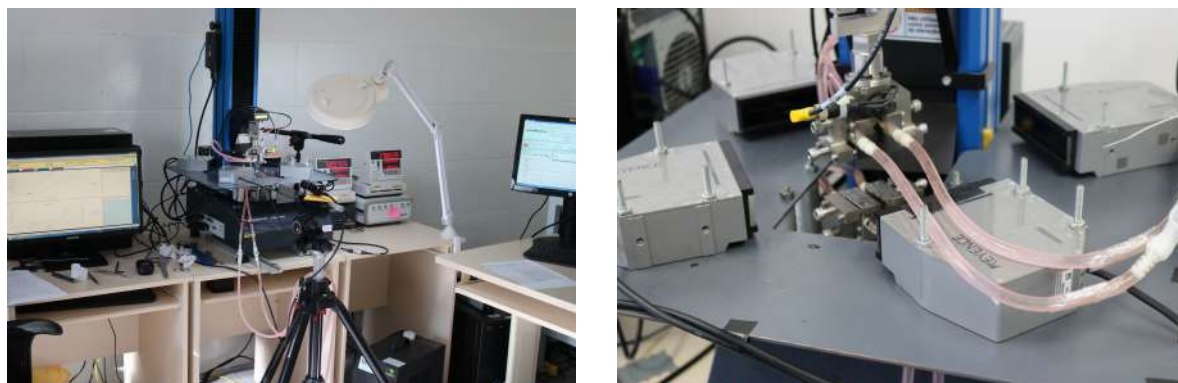
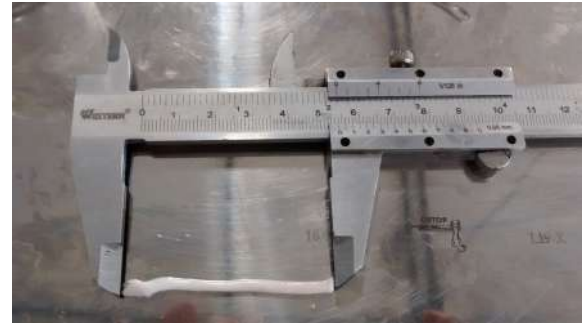


Figura 4.1 – Aparato para ensaio mecânico

A área da seção transversal das amostras foi calculada através das medidas fornecidas pelos micrômetros digitais ópticos de alta precisão, sendo realizada a aproximação por elipse. Deve-se notar que a geometria dos tendões se diferenciam significativamente, sendo que o tendão flexor tem um formato circunferencial e o tendão extensor um formato achatado, conforme Figura 4.2. Ainda deve-se notar que é esperado que a geometria da seção transversal se modifique ao longo do ensaio se achatando cada vez mais [Carniel et al., 2019].



(a) Tendão extensor

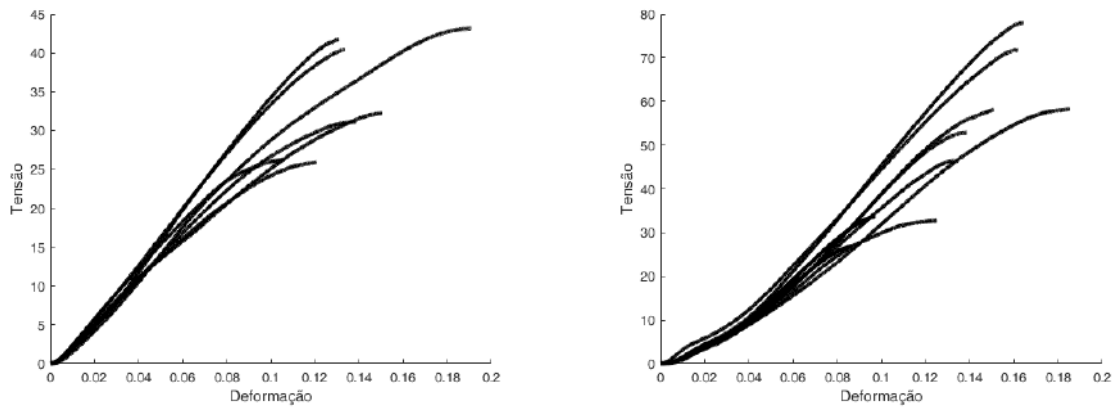


(b) Tendão flexor

Figura 4.2 – Tendões utilizados

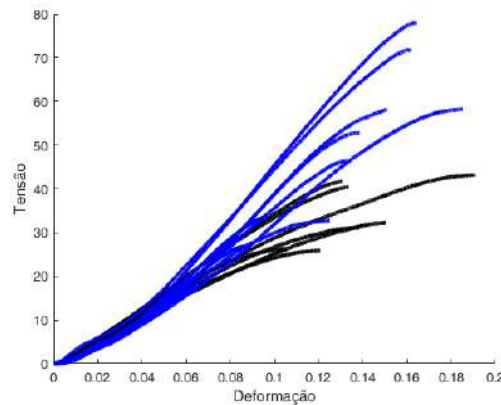
Os parâmetros mecânicos foram retirados da curva de tensão x deformação de cada tendão. A Figura 4.3 traz as curvas de tensão x deformação de engenharia para tendões extensores e flexores e representa a curva monotônica de cada amostra a ser analisada.

Alguns ensaios das amostras apresentaram problemas e seus dados não puderam ser aproveitados. Assim, para os parâmetros mecânicos foi possível trabalhar com 16 amostras.



(a) Tendões extensores

(b) Tendões flexores



(c) Tendões extensores (em preto) e tendões flexores (em azul)

Figura 4.3 – Curva Tensão x Deformação

Na Figura 4.3 ainda é possível visualizar a diferença existente entre o comportamento dos tendões extensores e flexores.

Neste estudo puramente experimental, necessita-se escolher parâmetros representativos do comportamento mecânico do tecido biológico, a fim de viabilizar o tratamento estatístico de correlação, sendo este um procedimento muito utilizado na literatura [Sokolis et al., 2011, Robinson et al., 2004]. Através das curvas apresentadas pôde-se extrair os parâmetros mecânicos definidos anteriormente, obtendo-se para cada tendão o alongamento último (mm), o módulo tangente (MPa), o módulo tangente verdadeiro (MPa), a tensão última (MPa) e a tensão última verdadeira (MPa), sendo o módulo tangente neste caso a inclinação da região linear do tendão (conforme a Figura 2.5).



### 4.1.1 Alongamento

O alongamento foi obtido através da curva monotônica de cada ensaio. A curva monotônica foi definida através da força mínima encontrada após os ciclos de pré-condicionamento até o momento onde o tendão começava romper em cada amostra. Foram realizadas dezesseis medições que apresentaram média  $\pm$  desvio padrão de  $1,13 \pm 0,03$ , sendo 1,08 o menor alongamento encontrado e 1,19 o maior alongamento encontrado.

### 4.1.2 Tensão última e tensão última verdadeira

A tensão pôde ser calculada de duas formas distintas. A tensão última foi calculada através da área inicial da seção transversal da curva monotônica (valor mínimo após o pré-condicionamento). Já a tensão última verdadeira foi obtida através da área da seção transversal atualizada, obtida através dos micrômetros digitais, que acompanharam a mudança de diâmetro dos tendões. A tensão última verdadeira foi obtida no mesmo ponto da tensão última, mas com a área de seção transversal obtida pelos micrômetros.

A média mais ou menos desvio padrão obtida para a tensão última (MPa), para as dezesseis amostras, foi de  $43,5 \pm 15,32$ , sendo o valor mínimo de 25,88 MPa e o valor máximo de 78,05 MPa. A média  $\pm$  desvio padrão da tensão última verdadeira (MPa) para as dezesseis amostras foi de  $49,03 \pm 16$  com um valor mínimo de 26,55 MPa e valor máximo de 81,48 MPa.

### 4.1.3 Módulo tangente e módulo tangente verdadeiro

O módulo tangente da curva tensão x deformação foi obtida através da inclinação da região linear. A Figura 4.4 apresenta a curva (em preto) e a região linear (em vermelho) de cada amostra, considerando o módulo tangente. A região de cálculo do módulo tangente verdadeiro pode ser visualizada na Figura 4.5.

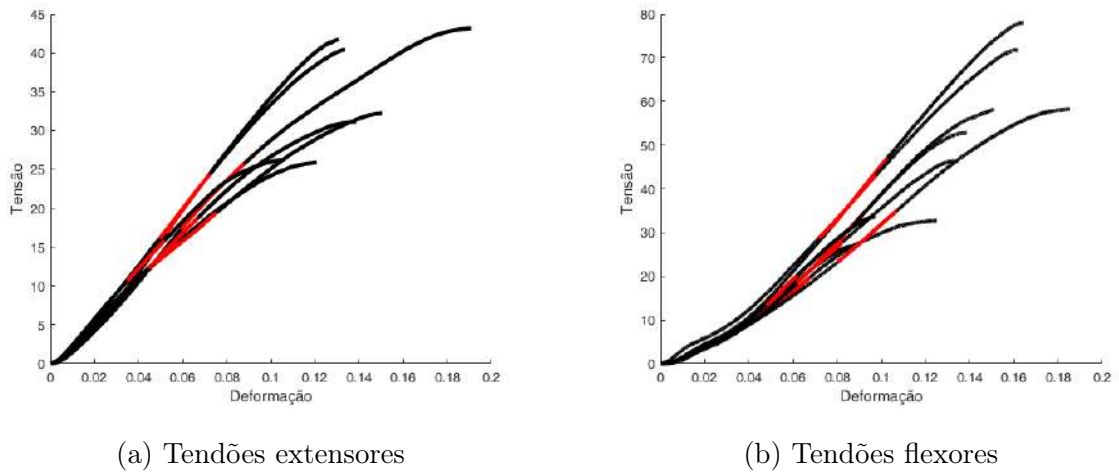


Figura 4.4 – Curva monotônica para cada tendão (em preto) e a região onde o módulo tangente foi calculado (em vermelho)

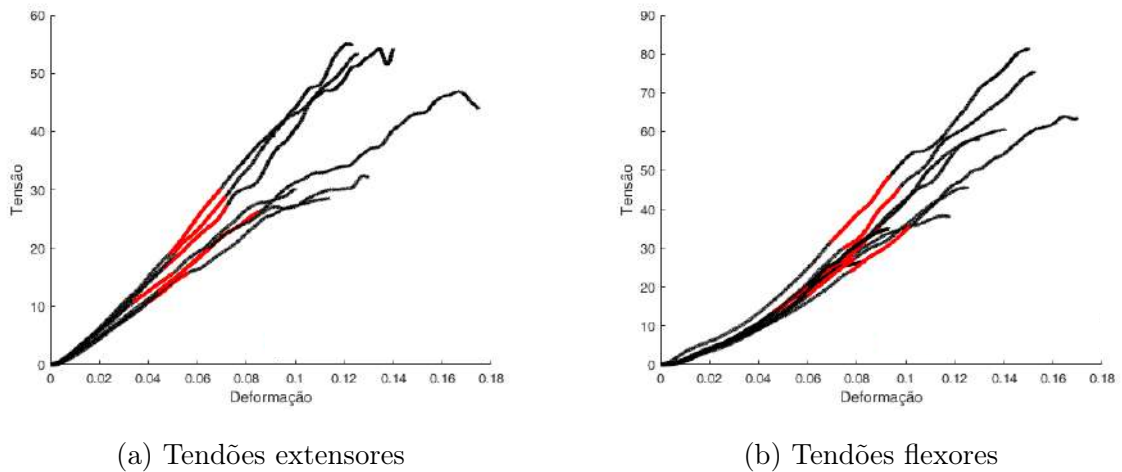


Figura 4.5 – Curva monotônica para cada tendão (em preto) e a região onde o módulo tangente verdadeiro foi calculado (em vermelho)

A média  $\pm$  desvio padrão para o módulo tangente (MPa) foi de  $413,48 \pm 115,71$ , sendo o valor mínimo de 232,28 MPa e o valor máximo de 623,79 MPa. Para o módulo tangente verdadeiro a média  $\pm$  desvio padrão foi de  $488,64 \pm 131,49$ , sendo o valor mínimo de 307,85 MPa e o valor máximo de 728,44 MPa.

#### 4.1.4 Resumo dos parâmetros mecânicos encontrados

A Tabela 4.1 apresenta a quantidade de amostras ensaiadas ( $n$ ), a média, o desvio padrão (DP), o valor máximo e o mínimo de cada parâmetro.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos para os parâmetros mecânicos

Amostra	n	Média $\pm$ DP	Valor Mínimo	Valor Máximo
Alongamento	16	1,13 $\pm$ 0,03	1,08	1,19
Tensão última (MPa)	16	43,7 $\pm$ 16,15	25,88	78,05
Tensão última verdadeira (MPa)	16	49,13 $\pm$ 16,63	26,55	81,48
Módulo tangente (MPa)	16	413,48 $\pm$ 115,71	232,28	623,79
Módulo tangente verdadeiro (MPa)	16	488,64 $\pm$ 131,49	307,85	728,44

#### 4.2 Influência do sexo e do tipo de tendão nos parâmetros mecânicos

Como retratado ao longo do texto, na literatura encontram-se trabalhos que constataram diferenças entre machos e fêmeas e entre os tendões extensores e flexores. Apesar deste não ser o escopo deste trabalho, pois a proposta busca uma resposta frente a um parâmetro individual independente do sexo ou localização, para verificar se essa diferença existe no presente trabalho, e se é estatisticamente significativa nos parâmetros mecânicos, algumas análises foram realizadas.

Primeiramente a distribuição de dados de cada parâmetro foi avaliada. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Todos os parâmetros mecânicos estão normalmente distribuídos mesmo se forem divididos entre machos e fêmeas e entre tendões extensores e flexores.

Na Tabela 4.2 é possível visualizar a média e o desvio padrão para cada um dos parâmetros em separado por sexo e por tipo de tendão.

Para realizar o teste  $t$  avaliou-se primeiramente a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene, sendo que todos os parâmetros apresentaram valores não significativos para o teste ( $p > 0,05$ ), ou seja, as variâncias são aproximadamente iguais e o teste  $t$  pode ser realizado, em separado por sexo e por tipo de tendão.

Através do teste  $t$  pôde-se verificar que os parâmetros mecânicos não possuem diferença estatisticamente significativa entre machos e fêmeas, apesar de algumas médias

possuírem diferenças perceptíveis como no módulo tangente verdadeiro e na tensão última.

Para o caso dos tipos de tendões o teste  $t$  verificou uma diferença estatisticamente significativa entre as médias do módulo tangente ( $p < 0,001$ ), do módulo tangente verdadeiro ( $p = 0,002$ ) e da tensão última ( $p = 0,037$ ), ou seja, para esses parâmetros existe influência do tipo de tendão, considerando um valor de significância de  $p < 0,05$ .

Tabela 4.2 – Médias e desvios padrões dos parâmetros mecânicos divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão

	Machos (n=5)	Fêmeas (n=11)	Tendão extensor (n=7)	Tendão flexor (n=9)
Alongamento	1,13±0,014	1,13±0,033	1,14±0,027	1,13±0,03
Módulo Tangente (MPa)	402,35±145,01	418,53±107,62	306,62±53	496,58±72,37
Módulo Tangente Verdadeiro (MPa)	504,04±138,6	481,63±134,45	385,2±88,16	569,09±99,72
Tensão Última (MPa)	40,36±14,2	45,23±17,39	34,4±7,32	50,94±17,73
Tensão última verdadeira (MPa)	47,99±13,88	49,65±18,35	43,02±12,13	53,89±18,71

As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os diagramas de caixa e bigode para as análises descritas acima. Desta forma fica mais fácil visualizar a diferença entre machos e fêmeas (Figura 4.6) e entre tendões extensores e flexores (Figura 4.7).

A diferença entre tendões extensores e flexores já era esperada, pois pesquisas anteriores demonstraram que existem diferenças estruturais e mecânicas entre tendões do mesmo indivíduo [Herod et al., 2016]. Alguns autores reconhecem que os tendões pertencem a duas classes distintas, aquelas que atuam para posicionar membros (tendões posicionais) e aqueles que conduzem a locomoção armazenando energia de deformação sob grandes tensões e subsequentemente liberando-a (tendões de armazenamento de energia) [Batson et al., 2003].

Através das Figuras 4.6 e 4.7 também é possível observar dois valores atípicos. Um dos valores atípicos aparece no módulo tangente verdadeiro (amostra S14TF), quando analisada a diferença entre sexos, e o outro aparece no alongamento (amostra S12TE),

quando a diferença entre tendão flexor e extensor é analisada. A permanência ou não desses pontos para as análises subsequentes depende de como serão realizadas as correlações finais.

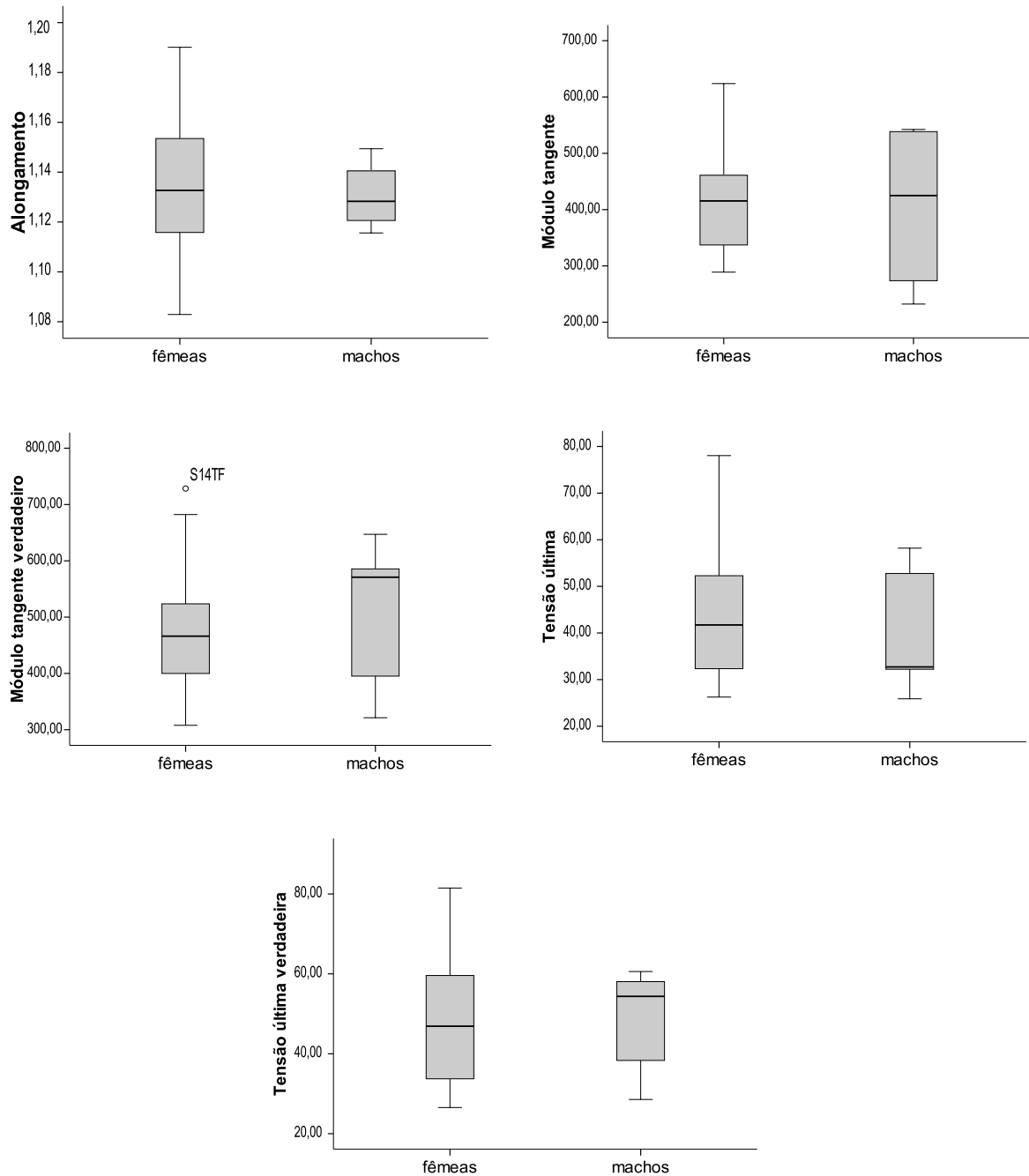


Figura 4.6 – Diagramas de caixa para parâmetros mecânicos entre machos e fêmeas

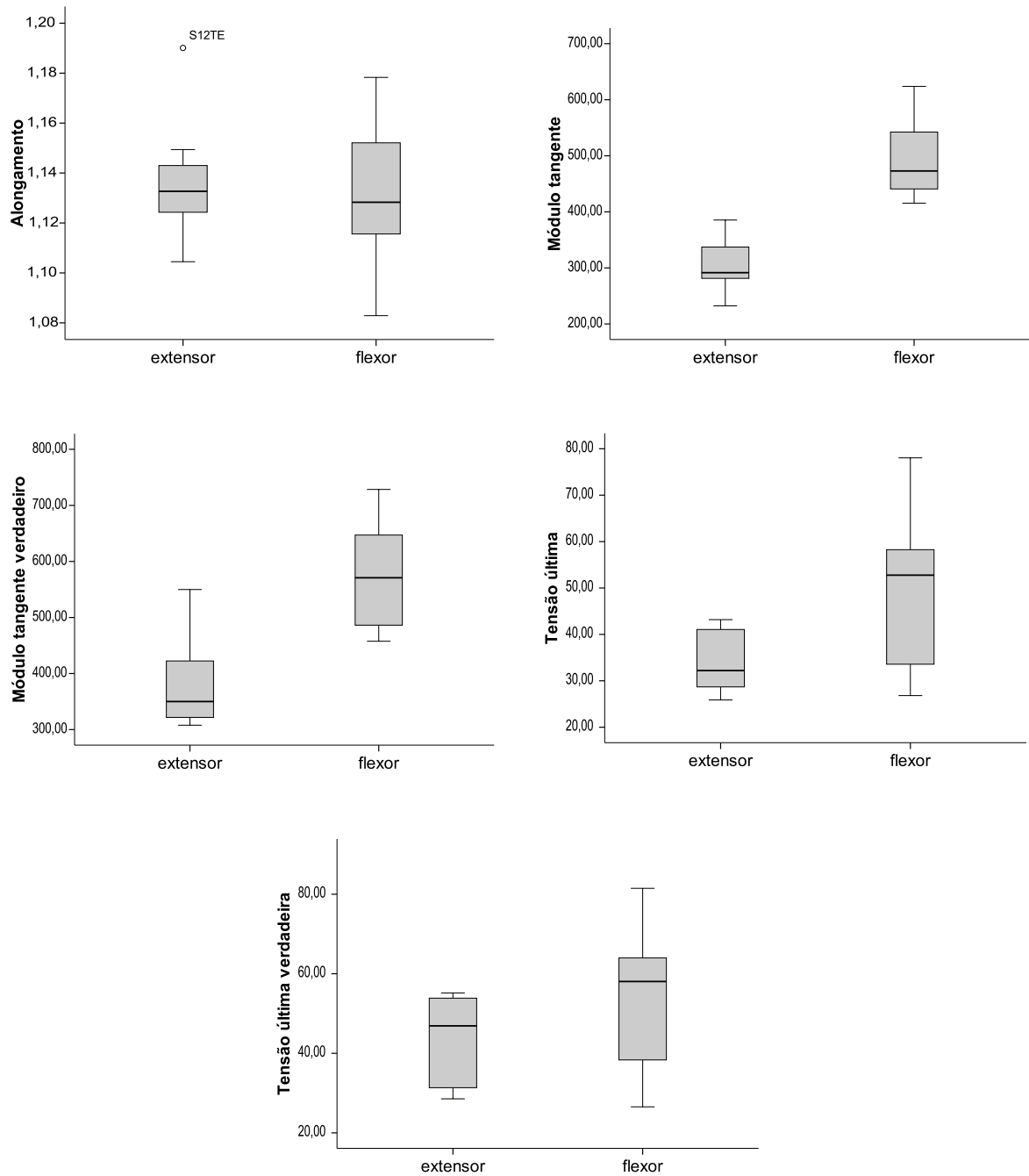


Figura 4.7 – Diagramas de caixa para os parâmetros mecânicos entre tendões extensores e flexores

### 4.3 Resultados dos aspectos individuais

Visando obter um conjunto de parâmetros individuais que represente aspectos do tecido tendinoso, algumas técnicas foram utilizadas para representar os diversos níveis do tendão.

