

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DO
PERICÁRDIO BOVINO CONSERVADO EM DIFERENTES
MEIOS**

Antonio Fernando Bariani Junior

Medico Veterinário

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DO
PERICÁRDIO BOVINO CONSERVADO EM DIFERENTES
MEIOS**

Antonio Fernando Bariani Junior

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

B252a

Bariani, Antonio Fernando Junior

Avaliação tensiométrica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em diferentes meios / Antonio Fernando Junior Bariani. -- Jaboticabal, 2021

55 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Fabrício Singaretti Oliveira

1. Cirurgia veterinária. 2. Membranas (Biologia). 3. Pericárdio. 4. Alcoóis. 5. Microbiologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

Câmpuri de Jaboticabal



TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO TENSIONMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DO PERICÁRDIO BOVINO CONSERVADO EM DIFERENTES MEIOS

ORIENTADOR: FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

[Signature]

1980

Ref: 6

Q. R. S.

Re: [redacted]

Jaboticabal, 09 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANTONIO FERNANDO BARIANI JUNIOR- filho de Antonio Fernando Bariani e Marisa Eduardo dos Santos Bariani, nascido na cidade de Ribeirão Preto-SP, em 06 de março de 1984, Médico Veterinário formado pelo Centro Universitário Barão de Mauá (CUBM) em Ribeirão Preto, em dezembro de 2009. Realizou o programa de aprimoramento em medicina veterinária na área de clínica médica e cirurgia de Grandes animais do Centro Universitário Barão de Mauá, no período de 2010 a 2012. Possui pós-graduação lato sensu em anestesiologia pelo Instituto Brasileiro de Veterinária (IBVET) no ano de 2012. Trabalhou como Médico Veterinário responsável pelo setor de anestesiologia do hospital veterinário da Fundação Educacional de Ituverava durante o ano de 2012. Iniciou mestrado em 2013 na área de Clínica Médica pela Universidade Estadual Paulista- Campus Jaboticabal, terminando em 2015. Trabalhou como médico veterinário do setor de Clínica médica e Cirúrgica do Centro Universitário Barão de Mauá de 2014 a 2016. Ingressou no quadro de docentes do Centro universitário Barão de Mauá no ano de 2016, ministrando as disciplinas de Técnica Cirúrgica I e II, atuação até o presente momento. Iniciou o doutorado em 2017 no programa de Cirurgia Veterinária sob orientação do Professor Dr. Fabricio Singaretti de Oliveira.

“Há aqueles que lutam um dia; e por isso são muito bons;

Há aqueles que lutam muitos dias; e por isso são muito bons;

Há aqueles que lutam anos; e são melhores ainda

Porém há aqueles que lutam toda a vida; esses são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor, compreensão, apoio e ensinamentos. A minha esposa Amanda (Nanda) que além do amor, companheirismo, sempre apoia as minhas loucuras e jura que vou conseguir terminar, mesmo eu não acreditando que seja possível. Aos meus dois filhos Noah e Anne, descobri que um dia ruim pode ser apagado por um sorriso ao chegar em casa.

AGRADECIMENTOS

Principalmente ao Professor Dr. Fabricio Singaretti Oliveira, quando todas as portas da pós-graduação vinham se fechando a minha frente, em uma conversa desesperada de minha parte, me chamou para sentar em um banco à sombra, perguntou da minha vida o que já tinha feito o porquê trocar de programa de pós-graduação. Mesmo saindo dali somente com uma possibilidade, o senhor já me trouxe calma e esperança. Depois de reabrir as portas da pós-graduação, me acolheu em seu laboratório e me ajudou de todas as formas possíveis. O senhor virou referência para mim, não só como orientador, mas como pessoa.

Ao Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que mesmo sem orientador após passar no doutorado, me incentivou a não desistir e “falou vai atrás de um orientador não perde tempo, se matricula em disciplina”.

Aos amigos Laura Gusman Soares, Andrea Barros Piazzon de Souza Queiroz e Rafael Chiarelo Zero pela amizade, ajuda sempre que precisei.

Ao Walder Oliveira Dias, irmão de espírito que para virar irmão no resto só falta alterar documento e fazer uma transfusão sanguínea. Sempre disposto a me ajudar e incentivar.

A todos meus familiares pelo apoio.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Campus de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida.

À minha sogra, que sempre me ajuda quando é preciso, mesmo que eu não peço. Sabe olhar em meu semblante, quando me encontro esgotado precisando de ajuda, que cuida dos meus filhos de uma forma inexplicável e que me ajudou da sua forma com que eu pudesse escrever esta tese. Sem sua ajuda provavelmente não conseguiria.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO ÉTICA.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Anatomia macro e microscópica do pericárdio.....	16
2.2 Aplicabilidade das membranas.....	17
2.3 Meios de conservação.....	19
2.3.1 Glicerina.....	20
2.3.2 Etilenoglicol.....	21
2.3.3 Propilenoglicol.....	22
2.3.4 Álcool etílico.....	22

2.3.5 Butanol.....	23
2.3.6 Solução salina a 150%.....	23
2.4 Ensaaios Mecânicos	24
2.5 Microbiologia dos meios de conservação.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Primeira fase do projeto.....	26
3.1.1 Pericárdios.....	26
3.1.2 Análise biomecânica.....	29
3.2 Segunda fase do projeto.....	30
3.2.1 Pericárdios em meio de conservação.....	30
3.2.2 Análise microbiológica.....	32
3.2.3 Análises estatísticas e apresentação dos resultados	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Primeira fase.....	35
4.2 Segunda fase.....	36
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



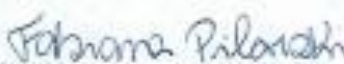
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Diferentes métodos de conservação de pericárdio bovino – Análise biomecânica, microbiológica e histopatológica visando a prática da cirurgia veterinária", protocolo nº 004594/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de maio de 2019.