A apresentação detalhada de cada um dos parâmetros obtidos será realizada na sequência.

#### 4.3.1 Liofilização

A porcentagem de peso seco foi obtida através da liofilização e a média  $\pm$  desvio padrão para as 24 amostras foi de  $32,06 \pm 2,68$  %, sendo o valor mínimo de 27,75% e o valor máximo de 36,82%. Para a obtenção desses valores seguiu-se a metodologia apresentada anteriormente, onde a porcentagem de peso é obtida entre a diferença entre o peso da amostra logo após a dissecação e após passar pelo processo de liofilização.

O resultado da média ficou dentro da faixa apresentada em literatura, onde a água é descrita como o maior constituinte dos tendões, entre 65-70% [Schmid-Schönbein et al., 1986 e Woo et al., 2005].

#### 4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

O parâmetro vinculado ao *crimp* do tendão foi obtido em outro nível do tendão, onde encontram-se as fibras de colágeno, as quais se encontravam alinhadas e organizadas em feixes que apresentavam ondulações, o que pode ser observado na Figura 4.8. Essa ondulação é possível verificar em magnificações de 180x e foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV a 10kV.

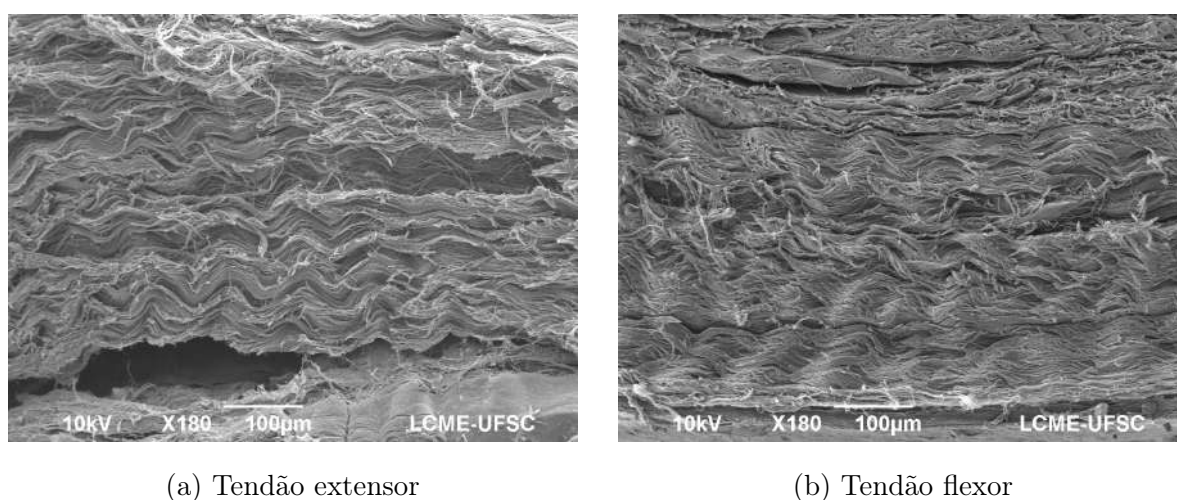


Figura 4.8 – Ondulações presentes nos tendões

A ondulação das fibras do tendão é medida por alguns autores na literatura [Herod

et al., 2016], entretanto essa medida não foi utilizada no presente trabalho. Isto ocorreu pois durante as análises de microscopia eletrônica notou-se a presença de distorções nas extremidades das amostras. Além disto, não foi possível controlar estiramento dos tendões nas análises microscópicas, que poderia levar a valores diferentes devido ao estiramento de cada amostra durante a fixação. A Figura 4.9 apresenta as alterações descritas. Essas disformidades podem ter sido ocasionadas devido aos cortes do tendão, que ocorreram logo após a dissecação e antes do processamento do tecido. O tamanho reduzido de amostra disponível pode ter sido o principal fator para essa distorção.

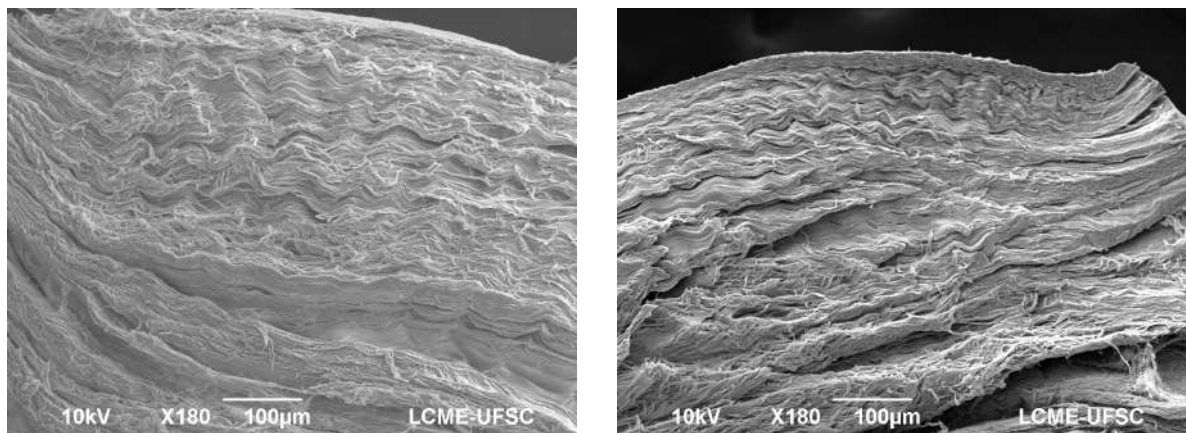


Figura 4.9 – Interferência dos cortes nas amostras

Além das distorções apresentadas nas extremidades de cada amostra, o corte realizado durante o processamento pode interferir na medição da ondulação. Esse corte expõe o interior do tendão. A Figura 4.10 apresenta a estrutura interna do tendão, onde pode-se perceber que feixes de fibras foram seccionados.

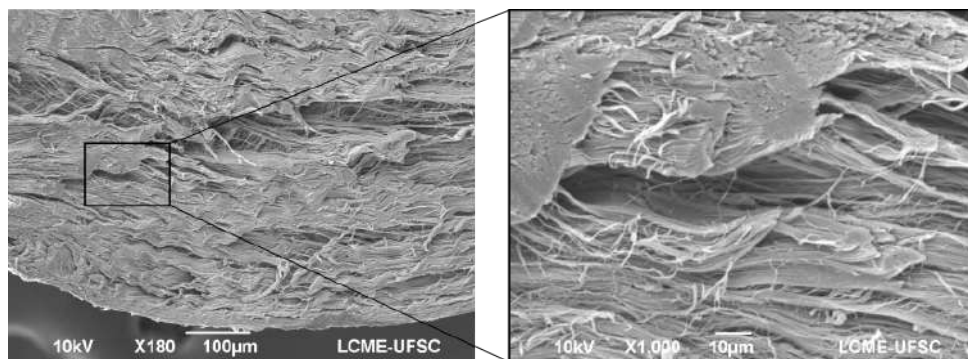


Figura 4.10 – Interferência dos cortes nas amostras

As imagens mostradas até agora possuíam uma magnificação de até 4500x, já



a medição do diâmetro das fibrilas de colágeno necessita de uma magnificação maior, conforme pode ser visto na Figura 4.11, onde a magnificação foi de 20000x. Utilizando esta magnificação pode-se observar a periodicidade D relatada anteriormente.

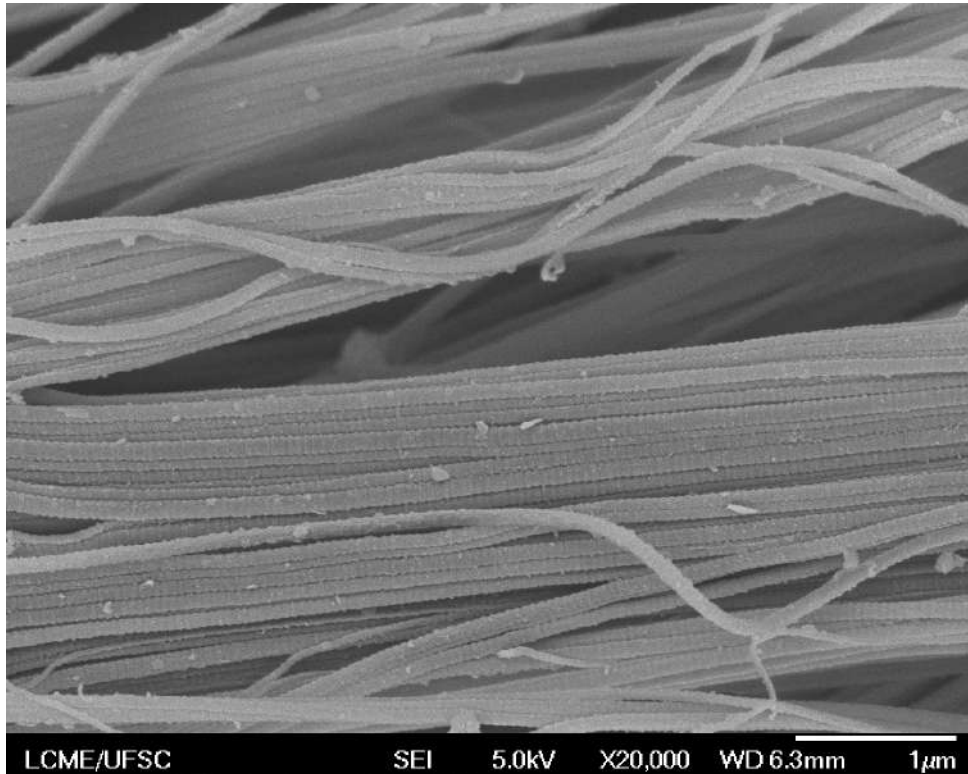


Figura 4.11 – Fibrilas de colágeno

Na Figura 4.12 exemplifica-se a medição do diâmetro de fibrila, onde mediu-se todas as fibrilas que pudessem ser diferenciadas e para cada fibrila o diâmetro foi medido em cinco localizações distintas. A obtenção do diâmetro por medições longitudinais foi baseada em Herod et al., 2016. O diâmetro da fibrila também pode ser medido em cortes transversais do tendão, como em Hansen et al., 2010 e Giannini et al., 2008, onde utiliza-se microscopia eletrônica de transmissão. Como trata-se de técnicas distintas os resultados da medição do diâmetro da fibrila podem apresentar valores diferentes.

As múltiplas medidas realizadas produziram uma única medida (média) de diâmetro de fibrila para cada tendão. O valor da média mais ou menos desvio padrão para o diâmetro das fibrilas de colágeno medido foi de  $104,55 \pm 10,08$  nm, sendo a média mínima encontrada de 84,5nm e a média máxima encontrada de 135,42nm. Foram realizadas um total de 11.110 medidas, sendo em 2.222 fibrilas diferentes.

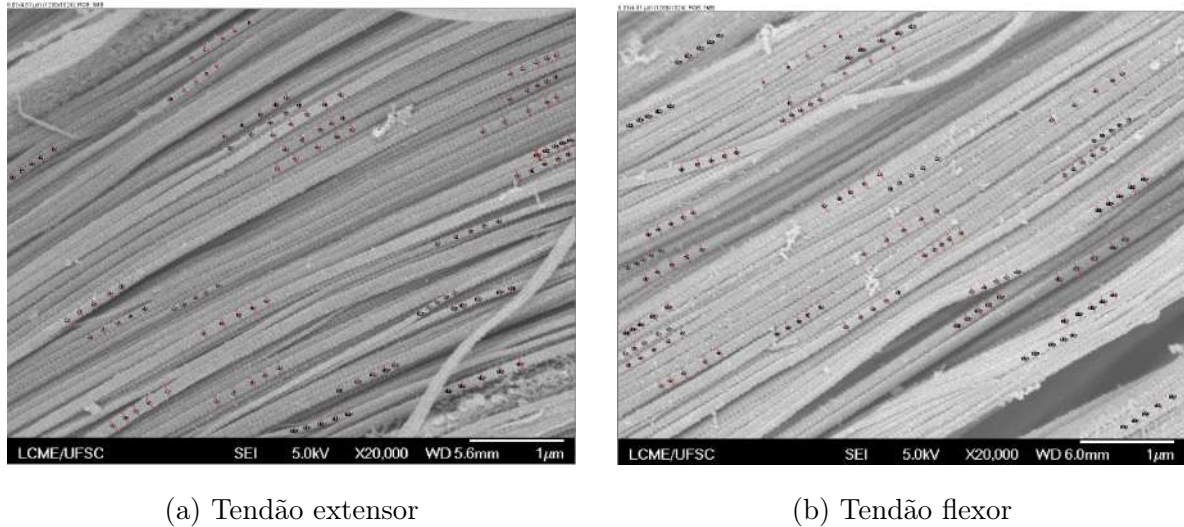


Figura 4.12 – Medição do diâmetro ao longo de cada fibrila

Separando-se por tendão extensor e flexor as médias e desvios padrões encontrados foram  $100,65 \pm 7,56$  nm para tendões extensores e  $108,44 \pm 11,06$  nm para tendões flexores. Foram realizadas 5.535 medidas nos tendões extensores, sendo 1.107 fibrilas diferentes. Nos tendões flexores foram realizadas 5.575 medidas, sendo 1.115 fibrilas diferentes.

Na literatura encontra-se diversos artigos que realizaram a medição do diâmetro da fibrila, nos quais diferentes animais são estudados. Em Herod et al., 2016, a média mais ou menos desvio padrão do diâmetro das fibrilas para os tendões flexores de bovinos foi de  $80 \pm 7$  nm, já para os tendões extensores foi de  $134 \pm 5$  nm. No trabalho de Birch et al., 2007, foram estudados tendões extensores e flexores de cavalos, a média mais ou menos desvio padrão de diâmetros de fibrilas para os tendões flexores foi de  $169 \pm 19$  nm e para tendões extensores foi de  $229 \pm 36$  nm. Derwin e Soslowsky, 1999, estudaram o fascículo do tendão da calda de ratos, encontraram diferentes médias para o diâmetro das fibrilas dependendo da idade do animal, com 3 semanas a média mais ou menos desvio padrão foi de  $138,1 \pm 6,1$  nm, para 8 semanas foi de  $190,3 \pm 9,5$  nm. No trabalho de Giannini et al., 2008, a média  $\pm$  desvio padrão para as fibrilas de tendões tibiais humanos foi de  $47 \pm 8,1$  nm. Portanto pode-se observar que cada animal apresenta diferenças no tamanho do diâmetro da fibrila.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar também uma cobertura adicional de matriz cobrindo ou anexada as fibrilas, conforme pode ser visto na Figura 4.13. O artigo de Herod et al., 2016, encontrou diferença na matriz entre o tendão

extensor e flexor, ou seja, nas fibrilas do tendão extensor existia pouco ou nenhuma cobertura adicional de matriz cobrindo ou anexadas as fibrilas, já nos tendões flexores as fibrilas de colágeno eram frequentemente cobertas por uma teia espessa de matriz composta de filamentos finos. No presente trabalho não foi possível afirmar diferença entre a cobertura dos tendões, sendo encontrada em ambos e com maior ou menor regularidade dependendo da localização da imagem, como pode-se perceber através da Figura 4.13, onde tem-se a imagem de um tendão extensor e de um tendão flexor. A diferença do pós-processamento pode ter afetado a superfície do tendões estudados, já que no presente trabalho foi realizada uma pós-fixação em tetróxido de ósmio, o que não foi feito por Herod et al., 2016.

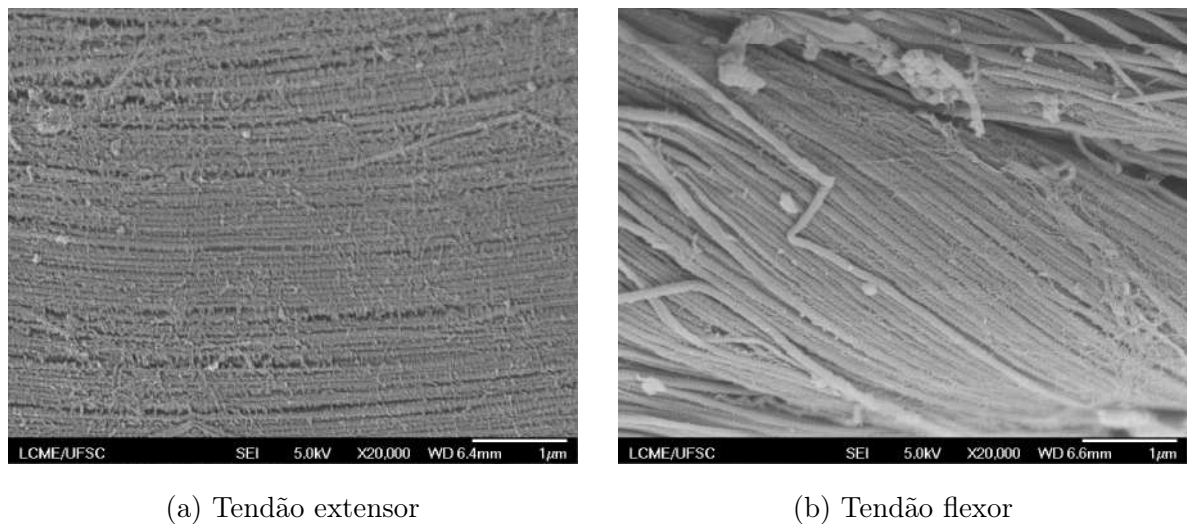


Figura 4.13 – Cobertura da matriz nos tendões

### 4.3.3 Microscopia de luz

Para a obtenção dos parâmetros vinculados ao colágeno foi utilizada a microscopia de luz, técnica que possibilita a visualização de diferentes magnificações do tendão. Através desta técnica e da utilização de diferentes colorações pode-se observar os constituintes do tendão. O protocolo de preparação e coloração das lâminas se encontra no Apêndice B.

Primeiramente uma coloração rotineira de laboratório chamada Hematoxilina e Eosina (HE) foi realizada. A Figura 4.14 apresenta a coloração em HE para um tendão extensor e um tendão flexor, onde os pontos escuros são os núcleos de fibroblastos e a

parte mais clara (rosa) constitui os feixes de fibra colágena [Junqueira et al., 2004]. Essa coloração permite uma visão de todo o tecido, possibilitando uma identificação geral de todos os elementos teciduais, sendo possível averiguar se o protocolo de processamento foi realizado de maneira adequada.

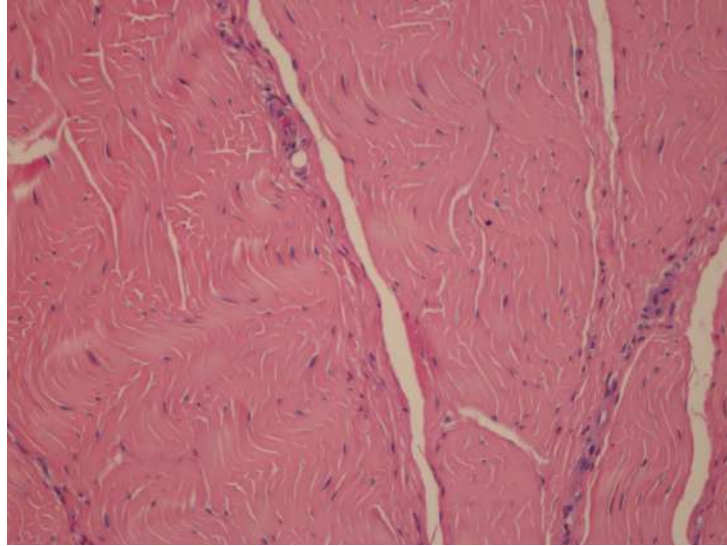


Figura 4.14 – Coloração de tendão em HE

Além do HE uma segunda coloração foi utilizada, objetivando a visualização das fibras elásticas. Essa coloração é chamada de orceína e cora as fibras elásticas em um tom mais escuro que o restante do tecido. Na Figura 4.15 é possível visualizar algumas fibras elásticas circulares, entretanto é de difícil localização e não mostrou-se eficaz quanto a quantificação, portanto foi descartada como metodologia para obtenção de um parâmetro específico. A Figura 4.15 apresenta o corte de um tendão corado com orceína.

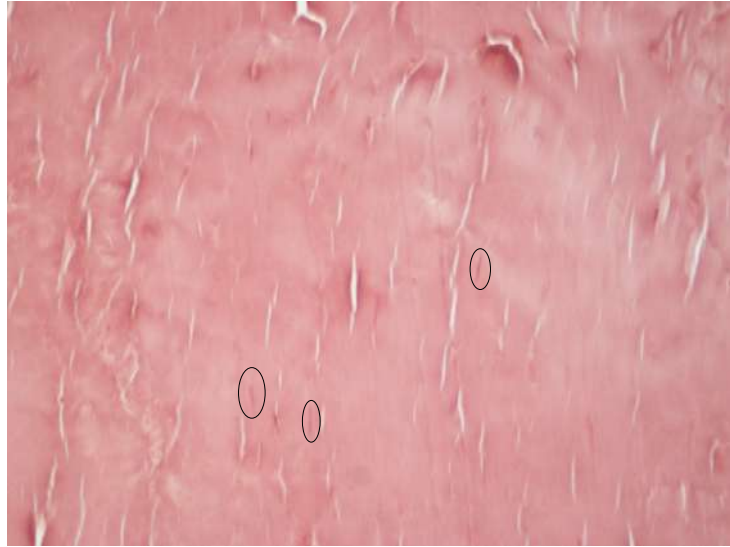
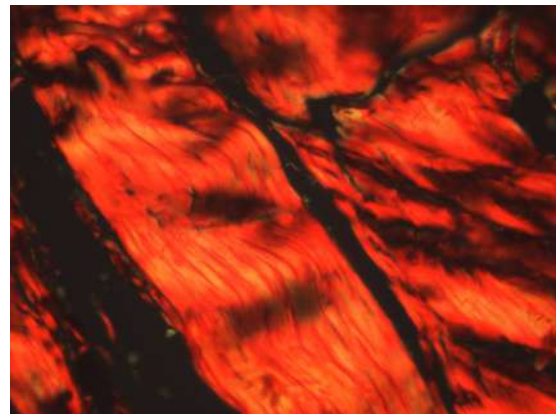


Figura 4.15 – Coloração de tendão em orceína

Além das colorações mencionadas anteriormente, os tipos de colágeno do tendão foram corados através da coloração picro sirius red, o que pode ser observado através da Figura 4.16.



(a) Tendão extensor



(b) Tendão flexor

Figura 4.16 – Coloração de tendão em picrosirius red

A quantificação dos tipos de colágeno foi realizada por meio de duas técnicas diferentes. A primeira técnica utilizou a divisão de canais para separar colágeno tipo I e tipo III, sendo exemplificada através da Figura 4.17. Posteriormente a proporção I/III foi realizada, encontrando-se uma média mais ou menos desvio padrão de  $2,01 \pm 0,26$ . A segunda técnica separou o colágeno tipo I do colágeno tipo III através da tonalidade de



cada pixel. A média mais ou menos desvio padrão para a quantidade de colágeno I foi de  $99,51 \pm 0,65$  e  $0,47 \pm 0,63$  para a quantidade de colágeno tipo III.

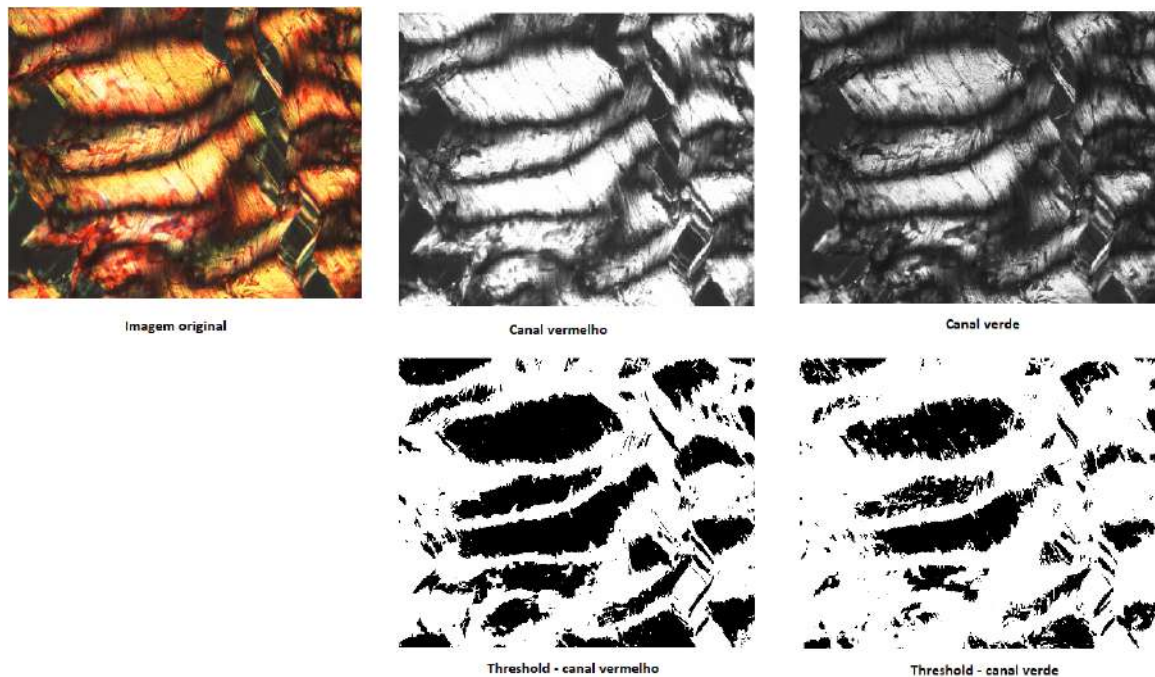


Figura 4.17 – Procedimento para quantificação de colágeno tipo I e colágeno tipo III

Na literatura, o colágeno tipo I constitui cerca de 95%, já o colágeno tipo III compõe cerca de 3% do peso seco de tendões [Riley et al., 1994]. As médias encontradas no presente estudo ficaram distantes dos valores mencionados. Já a proporção de colágeno I/III se aproximou do valor encontrado por Brown et al., 2011, para ligamentos. Porém, como observado anteriormente, estes valores dependem do animal e local. Além disto, os diferentes protocolos e critérios são realizados por diferentes laboratórios também podem levar a diferentes valores. Assim, os resultados aqui apresentados poderiam ser comparados apenas com laboratórios que seguissem exatamente o mesmo protocolo. De qualquer forma, estes servem para o escopo deste trabalho.

Alguns autores não indicam essa coloração para quantificar os tipos de colágenos, como Lattouf et al., 2014, que afirmam que a coloração do colágeno tipo I e III pode ser alterada rotacionando a lâmina do microscópio, ou seja, depende do alinhamento do polarizador. Rich e Whittaker, 2005, reiteram que a tonalidade da fibra não permite a identificação do tipo de fibra, ou seja, que as fibras verdes são do tipo III e laranja do tipo I, já que uma fibra verde pode ser uma fibra tipo I imatura ou que o corte para a produção

da lâmina deixou essa fibra tipo I mais fina corando-a em verde. Alguns autores utilizam técnicas para tentar amenizar os problemas dessa coloração, como Glazer et al., 1996, que combina um plano rotativo de polarização com um analisador circular e assim é capaz de obter imagens de alta resolução, ou seja, avalia imagens resultantes da soma de fotografias obtidas sob diferentes ângulos. Esta técnica também é utilizada por Recidoro et al., 2014. Além disso, como as fibras de colágeno frequentemente são onduladas ou frisadas, zonas escuras podem aparecer nas imagens, pois as fibras, ou parte das fibras, estão alinhadas paralelamente com o eixo de transmissão do polarizador [Whittaker e Canham, 1991, Rich e Whittaker, 2005 e Rittié, 2017]. Assim, o teor total de colágeno pode estar subestimado, especialmente em tecidos contendo grandes quantidades de fibras onduladas [Whittaker e Canham, 1991].

No presente estudo manteve-se o mesmo alinhamento do polarizador, entretanto o corte das amostras não é um fator que possa ser controlado. Assim, a associação do picosirius a outras tecnologias, como a imuno-histoquímica, pode vir a ser utilizada como estratégia futura, para confirmar os resultados obtidos, caso for interessante para novos desenvolvimentos.

#### 4.3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura

Para obter os parâmetros vinculados ao nível molecular do tendão ( $T_{onset}$ ,  $T_{peak}$ ,  $\Delta h$  e  $\Delta h$ ) utilizou-se a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

A Figura 4.18 apresenta um gráfico de fluxo de calor por temperatura, sendo o resultado representado por uma linha sólida. A linha pontilhada condiz com a derivada do fluxo de calor e através desta os pontos de início e fim para o cálculo da entalpia são definidos, sendo a variação da derivada o intervalo utilizado.

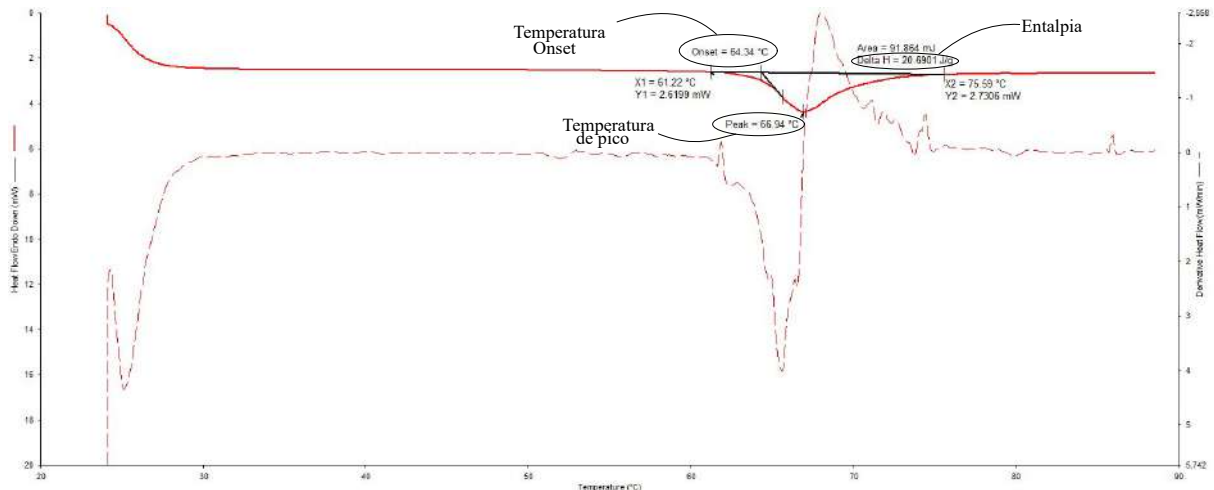


Figura 4.18 – Exemplo de curva obtida através do DSC (amostra S15TE)

Para cada uma dessas curvas foram retirados as temperaturas de pico e a temperatura *onset*, assim como a entalpia de peso úmido e a entalpia de peso seco.

Os resultados de média  $\pm$  desvio padrão encontrados nas análises de DSC foram de  $67,22 \pm 0,92$  °C para a temperatura de pico,  $65,05 \pm 1,06$  °C para a temperatura *onset*,  $56,25 \pm 12,22$  J/g para a entalpia de peso seco e  $16,97 \pm 3,41$  J/g para a entalpia de peso úmido. Os resultados obtidos são referente a 23 amostras analisadas com sucesso. A análise da amostra S8TE (tendão extensor do suíno 8) apresentou uma curva inconsistente portanto foi desconsiderada.

Giannini et al., 2008, estudaram o tendão tibial posterior de humanos e encontraram para a temperatura desnaturação (temperatura de pico) uma média  $\pm$  desvio padrão de  $68,3 \pm 2,6$  °C e para a entalpia de desnaturação (entalpia de peso úmido) a média encontrada foi de  $44,5 \pm 1,3$  J/g. No trabalho de Miles et al., 1994 foram analisados tendões flexores de cavalos e os valores de média  $\pm$  desvio padrão foram de  $70,1 \pm 1,1$  °C para a temperatura de pico,  $67,4 \pm 1,2$  °C para a temperatura *onset*,  $18,04$  J/g para a entalpia de peso úmido e  $49,4$  J/g para a entalpia de peso seco. Já em Herod et al., 2016 a temperatura de pico teve uma média  $\pm$  desvio padrão de  $65,4 \pm 0,7$  °C, a temperatura *onset* teve uma média  $63,1 \pm 1$  °C e a entalpia de massa seca teve uma média de  $58 \pm 13,7$  J/g.

Os valores encontrados em literatura que foram apresentados se aproximam dos valores médios encontrados para o presente trabalho.



#### 4.3.5 Resumo dos parâmetros individuais encontrados

Cada uma das técnicas experimentais resultou em um conjunto de dados. A Tabela 4.3 apresenta o número de amostras (n), a média, o desvio padrão (DP), o valor máximo e o valor mínimo para cada parâmetro.

Tabela 4.3 – Resultados obtidos para os parâmetros individuais

Amostra	n	Média $\pm$ DP	Valor Mínimo	Valor Máximo
% de peso seco	24	32,06 $\pm$ 2,68	27,75	36,82
Diâmetro fibrila (nm)	24	104,65 $\pm$ 10,3	84,5	135,42
I/III	24	2,02 $\pm$ 0,26	1,65	2,46
% Colágeno I	24	99,50 $\pm$ 0,67	97,9	100
% Colágeno III	24	0,48 $\pm$ 0,65	0	2,03
Temperatura pico (°C)	23	67,22 $\pm$ 0,92	65,43	68,43
Temperatura <i>onset</i> (°C)	23	65,05 $\pm$ 1,06	62,28	66,46
Entalpia peso seco (J/g)	23	56,25 $\pm$ 12,22	33,9	82,86
Entalpia peso úmido (J/g)	23	16,97 $\pm$ 3,41	9,32	21,58

#### 4.3.6 Influência do sexo e do tipo de tendão nos parâmetros individuais

Assim como realizado para os parâmetros mecânicos, os parâmetros individuais também foram avaliados quanto ao sexo do animal e ao tipo de tendão, verificando se a diferença entre eles é estatisticamente significativa. Esta análise permite a possibilidade de se verificar se existem correlações específicas para a classificação do sexo ou tipo de tendão, o que também pode ser útil.

Primeiramente a distribuição de dados de cada parâmetro foi avaliada quanto a normalidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk encontrou-se que exceto pelo colágeno tipo I e colágeno III, todos os outros parâmetros possuem distribuição normal. Quando são divididos entre machos e fêmeas e entre tendões extensores e flexores, novamente o colágeno tipo I e colágeno III não possuem distribuição normal, assim como a entalpia de peso úmido para tendões extensores ( $p=0,033$ ).

Na Tabela 4.4 as médias para machos e fêmeas e para tendões extensores e flexores de cada parâmetro pode ser visualizada.

Através do teste *t* pôde-se verificar se as médias dos grupos são estatisticamente diferentes. Verificou-se que nenhum dos parâmetros individuais é significativamente influen-

Tabela 4.4 – Parâmetros individuais divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão

Parâmetro	Machos (n=11)	Fêmeas (n=12)	Tendão extensor (n=11)	Tendão flexor (n=12)
%peso seco	31,95±2,55	32,16±2,91	32,83±2,82	31,33±2,29
Diâmetro fibrila(nm)	103,79±5,67	105,44±13,46	100,66±7,56	108,44±11,06
Proporção I/III	2,08±0,27	1,96±0,24	2±0,29	2,02±0,24
% colágeno I	99,36±0,72	99,64±0,62	99,69±0,48	99,32±0,77
% colágeno III	0,62±0,7	0,35±0,59	0,3±0,47	0,65±0,74
Temperatura de pico (°C)	67,13±1,13	67,3±0,71	66,43±0,58	67,94±0,42
Temperatura onset (°C)	65,08±1,36	65,02±0,75	64,31±1,05	65,73±0,42
Entalpia peso seco ( $\Delta H$ )	54±9,65	58,31±14,3	57,82±14,63	54,8±9,98
Entalpia peso úmido ( $\Delta H$ )	16±2,95	17,86±3,67	17,19±4,57	16,77±2,02

ciado pelo sexo do animal, porém pôde-se averiguar que a temperatura de pico ( $p < 0,001$ ) e a temperatura *onset* ( $p < 0,001$ ) são significativamente influenciadas pelo tipo de tendão. O diâmetro da fibrila apresenta valores muito próximos da significância ( $p = 0,057$ ), quando avaliado em relação ao tipo de tendão, considerando um valor de significância de  $p < 0,05$ .

Além de não apresentar uma distribuição normal para tendões extensores, a entalpia de peso úmido para tendões extensores não apresentou homogeneidade de variâncias através do teste de Levene.

Devido à distribuição de dados da porcentagem de colágeno tipo I e à porcentagem de colágeno tipo III utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar a influência do sexo do animal e do tipo de tendão, teste equivalente ao teste *t*. Tanto a porcentagem de colágeno tipo I quanto a porcentagem de colágeno tipo III não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os sexos e entre os tipos de tendões, portanto esses parâmetros não são influenciados pelo tipo de tendão e nem pelo sexo do animal.

Em Herod et al., 2016, a temperatura *onset* e a temperatura de pico foram significativamente maiores para tendões flexores do que para tendões extensores, o que segundo os autores indica maior estabilidade molecular nos tendões flexores. Encontraram também que os tendões flexores tiveram uma entalpia de desnaturação específica significativamente mais baixa do que os tendões extensores.

As Figuras 4.19 e 4.20 apresentam os diagramas de caixa e bigode para as análises entre machos e fêmeas, onde é possível visualizar os dados entre machos e fêmeas. Além disso, pode ser observado valores atípicos para as fêmeas no diâmetro das fibrilas, na porcentagem de colágeno tipo I e tipo III.

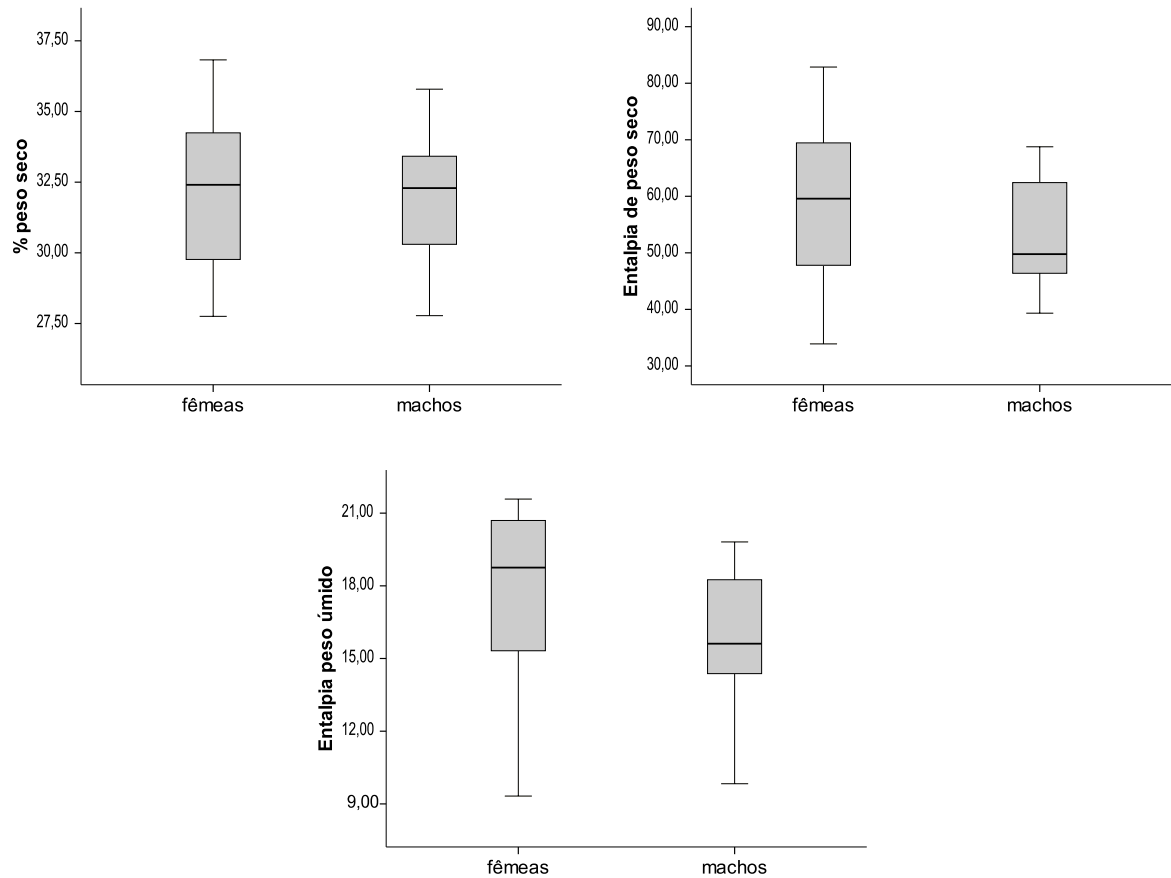


Figura 4.19 – Diagramas de caixa e bigode para parâmetros individuais de machos e fêmeas

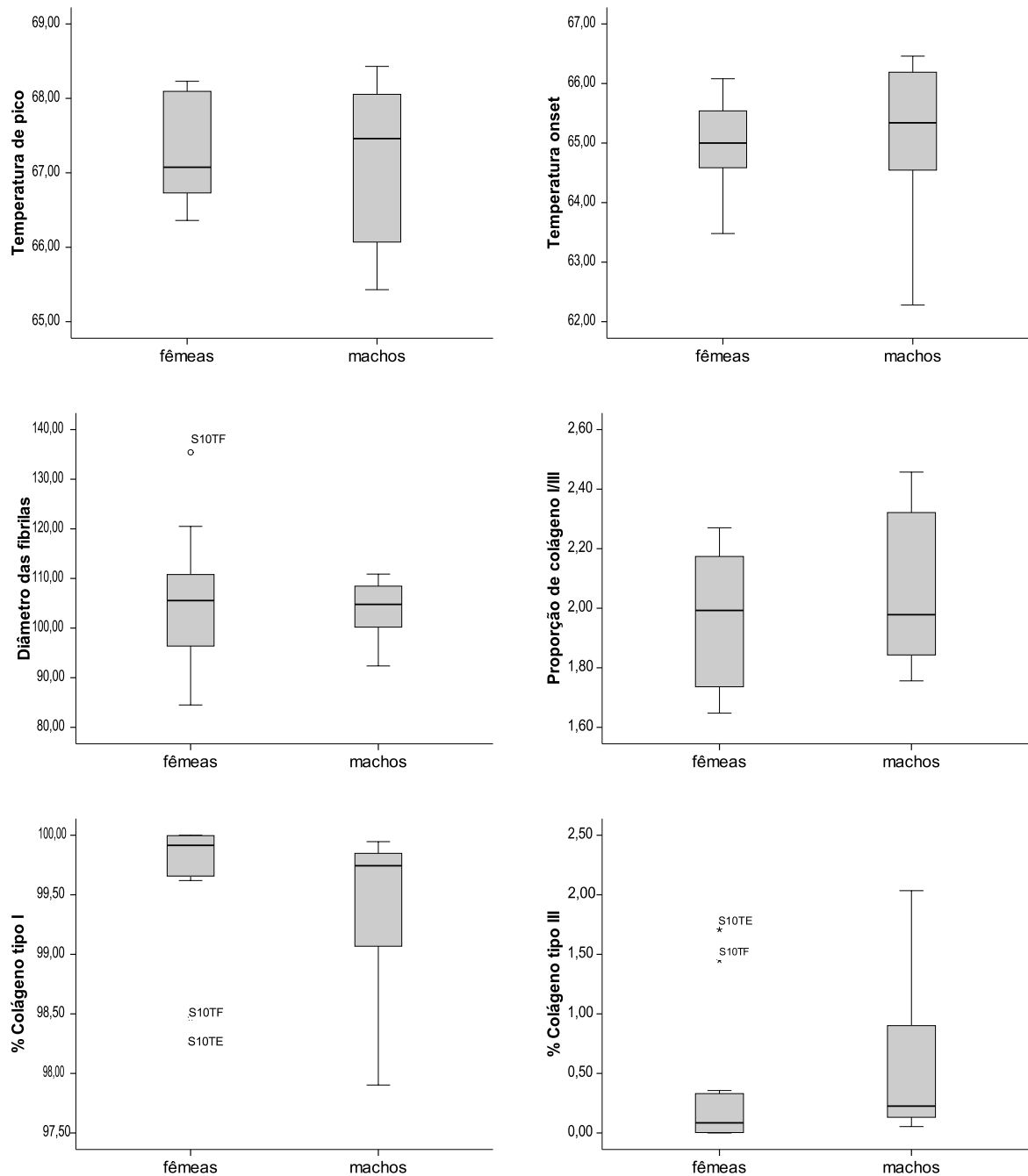


Figura 4.20 – Diagramas de caixa e bigode para parâmetros individuais de machos e fêmeas

As Figuras 4.21 e 4.22 apresentam os diagramas de caixa e bigode para as análises entre tendões extensores e flexores, sendo possível visualizar a diferença estatisticamente significantes para tendões extensores e flexores na temperatura de pico e na temperatura *onset*. Na Figura 4.22 também pode ser observado os valores atípicos para os tendões

extensores na temperatura *onset*, na porcentagem de colágeno tipo I e na porcentagem de colágeno tipo III, além disso um valor atípico aparece no diâmetro das fibrilas para tendões flexores.