Vigência do Projeto	20/04/2019 a 01/10/2020
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus albinus</i> variedade Wistar, <i>Bos Taurus</i>
Nº de animais	20 e 96 respectivamente
Peso / Idade	200 – 300 gr, 300 kg
Sexo	Macho
Origem	Biotério Unesp

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7130 www.fcav.unesp.br

AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DO PERICÁRDIO BOVINO CONSERVADO EM DIFERENTES MEIOS

RESUMO - As membranas biológicas são tecidos compostos principalmente de colágeno e utilizadas de forma a servir de arcabouço em cirurgias reparadoras. Dentre os tecidos utilizados para essa finalidade, há o pericárdio, que é basicamente composto por tecido colágeno e uma fina camada de células epiteliais, suportando boa carga de tração em ensaios biomecânicos. O principal meio utilizado para conservação dessas membranas nas últimas décadas foi a glicerina 98%. Este trabalho objetivou analisar, primeiramente, se há diferenças na tração de acordo com o sentido da coleta em pericárdios bovinos, avaliar diferentes meios de conservação, por até 4 meses. Foi padronizado a abertura do pericárdio no sentido do maior eixo do coração (da base para o ápice), depois com a utilização de um molde realizado a coleta dos corpos de prova com 1 cm de largura e 4 cm de comprimento em sentido paralelo e perpendicular, ao corte de padronização. Foram utilizados 20 pericárdios provenientes de bovinos machos ou fêmeas, entre 18 e 32 meses, os pericárdios foram lavados em água corrente realizado a sua limpeza para retirada de gordura e os corpos de prova colocados para ensaio biomecânico de tração. Após a padronização do sentido de coleta perpendicular, foram colocados 14 pericárdios bovinos, utilizando o mesmo sentido de corte padronizado, colocados em caixas contendo os seguintes meios glicerina, propilenoglicol, etilenoglicol, butanol, álcool etílico e solução salina a 150%. Os meios foram avaliados mensalmente para cultura microbiológica e as membranas para ensaios biomecânicos de tração. Foi observado diferença significativa da força máxima de ruptura no sentido de coleta perpendicular ao maior eixo do coração, do que o sentido paralelo. Portanto foi padronizado o sentido de coleta perpendicular para as amostras que foram colocadas nos meios de conservação. Foi observado o aumento de força de ruptura significativamente das membranas conservadas no butanol nos períodos 30, 60 e 120 dias e no etilenoglicol com 30 dias. Já a força de deformação só não foi observada diferença estatística comparando o pericárdio fresco as membranas armazenadas no cloreto de sódio a 150%. Foi observado crescimento microbiológico somente no etilenoglicol e solução salina a 150% no momento 60 dias, nos outros meios não foi observado crescimento microbiológico. Todos os meios se demonstraram viáveis para a conservação do pericárdio bovino, sendo que o butanol e o etilenoglicol proporcionaram maior resistência.

Palavras chaves: Álcool etílico, butanol, cloreto de sódio, etilenoglicol, glicerina, membrana biológica, pericárdio e propilenoglicol

TENSIOMETRIC AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF BOVINE PERICARDIUM CONSERVED IN DIFFERENT MEDIA

ABSTRACT - Biological membranes are tissues composed mainly of collagen and used in order to serve as a framework in reparative surgeries. Among the tissues used for this purpose, there is the pericardium, which is basically composed of collagen tissue and a thin layer of epithelial cells, supporting a good traction load in biomechanical tests. The main means used for the conservation of these membranes in the last decades was glycerin 98%. This work aimed to analyze, first, if there are differences in traction according to the direction of collection in bovine pericardiums, to evaluate different means of conservation, for up to 4 months. The opening of the pericardium in the direction of the largest axis of the heart (from the base to the apex) was standardized, then with the use of a mold, the specimens were collected 1 cm wide and 4 cm long in a parallel and perpendicular direction, to the standardization cut. Twenty pericardiums from male or female animals were used, between 18 and 32 months, the pericardiums were washed in running water, cleaned to remove fat and the specimens were placed for biomechanical traction testing. After standardizing the direction of perpendicular collection, 14 bovine pericardiums were placed, using the same standardized cutting direction, placed in boxes containing the following media: glycerin, propylene glycol, ethylene glycol, butanol, ethyl alcohol and saline solution 150%. The media were evaluated monthly for microbiological culture and the membranes for biomechanical tensile tests. There was a significant difference in the maximum rupture force in the direction of collection perpendicular to the largest axis of the heart, than in the parallel direction. Therefore, the direction of perpendicular collection was standardized for the samples that were placed in the conservation media. It was observed a significant increase in the breaking strength of the membranes conserved in butanol at periods 30, 60 and 120 days and in ethylene glycol at 30 days. However, the deformation force was not observed only when comparing the fresh pericardium with the membranes stored in sodium chloride 150%. Microbiological growth was observed only in ethylene glycol and saline solution 150% at the time of 60 days, in other media no microbiological growth was observed. All means proved to be viable for the conservation of bovine pericardium, but butanol and ethylene glycol provided greater resistance.

Keywords: Ethyl alcohol, butanol, sodium chloride, ethylene glycol, glycerin, biological membrane, pericardium and propylene glycol

LISTA DE ABREVIATURAS

AE.....	Álcool Etílico
BHI.....	Brain Heart Infusion
CEBEA.....	Comissão de Ética e Bem-Estar Animal
COBEA.....	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DR.....	Deformidade de ruptura
EG.....	Etilenoglicol
FMR.....	Força máxima de ruptura
MYP Base.....	manitol-york-polymyxin
N.....	Newtons
NaCl 150%.....	Solução de cloreto de sódio à 150%
PPG.....	Propilenoglicol
SPS.....	Sulfito-polimixina-sulfadiazina
UFC.....	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Média e desvio padrão (DP) da força máxima de ruptura e deformação de ruptura dos sentidos perpendicular e paralelo ao eixo maior do coração de pericárdios bovino a fresco.....	35
Tabela 2 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina 98% nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	37
Tabela 3 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em butanol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	37
Tabela 4 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em propileno glicol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	37
Tabela 5 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em álcool etílico nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	38
Tabela 6 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em etileno glicol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	38
Tabela 7 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em solução de cloreto de potássio (NaCl) 150% nos momentos D-0, D30, D60, D90 e D120.....	38
Tabela 8 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina, butanol, propileno glicol, álcool etílico, etileno glicol e Cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	40
Tabela 9 Média e desvio padrão (DP) da avaliação da deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina, butanol,	

	propileno glicol, álcool etílico, etileno glicol e Cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.....	40
Tabela 10	Análise microbiológica dos meios glicerina, álcool etílico, butanol, propileno glicol, etileno glicol e solução de cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D30, D60, D90 e D120 dias. Coleta do meio feita após coleta do pericárdio.....	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem fotográfica do coração em que a letra A representa o maior eixo do coração utilizado como base para abertura do pericárdio, letra B sentido paralelo de coleta e letra C sentido perpendicular de coleta. (Fonte: Brudas et al., 2009).....	27
Figura 2. Imagem fotográfica do molde utilizado para coleta de fragmento de pericárdio bovino fresco ante do ensaio mecânico. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal,2021.....	27
Figura 3 Imagem fotográfica do pericárdio bovino após o descongelamento e antes da coleta das amostras, paralelas ao maior eixo cardíaco (ápice-base).Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal,2021.....	28
Figura 4. Imagem fotográfica da demonstração da coleta de amostras nos sentidos paralelo (1) e perpendicular (2) ao eixo maior do coração, em pericárdios bovinos frescos. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal.....	28
Figura 5. Imagem fotográfica da máquina universal de ensaios biomecânicos (EMIC® DL 2000) utilizada para o teste de tração das amostras de pericárdio bovino fresco visando a prática da cirurgia veterinária. Equipamento pertencente ao Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal.....	30
Figura 6. Imagem fotográfica dos recipientes de plástico em que foram armazenados os pericárdios bovinos. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal, 2021.....	31

- Figura 7. Imagem fotográfica de um recipiente de armazenamento dos sacos pericárdio em solução de cloreto de sódio 150%. Observa-se compressas cirúrgicas no sobrenadante para garantir a imersão total das amostras. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021..... 32
- Figura 8. Imagem fotográfica ilustrando o processo de avaliação microbiológica dos diferentes meios de preservação utilizados para conservação dos sacos pericárdicos, no momento da diluição dos meios para homogeneização da amostra recolhida, realizando a diluição em até 5 vezes. Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021..... 33
- Figura 9. Imagem fotográfica ilustrando o processo de avaliação microbiológica das amostras de pericárdio bovino conservados em diferentes meios distribuição da diluição em placa de petri com ágar, com o uso de alça de Drigalski. Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021..... 34
- Figura 10 Imagem fotográfica de microscopia do pericárdio bovino a fresco, em corte transversal (A) e paralelo (B) ao maior eixo do coração, em Tricômico de Masson, aumento de 20x. Em cortes transversais, há maior quantidade de fibra colágenas além de estarem mais organizadas em relação aos cortes longitudinais, com duas camadas periféricas de fibroblastos (setas), dispostas paralelamente. Na parte central, as fibras colágenas se dispõem de forma perpendicular às periféricas, com fibroblastos em maior quantidade na região central..... 36
- Figura 11 Imagem fotográfica do momento da ruptura da membrana, fixada em garras com ranhuras durante ensaio mecânico de tração. Observa-se que o ponto que ocorreu a ruptura foi bem próximo dos pontos de fixação. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do

	Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.....	39
Figura 12	Imagem fotográfica de pericárdio submetida ao teste biomecânico. Imagem A: amostra antes do início do teste; imagem B: tração durante o teste; imagem C: após a ruptura. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.....	39
Figura 13	Média da força máxima de ruptura (FMR) e deformidade de ruptura (DR) dos meios: glicerina, butanol, propilenoglicol, etilenoglicol, álcool etílico e cloreto de sódio 150%(NaCl), nos períodos D0, D30, D60, D90 e D120.....	41

1. INTRODUÇÃO

A preocupação em preservar cadáveres humanos existe há mais de 5.000 anos em cadáveres, sendo sua utilização para estudo anatômico como para estudo prático de técnicas cirúrgicas. Para que ocorra de forma efetiva os meios de conservação devem propiciar a conservação e manutenção das características morfológicas das peças o mais semelhante possível ao animal vivo, e também deve propiciar a manutenção da flexibilidade e consistência dos tecidos (Gigek et al., 2009).