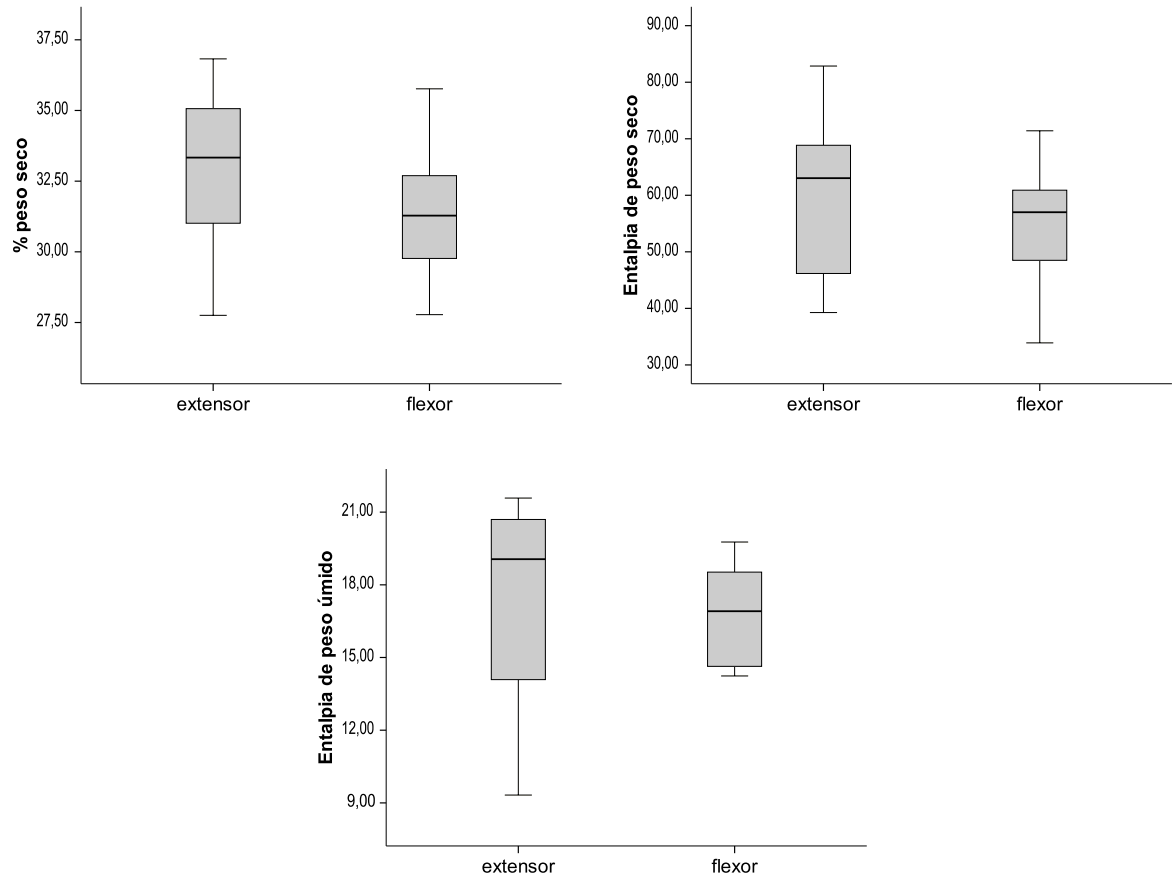


Figura 4.21 – Diagramas de caixa para parâmetros individuais de tendões extensores e flexores

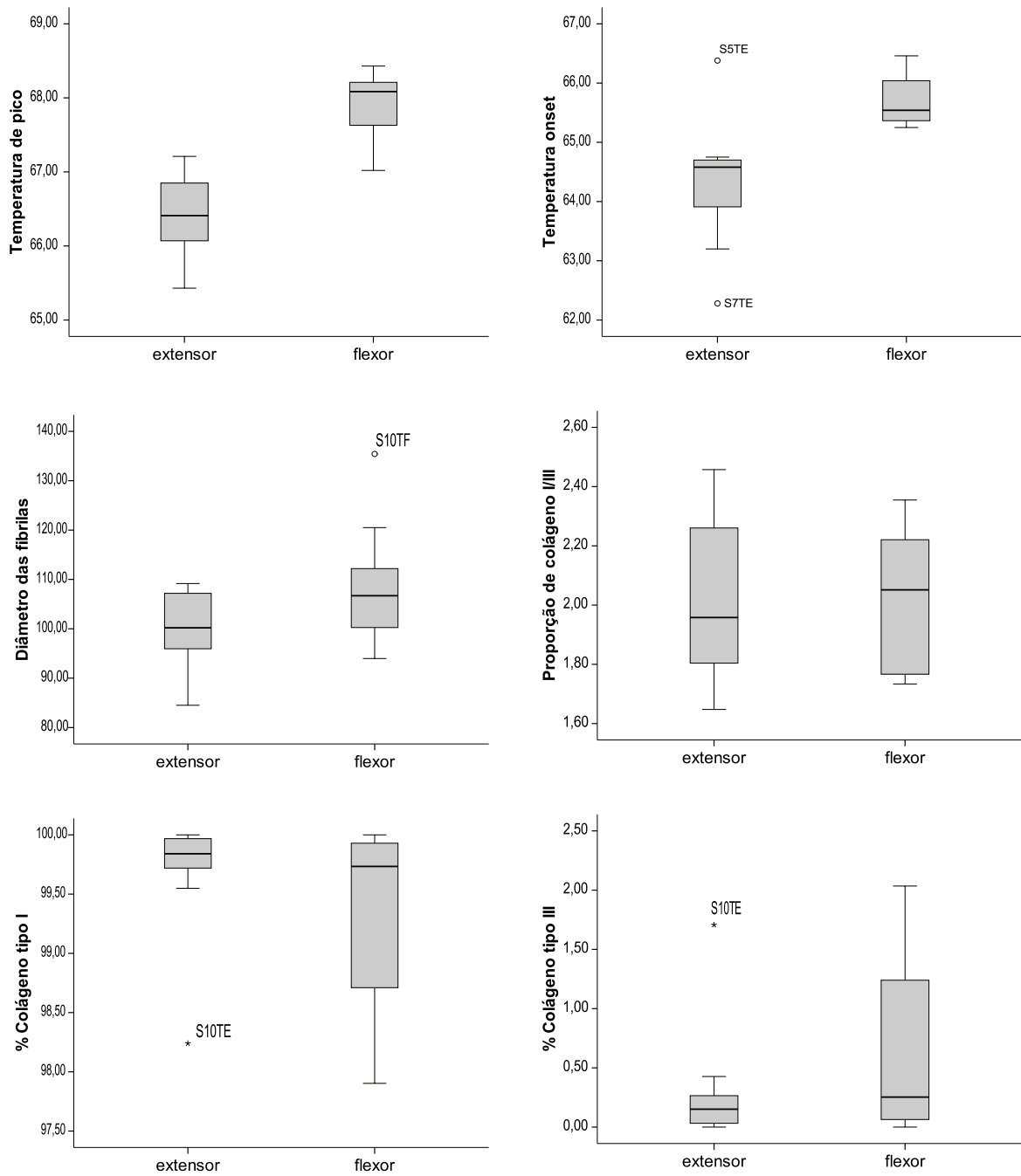


Figura 4.22 – Diagramas de caixa para parâmetros individuais de tendões extensores e flexores

#### 4.4 Correlação entre parâmetros individuais e mecânicos

Muitos trabalhos realizam a separação entre tendões extensores e flexores, considerando que estes diferem em sua função, estrutura e mecânica. Entretanto muito ainda precisa ser aprendido sobre como a mecânica dos tendões se relaciona com a estrutura,

principalmente em como a nanoescala interfere na mecânica macroescalar. Portanto a busca por um parâmetro que pudesse por si só representar e prever o comportamento mecânico, sem distinções entre classes seria o mais interessante.

Portanto o principal objetivo do presente trabalho consistiu em buscar algum parâmetro individual (da estrutura ou que compõe) do tecido tendinoso que possui correlação com algum parâmetro mecânico do mesmo tecido. Nessa busca a divisão entre machos e fêmeas e entre tendões flexores e extensores não constitui o principal propósito da busca por um parâmetro individual independente de localização, sexo, idade ou qualquer divisão que pudesse ser avaliada. A correlação aqui apresentada objetiva buscar um parâmetro individual que por si só consiga descrever seu comportamento mecânico.

As correlações foram realizadas entre as quinze amostras que obtiveram valores para todos os ensaios (tanto mecânicos quanto individuais), sendo que cada um dos parâmetros mecânicos foi avaliado para cada um dos parâmetros individuais. Utilizou-se o coeficiente de correlação (CC) de Pearson para as variáveis com dados normalmente distribuídos e o coeficiente de correlação de Spearman para as demais variáveis.

A distribuição de dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, encontrando-se que a % de colágeno tipo I, a % de colágeno tipo III e a temperatura *onset* não possuem valores normalmente distribuídos para essas quinze amostras consideradas.

Analisando as respostas de correlação de cada parâmetro individual com cada parâmetro mecânico, segundo o coeficiente de correlação de Pearson, encontrou-se que a temperatura de pico é positivamente relacionada a módulo tangente com um coeficiente  $r=0,803$  e existe uma probabilidade de menos de 0,001 ( $p<0,001$ ) que esta correlação tenha ocorrido por acaso numa amostra de 15 tendões, indicando uma correção forte e estatisticamente significativa. Além disso encontrou-se correlação entre a temperatura de pico e a módulo tangente verdadeiro (com um coeficiente de correlação de  $r=0,734$ , o qual é significativo a  $p=0,002$ ), entre a temperatura de pico e a tensão última ( $r=0,655$ ,  $p=0,008$ ) e entre a temperatura de pico e a tensão última verdadeira ( $r=0,584$ ,  $p=0,022$ ). Outros estudos que avaliaram a relação da estrutura com a função de tecidos consideraram o coeficiente de correlação como forte acima de 0,7 [Robinson et al., 2004] e 0,8 [Connizzo et al., 2013]. Cada área considera o relacionamento das variáveis de maneira diferente, na área da saúde por exemplo, o coeficiente de correlação é considerado forte quando  $r=0,5$  [Cohen, 1992].

Para facilitar a interpretação dos resultados a Figura 4.23 apresenta diagramas de dispersão entre as variáveis que apresentaram correlação estatisticamente significativa, mostrando a relação entre as variáveis.

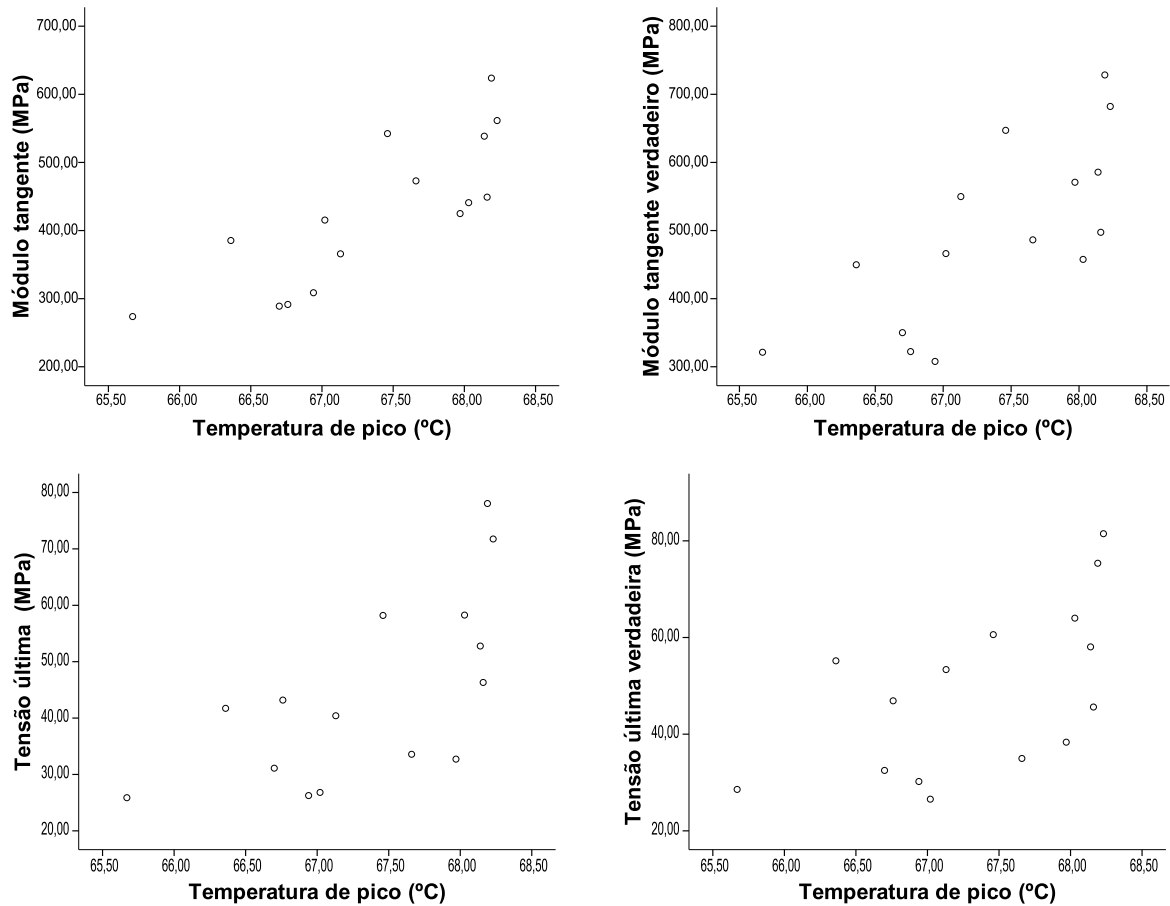


Figura 4.23 – Diagramas de dispersão entre variáveis que apresentaram correlação

Utilizando o coeficiente de correlação de Spearman encontrou-se correlação entre a temperatura *onset* e o módulo tangente ( $r=0,761$ ,  $p=0,001$ ), entre a temperatura *onset* e o módulo tangente verdadeiro ( $r=0,657$ ,  $p=0,008$ ) e entre a temperatura *onset* e a tensão última ( $r=0,696$ ,  $p=0,008$ ). A Figura 4.24 apresenta diagramas de dispersão entre as variáveis que apresentaram correlação estatisticamente significativa, mostrando a relação entre as variáveis.



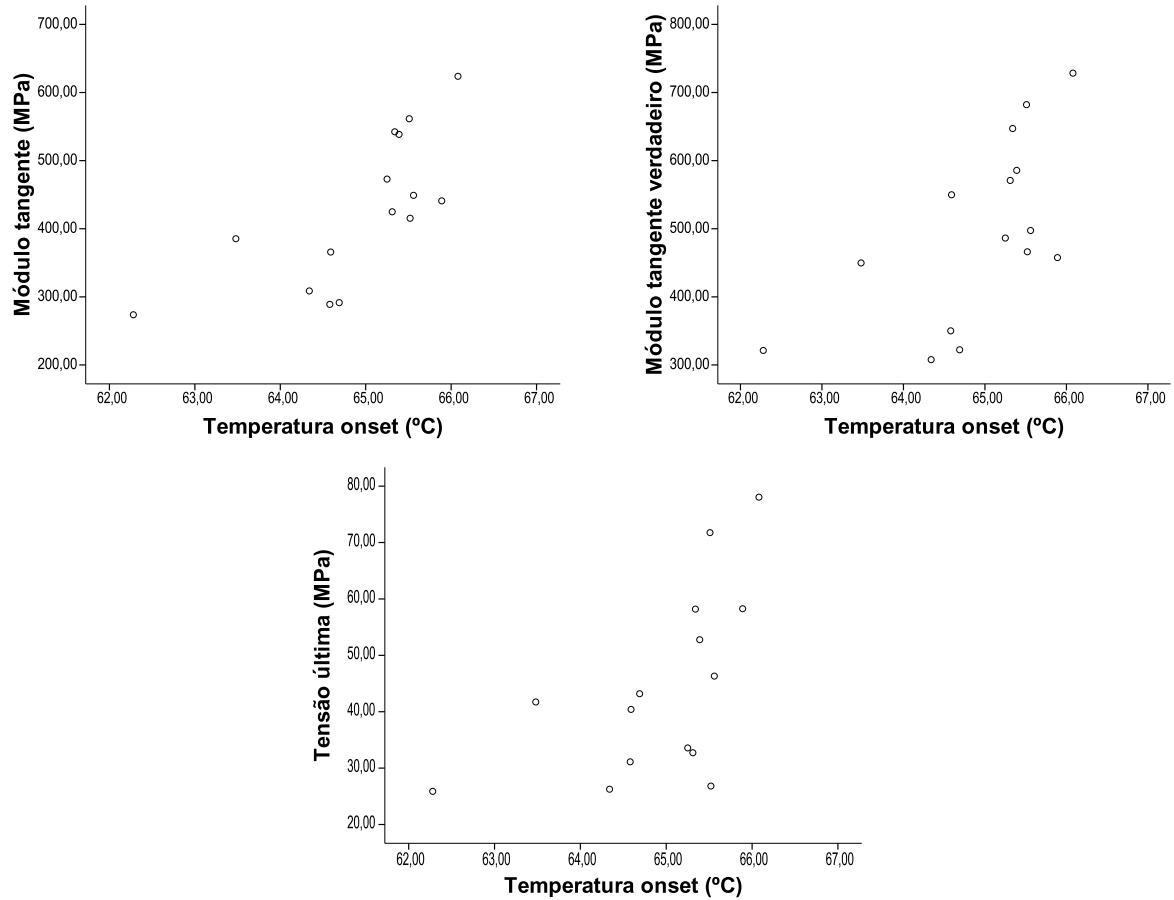


Figura 4.24 – Diagramas de dispersão entre variáveis que apresentaram correlação

A Tabela 4.5 apresenta as correlações significantes encontradas ( $p < 0,05$ ) e descritas anteriormente.

Tabela 4.5 – Correlações entre os parâmetros individuais e os parâmetros mecânicos

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	r	p	CC
Temperatura de pico	Módulo tangente	0,803	<0,0001	Pearson
Temperatura de pico	Módulo tangente verdadeiro	0,734	0,002	Pearson
Temperatura de pico	Tensão última	0,655	0,008	Pearson
Temperatura de pico	Tensão última verdadeira	0,584	0,022	Pearson
Temperatura <i>onset</i>	Módulo tangente	0,761	0,001	Spearman
Temperatura <i>onset</i>	Módulo tangente verdadeiro	0,657	0,008	Spearman
Temperatura <i>onset</i>	Tensão última	0,696	0,008	Spearman

Portanto encontrou-se uma correlação forte ( $r > 0,8$ ) entre a temperatura de pico e o módulo tangente do tecido tendinoso. A temperatura de pico apresentou uma correlação moderada ( $0,5 < r \leq 0,8$ ) com o módulo tangente verdadeiro, tensão última e tensão

última verdadeira. A temperatura *onset* foi moderadamente correlacionada com o módulo tangente, módulo tangente verdadeiro e tensão última.