Muitos pesquisadores se dedicaram a encontrar materiais com característica adequada para restauração e substituição de tecidos no corpo humano, como no caso dos enxertos e transplantes (Almeida Filho et al., 2007).

Em 1962, se realizou o primeiro transplante de valva cardíaca em humanos feita de pericárdio suíno, posteriormente começou a se utilizar próteses confeccionadas com a utilização de pericárdio bovino (Rosa et al., 2006). Na década de 60 (Pigossi, 1964) empregou a dura mater canina conservada em glicerina em cirurgias reparadoras em cães. Na década de 70, descreveu-se a utilização do pericárdio equino conservado em glicerina para substituição do colédoco em cães (Alvarenga, 1978). O emprego de tais membranas deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade na estocagem, pouca ou nenhuma reação tecidual quando utilizada (Alvarenga, 1992) e de longo período de viabilidade como implante (Brun et al., 2002).

Objetivou-se analisar por meio de ensaio biomecânico de tração a força máxima de ruptura (FMR) em Newtons (N) e a deformação para ruptura (DR) em milímetros (mm) das amostras de pericárdio bovino fresco em dois sentidos de coleta, paralelo ou perpendicular ao maior eixo do coração, para determinar se há alteração da resistência/ elasticidade de acordo com a coleta da amostra. Verificar histologicamente, eventuais diferenças no pericárdio coletados em cada sentido em relação ao maior eixo do coração.

Ainda, analisar a resistência mecânica à tração dos pericárdios conservados em diferentes meios de preservação como à glicerina a 98%, etilenoglicol (EG), álcool etílico (AE), propilenoglicol (PPG), butanol e solução aquosa de cloreto de sódio à 150% (NaCl 150%) durante 4 meses, além da análise microbiológica durante todo o processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O termo biomaterial foi definido de diversas formas por diversos autores ao longo dos anos, podendo ser definido como dispositivo que entra em contato com sistemas biológicos, com aplicações diagnósticas, vacinas, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser de origem sintética ou natural. Também podem ser de origem natural e modificados quimicamente, passando por processo de fabricação como géis ou não, como valvas cardíacas e banco de pele humanas (Sionkowska, 2011; Pires et al., 2015; Costa et al., 2016).

A escolha de um biomaterial é baseada nas suas propriedades físico químicas, nas suas propriedades mecânicas e características biológicas. No entanto, mesmo conhecendo todas estas, fazem-se necessários testes de biocompatibilidade para a verificação e determinação da interação hospedeiro-material implantado, sendo a maioria realizada em roedores (Gasque et al., 2007).

Nos estudos iniciados com bioimplantes por volta da década de 50, buscavam-se materiais que fossem o mais inerte possível. Com o tempo, passou a ser mais focado a bioatividade do material e a regeneração do tecido de forma funcional. Os biomateriais poliméricos são os mais empregados como bioimplantes, constituem-se por macromoléculas que podem ser divididas em repetidas unidades menores, sua obtenção poder ser por reações de polimerização ou de organismos vivos. Portanto, pode se dividir em polímeros sintéticos e polímeros naturais, sendo nos últimos destacam-se os compostos por proteínas como exemplo o colágeno (Sionkowska, 2011; Pires et al., 2015).

As membranas biológicas são tecidos de origem orgânica, constituídos principalmente por colágeno (Oliveira, 2007). O colágeno é uma proteína que possui características importantes na sua utilização como bioimplantes, dentre elas o baixo índice de alergenicidade e a característica não inflamatórias, o que torna a membrana altamente biocompatível (Daamen, et al., 2007)

A maioria dos trabalhos envolvendo membranas biológicas, obtidas de diferentes espécies animais, buscam avaliar a viabilidade destas em diversos procedimentos cirúrgicos, além da viabilidade da membrana por período prolongado de tempo. Sua função principal é fornecer arcabouço para a orientação de tecido cicatricial, mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e a função do órgão afetado (Batista et al., 1996; Mazzanti et al., 2001). Sua utilização em falhas ósseas promove a regeneração guiada; a função principal da membrana é produzir espaço impedindo a migração de células epiteliais e tecido conjuntivo, permitindo a migração/multiplicação de células ósseas para a região (Costa et al., 2016). Na medicina e na odontologia, as membranas de colágeno possuem grande aplicabilidade, principalmente em cirurgias com hemorragia abundante, além de aumentar a qualidade de tecido cicatricial pela capacidade de realizar quimiotaxia de fibroblastos para a região de implante (Romanos et al., 1998).

Devido aos resultados com a utilização das membranas homólogas de pericárdio canino, houve aumento de interesse pelo emprego do pericárdio equino por sua maior espessura e resistência, necessárias para o tratamento de processos patológicos mais extensos. A escolha dessa espécie ocorreu pela necessidade do doador se encontrar hígido e devido à necessidade de eutanásia por traumas que ocorrem de forma frequente nessa espécie (Alvarenga, 1992).