Os demais parâmetros individuais do tecido não apresentaram correlação significativa com os parâmetros mecânicos. Assim, estes parâmetros são os candidatos naturais para a continuação de trabalhos que exploram correlações entre parâmetros individuais e mecânicos.

A correlação também é utilizada para determinar relações entre as variáveis preditoras, ou seja, entre os parâmetros individuais. A Tabela 4.6 apresenta as correlações significantes encontradas ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros individuais, podendo-se visualizar a existência de correlações fortes e moderadas. Em geral as correlações apareceram em dados obtidos através da calorimetria diferencial de varredura, ou seja, são complementares. Por outro lado o peso seco e a % de colágeno apresentaram uma correlação moderada.

Tabela 4.6 – Correlações entre os parâmetros individuais (variáveis independentes)

Variáveis independentes		r	p	CC
Temperatura de pico	Entalpia peso úmido	-0,597	0,019	Pearson
Peso seco	Entalpia peso úmido	0,564	0,029	Pearson
Temperatura <i>onset</i>	Temperatura de pico	0,843	<0,0001	Spearman
Temperatura <i>onset</i>	Entalpia peso úmido	-0,661	0,007	Spearman
Peso seco	% colágeno tipo I	0,656	0,008	Spearman
Peso seco	% colágeno tipo III	-0,656	0,008	Spearman
Temperatura <i>onset</i>	Entalpia peso seco	-0,536	0,04	Spearman

As correlações apresentadas revelaram que existe relação entre alguns parâmetros mecânicos e alguns parâmetros individuais, mas esses coeficientes não quantificam a relação que existe entre cada uma das variáveis e se existem outras variáveis, medidas ou não, afetando a relação.

#### 4.5 Regressão múltipla linear

Como apresentado anteriormente, a regressão múltipla permite obter a correlação de um conjunto de parâmetros individuais com cada parâmetro mecânico. Assim, é importante avaliar se algum parâmetro individual, quando combinado com outro, possa apresentar correlação significativa, mesmo quando não possui sozinho. Objetivando quantificar a relação entre cada uma das variáveis dependentes (variáveis mecânicas) e as va-

riáveis preditoras (variáveis dos parâmetros individuais) realizou-se a regressão múltipla linear passo a passo através do método de eliminação retroativa.

Realizou-se então a regressão de cada variável dependente (parâmetros mecânicos) em relação a todas as variáveis independentes (parâmetros individuais). Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados obtidos através da regressão múltipla linear que são estatisticamente significantes.

Tabela 4.7 – Resultado para regressão múltipla linear considerando somente os os parâmetros significantes

Variável dependente	Significância do modelo	R <sup>2</sup>	R	Peso Seco	Entalpia peso úmido	Temperatura de pico
Alongamento	<0,05	0,54	0,74	0,009	-0,008	-
Módulo tangente	<0,05	0,64	0,8	-	-	111,37
Módulo tangente verdadeiro	<0,05	0,54	0,73	-	-	125,06
Tensão última	<0,05	0,61	0,78	2,65	-	15,07
Tensão última verdadeira	<0,05	0,59	0,77	3,29	-	14,46

Definindo o alongamento como variável dependente encontrou-se que o peso seco ( $p=0,003$ ) e a entalpia de peso úmido ( $p=0,016$ ) afetam o alongamento. A entalpia de peso úmido possui uma relação negativa com o alongamento, ou seja, quando a entalpia de peso úmido aumenta uma unidade espera-se um decréscimo de 0,008 no alongamento. Já o peso seco possui uma relação positiva com o alongamento, ou seja, quando o peso seco aumenta espera-se que o alongamento aumente.

Definindo o módulo tangente como variável dependente encontrou-se que a temperatura de pico ( $p<0,001$ ) afeta o módulo tangente. A temperatura de pico possui uma relação positiva com o módulo tangente, ou seja, quando a temperatura de pico aumenta uma unidade se espera que o módulo tangente aumente 111,37 MPa.

Definindo o módulo tangente verdadeiro como variável dependente encontrou-se que a temperatura de pico ( $p=0,002$ ) afeta o módulo tangente verdadeiro. A temperatura de pico influencia positivamente a módulo tangente verdadeiro, ou seja, quando a temperatura de pico aumenta uma unidade se espera que o módulo tangente aumente 125,06 MPa.

Definindo a tensão última como variável dependente encontrou-se que o peso seco ( $p=0,037$ ) e a temperatura de pico ( $p=0,002$ ) afetam a tensão última.

Quando define-se a tensão última verdadeira como variável dependente encontra-se que o peso seco ( $p=0,018$ ) e a temperatura de pico ( $p=0,004$ ) afetam a tensão última verdadeira.

Observa-se que os cinco parâmetros mecânicos medidos possuem modelos de regressão linear estatisticamente significantes.

Na Tabela 4.7 é apresentado o coeficiente de determinação, o qual representa a contribuição do conjunto de variáveis independentes (ou variável independente) em descrever a variabilidade das variáveis dependentes. Dessa forma o modelo do alongamento é significativo, com 54 % da variação desse parâmetro explicado pelo peso seco e pela entalpia de peso úmido. O módulo tangente e o módulo tangente verdadeiro possuem respectivamente 64% e 54 % de variabilidade explicada pela temperatura de pico, através do modelo. A tensão última e a tensão última verdadeira possuem um modelo de regressão múltipla linear que explica 61% e 59% da variância através do peso seco e da temperatura de pico.

Os resultados obtidos através da regressão podem ser representados na forma de equação, onde a variação da variável dependente é equivalente aos valores dos preditores independentes (parâmetros individuais) multiplicados pelos coeficientes individuais, ou seja,

$$\text{Alongamento} = 0,972 + (0,009 \times \text{Peso seco}) + (-0,008 \times \text{Entalpia de peso úmido})$$

$$\text{Módulo tangente (MPa)} = -7076,43 + (111,37 \times \text{Temperatura de pico})$$

$$\text{Módulo tangente verdadeiro (MPa)} = -7929,09 + (125,06 \times \text{Temperatura de pico})$$

$$\text{Tensão última (MPa)} = -1054,9 + (2,65 \times \text{Peso seco}) + (15,07 \times \text{Temperatura de pico})$$

$$\text{Tensão última verdadeira (MPa)} = -1030,203 + (3,29 \times \text{Peso seco}) + (14,46 \times \text{Temperatura de pico})$$

A regressão múltipla linear forneceu modelos estatisticamente significantes para prever as propriedades mecânicas.

Os coeficientes apresentados na Tabela 4.7 e nas equações acima representam as mudanças nas variáveis dependentes previstas para um aumento unitário na variável ou nas variáveis independentes.

Na literatura artigos como Robinson et al., 2004, fazem regressão somente entre dados normalizados e separadamente entre dados não normalizados, entretanto a regressão múltipla linear só exige que as variáveis dependentes sejam normalmente distribuídas, que é o caso dos dados desta análise, conforme previamente testado. Se o objetivo fosse realizar regressão onde as variáveis dependentes normalizadas fazem regressão somente com variáveis independentes normalizadas, três parâmetros não entrariam na regressão múltipla linear: a temperatura *onset*, a porcentagem de colágeno tipo I e a porcentagem de colágeno tipo III.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou um estudo exploratório capaz de caracterizar experimentalmente o tecido tendinoso de uma pata de suíno segundo aspectos individuais. Considerando que não existe um método experimental específico para tecidos biológicos, uma metodologia que incorpora aspectos individuais foi proposta, envolvendo múltiplos parâmetros individuais, diretamente relacionados com diferentes níveis hierárquicos estruturais. Diferentemente do que se encontra em literatura, que normalmente estuda apenas um ou poucos parâmetros individuais, este estudo foi capaz de tratar de aspectos estruturais de um ampla forma, como o mesmo tipo de tecido (tendão). Este tipo de abordagem permite avaliações qualitativas entre parâmetros de forma mais segura, uma vez que trata-se do mesmo tecido ensaiado mecanicamente, não sendo exposto a variações de resultados por se tratar efetivamente de outro tecido.

A metodologia experimental proposta apresentou alguns diferenciais, dentre eles o uso de garras termoelétricas e a possibilidade de acompanhar a mudança da área da seção transversal durante o ensaio, que são fatores que também podem influenciar na resposta mecânica. As garras utilizadas auxiliaram a evitar o escorregamento das amostras e não congelaram o tecido ao longo do comprimento. A viabilidade de obter a área da seção transversal atualizada permitiu que medidas como o módulo tangente verdadeiro e a tensão última verdadeira fossem realizadas.

Através das análises não foi possível observar a diferença entre machos e fêmeas, o que pode estar vinculado ao fato de todos possuírem a mesma idade (aproximadamente seis meses). Tratando-se do mesmo tecido mas de diferentes localizações pode-se observar diferenças estatisticamente significantes entre tendões flexores e extensores em alguns parâmetros, o que já era esperado e desejado, uma vez que diferentes tecidos podem levar a valores dos parâmetros distribuídos em uma região mais ampla, sendo benéficos para a análise de correlação.

Por meio de análises estatísticas e considerando tendões extensores e flexores pôde-se encontrar parâmetros mecânicos correlacionados com a estrutura molecular do tecido tendinoso. O coeficiente de Pearson foi utilizado e mostrou que existe uma correlação forte entre o módulo tangente e a temperatura de pico das amostras estudadas ( $r=0,803$ ;  $p<0,0001$ ). O relacionamento das demais variáveis se mostrou moderado ou não foi pos-

sível obter uma correlação estatisticamente significativa. Do ponto de vista estatístico, a temperatura de pico obtida com o DSC pode ser usada para correlacionar o indivíduo e a sua resposta mecânica por meio do módulo tangente.

Utilizando a regressão múltipla linear foi possível quantificar a relação entre os parâmetros mecânicos e os parâmetros individuais, obtendo-se modelos estatisticamente significantes para prever as propriedades mecânicas usando um ou mais parâmetros. Novamente os parâmetros que se mostraram mais promissores estavam vinculados ao DSC.

O presente trabalho foi capaz de evidenciar a correlação entre parâmetros mecânicos e individuais indicando até mesmo a falta de correlação mecânica com parâmetros que em outros trabalhos da literatura indicavam existir. Utilizando tendões extensores e flexores conjuntamente foi possível obter uma correlação entre o comportamento mecânico e a estrutura molecular do tendão. Desta forma pôde-se evidenciar que o estudo da estrutura molecular pode fornecer maiores detalhes da função-estrutura do tendão na macroescala.

Até onde esta autora tem conhecimento, a correlação forte entre parâmetros mecânicos com parâmetros do DSC ainda não foi relatada na literatura. Isto indica que estes parâmetros são candidatos naturais para correlação a níveis moleculares, ainda que usando uma técnica relativamente simples para sua obtenção.

## 5.1 Sugestões para Trabalho Futuros

Para dar continuidade nesta linha de pesquisas alguns pontos identificados neste trabalho poderiam ser explorados em trabalhos futuros. Pode-se citar:

- os parâmetros individuais que apresentaram correlação, moderada e forte, com parâmetros mecânicos poderiam ser avaliados para um número maior de amostras, aprofundando o estudo exploratório aqui realizado.
- explorar outros parâmetros, ou mesmo outras técnicas de quantificação para os parâmetros estudados neste trabalho, assim como outros animais e/ou tendões, a fim de estudar intervalos maiores de parâmetros individuais aqui encontrados. Por exemplo, neste trabalho, devido aos animais usados, os valores dos parâmetros se restringiram em um intervalo relativamente pequeno frente ao reportado na literatura. Os valores mínimo e máximo do Parâmetro de Temperatura de pico foram, respectivamente, 65, 45°C

e 68,43°C. Para diferentes tendões, diferentes animais, ou suínos com diferentes idades, esta faixa pode ser bem mais ampla e ainda manter a correlação com um parâmetro mecânico, como apresentado ilustrativamente na Figura 5.1, onde os dados destacados em caixa são os dados dos tendões extensores e flexores deste trabalho.

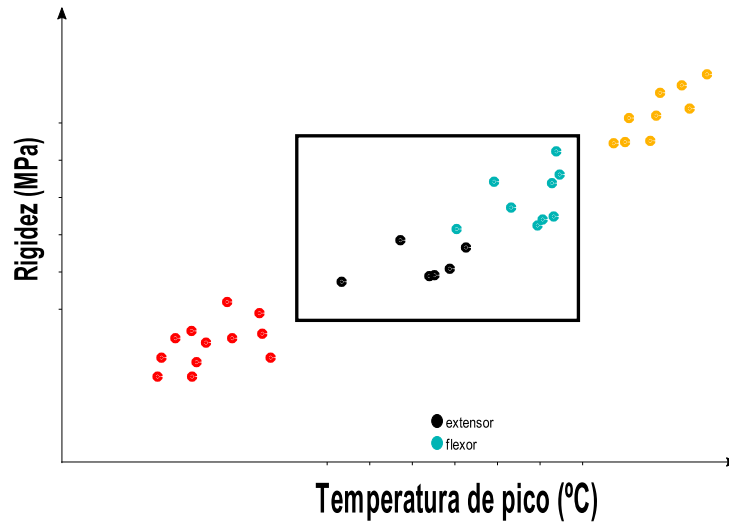


Figura 5.1 – Dados extrapolados

- Utilizar modelo de material capaz de incorporar aspectos individuais. No Apêndice E um modelo preliminar é apresentado, onde propõe-se o uso de uma função que modifica a relação constitutiva, sendo que os parâmetros individuais a serem inseridos nessa função devem possuir uma relação estatisticamente significativa com o comportamento mecânico do tecido. Outras estratégias de análise estatísticas podem ser investigadas uma vez que neste caso há a necessidade de utilizar uma curva não linear dada por um modelo específico, e não de parâmetros mecânicos que representam o seu comportamento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avalle, M., Belingardi, G., e Ibba, A. Mechanical models of cellular solids: parameters identification from experimental tests, **International Journal of Impact Engineering**, vol. 34(1), p. 3–27, 2007.

Azadani, A. N., Chitsaz, S., Matthews, P. B., Jaussaud, N., Leung, J., Wisneski, A., Ge, L., e Tseng, E. E. Biomechanical comparison of human pulmonary and aortic roots, **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, vol. 41(5), p. 1111–1116, 2012.

Baer, E., Hiltner, A., e Morgan, R. Biological and synthetic hierarchical composites, **Physics Today**, vol. 45, p. 60–67, 1992.

Baker, A., Abreu, E., Mascha, E., e Derwin, K. A. Homotypic variation of canine flexor tendons: implications for the design of experimental studies in animal models, **Journal of biomechanics**, vol. 37(7), p. 959–968, 2004.

Batson, E., Paramour, R., Smith, T., Birch, H., Patterson-Kane, J., e Goodship, A. Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions?, **Equine veterinary journal**, vol. 35(3), p. 314–318, 2003.

Beyar, R., Gruberg, L., Deleanu, D., Roguin, A., Almagor, Y., Cohen, S., Kumar, G., e Wenderow, T. Remote-control percutaneous coronary interventions, **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 47(2), p. 296–300, 2006.

Billaud, M., Johnstone, S. R., e Isakson, B. E. Loss of compliance in small arteries, but not in conduit arteries, after 6 weeks exposure to high fat diet, **Journal of cardiovascular translational research**, vol. 5(3), p. 256–263, 2012.

Binnebösel, M., Klink, C., Otto, J., Conze, J., Jansen, P. L., Anurov, M., Schumpe-lick, V., e Junge, K. Impact of mesh positioning on foreign body reaction and collagenous ingrowth in a rabbit model of open incisional hernia repair, **Hernia**, vol. 14(1), p. 71–77, 2010.

Bozzola, J. J. **Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells**. In *Electron Microscopy*, p. 1–19. Springer, 2014.

Brown, S. R., Melman, L., Jenkins, E., Deeken, C., Frisella, M. M., Brunt, L. M., Eagon, J. C., e Matthews, B. D. Collagen type I: III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias, **Surgical endoscopy**, vol. 25(5), p. 1390–1394, 2011.

Callegari-Jacques, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Artmed Editora, 2009.

Camhi, S. M., Katzmarzyk, P. T., Broyles, S. T., Srinivasan, S. R., Chen, W., Bouchard, C., e Berenson, G. S. Subclinical atherosclerosis and metabolic risk: role of body mass index and waist circumference, **Metabolic syndrome and related disorders**, vol. 9(2), p. 119–125, 2011.

Carniel, T. A., Formenton, A. B. K., Klahr, B., Vassoler, J. M., de Mello Roessler, C. R., e Fancello, E. A. An experimental and numerical study on the transverse deformations in tensile test of tendons, **Journal of biomechanics**, 2019.

Cavallo, J. A., Roma, A. A., Jasielec, M. S., Ousley, J., Creamer, J., Pichert, M. D., Baalman, S., Frisella, M. M., Matthews, B. D., e Deeken, C. R. Remodeling characteristics and collagen distribution in synthetic mesh materials explanted from human subjects after abdominal wall reconstruction: an analysis of remodeling characteristics by patient risk factors and surgical site classifications, **Surgical endoscopy**, vol. 28(6), p. 1852–1865, 2014.

Ciarletta, P., Dario, P., e Micera, S. Pseudo-hyperelastic model of tendon hysteresis from adaptive recruitment of collagen type I fibrils, **Biomaterials**, vol. 29(6), p. 764–770, 2008.

Ciarletta, P., Micera, S., Accoto, D., e Dario, P. A novel microstructural approach in tendon viscoelastic modelling at the fibrillar level, **Journal of biomechanics**, vol. 39(11), p. 2034–2042, 2006.

Clavert, P., Kempf, J.-F., Bonnomet, F., Boutemy, P., Marcelin, L., e Kahn, J.-L. Effects of freezing/thawing on the biomechanical properties of human tendons, **Surgical and Radiologic Anatomy**, vol. 23(4), p. 259–262, 2001.

Cohen, J. Statistical power analysis, **Current directions in psychological science**, vol. 1(3), p. 98–101, 1992.

Connizzo, B. K., Yannascoli, S. M., e Soslowsky, L. J. Structure–function relationships of postnatal tendon development: a parallel to healing, **Matrix Biology**, vol. 32(2), p. 106–116, 2013.

Cowin, S. C. e Doty, S. B. **Tissue mechanics**. Springer Science & Business Media, 2007.

Cuttle, L., Nataatmadja, M., Fraser, J. F., Kempf, M., Kimble, R. M., e Hayes, M. T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization, **Wound repair and regeneration**, vol. 13(2), p. 198–204, 2005.

Daly, C. H. e Odland, G. F. Age-related changes in the mechanical properties of human skin, **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 73(1), p. 84–87, 1979.

Danielsen, C. C. e Andreassen, T. T. Mechanical properties of rat tail tendon in relation to proximal-distal sampling position and age, **Journal of biomechanics**, vol. 21(3), p. 207–212, 1988.

Dayan, D., Hiss, Y., Hirshberg, A., Bubis, J., e Wolman, M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers?, **Histochemistry**, vol. 93(1), p. 27–29, 1989.

Derwin, K. A. e Soslowsky, L. A quantitative investigation of structure-function relationships in a tendon fascicle model, **Journal of biomechanical engineering**, vol. 121(6), p. 598–604, 1999.

Devkota, A. C. e Weinhold, P. S. Mechanical response of tendon subsequent to ramp loading to varying strain limits, **Clinical Biomechanics**, vol. 18(10), p. 969–974, 2003.

Devore, J. L. **Probability and Statistics for Engineering and the Sciences**. Cengage learning, 2011.

Doroski, D. M., Brink, K. S., e Temenoff, J. S. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament, **Biomaterials**, vol. 28(2), p. 187–202, 2007.

Duenwald, S. E., Vanderby, R., e Lakes, R. S. Viscoelastic relaxation and recovery of tendon, **Annals of biomedical engineering**, vol. 37(6), p. 1131–1140, 2009.

Dunkman, A. A., Buckley, M. R., Mienaltowski, M. J., Adams, S. M., Thomas, S. J., Satchell, L., Kumar, A., Pathmanathan, L., Beason, D. P., Iozzo, R. V., et al. Decorin expression is important for age-related changes in tendon structure and mechanical properties, **Matrix Biology**, vol. 32(1), p. 3–13, 2013.

Ehret, A. E., Böl, M., e Itskov, M. A continuum constitutive model for the active behaviour of skeletal muscle, **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, vol. 59(3), p. 625–636, 2011.

Ehret, A. E. e Itskov, M. Modeling of anisotropic softening phenomena: application to soft biological tissues, **International Journal of Plasticity**, vol. 25(5), p. 901–919, 2009.

El Sayed, T., Mota, A., Fraternali, F., e Ortiz, M. Biomechanics of traumatic brain injury, **Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering**, vol. 197(51-52), p. 4692–4701, 2008a.

El Sayed, T., Mota, A., Fraternali, F., e Ortiz, M. A variational constitutive model for soft biological tissues, **Journal of biomechanics**, vol. 41(7), p. 1458–1466, 2008b.

Fancello, E., Ponthot, J.-P., e Stainier, L. A variational formulation of constitutive models and updates in non-linear finite viscoelasticity, **International Journal for Numerical Methods in Engineering**, vol. 65(11), p. 1831–1864, 2006.

Fancello, E., Vassoler, J. M., e Stainier, L. A variational constitutive update algorithm for a set of isotropic hyperelastic–viscoplastic material models, **Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering**, vol. 197(49), p. 4132–4148, 2008.

Field, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS-2**. Bookman Editora, 2009.

Formenton, A. B. K., Vassoler, J. M., Silveira, P. G., e de Mello Roesler, C. R. An experimental methodology for arterial walls, **Bioscience Journal**, vol. 32(6), 2016.

Franchi, M., Trirè, A., Quaranta, M., Orsini, E., e Ottani, V. Collagen structure of tendon relates to function, **The Scientific World Journal**, vol. 7, p. 404–420, 2007.

Frank, C., Amiel, D., Woo, S. L., e Akeson, W. Normal ligament properties and ligament healing., **Clinical orthopaedics and related research**, vol. 196, p. 15–25, 1985.

García, A., Pena, E., Laborda, A., Lostalé, F., De Gregorio, M., Doblaré, M., e Martínez, M. Experimental study and constitutive modelling of the passive mechanical properties of the porcine carotid artery and its relation to histological analysis: implications in animal cardiovascular device trials, **Medical engineering & physics**, vol. 33(6), p. 665–676, 2011.