Entre as membranas biológicas mais utilizadas tanto na medicina humana como na medicina veterinária encontra-se o pericárdio bovino, que possui como característica principal, constituição quase que exclusivamente de colágeno (Alvarenga, 1992). Seu emprego como membrana biológica deve-se à sua facilidade de obtenção e pela quantidade de tecido aproveitável, que se mostra adaptável às diversas situações a que é submetida na prática cirúrgica (Bastos et

al., 2005; Stelmann et al., 2010; Vidor et al., 2012). Além do pericárdio, vários outros tecidos passaram a ser utilizados para essa finalidade, como o peritônio, duramater, fáscia lata, centro tendíneo, membrana amniótica e túnica vaginal, que são constituídos por tecido conjuntivo denso não modelado, podendo ser obtidos de diferentes espécies animais (Batista et al., 1996; Barbosa et al., 2012).

Os implantes podem ter origem biológica e serem classificados como autógeno, em que o próprio doador é o receptor, como alógenos/homógenos em que o doador e receptor são da mesma espécie. Também podem ser xenógenos, em que doador e receptor são de espécies diferentes. Os casos de isogênia ocorrem quando doador e receptor possuem antígenos de histocompatibilidade (Alvarenga, 1992; Almeida filho., 2007).

Membranas biológicas bovinas têm sido utilizadas em estudos experimentais tanto como implantes homógenos quanto xenógenos, apresentando resultados satisfatórios. Como exemplo descreve-se o emprego do pericárdio bovino conservado em glicerina como reforço na ráfia do peritônio de um equino no tratamento cirúrgico de eventração (Stelmann et al., 2010) e na confecção de biopróteses valvares humanas, pois resulta em baixa incidência de tromboembolismo na ausência de anticoagulantes, sendo por este motivo a membrana biológica natural mais utilizada para esta finalidade (Pomerantzeff et al., 1997; Costa et al., 2005; Forti et al., 2006).

Com a finalidade de redução da capacidade de rejeição, sugere-se que as membranas devam permanecer preservadas em glicerina por período mínimo de 30 dias (Pigossi, 1964; Pigossi et al., 1971; Daleck et al., 1992; Sartori filho et al., 1997; Costa neto et al., 1999), embora possam ser conservadas por até seis meses ou mais, sem alterar suas características e propriedades (Pigossi, 1967; Vidor et al., 2012), mesmo em períodos de conservação superior a 10 anos (Burn et al., 2002).

Na busca por meios de conservação alternativos que apresentassem características desidratantes, antissépticas e anti-imunogênicas semelhantes ou superiores à glicerina, desenvolveram trabalhos testando a solução de tintura alcoólica de tiomersal 1:1000 (Alvarenga, 1992; Mota et al., 2003), solução de polivinilpirrolidona a 50%, a solução supersaturada de açúcar à 300% (Mazzanti et

al., 2001; Mota et al., 2003), o mel não processado (Gaiga e Schossler, 2003), glutaraldeído 4% (Rabelo et al., 2004), além da solução de NaCl 150% (Brun et al., 2002; Brun et al., 2004), N-dimetilsulfóxido, ácido acético e o EG (Forti et al., 2006).

Membranas biológicas, tanto de origem orgânica como as de origem sintética, são utilizadas na correção de defeitos abdominais, mas sem abordagem da resistência dos materiais (Vulcanis et al., 2009).

Poucos trabalhos comparam a resistência tecidual após os tecidos serem armazenados em meios de conservação. Dentre eles está o que avaliou a resistência do pericárdio, peritônio e centro tendíneo bovino conservados em glicerina 98% por até noventa dias (Guimarães, 2008).

Ensaio de tração em peritônio de suíno, equino, canino e bovino, tanto a fresco como conservado em glicerina 98%, já foram realizados por até 60 dias, sendo que o peritônio bovino foi o que suportou maior carga, não havendo diferença estatística a fresco e após 60 dias conservado (Batista et al., 1996). Quando comparada a resistência à tração do pericárdio de bezerros com o de avestruz, ambos conservados em glicerina, observou-se que não houve diferença estatística entre as espécies. No entanto, as diferenças entre o tamanho dos corpos de prova coletados interferiram nas forças suportadas por cada um, sendo essas proporcionais à área do tecido testado (Páez et al., 2006).

2.1 Anatomia macroscópica e microscópica do pericárdio

O pericárdio é encontrado na cavidade torácica e constitui envoltório de dupla parede para proteção do coração. Ele se diferencia em pericárdio fibroso e seroso. O pericárdio seroso por sua vez é constituído por duas camadas distintas, a lâmina visceral, que está intimamente aderida à superfície externa do coração, sendo denominada como epicárdio, e a lâmina parietal do pericárdio seroso, que é contínua com a lâmina visceral na região da base do coração. Esta última é reforçada pela porção fibrosa do pericárdio, que está associado à pleura

mediastínica denominada nesta região como pleura pericárdica, formando assim o saco pericárdico que envolve e protege o coração (Didio, 1985; Frandson et al., 2005; König e Liebich, 2016).

O pericárdio fibroso é constituído por tecido conjuntivo denso com poucas fibras elásticas. Os feixes de colágeno são paralelos à superfície da membrana e entrecruzam-se em várias direções; profundamente a este encontra-se entremeado a rede de fibras elásticas. Na região que o pericárdio fibroso possui íntimo contato com a pleura mediastinal encontra-se uma camada de tecido conjuntivo sub-seroso contendo tecido adiposo. A lâmina parietal do pericárdio seroso encontra-se internamente ao pericárdio fibroso, sendo constituída por duas camadas, uma de tecido fibrila (conjuntivo elástico) e outra de células mesoteliais (Didio, 1985).

A lâmina parietal do pericárdio seroso associada ao pericárdio fibroso é constituído por fina camada de células epiteliais (mesotélio) repousando sobre tecido conjuntivo denso não modelado com fibras pouco acidófilas dispostas longitudinalmente, bem próximas entre si e núcleos acentuadamente basófilos (Guimarães et al., 2007). Apresenta feixes de fibras de colágeno densamente entrelaçadas (König e Liebich, 2016; Junqueira e Carneiro, 2017), apresentando um arcabouço mais profundo composto por fibras elásticas (Junqueira e Carneiro, 2017).

Os fibroblastos com núcleos alongados e poucos vasos sanguíneos finos estão normalmente presentes na lâmina parietal do pericárdio seroso. A lâmina visceral do pericárdio seroso ou epicárdio, é composta por uma única camada de células mesoteliais e uma fina camada sub-epitelial de colágeno com fibras elásticas (Klein et al., 2013).

2.2 Aplicabilidade das membranas

A perda tecidual é uma das complicações encontradas por cirurgiões, principalmente em tecidos com lesões crônicas, em que estes se apresentam bastante retraídos ou em condições que impeçam a reconstrução anatômica sem

elevado nível de tensão do tecido. Algumas regiões como a parede abdominal, parede torácica, períneo, cavidade oral e diafragma são mais comuns a perda tecidual, sendo mais difícil o reparo cirúrgico. Portanto, se faz necessária a utilização de materiais compatíveis com os organismos para obtenção de uma estrutura que assemelha-se, substitua ou sirva de suporte para que ocorra a cicatrização ou substituição do tecido lesionado por tecido cicatricial do próprio animal (Queiroz et al., 2012).

As membranas servem como arcabouço para orientação cicatricial no tratamento cirúrgico de grandes defeitos anatômicos como aqueles decorrentes de traumatismo, de neoplasias, abscessos e enfermidades que comprometam a função normal de um órgão (Batista et al., 1996; Mazzanti et al., 2001). Devido sua composição por tecido colágeno e elastina, apresenta característica de suportar força, estabilidade e flexibilidade, o que é desejado para a reparação de alguns tecidos (Ferreira et al., 2015)

Os polímeros naturais que compõe a membrana interagem com leucócitos e plaquetas, que se aderem a sua superfície e resulta na regulação de citocinas e consequentemente ao processo inflamatório. Ocorrendo a migração e proliferação de fibroblastos que irão sintetizar os componentes da matriz extracelular, concomitantemente ocorrerá a neovascularização e formação de tecido de granulação e a cicatrização do tecido (Ferreira et al., 2015)

A conservação de tendão calcâneo comum em glicerina 98% com a intensão de implementação desse em cães com diferentes formas de fixação, mostrou-se viável, pois não foi observado histologicamente e clinicamente sinais de rejeição do implante. Foram observados, após 22 dias de implantação, processo inflamatório e neovascularização, caracterizando a reabsorção do implante e substituição por tecido neoformado (Raiser et al., 2001).

Na Medicina Humana as membranas biológicas continuam sendo bastante empregadas na substituição de valvas cardíacas. A vantagem da utilização de membranas biológicas bovinas ou porcinas na troca ou correção valvar em humanos é a menor necessidade da utilização de medicação anticoagulante ao longo da vida do paciente. No entanto, pode ocorrer a degradação do implante pela calcificação o que geralmente torna-se necessário a recuperação, diferentemente

de valvas mecânicas que possuem maior durabilidade, mas existe a necessidade constante da administração de anticoagulantes para que não ocorra tromboembolismos (Rosa et al., 2006).

O principal efeito indesejável que ocorre nessas próteses valvares está relacionado à calcificação ou formação de cristais de hidroxapatita que acontecem em períodos longos; normalmente, esse efeito está associado ao glutaraldeído como meio de conservação, o que salienta a busca por novas técnicas (Forti et al., 2006; Oliveira, 2007).

2.3 Meios de conservação

Como características principais, os meios de preservação utilizados para manter as membranas biológicas devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a decomposição dos tecidos e o crescimento de microrganismos, preservarem ao máximo a integridade celular, manter ou aumentar a integridade mecânica, atuar por um período de tempo prolongado, manter a assepsia do material, possuir fácil manuseio e neutralizar as propriedades antigênicas (Alvarenga, 1992; Mota et al., 2002; Baucia et al., 2006; Oliveira, 2007).

Os métodos de conservação para os diferentes tecidos animais podem ser classificados em duas categorias: os que mantêm a vitalidade celular e os que não mantêm (Leite et al., 1979). Neste último grupo, encontra-se a glicerina a 98%, que atualmente é um dos meios mais utilizados tanto em casos clínicos quanto em estudos experimentais (Daleck et al., 1992; Costa Neto et al., 1999; Ferreira et al., 2015; Cardoso, 2018).