García-Herrera, C. M., Atienza, J., Rojo, F., Claes, E., Guinea, G., Celentano, D. J., García-Montero, C., e Burgos, R. Mechanical behaviour and rupture of normal and pathological human ascending aortic wall, **Medical & biological engineering & computing**, vol. 50(6), p. 559–566, 2012.

Gasperin, C. A., Germiniani, H., Facin, A., Souza, A. M. d., e Cunha, C. L. P. d. Análise dos critérios eletrocardiográficos para determinação da sobrecarga ventricular esquerda, **Arq Bra Cardiol**, vol. 78(1), p. 59–71, 2002.

Gasser, T. C. e Holzapfel, G. A. A rate-independent elastoplastic constitutive model for biological fiber-reinforced composites at finite strains: continuum basis, algorithmic formulation and finite element implementation, **Computational Mechanics**, vol. 29(4-5), p. 340–360, 2002.

Geest, J. P. V., Sacks, M. S., e Vorp, D. A. The effects of aneurysm on the biaxial mechanical behavior of human abdominal aorta, **Journal of biomechanics**, vol. 39(7), p. 1324–1334, 2006.

Giannini, S., Buda, R., Di Caprio, F., Agati, P., Bigi, A., De Pasquale, V., e Ruggeri, A. Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons, **International orthopaedics**, vol. 32(2), p. 145–151, 2008.

Glazer, A., Lewis, J., e Kaminsky, W. An automatic optical imaging system for birefringent media, **Proceedings of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, vol. 452(1955), p. 2751–2765, 1996.

Grasa, J., Calvo, B., Delgado-Andrade, C., e Navarro, M. Variations in tendon stiffness due to diets with different glycotoxins affect mechanical properties in the muscle-tendon unit, **Annals of biomedical engineering**, vol. 41(3), p. 488–496, 2013.

Gundiah, N., Babu, A. R., e Pruitt, L. A. Effects of elastase and collagenase on the nonlinearity and anisotropy of porcine aorta, **Physiological measurement**, vol. 34(12), p. 1657, 2013.

Halliday, D., Resnick, R., e Walker, J. **Fundamentals of physics extended**. John Wiley & Sons, 2010.

Hamada, M., Shino, K., Mitsuoka, T., Abe, N., e Horibe, S. Cross-sectional area measurement of the semitendinosus tendon for anterior cruciate ligament reconstruction, **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, vol. 14(7), p. 696–701, 1998.

Hansen, M., Couppe, C., Hansen, C. S., Skovgaard, D., Kovanen, V., Larsen, J. O., Aagaard, P., Magnusson, S. P., e Kjaer, M. Impact of oral contraceptive use and menstrual phases on patellar tendon morphology, biochemical composition, and biomechanical properties in female athletes, **Journal of Applied Physiology**, vol. 114(8), p. 998–1008, 2013.

Hansen, P., Haraldsson, B. T., Aagaard, P., Kovanen, V., Avery, N. C., Qvortrup, K., Larsen, J. O., Krogsgaard, M., Kjaer, M., e Magnusson, S. P. Lower strength of the human posterior patellar tendon seems unrelated to mature collagen cross-linking and fibril morphology, **Journal of applied physiology**, vol. 108(1), p. 47–52, 2010.

Harvey, A., Thompson, M., Cochlin, L., Raju, P., Cui, Z., Cornell, H., Hulley, P., e Brady, J. Functional imaging of tendon, **Ann. Brit. Machine Vision Assoc**, vol. 2009, p. 1–11, 2009.

Hashemi, J., Chandrashekar, N., e Slauterbeck, J. The mechanical properties of the human patellar tendon are correlated to its mass density and are independent of sex, **Clinical Biomechanics**, vol. 20(6), p. 645–652, 2005.

Haskett, D., Johnson, G., Zhou, A., Utzinger, U., e Vande Geest, J. Microstructural and biomechanical alterations of the human aorta as a function of age and location, **Biomechanics and modeling in mechanobiology**, vol. 9(6), p. 725–736, 2010.

Haut, R. C. The influence of specimen length on the tensile failure properties of tendon collagen, **Journal of Biomechanics**, vol. 19(11), p. 951–955, 1986.

Haut, R. C., Lancaster, R. L., e DeCamp, C. E. Mechanical properties of the canine patellar tendon: some correlations with age and the content of collagen, **Journal of biomechanics**, vol. 25(2), p. 163167–165173, 1992.

Haut, T. L. e Haut, R. C. The state of tissue hydration determines the strain-rate-sensitive stiffness of human patellar tendon, **Journal of biomechanics**, vol. 30(1), p. 79–81, 1997.

Herod, T. W., Chambers, N. C., e Veres, S. P. Collagen fibrils in functionally distinct tendons have differing structural responses to tendon rupture and fatigue loading, **Acta biomaterialia**, vol. 42, p. 296–307, 2016.

Hirpara, K. M., Sullivan, P. J., e O’Sullivan, M. E. The effects of freezing on the tensile properties of repaired porcine flexor tendon, **The Journal of hand surgery**, vol. 33(3), p. 353–358, 2008.

Hokanson, J. e Yazdani, S. A constitutive model of the artery with damage, **Mechanics Research Communications**, vol. 24(2), p. 151–159, 1997.

Holzappel, G. A. **Nonlinear solid mechanics**. vol. 24. Wiley Chichester, 2000.

Holzapfel, G. A. e Gasser, T. C. A viscoelastic model for fiber-reinforced composites at finite strains: Continuum basis, computational aspects and applications, **Computer methods in applied mechanics and engineering**, vol. 190(34), p. 4379–4403, 2001.

Holzapfel, G. A., Gasser, T. C., e Ogden, R. W. A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models, **Journal of elasticity and the physical science of solids**, vol. 61(1-3), p. 1–48, 2000.

Holzapfel, G. A., Gasser, T. C., e Stadler, M. A structural model for the viscoelastic behavior of arterial walls: continuum formulation and finite element analysis, **European Journal of Mechanics-A/Solids**, vol. 21(3), p. 441–463, 2002.

Hu, J., Klinich, K. D., Miller, C. S., Nazmi, G., Pearlman, M. D., Schneider, L. W., e Rupp, J. D. Quantifying dynamic mechanical properties of human placenta tissue using optimization techniques with specimen-specific finite-element models, **Journal of Biomechanics**, vol. 42(15), p. 2528–2534, 2009.

Huang, C.-Y., Wang, V. M., Flatow, E. L., e Mow, V. C. Temperature-dependent viscoelastic properties of the human supraspinatus tendon, **Journal of biomechanics**, vol. 42(4), p. 546–549, 2009.

Johnson, G. A., Tramaglini, D. M., Levine, R. E., Ohno, K., Choi, N.-Y., e L-Y Woo, S. Tensile and viscoelastic properties of human patellar tendon, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 12(6), p. 796–803, 1994.

Junqueira, L., Bignolas, G., e Brentani, R. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen, **Analytical biochemistry**, vol. 94(1), p. 96–99, 1979.

Junqueira, L., Cossermelli, W., , e Brentani, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy, **Archivum histologicum japonicum**, vol. 41(3), p. 267–274, 1978.

Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Abrahamsohn, P. A., Zorn, T. M. T., e Santos, M. F. d. **Histologia básica: texto e atlas**. In *Histologia básica: texto e atlas*, p. 488–488, 2004.

Kahn, C. J., Wang, X., e Rahouadj, R. Nonlinear model for viscoelastic behavior of Achilles tendon, **Journal of biomechanical engineering**, vol. 132(11), p. 111002, 2010.

Kannus, P. Structure of the tendon connective tissue, **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, vol. 10(6), p. 312–320, 2000.

Karimi, A., Navidbakhsh, M., Shojaei, A., e Faghihi, S. Measurement of the uniaxial mechanical properties of healthy and atherosclerotic human coronary arteries, **Materials Science and Engineering: C**, vol. 33(5), p. 2550–2554, 2013.

Kastelic, J., Galeski, A., e Baer, E. The multicomposite structure of tendon, **Connective tissue research**, vol. 6(1), p. 11–23, 1978.

Khayyeri, H., Gustafsson, A., Heuwerkerk, A., Matikainen, M. K., Julkunen, P., Eliasson, P., Aspenberg, P., e Isaksson, H. A fibre-reinforced poroviscoelastic model accurately describes the biomechanical behaviour of the rat achilles tendon, **PloS one**, vol. 10(6), p. e0126869, 2015.

Kia, M., Stylianou, A. P., e Guess, T. M. Evaluation of a musculoskeletal model with prosthetic knee through six experimental gait trials, **Medical engineering & physics**, vol. 36(3), p. 335–344, 2014.

LaCroix, A. S., Duenwald-Kuehl, S. E., Brickson, S., Akins, T. L., Diffie, G., Aiken, J., Vanderby, R., e Lakes, R. S. Effect of age and exercise on the viscoelastic properties of rat tail tendon, **Annals of biomedical engineering**, vol. 41(6), p. 1120–1128, 2013.

Lake, S. P., Miller, K. S., Elliott, D. M., e Soslowky, L. J. Effect of fiber distribution and realignment on the nonlinear and inhomogeneous mechanical properties of human supraspinatus tendon under longitudinal tensile loading, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 27(12), p. 1596–1602, 2009.

Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., e Changotade, S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues, **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, vol. 62(10), p. 751–758, 2014.

Learoyd, B. M. e Taylor, M. G. Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls, **Circulation research**, vol. 18(3), p. 278–292, 1966.

Leng, Y. **Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods**. John Wiley & Sons, 2009.

Lepock, J. R., Frey, H. E., e Inniss, W. E. Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: relationship of protein denaturation in situ to maximum growth temperature, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, vol. 1055(1), p. 19–26, 1990.

Maher, E., Early, M., Creane, A., Lally, C., e Kelly, D. J. Site specific inelasticity of arterial tissue, **Journal of biomechanics**, vol. 45(8), p. 1393–1399, 2012.

Mescher, A. L. **Junqueira's basic histology: text and atlas**. Mcgraw-hill, 2013.

Mikic, B., Amadei, E., Rossmeier, K., e Bierwert, L. Sex matters in the establishment of murine tendon composition and material properties during growth, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 28(5), p. 631–638, 2010.

Miles, C., Wardale, R., Birch, H., e Bailey, A. Differential scanning calorimetric studies of superficial digital flexor tendon degeneration in the horse, **Equine veterinary journal**, vol. 26(4), p. 291–296, 1994.

Miles, C. A. e Bailey, A. J. **Thermal denaturation of collagen revisited**. In Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences, vol. 111, p. 71–80. Springer, 1999.

Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., Amendoeira, M. R. R., et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, 2012.

Muñoz-Rojas, P. A. Computational modeling, optimization and manufacturing simulation of advanced engineering materials, **Advanced structured materials (ISSN 1869-8433)**, vol. 49, 2016.

Nordin, M. e Frankel, V. H. **Basic biomechanics of the musculoskeletal system**. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Noyes, F., Butler, D., Grood, E., Zernicke, R., e Hefzy, M. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament, **J. Bone Joint Surg. Am**, vol. 66, p. 344–352, 1984.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kaneda, K., e Hayashi, K. Effects of complete stress-shielding on the mechanical properties and histology of in situ frozen patellar tendon, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 11(4), p. 592–602, 1993.

Orgel, J. P., Irving, T. C., Miller, A., e Wess, T. J. Microfibrillar structure of type I collagen in situ, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 103(24), p. 9001–9005, 2006.

Oryan, A. e Shoushtari, A. Biomechanical properties and dry weight content of the developing superficial digital flexor tendon in rabbit, **Comparative Clinical Pathology**, vol. 18(2), p. 131–137, 2009.

O'Brien, T. D., Reeves, N. D., Baltzopoulos, V., Jones, D. A., e Maganaris, C. N. Mechanical properties of the patellar tendon in adults and children, **Journal of biomechanics**, vol. 43(6), p. 1190–1195, 2010.

Pioletti, D. P., Rakotomanana, L., Benvenuti, J.-F., e Leyvraz, P.-F. Viscoelastic constitutive law in large deformations: application to human knee ligaments and tendons, **Journal of biomechanics**, vol. 31(8), p. 753–757, 1998.

Pioletti, D. P. e Rakotomanana, L. R. Non-linear viscoelastic laws for soft biological tissues, **European Journal of Mechanics-A/Solids**, vol. 19(5), p. 749–759, 2000.

Ragkousis, G. E., Curzen, N., e Bressloff, N. W. Simulation of longitudinal stent deformation in a patient-specific coronary artery, **Medical engineering & physics**, vol. 36(4), p. 467–476, 2014.

Recidoro, A. M., Roof, A. C., Schmitt, M., Worton, L. E., Petrie, T., Strand, N., Ausk, B. J., Srinivasan, S., Moon, R. T., Gardiner, E. M., et al. Botulinum toxin induces muscle paralysis and inhibits bone regeneration in zebrafish, **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 29(11), p. 2346–2356, 2014.

Rich, L. e Whittaker, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution, **Braz J Morphol Sci**, vol. 22(2), p. 97–104, 2005.

Riley, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective, **Rheumatology**, vol. 43(2), p. 131–142, 2003.



Riley, G., Harrall, R., Constant, C., Chard, M., Cawston, T., e Hazleman, B. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis., **Annals of the rheumatic diseases**, vol. 53(6), p. 359–366, 1994.

Rittié, L. **Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections**. In *Fibrosis*, p. 395–407. Springer, 2017.

Robinson, P. S., Lin, T. W., Jawad, A. F., Iozzo, R. V., e Soslowsky, L. J. Investigating tendon fascicle structure–function relationships in a transgenic-age mouse model using multiple regression models, **Annals of biomedical engineering**, vol. 32(7), p. 924–931, 2004.

Schmid-Schönbein, G. W., Woo, S.-Y., e Zweifach, B. W. **Frontiers in biomechanics**. Springer Science & Business Media, 1986.

Scott, A., Zwerver, J., Grewal, N., de Sa, A., Alktebi, T., Granville, D. J., e Hart, D. A. Lipids, adiposity and tendinopathy: is there a mechanistic link? Critical review, **Br J Sports Med**, vol. 49(15), p. 984–988, 2015.

Sisson, S., Grossman, J. D., e Getty, R. **Anatomia dos animais domésticos**, 1986.

Sokolis, D. P. A passive strain-energy function for elastic and muscular arteries: correlation of material parameters with histological data, **Medical & biological engineering & computing**, vol. 48(6), p. 507–518, 2010.

Sokolis, D. P., Sassani, S., Kritharis, E. P., e Tsangaris, S. Differential histomechanical response of carotid artery in relation to species and region: mathematical description accounting for elastin and collagen anisotropy, **Medical & biological engineering & computing**, vol. 49(8), p. 867–879, 2011.

Starborg, T., Kalson, N. S., Lu, Y., Mironov, A., Cootes, T. F., Holmes, D. F., e Kadler, K. E. Using transmission electron microscopy and 3View to determine collagen fibril size and three-dimensional organization, **Nature protocols**, vol. 8(7), p. 1433, 2013.

Stephen, E. A., Venkatasubramaniam, A., Good, T. A., e Timmie Topoleski, L. The effect of oxidation on the mechanical response and microstructure of porcine aortas, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, vol. 102(9), p. 3255–3262, 2014.

Svensson, R. B., Herchenhan, A., Starborg, T., Larsen, M., Kadler, K. E., Qvortrup, K., e Magnusson, S. P. Evidence of structurally continuous collagen fibrils in tendons, **Acta biomaterialia**, vol. 50, p. 293–301, 2017.

Terroni, H. C., D. J. J. M. A. L. T. V. L. V. S. R. F. D.-B. P. d. C. Liofilização, **Revista Científica UNILAGO**, vol. 1(1), p. 271–284, 2013.

Tomic, A., Grillo, A., e Federico, S. Poroelastic materials reinforced by statistically oriented fibres—numerical implementation and application to articular cartilage, **IMA Journal of Applied Mathematics**, vol. , p. hxu039, 2014.

Tsuchida, T., Yasuda, K., Kaneda, K., Hayashi, K., Yamamoto, N., Miyakawa, K., e Tanaka, K. Effects of in situ freezing and stress-shielding on the ultrastructure of rabbit patellar tendons, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 15(6), p. 904–910, 1997.

Varadarajan, K. M., Gill, T. J., Freiberg, A. A., Rubash, H. E., e Li, G. Patellar tendon orientation and patellar tracking in male and female knees, **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 28(3), p. 322–328, 2010.

Vassoler, J., Reips, L., e Fancello, E. A variational framework for fiber-reinforced viscoelastic soft tissues, **International Journal for Numerical Methods in Engineering**, vol. 89(13), p. 1691–1706, 2012.

Vassoler, J., Stainier, L., e Fancello, E. A variational framework for fiber-reinforced viscoelastic soft tissues including damage, **International Journal for Numerical Methods in Engineering**, vol. , 2016.

Veras, K. N., Mendes Filho, J., Costa, P. H. M., Medeiros, P. R., Martins, S. N., e Vasconcelos, J. T. P. Gênero e mortalidade em cirurgia de revascularização do miocárdio, **Rev Bras Ter Intensiva**, vol. 15(1), p. 19–25, 2003.

Wang, J. H.-C. Mechanobiology of tendon, **Journal of biomechanics**, vol. 39(9), p. 1563–1582, 2006.

Weber, G. e Anand, L. Finite deformation constitutive equations and a time integration procedure for isotropic, hyperelastic-viscoplastic solids, **Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering**, vol. 79(2), p. 173–202, 1990.

Whittaker, P. e Canham, P. B. Demonstration of quantitative fabric analysis of tendon collagen using two-dimensional polarized light microscopy, **Matrix**, vol. 11(1), p. 56–62, 1991.

Wilchez, D. F. T. Estudo do comportamento mecânico de ligamentos e tendões utilizando medição ótica, vol. , 2012.

Wilmink, J., Wilson, A., e Goodship, A. Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses, **Research in veterinary science**, vol. 53(3), p. 354–359, 1992.

Woo, S., Thay, Q., Abramowitch, S., e Gilbert, T. **Structure and function of ligaments and tendons**. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Woo, S. L.-Y., Orlando, C. A., Camp, J. F., e Akeson, W. H. Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior, **Journal of biomechanics**, vol. 19(5), p. 399–404, 1986.

Zitnay, J. L. e Weiss, J. A. Load transfer, damage, and failure in ligaments and tendons, **Journal of Orthopaedic Research®**, vol. 36(12), p. 3093–3104, 2018.

## APÊNDICE A – Procedimento Experimental para Ensaio

Aluna: Ana Bárbara K. Formenton - PROMEC/UFRGS

Professores: Jakson Manfredini Vassoler / Carlos Rodrigo de Mello Roesler

Frigorífico: Antônio Carlos Responsável (Frig.): Daniel/Murilo

---

Devido a quantidade de amostras a serem ensaiadas os testes foram divididos em quatro baterias de ensaio, sendo que cada bateria é composta por três patas dianteiras. Foram retirados dois tendões de cada pata, um extensor (Figura A.1) e um flexor (A.2).



Figura A.1 – Tendão extensor.



Figura A.2 – Tendão flexor e extensor.

Serão realizadas análises de microscopia de luz, microscopia eletrônica, liofilização

e DSC, além de realizar ensaios mecânicos. Para isto, pretende-se dividir o tendão da seguinte maneira (Figura A.3):

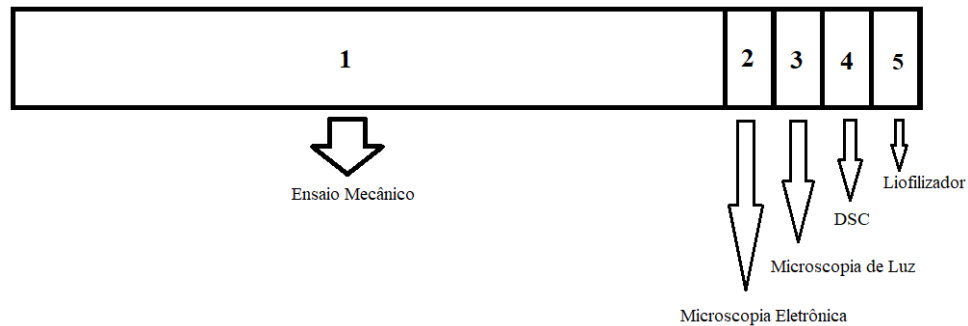


Figura A.3 – Exemplificação dos cortes para cada tendão

### Registro:

Data: \_\_\_\_\_ Saída Florianópolis: \_\_\_\_\_ Chegada Frigorífico: \_\_\_\_\_

Saída Frigorífico: \_\_\_\_\_ Chegada LEBm: \_\_\_\_\_

Dados Gerais (Concedidos pelo Frigorífico):

Animal utilizado: suíno – pata dianteira direita

Raça: machos MS60 e fêmeas híbridas ou F1.

### Sexo:

Suíno 1=> \_\_\_\_\_ Peso => \_\_\_\_\_

Suíno 2=> \_\_\_\_\_ Peso => \_\_\_\_\_

Suíno 3=> \_\_\_\_\_ Peso => \_\_\_\_\_

Idade: Aproximadamente 180 dias.

### ETAPA I - Procedimento de retirada - Frigorífico:

1. Registrar a data e hora do abate.

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

2. Procedimentos realizados no frigorífico entre o abate e o corte da pata dianteira: sangria, escaldagem, depilação, retirada do casco e toailete, evisceração, etc. São sempre os mesmos, assim como os de abate.

3. Especificar a altura do corte do antebraço do suíno que está vinculada aos cortes da carne suína, ou seja, não precisa ser tão alto a ponto de interferir no corte da paleta, mas

tem que incluir toda a extensão do tendão (Figura A.4). OBS.: mostrar imagem para o pessoal do frigorífico;

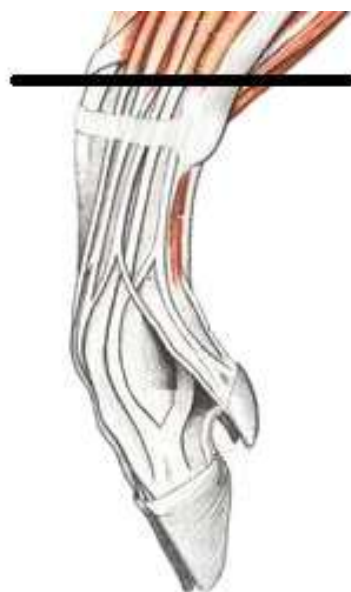


Figura A.4 – Altura do corte (pata dianteira)

4. Colocar a pata (ou as patas) em sacos plásticos (tipo ziplock), fechar e armazenar dentro de uma caixa de isopor com gelo para o transporte. Os sacos plásticos precisam estar devidamente identificados e selados (para que não ocorra hidratação e nem desidratação do tecido).