2.3.1 Glicerina

A glicerina é um álcool trídico de fórmula $C_3H_8O_3$, em estado líquido semi-viscoso em temperatura ambiente, leve odor e sabor adocicado, de peso molecular 92,09 μ (Bravos et al., 2000).

A glicerina na contemporaneidade ainda é utilizada como principal meio de conservação de membranas biológicas, devido a vantagem de ser de baixo custo, o armazenamento ocorre em meio ambiente o que dispensa custos com refrigeração e de fácil transporte (Alvarenga, 1992; Batista et al., 1996; Ferreira et al., 2015; Cardoso, 2018).

Uma das principais características observadas na glicerina é o seu efeito antimicrobiano exceto contra esporos, sendo utilizadas para conservação de peles de cadáveres humanos contaminadas com vírus HIV, com eficácia comprovada em concentrações acima de 50% (Marshall et al., 1995; Herson, et al., 2001).

Além da sua utilização como meio de conservação de membranas, devido suas propriedades antissépticas, passou a ser utilizada na conservação de vacinas e instrumentos constituídos de borracha (Mota et al., 2002; Oliveira, 2007). Outra característica observada é o elevado grau de desidratação do tecido, removendo a maior parte da água intracelular, sem alterar a concentração iônica das células, sendo um eficiente protetor de matriz tecidual e também promovendo a diminuição da antigenicidade (Richters et al., 1996; Herson et al., 2001; Raiser et al., 2001).

Com a utilização da glicerina a 98% na conservação de jejuno canino, não foi observado crescimento de nenhum microrganismo, nem diferenças histológicas do material a fresco e conservado por 45 dias (Mota et al., 2003).

A Glicerina possui poder de desidratação bastante elevado, observa-se redução do tamanho da membrana em 17% após o armazenamento, o que é revertido com a reidratação, sugerindo que este agente não reage com a matriz extracelular (Well et al., 2006). Acredita-se que o tamanho reduzido da molécula da glicerina e a permeabilidade da membrana ocorra a impregnação com glicerina. Como em temperatura ambiente a glicerina não forma cristais, essa seja outra

característica de manutenção das células do tecido (Raiser et al., 2001; Oliveira, 2007).

2.3.2 Etilenoglicol

O EG é um álcool diídrico, cuja formula é 1,2-etanodiol, é miscível em água. Devido suas propriedades tóxicas foi eliminada a sua utilização em medicamentos destinados a uso interno (Hatch et al., 1992).

É bastante utilizado como estabilizador para água e óleo em emulsões e possui propriedades emolientes, espessantes e dispersantes. Em cosméticos é empregado como corpo gorduroso (Rowe et al., 2009).

Deve ser armazenado em local fresco e protegidos da luz (Rowe et al., 2009). Também é utilizado associado com outras substâncias com a características anticongelante ou de degelo, isso devido ao seu alto ponto de ebulição (197° célsius) e baixo ponto de congelamento. A toxicidade do EG é incomum, mas quando ocorre pode ter alta morbidade e mortalidade (Gang et al., 2019). A intoxicação afeta principalmente o sistema nervoso central bem similar a intoxicação por etanol, compostos gerados do metabolismo do EG provocam acidose metabólica e a formações de cristais de oxalato de cálcio levam a lesões renais (Uttam, Lowry e Adam, 2019).

O formaldeído, por muito tempo utilizado na preservação de peças provoca mudança de coloração, de força e fragilidade de alguns órgãos. É interessante que, se busque por outros meios que promovam a preservação com menor alteração dos tecidos. Dentre as substâncias estudadas está o EG (Groscurth et al., 2001).

O EG também é muito estudado na composição de meios de preservação e diluição de sêmen em diversas espécies animais, mantendo-se a viabilidade e motilidade espermática (Soares et al., 2002).

2.3.3 Propilenoglicol

O PPG possui a fórmula $C_3H_8O_2$ com peso molecular de 76,09 u. É uma substância que se tornou amplamente utilizada como solvente e conservante em várias formulações farmacêuticas parenterais e não parenterais. Sua função antisséptica se assemelha ao etanol, sendo muito utilizado em cosméticos e na indústria alimentícia como emulsionantes e para aromas (Rowe et al., 2009).

Em temperaturas altas pode tender a oxidação caso não esteja hermeticamente fechado; é higroscópico e deve ser armazenado e protegido de luz em local fresco e seco (Rowe et al., 2009).

O PPG possui razoável ação antibacteriana e antifúngica nas concentrações de entre 40 e 50%. Quando empregados em concentrações mais baixas é utilizado como veículo de outros agentes bacterianos devido sua propriedade umectante. Em concentrações de 60 a 70% é queratolítico, solubilizador e desnaturador de proteínas. Acima de 75% pode sensibilizar ou irritar a pele (Larson et al., 2002).

Devido ao seu metabolismo e excreção é menos tóxico que outros glicóis (Larson et al., 2002). Pode ser considerado fixador e substância que mantém a flexibilidade dos músculos quando adicionado ao formaldeído (Janczyk et al., 2011).

2.3.4 Álcool etílico

O AE é um antisséptico barato, e em concentração superior a 70% é efetivo contra bactérias. Atua através da coagulação das proteínas, inibição de metabólitos essenciais à divisão celular, principalmente aminoácidos e pela solubilização da membrana lipídica, tendo pouca ação efetiva contra esporos e vírus. Concentrações mais baixas do que 70% fazem com que deixe de ter efeito bactericida e passe a ser bacteriostático (Trabuci et al., 1991; Bretas et al., 2006; Silva et al., 2009).