Exemplo de nomenclatura para as patas armazenadas em sacos plásticos: S1M (1º animal, M - Macho), S2F (2º animal, F - Fêmea), etc.

## **ETAPA II - Procedimento de dissecação – LEBm:**

1. Antes de começar o processo de dissecação é recomendado ligar o PCI, assim como os micrômetros digitais. Os micrômetros digitais devem ser ligados, por pelo menos, 30 minutos antes de iniciar a medição (tempo necessário para o circuito interno do micrômetro ficar estável), assim como o PCI. Posteriormente liga-se a central de refrigeração das garras termoelétricas (chiller), o qual precisa estar com um fluxo entre 1200-2000 mL/min (foi estipulado 1600 mL/min) e temperatura entre 5-10°C para que a fonte possa ser ligada (foi estipulado 7,5°C), iniciando o congelamento do tecido que se encontra entre as garras.

2. Registrar a altura total das patas após o corte (ponta da unha/dedo – até região do corte, conforme Figura A.5) e horário inicial da dissecação. OBS.: anotar na folha de

cada tendão também (Apêndice D).

Suíno 01: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_(cm) Hora: \_\_\_\_\_(início)

Suíno 02: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_(cm) Hora: \_\_\_\_\_(início)

Suíno 03: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_(cm) Hora: \_\_\_\_\_(início)



Figura A.5 – Altura do corte (pata dianteira)

3. Realizar dissecação (cortar a pele com bisturi e divulsionar a pele da pata até a exposição inicial do tendão do músculo extensor do dedo) expondo todos os tendões (primeiramente extensores e posteriormente os flexores).
4. Realizar uma incisão a 60mm de distância da ponta do dedo do suíno para o tendão extensor (Figura A.6), retirando o peritendão (membrana que envolve o tendão) e qualquer tecido que não seja o próprio tendão (evitando a influência destes nas medições do tendão).

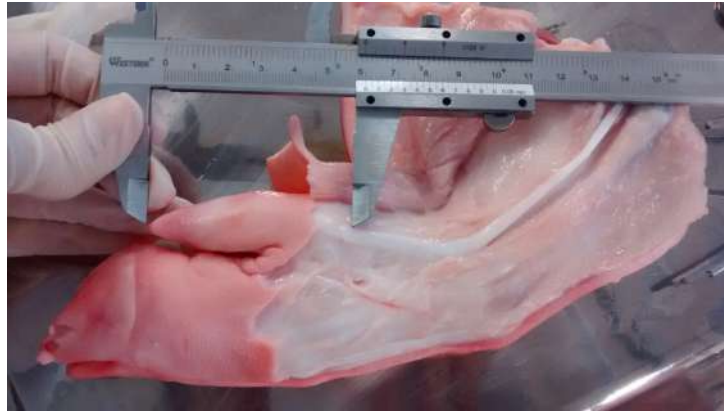


Figura A.6 – Incisão a 60mm para o tendão extensor

5. Retirar o tendão extensor marcando a extremidade próxima ao dedo com um pouco de toner.
6. Enrolar o tendão extensor em gaze umidificada (em solução salina), colocá-lo em um saco (tipo ziplock) e mantê-lo resfriado durante a extração do tendão flexor.
7. Realizar uma incisão a 20mm de distância da ponta do dedo para o tendão flexor (Figura A.7), seguindo o mesmo procedimento utilizado para o tendão extensor.



Figura A.7 – Incisão a 20mm para o tendão flexor

8. Retirar o tendão flexor marcando a extremidade próxima ao dedo com um pouco de toner.
9. Enrolar o tendão flexor em gaze umidificada (em solução salina), colocá-lo em um saco (tipo ziplock) e mantê-lo resfriado durante o ensaio do tendão extensor. Armazenar o restante da pata em um saco plástico (tipo ziploc) devidamente etiquetado, juntamente

com as outras patas na caixa de isopor com gelo (ou na geladeira).

**10.** Pegar o tendão a ser ensaiado (tendão extensor do dedo) e medir o comprimento total, conforme Figura A.8. OBS.: anotar na folha de cada tendão também (Apêndice D).

Comprimento total do tendão \_\_\_\_\_(cm)



Figura A.8 – Comprimento total do tendão extensor.

**11.** Realizar 4 cortes no tendão, com bisturi, sendo dois cortes de 5mm, um corte de 1mm (DSC) e um corte de 3mm (para liofilização). Lavando cada corte em solução salina. OBS.: a sequência de cortes deve ser a mesma para todos os tendões, permitindo assim que a mesma região dos tendões, de diferentes indivíduos, possa ser comparada.

**12.** Colocar a amostra que será analisada em microscopia de luz em cassetes histológicos (Figura A.9a) devidamente identificados.

Exemplo de nomenclatura para o tendão extensor da primeira pata: S1TE (S1 - 1º animal, TE – tendão extensor).

**13.** Colocar o cassete histológico dentro do recipiente de vidro contendo o fixador apropriado para microscopia de luz (formalina 10% em tampão fosfato). O cassete deve estar identificado (escrito a lápis), assim como uma etiqueta dentro do cassete deve ser colocada (papel branco escrito a lápis). Registrar data e hora, inclusive na etiqueta do frasco.

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Exemplo de nomenclatura para o recipiente contendo o corte do tendão extensor para microscopia de luz: S1TE (S1 - 1º animal, TE – tendão extensor).

**14.** Colocar as amostras que serão analisadas em microscopia eletrônica de varredura no recipiente de vidro, contendo o fixador apropriado (glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato),



devidamente identificado. Registrar data e hora, inclusive na etiqueta do frasco. OBS.: a amostra será cortada em dois pedaços após a fixação para visualizar longitudinalmente a estrutura interna do tendão.

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Exemplo de nomenclatura para o recipiente contendo os cortes do tendão extensor para microscopia eletrônica de varredura: S1TE (S1 - 1º animal, TE – tendão extensor).

**15.** Colocar as amostras que serão analisadas no liofilizador em eppendorfs (Figura A.9b) devidamente etiquetados. Esses eppendorfs serão mantidos resfriados até o momento da pesagem, que ocorrerá após os ensaios mecânicos.



(a) Cassetes histológicos



(b) Eppendorfs

Figura A.9 – Recipientes

**16.** Colocar as amostras que serão analisadas no DSC em eppendorfs devidamente etiquetados. Esses eppendorfs serão mantidos resfriados até o momento da pesagem, que ocorrerá após os ensaios mecânicos.

**17.** O processamento das amostras, para as análises histológicas, segue o protocolo disponível no apêndice B (protocolo para microscopia de luz) e no apêndice C (protocolo para microscopia eletrônica de varredura). A liofilização e o DSC seguem a metodologia explicada ao longo do texto, no Apêndice D encontram-se alguns detalhes.

### **ETAPA III – Ensaio Mecânico – Preparação das amostras:**

**1.** Medir e registrar o comprimento do tendão. Considerar somente o comprimento do tendão que será analisado no ensaio mecânico (comprimento que sobrou do tendão após fazer a separação para as análises histológicas).

Comprimento tendão (mm): \_\_\_\_\_

2. Prender a extremidade da amostra marcada com toner utilizando uma linha fina de aproximadamente 30cm, sendo que a amostra deve ficar centralizada em relação a linha (Figura A.10). Desta forma a amostra poderá ficar suspensa somente através da linha, o que ajuda a centralizar a amostra nas garras.

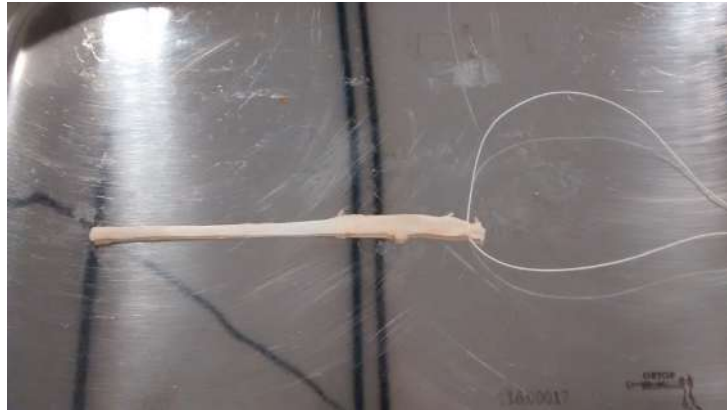


Figura A.10 – Amostra presa por linha.

3. Elevar a amostra através das extremidades da linha. Fixar o tendão nas garras termoeletricas<sup>11</sup> (Figura A.11). Respeitar a distância mínima entre garras e a distância mínima da amostra dentro da garra<sup>12</sup>. Foi estipulada uma distância entre garras fixa de 35mm.

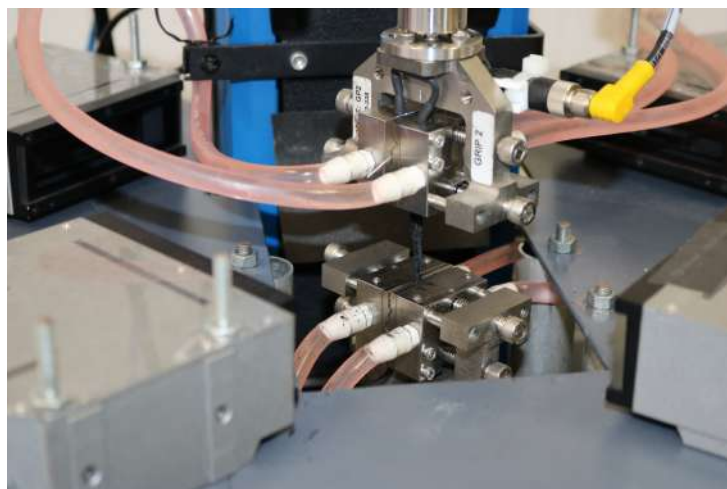


Figura A.11 – Garras termoeletricas

(11) As amostras devem ser “apertadas” levemente, ou seja, até que as faces da garra tenham um contato firme

com a espécime. Segundo o manual das garras o aperto final (mais forte) deve ser realizado após a amostra congelar. Deixar o máximo possível de amostra nas garras para evitar escorregamento (até o segundo dente). Entre um ensaio e outro é necessário secar as garras, devido a condensação de água.

(12) O comprimento mínimo da amostra deve ser de 25mm (segundo o manual das garras), sendo que o comprimento mínimo da amostra dentro de cada garra é de 10mm, portanto o comprimento útil seria de 15mm. Para que se possa ter um comprimento útil maior foi estipulado um comprimento mínimo de 35mm (com este valor a garra superior não causa interferência nos micrômetros).

6. Conferir se a temperatura do chiller (Figura A.12) chegou em  $7,5^{\circ}\text{C}$  e se o fluxo está em 1600ml/min (Figura A.12) e ligar a fonte (da garra termoelétrica) para dar início ao congelamento das extremidades do tecido. OBS.: A fonte deve estar em 10V e 6,6A e segundo o protocolo para o presente estudo deve-se esperar 3 minutos para que a garra congele as extremidades do tendão.



Figura A.12 – Chiller e medidor de fluxo

7. Realizar o aperto final das garras (mais forte) após a amostra estar com as extremidades congeladas.

8. Começar o ensaio.

#### **ETAPA IV - Ensaio Mecânico – Procedimento para realização do teste:**

1. Utilizar célula de carga de 500N (50kg).
2. Realizar uma pré-carga de 0,5N, verificando os valores dos diâmetros. A velocidade para a pré-carga será de 0,1%/s.
3. Ainda durante a pré-carga, realizar a medição da temperatura (através de um pirômetro

infravermelho laser) da amostra na região central do tendão, sendo esta a mesma para os lares.

4. Após a pré-carga, iniciar o ensaio de medição dos micrômetros.
5. Realizar 10 ciclos de pré-condicionamento, com amplitude de 0,1N até 10N, utilizando a mesma velocidade da pré-carga.
6. Realizar a sincronização (causar uma interferência na medição do diâmetro e na medição da máquina ao mesmo tempo) das medições do ensaio mecânico no último ciclo do pré-condicionamento, não perturbando a curva monotônica.
7. Após o pré-condicionamento, realizar o ensaio quase-estático aplicando carregamento por controle de deslocamento com velocidade de 0,1%/s, até o rompimento da amostra. A velocidade será a mesma para todas as amostras, já que a distância entre garras foi fixada em 35mm.

#### **ETAPA IV – Tendões flexores**

Repetir as etapas II (a partir do item 10), III e IV para os tendões flexores.

#### **Considerações Finais:**

- O total de patas ficou definido em doze;

**APÊNDICE B** – Protocolo Microscopia de Luz e Luz Polarizada

1. Limpar as amostras em solução salina e colocá-las em cassetes devidamente etiquetados. Obs.: não comprimir o material a ser fixado com pinça ou qualquer outro instrumental, pois a força imprimida pode causar distorção da estrutura tecidual.
2. Transferir os cassetes contendo as amostras para o recipiente com formalina 10% em tampão fosfato de sódio 0,1M, fixando as amostras – 24h.
3. Lavar as amostras em tampão fosfato de sódio 0,1M (3x) – 30 min cada.
4. Lavar as amostras em água destilada (1x) – 1hr, antes de iniciar a desidratação.
5. Desidratar as amostras em álcool etílico 70% (3x – 10 min), 95% (1x – 20 min) e 100% (1x – 20 min e 1x – 30 min). OBS.: se for necessário parar o processamento, deixar em álcool 70%, por alguns dias no máximo.
6. Diafanizar as amostras em xilol I (puro) (1x – 1 h) e xilol II (puro) (1x – 30 min).
7. Incluir as amostras em parafina I (1x), parafina II (1x), parafina III (1x) –1 hora cada. OBS.: o tempo na parafina III geralmente é maior, ficando até o dia seguinte.
8. Realizar um corte ao longo do tendão (corte longitudinal) na parte central do tecido, expondo a parte interna o tendão. OBS.: utilizar uma lâmina de bisturi (nova) ou navalha (nova) para o corte.
9. Emblocar as amostras, ou seja, colocar parafina no molde de metal e então posicionar a amostra de acordo com o corte que se pretende realizar. OBS.: pretende-se visualizar a parte interna do tendão partindo-se do meio.
10. Esperar o endurecimento dos blocos de parafina – 24-48 horas.
11. Realizar os cortes com espessura de  $2\mu$  (HE e orceína) e  $5\mu$  (picrossirius red) utilizando o micrótomo.
12. Pegar a fita e colocar em água aquecida a aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ .
13. Pegar o corte desejado com a lâmina. OBS.: etiquetar as lâminas antes de pegar o corte, conforme nomenclatura já utilizada.
14. Colocar as lâminas em estufa com temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , por 24h.
15. Realizar a coloração das lâminas. Cada coloração possui o próprio protocolo a ser seguido. As colorações pretendidas são: picrossirius red, orceína, hematoxilina e eosina (HE).

16. Montagem da lâmina com lamínula.

## APÊNDICE C – Protocolo Microscopia Eletrônica de Varredura

1. Limpar as amostras em solução salina e colocá-las em vidros devidamente identificado.
2. Adicionar cerca de 2ml de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, fixando as amostras – 24h.
3. Cortar a amostra para visualização da estrutura interna (com uma lâmina de bisturi nova).
4. Lavar as amostras em tampão fosfato de sódio 0,1M (3x) – 10 min cada.
5. Pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub> a 1%) em tampão fosfato de sódio 0,1M, duração de 2 horas em temperatura ambiente.
6. Lavar as amostras em tampão fosfato de sódio 0,1M ou em água destilada (3x) – 10 min cada.
7. Desidratar o tecido em álcool 70% (2x – 10 min), 95% (1x – 10 min) e 100% (1x – 20 min e 1x – 30 min).
8. Transferir as amostras para a câmara de ponto crítico, realizando a secagem de cada amostra.
9. Montar a amostra em “stub” apropriado com a utilização de cola condutiva de prata e aplicar o revestimento metálico.

## APÊNDICE D – Medidas para Cada Tendão

<b>DATA:</b>	
<b>DADOS DO SUINO</b> - SEXO: _____ PESO: _____ HR ABATE: _____	
SUINO: _____ TENDÃO: _____	
<b>MEDIDAS DO TENDÃO</b>	
<b>Horária de dissecação:</b>	Início: _____ Fim: _____
Altura total da pata (ponta do dedo até região do corte)	Altura (mm): _____
Distância entre a incisão no tendão e a ponta do dedo	Distância (mm): ( ) 60mm - extensor ( ) 20mm - flexor
Comprimento total do tendão	distância (mm): _____
Comprimento dos cortes para microscopia de luz, microscopia eletrônica e liofilização	Liofilização (mm): _____ ±3mm
	DSC (mm): _____ ±1mm
	M. de Luz (mm): _____ ±5mm
	M. Eletrônica (mm): _____ ±5mm
Comprimento do tendão após os cortes	Comprimento (mm): _____ obs: mínimo 55mm
Diâmetro dos lasers na pré-carga:	Medida aparelho laser1 (mm): _____
	Medida aparelho laser2 (mm): _____
Temperatura amostra início do ensaio	Temperatura superior (°C): _____
	Temperatura central (°C): _____
	Temperatura inferior (°C): _____
Temperatura amostra final do ensaio	Temperatura superior (°C): _____
	Temperatura central (°C): _____
	Temperatura inferior (°C): _____

<b>Liofilização</b>	
Pesos da amostra para liofilização (LEBm) e horário que o eppendorf foi para o freezer (-22°C)	Peso eppendorf (mg): _____
	Peso tendão (mg): _____
	Peso eppendorf + tendão (mg): _____
	Horário: _____ foi p/ o congelador

<b>DSC</b>	
Pesos da amostra para DSC e horário que o eppendorf foi para a geladeira (4°C)	Peso eppendorf (mg) - LEBm: _____
	Peso tendão (mg) - LEBm: _____
	Peso eppendorf + tendão (mg) - LEBm: _____
	Horário: _____ foi p/ o geladeira



Continuação protocolo DSC	
<b>DATA:</b>	
Horário de início	Horário:
Peso do tendão antes do banho em solução salina	Peso (mg):
Banho em solução fisiológica durante 1 hora (temperatura ambiente)	Horário início:
	Horário fim:
<b>Não esquecer de secar a amostra entre estes passos</b>	
Peso da amostra após o banho	Peso (mg):
Peso da amostra após cortá-la	Peso (mg): <span style="float: right;">entre 6 e 8mg</span>
Pesos da panelinha e tampa utilizados na análise (EQA)	Peso panelinha + tampa (mg):
	Peso panelinha + tampa + tendão (mg):
Análise DSC	Horário início:
	Horário fim:
Peso da amostra + panelinha (logo após análise)	Peso (mg) - EQA:
	Peso (mg) - LEBm:
Peso da amostra + panelinha (antes de ir para a estufa)	Peso (mg) - LEBm:
Estufa por 24horas (110°C) OBS: a panelinha tem que estar perfurada	Horário início: <span style="float: right;">Data:</span>
	Horário fim: <span style="float: right;">Data:</span>
Peso da amostra + panelinha (após estufa)	Peso (mg) - LEBm:

Continuação protocolo Liofilizador	
<b>DATA:</b>	
<b>Se descongelar no caminho colocar no congelador por algumas horas</b>	
Liofilizador por 24hrs OBS: eppendorf com parafilm perfurado	Horário início:
	Horário fim:
Peso do tendão após ir para o liofilizador (LEBm)	Peso eppendorf (mg):
	Peso tendão (mg):
	Peso eppendorf + tendão (mg):

## APÊNDICE E – Modelo Material

No presente apêndice será apresentado um modelo acomodado na estrutura variacional, o qual inclui a contribuição das fibras e é capaz de considerar aspectos individuais do tecido. Maiores detalhes sobre a estrutura variacional podem ser obtidos em Vassoler et al., 2012 e em Muñoz-Rojas, 2016. Este modelo pode ser utilizado para dar continuidade neste trabalho, usando técnicas estatísticas de regressão não linear.

### E.1 Modelos Variacionais para Tecidos Biológicos

Alguns tecidos biológicos são considerados anisotrópicos devido a presença de fibras em sua constituição, é o caso das artérias, dos tendões e dos ligamentos. Estes tecidos geralmente são modelados como compósitos [Holzapfel et al., 2000, Ehret e Itskov, 2009, Vassoler et al., 2012], sendo formados por fibras inseridas em uma matriz isotrópica representada pela substância fundamental.

Através da estrutura variacional, pode-se incluir o comportamento das fibras por meio de uma decomposição aditiva no potencial incremental [Vassoler et al., 2012], ou seja,

$$\Psi = \Psi_{iso} + \Psi_f \quad (\text{E.1})$$

onde  $\Psi_{iso}$  é o potencial incremental isotrópico e  $\Psi_f$  é a contribuição desacoplada das fibras. Neste contexto a energia livre  $W$  também pode ser separada aditivamente em uma contribuição desviadora proveniente da matriz isotrópica  $W_{iso}$ , uma contribuição desviadora proveniente da fibra  $W_f$  e uma contribuição puramente volumétrica  $U$ :

$$W = W_{iso} + W_f + U \quad (\text{E.2})$$

tal que

$$W_{iso} = \varphi + \varphi_N^e \quad (\text{E.3})$$

$$W_f = \varphi_f + \varphi_f^e \quad (\text{E.4})$$

onde  $N$  representa o número de braços de Maxwell. Para representar o comportamento dissipativo, assume-se a existência dos potenciais pseudo-dissipativos  $\psi_N$  e  $\psi_f$ . O modelo

reológico que representa esta decomposição de contribuições, pode ser visualizado na Figura E.1.

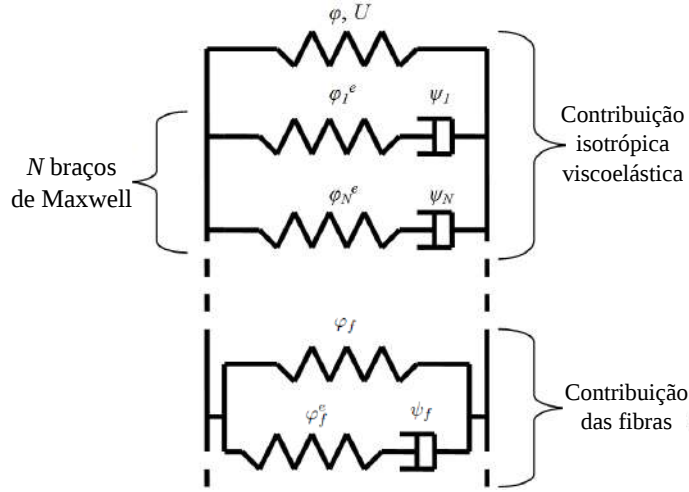


Figura E.1 – Modelo Reológico

Na Figura E.1 a contribuição isotrópica e a contribuição das fibras são conectadas em paralelo, reagindo independentemente uma da outra para a mesma deformação total, onde cada braço do modelo representa uma contribuição aditiva no potencial total.

Os modelos mencionados aqui realizam a decomposição comumente empregada na energia de deformação, ou seja, contribuição volumétrica e isocórica. Por isso o gradiente de deformação  $\mathbf{F}$  é decomposto multiplicativamente em duas partes, uma isocórica

$$\hat{\mathbf{F}} = J^{-\frac{1}{3}} \mathbf{F} \quad (\text{E.5})$$

e outra volumétrica

$$J = \det(\mathbf{F}) \quad (\text{E.6})$$

O tensor isocórico  $\hat{\mathbf{F}}$  é também decomposto multiplicativamente em contribuições elásticas  $\hat{\mathbf{F}}^e$  e inelásticas  $\hat{\mathbf{F}}^i$ , então:

$$\hat{\mathbf{F}} = \hat{\mathbf{F}}^e \hat{\mathbf{F}}^i; \quad \hat{\mathbf{C}} = \hat{\mathbf{F}}^T \hat{\mathbf{F}}; \quad \hat{\mathbf{C}}^e = \hat{\mathbf{F}}^{eT} \hat{\mathbf{F}}^e \quad (\text{E.7})$$

onde  $\hat{\mathbf{C}}$  e  $\hat{\mathbf{C}}^e$  são os tensores de Cauchy-Green isocóricos a direita, total e elástico. Estes tensores podem ser decompostos em termos de quantidade espectral [Fancello et al., 2006], ou seja,

$$\hat{\mathbf{C}} = \sum_{i=1}^3 c_i \mathbf{E}_i; \quad \hat{\mathbf{C}}^e = \sum_{i=1}^3 c_i^e \mathbf{E}_i^e; \quad (\text{E.8})$$

onde  $c_i$  e  $c_i^e$  são autovalores e  $\mathbf{E}_i$  e  $\mathbf{E}_i^e$  são as autoprojeções correspondentes.

A evolução da variável interna  $\hat{\mathbf{F}}^i$  depende do tensor de alongamento viscoso  $\mathbf{D}^v$

$$\mathbf{D}^v = \text{sym} \left( \dot{\hat{\mathbf{F}}}^v \hat{\mathbf{F}}^{v-1} \right) = \sum_{i=1}^3 d_i^v \mathbf{M}_i^v \quad (\text{E.9})$$

sendo  $d_i^v$  e  $\mathbf{M}_i^v$  os autovalores e as autoprojeções de  $\mathbf{D}^v$ . A Equação E.9 representa a decomposição espectral de  $\mathbf{D}^v$

A contribuição de energia da fibra depende da sua orientação, ou seja, depende tanto do tensor de Cauchy-Green a direita  $\hat{\mathbf{C}}$  quanto do tensor estrutural  $\mathbf{A}_f = \mathbf{a}_f \otimes \mathbf{a}_f$ , sendo  $\mathbf{a}_f$  um vetor unitário que define a orientação da fibra na configuração de referência. Através da Figura E.2 a dependência da direção das fibras é exemplificada.

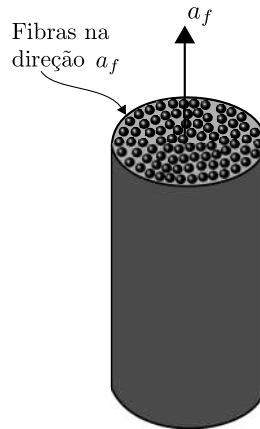


Figura E.2 – Direção das fibras

A dependência da direção das fibras pode ser vinculada com o pseudo-invariante  $I_4$  [Holzapfel, 2000]

$$I_4(\hat{\mathbf{C}}, \mathbf{A}_f) = \mathbf{A}_f : \hat{\mathbf{C}} = \mathbf{a}_f \cdot \hat{\mathbf{C}} \cdot \mathbf{a}_f = \lambda_f^2 \quad (\text{E.10})$$

A vinculação relatada na Equação E.10 permite a obtenção de uma expressão mais simples, ou seja, dependente somente do alongamento da fibra  $\lambda_f$ .

O modelo reológico para o potencial incremental  $\Psi_f$  está representado na Figura E.3, que incorpora um braço elástico e um braço de Maxwell.

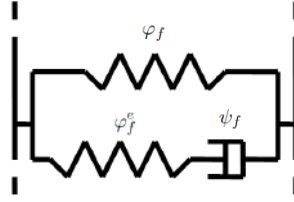


Figura E.3 – Modelo reológico para as fibras

O braço elástico comporta um potencial de energia reversível (não dissipativo), dependendo do alongamento total  $\lambda_f$ , já o braço de Maxwell abriga a decomposição multiplicativa

$$\lambda_f = \lambda_f^e \lambda_f^v \quad (\text{E.11})$$

onde  $\lambda_f^e$  corresponde ao alongamento elástico e  $\lambda_f^v$  representa o alongamento viscoso.

A taxa de deformação viscosa da fibra, pode ser definida como

$$d_f^v = \frac{\dot{\lambda}_f^v}{\lambda_f^v} \quad (\text{E.12})$$

Utilizando o mapeamento exponencial [Weber e Anand, 1990] é possível escrever a evolução incremental do alongamento viscoso, ou seja,

$$\Delta \lambda_f^v = \lambda_{f_{n+1}}^v \lambda_{f_n}^{v-1} = \exp[\Delta t d_f^v] \quad (\text{E.13})$$

Utilizando logaritmo natural, chega-se em

$$d_f^v = \frac{1}{\Delta t} \ln \left( \frac{\lambda_{f_{n+1}}^v}{\lambda_{f_n}^v} \right) \quad (\text{E.14})$$

Assumindo que as variáveis cinemáticas definidas anteriormente possuem dependência da energia livre  $W$ , então,

$$W(\mathbf{F}, \hat{\mathbf{F}}^i, \mathbf{Q}) = W_{iso}(\hat{\mathbf{C}}, \hat{\mathbf{C}}^e) + W_f(\hat{\mathbf{C}}, \mathbf{A}_f) \quad (\text{E.15})$$

tal que

$$W_{iso}(\hat{\mathbf{C}}, \hat{\mathbf{C}}^e) = \varphi(\hat{\mathbf{C}}) + \varphi_N^e(\hat{\mathbf{C}}_N^e) \quad (\text{E.16})$$

$$W_f(\hat{\mathbf{C}}, \mathbf{A}_f) = \varphi_f(\lambda_f) + \varphi_f^e(\lambda_f^e) \quad (\text{E.17})$$

Os potenciais elásticos  $\varphi$  e  $\varphi^e$  são funções da deformação total  $\hat{\mathbf{C}}$  e da deformação elástica  $\hat{\mathbf{C}}_N^e$  do  $N$ -éssimo braço de Maxwell, respectivamente. Assumindo que o comportamento volumétrico, dos modelos materiais, é reversível (elástico), pode-se utilizar a seguinte expressão para a energia de deformação volumétrica  $U$ ,

$$U(J) = \frac{K}{2}(J - 1)^2 \quad (\text{E.18})$$

A Equação E.18 pode ser utilizada para simular incompressibilidade em análises de elementos finitos quando o parâmetro  $K$  é considerado um fator de penalidade ( $K \rightarrow \infty$ ).

Finalmente, o pseudo-potencial dissipativo da parte isotrópica  $\psi_N$  é agora explicitamente dependente da variável interna de taxa  $\mathbf{D}_N^v$  do  $N$ -éssimo braço de Maxwell, isto é,  $\psi_N(\mathbf{D}_N^v)$  e o pseudo-potencial dissipativo da contribuição de fibra  $\psi_f$  é dependente da taxa de deformação viscosa da fibra  $d_f^v$ , isto é,  $\psi(d_f^v)$ .

### E.1.1 Inclusão de Parâmetros Individuais

Para que a sensibilidade parâmetros individuais possa ser incluída dentro da formulação apresentada, os potenciais de energia devem depender destes parâmetros. Existem muitas possibilidades de incorporar esta dependência. Baseando-se na resposta fenomenológica e na estrutura termodinâmica, é coerente assumir que estes atuem sobre os potenciais de energia livre  $W_{iso}$  e/ou  $W_f$ , que estão diretamente associados a energia de deformação desta família de modelos. Visto que os principais componentes estruturais de um tendão são as fibras de colágeno, que por sua vez tem sua contribuição contabilizada pelas energias  $\varphi_f$  e  $\varphi_f^e$ , pode-se assumir que a dependência de um parâmetro individual  $\beta$  possa ser incorporado nesta função.

Neste trabalho propõe-se o uso de um potencial construído da seguinte forma:

$$\varphi_f = g(\beta)\bar{\varphi}_f(\lambda_f); \quad (\text{E.19})$$

tal que este possa utilizar os clássicos modelos hiperelásticos para fibras que são definidos por potenciais do tipo  $\bar{\varphi}_f(\lambda_f)$ , como o potencial de Holzapfel et al., 2000. Neste caso, os parâmetros individuais são tomados como parâmetros externos.

A proposta do uso de uma função  $g$ , que modifica uma relação constitutiva, baseia-se em modelos encontrados em literatura, que usam de funções para incorporar determinadas características na sua resposta fenomenológica. Por exemplo, em Avalle et al., 2007,

é descrita uma formulação de modelo fenomenológico onde as propriedades das espumas, descritas como sólidos celulares, estão diretamente ligadas aos parâmetros externos do modelo, resultando na dependência do modelo em relação a densidade inicial do material. Este traz uma nova formulação e apresenta outros modelos que fazem uso de funções para considerar a dependência de parâmetros (iniciais) do material, como o modelo de Gibson modificado e o modelo de Rush [Avalle et al., 2007]. Ainda neste contexto, pode-se citar as relações constitutivas utilizadas para ativação de músculos esqueléticos, que fazem uso de uma função de ativação que depende do alongamento do músculo (sarcômero). Esta função, que é definida através de parâmetros de material, é a principal responsável por incorporar a resposta do músculo ativado [Ehret et al., 2011].

Assim, por exemplo, pode-se partir de uma função generalizada, dependente dos parâmetros individuais (ou combinações de parâmetros), capaz de representar diversas respostas fenomenológicas:

$$g(\beta) = \mu\beta^\alpha \quad (\text{E.20})$$

onde  $\mu$  e  $\alpha$  são parâmetros de material e  $\beta$  representa os parâmetros individuais do tecido a ser estudado. Assim, tem-se dois parâmetros de materiais para cada parâmetro individual (ou combinação).

Neste caso, seguindo o exemplo de utilização de uma função  $g$  deste tipo, três parâmetros individuais poderiam ser considerados: A (% de colágeno), B (diâmetro das fibrilas) e C (ondulação das fibras). Considerando que na análise estatística todos os parâmetros tem significância estatística, assim como suas combinações (multiplicativas - lineares),  $\beta$  seria representado pelos seus componentes da seguinte forma:

$$\{\beta\} = \left\{ A; B; C; AB; AC; BC; ABC \right\}$$

A função  $g(\beta)$  seria dada então por:

$$g(\beta) = \mu_1 A^{\alpha_1} + \mu_2 B^{\alpha_2} + \mu_3 C^{\alpha_3} + \mu_4 AB^{\alpha_4} + \mu_5 AC^{\alpha_5} + \mu_6 BC^{\alpha_6} + \mu_7 ABC^{\alpha_7} \quad (\text{E.21})$$

Através da Equação E.21 todos os parâmetros e interações considerados relevantes podem ser incluídos. Deve-se destacar que espera-se considerar apenas os parâmetros de maior significância estatística, reduzindo muito o número de parâmetros frente a este

exemplo.

A função  $g(\beta)$  proposta depende de  $\beta$ , o que confere uma maior capacidade de representação do comportamento do tecido.

### E.1.2 Potencial incremental considerando parâmetros individuais

Visto que não há modificação da contribuição isotrópica do modelo, a solução do potencial incremental  $\Psi_{iso}$  remete à solução apresentada em Fanello et al., 2006. Assim, mais detalhes podem ser buscados no trabalho original.

Além disso, a contribuição isotrópica no comportamento mecânico é conhecida por ser muito menor que a contribuição da fibra [Vassoler et al., 2012]. O estudo de Daly e Odland, 1979, relatou que a pele humana pode ser modelada por um modelo elástico e quase linear com um valor de módulo de Young quase 100 vezes menor do que uma borracha macia. Portanto, a contribuição isotrópica pode ser modelada também com valores pequenos e constantes para o material, assim como realizado em Vassoler et al., 2012.

Portanto, o modelo estendido necessita apenas do sistema de equações para solução da contribuição da fibra  $\Psi_f$ . Seguindo argumentos análogos aos utilizados em Fanello et al., 2006, e Vassoler et al., 2012, e utilizando a função  $g(\beta)$  pode-se definir o potencial incremental como

$$\Psi_f = \Delta\varphi_f(\lambda_{f_{n+1}}) + \min_{\lambda_{f_{n+1}}^v} \{ \Delta\varphi_f^e(\lambda_{f_{n+1}}^e(\lambda_{f_{n+1}}^v)) + \Delta t\psi(d(\lambda_{f_{n+1}}^v)) \} \quad (\text{E.22})$$

onde os potenciais elásticos apresentam a dependência dos parâmetros individuais pela função  $g(\beta)$ , tal que

$$\begin{aligned} \varphi_f &= g(\beta)\bar{\varphi}_f(\lambda_f) \\ \varphi_f^e &= g(\beta)\bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e) \end{aligned} \quad (\text{E.23})$$

onde

$$\begin{aligned} \Delta\varphi_f &= g(\beta)\bar{\varphi}_f(\lambda_{f_{n+1}}) - g(\beta)\bar{\varphi}_f(\lambda_{f_n}) \\ \Delta\varphi_f^e &= g(\beta)\bar{\varphi}_f^e(\lambda_{f_{n+1}}^e) - g(\beta)\bar{\varphi}_f^e(\lambda_{f_n}^e) \end{aligned} \quad (\text{E.24})$$

A condição de estacionariedade do problema de extremização apresentado na Equ-



ção E.22, em relação a  $\lambda_{f_{n+1}}^v$ <sup>1</sup>, é dado por

$$\frac{\partial \Psi_f}{\partial \lambda_f^v} = 0 \quad (\text{E.25})$$

$$\frac{\partial \Psi_f}{\partial \lambda_f^v} = \frac{\partial (g(\beta) \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e(\lambda_f^v)))}{\partial \lambda_f^v} + \Delta t \frac{\partial \psi_f(d_f^v(\lambda_f^v))}{\partial \lambda_f^v} = 0 \quad (\text{E.26})$$

Utilizando a regra da cadeia, obtém-se para o primeiro termo:

$$\frac{\partial (g(\beta) \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e(\lambda_f^v)))}{\partial \lambda_f^v} = \frac{\partial g(\beta)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\partial \lambda_f^e}{\partial \lambda_f^v} \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e) + g(\beta) \frac{\partial \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\partial \lambda_f^e}{\partial \lambda_f^v} \quad (\text{E.27})$$

$$= -\frac{\partial g(\beta)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{(\lambda_f^v)^2} \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e) - g(\beta) \frac{\partial \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{(\lambda_f^v)^2} \quad (\text{E.28})$$

O segundo termo da Equação E.26 fica

$$\frac{\partial \psi_f(d_f^v)}{\partial \lambda_f^v} = \frac{\partial \psi_f(d_f^v)}{\partial d_f^v} \frac{\partial d_f^v}{\partial \lambda_f^v} \frac{\partial \lambda_f^v}{\partial \lambda_f^v} = \frac{\partial \psi_f(d_f^v)}{\partial d_f^v} \frac{1}{\lambda_f^v} \frac{1}{\Delta t} \quad (\text{E.29})$$

A condição de estacionariedade resulta então

$$-\frac{\partial g(\beta)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{(\lambda_f^v)^2} \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e) - g(\beta) \frac{\partial \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{(\lambda_f^v)^2} + \Delta t \frac{\partial \psi_f(d_f^v)}{\partial d_f^v} \frac{1}{\lambda_f^v} \frac{1}{\Delta t} = 0 \quad (\text{E.30})$$

Podendo ser reescrita como

$$-\frac{\partial g(\beta, \lambda_f^e)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{\lambda_f^v} \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e) - g(\beta, \lambda_f^e) \frac{\partial \bar{\varphi}_f^e(\lambda_f^e)}{\partial \lambda_f^e} \frac{\lambda_f}{\lambda_f^v} + \frac{\partial \psi_f(d_f^v)}{\partial d_f^v} = 0 \quad (\text{E.31})$$

A Equação E.31 pode ser resolvida através do método de Newton-Raphson, encontrando-se o valor da variável interna  $\lambda_{f_{n+1}}^v$ . Com este valor é possível avaliar  $\lambda_{f_{n+1}}^e$  e consequentemente calcular a contribuição de tensão da fibra, tensor tensão de Piola-Kirchhoff, segundo:

$$\mathbf{P}_{n+1} = 2\mathbf{F}_{n+1} \frac{\partial \Psi_f(\mathbf{C}_{n+1}; \xi_n)}{\partial \mathbf{C}_{n+1}} \quad (\text{E.32})$$

---

<sup>1</sup>Será omitido o subscript  $n+1$  nas operações matemáticas de minimização, porém todas as grandezas são avaliadas no tempo  $n+1$

$$\mathbf{P}_{n+1} = \mathbf{F}_{n+1} \left\{ J_{n+1}^{-\frac{2}{3}} \text{DEV} \left[ 2 \left( \frac{\partial \varphi_f^e}{\partial \hat{\mathbf{C}}_{n+1}} + \frac{\partial \varphi_f}{\partial \hat{\mathbf{C}}_{n+1}} \right) \right] \right\} \quad (\text{E.33})$$

onde

$$\frac{\partial \varphi_f^e}{\partial \hat{\mathbf{C}}_{n+1}} = \frac{\partial \varphi_f^e}{\partial \lambda_{f_{n+1}}^e} \frac{1}{\lambda_{f_{n+1}}^v} \frac{1}{2\lambda_{f_{n+1}}} \mathbf{A}_f \quad (\text{E.34})$$

$$\frac{\partial \varphi_f}{\partial \hat{\mathbf{C}}_{n+1}} = \frac{\partial \varphi_f}{\partial \lambda_{f_{n+1}}} \frac{1}{2\lambda_{f_{n+1}}} \mathbf{A}_f \quad (\text{E.35})$$

A expressão para a matriz tangente (módulo tangente), útil na implementação do modelo em métodos numéricos, é similar aos métodos usados em hiperelasticidade e pode ser obtida de forma analítica, conforme apresentado em Muñoz-Rojas, 2016.

Como pôde ser observado, a formulação empregada contempla a contribuição viscosa. Para considerar o material hiperelástico apenas são necessárias simplificações, ou seja, a parte viscosa vai deixar de atuar. Desta maneira optou-se por deixar a formulação mais genérica e abrangente.

### E.1.3 Potenciais

Através da decomposição espectral utilizada na representação dos tensores, a formulação aqui empregada permite o uso de expressões clássicas comumente utilizadas em modelos hiperelásticos. Citam-se os seguintes modelos:

#### Modelo de Hencky

$$\psi_f(d_f^v) = \eta^v \sum_{j=1}^3 (\epsilon_j) \quad (\text{E.36})$$

#### Modelo de Ogden

$$\psi_f(d_f^v) = \sum_{j=1}^3 \sum_{p=1}^N \frac{\mu_p}{\alpha_p} ([\exp(\epsilon_j)]^{\alpha_p} - 1) \quad (\text{E.37})$$

#### Modelo de Holzapfel

$$\varphi^e(\lambda_f^e) = \frac{k_1}{2k_2} \{ \exp[k_2 (J^{-\frac{2}{3}}(\lambda_f^e) - 1)^2] - 1 \} \quad (\text{E.38})$$

### E.1.4 Restrições das fibras

A presença de fibra tem a característica de ser nula para deformações compressivas (ver Fig. E.4). Assim, os potenciais são definidos tal que

$$\varphi_f^e = \begin{cases} \frac{k_1}{2k_2} \{ \exp[k_2 (J^{-\frac{2}{3}}(\lambda_f^e) - 1)^2] - 1 \} & \lambda_f > 0 \\ 0 & \lambda_f \leq 0 \end{cases} \quad (\text{E.39})$$

$$\psi_f(d_f^v) = \begin{cases} \bar{\psi}_f(d_f^v) & d_f^v \geq 0 \\ 0 & d_f^v < 0 \end{cases} \quad (\text{E.40})$$

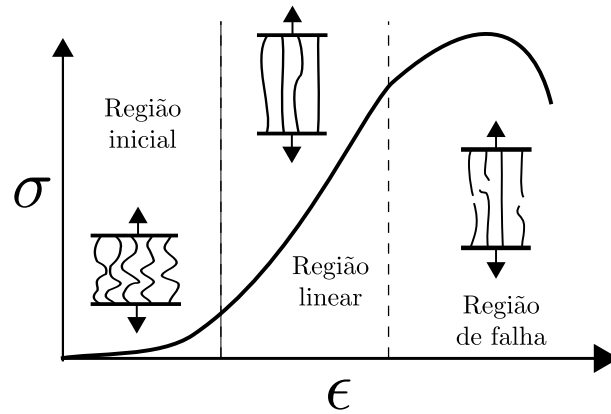


Figura E.4 – Direção das fibras [adaptado de Frank et al., 1985]