O AE e o formaldeído foram utilizados como meio de conservação de peitos de frangos, visando à avaliação da resistência ao corte. Determinou-se que o álcool promove maior maleabilidade tecidual (Nunes et al., 2011).

O AE foi utilizado como fixador e a solução salina de cloreto de sódio a 30% como conservante de cadáveres de cães para avaliação da viabilidade de treinamento microcirúrgico nas veias femorais, além da qualidade da sutura, além do teste biomecânico de tração nas veias jugulares externas. Demonstrou-se a eficiência do AE e do cloreto de sódio na manutenção da qualidade tecidual para treinamento microcirúrgico (Pelogia et al., 2018).

Na tentativa de se obter um meio eficiente na conservação de peças anatômicas para dissecação, sem a utilização do formaldeído foi avaliado a combinação de solução salina a 23% com etanol como agente antioxidante, além da adição do PPG. Observou-se que a somatória dessas substâncias foi melhor na conservação do tecido para dissecação e também na limitação de proliferação fúngica se comparado ao grupo formaldeído (Janczyk et al., 2011).

2.3.5 Butanol

O butanol é um álcool mais hidrofóbico que o etanol, composto por quatro carbonos e um grupo hidroxila(-OH) possuindo peso de 74,12 g mol, com mesma volatilidade e amplamente utilizado na produção de plastificantes, de tintas e vernizes, cosméticos, fluidos hidráulicos, como extrator na produção de fármacos. Possui viscosidade compatível com a do diesel (Brandão, 2017).

2.3.6 Solução salina a 150%

A solução hipersaturada de sal, na proporção de 150 gramas(g) de sal para 100 mililitro (ml) de água, se mostrou eficiente na conservação de centro tendíneo

de cães coletados de forma não asséptica e com ação antimicrobiana efetiva, devido ao não crescimento de fungos ou bactérias. Apesar da grande variação de tempo de hidratação das membranas podendo este chegar até o período de 24 horas, na hidratação para a implantação no subcutâneo de ratos, o centro tendíneo na solução salina, foram necessários 15 minutos(min). Na implantação em ratos, não foi observado, histologicamente, padrão de reação hiperaguda, mas a substituição da membrana por tecido fibroso se assemelhou ao mesmo tecido conservado em glicerina 98% (Brun et al., 2004).

2.4 Ensaios mecânicos

Os ensaios mecânicos têm por finalidade determinar as propriedades mecânicas de materiais, podendo submeter estas a ensaios de tração, torção, compressão e flexão. Dentre os materiais estudados há os ossos, que são submetidos a ensaios para determinar as forças necessárias para sua ruptura, assim como implantes para realização de osteossíntese (Batista et al., 1996).

Foi realizado ensaio mecânico comparando-se diferentes tecidos a serem utilizados como membranas biológicas acondicionadas em glicerina 98% e a que suportou maior quantidade de força para ruptura foi o pericárdio, comparando-se com centro tendíneo e peritônio de bovinos. A glicerina foi eficiente na manutenção dos tecidos, além de todas as membranas apresentarem aumento dos valores de alongamento (Guimaraes, 2006).

Em trabalho avaliando a túnica albugínea em animais de diferentes idades, conservadas em glicerina a 98%, os autores não observaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparado o sentido da coleta (Queiroz et al., 2007).

Ensaios mecânicos de tração em peritônio de pacas (*Cuniculus Paca*) a fresco ou conservado em glicerina, por período de 30, 60 e 90 dias, demonstraram que os tecidos conservados apresentaram diminuição de sua rigidez e aumento na ductibilidade e tenacidade. Nas amostras com 60 e 90 dias houve aumento

significativo na força máxima aplicada, evidenciando a possibilidade dessa membrana ser viável para testes de implantação (Camargo et al., 2014).

2.5 Microbiologia dos meios de conservação

Caso os meios de conservação apresentem turvação, ou formação de grumos durante a conservação das membranas, deve-se realizar o descarte. O mais indicado seria a coleta do meio em período pré-fixado para a realização microbiológica do meio e caso cresça algum microrganismo no meio de cultura realize-se o seu descarte (Alvarenga, 1992).

A glicerina a 98%, mel, solução saturada de açúcar a 300% e NaCl 150% já foram analisados como meios de conservação de pericárdio bovino por até 60 dias, sem procedimentos de assepsia ou de controle da manipulação durante a coleta e manipulação das membranas. Sendo observado o crescimento de microrganismos somente na solução de açúcar 300% com 60 dias, mostrando assim a importância do controle e verificação microbiológica do meio de conservação (Bariani Junior et al., 2014).

Devido à grande preocupação com a contaminação dos meios, pode ser sugerida a adição de antimicrobianos a esses meios. A adição de cefazolina a 0,5% em solução saturada a 300% de açúcar e em solução de cloreto de sódio a 0,9% congelada foi analisada, por período de 45 dias e não foi observado crescimento de microrganismos (Mota et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho realizado está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal

(CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/ Unesp- Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 004594/19).

3.1 Primeira fase do projeto

3.1.1 Pericárdios

Nesta primeira fase foram usados 20 pericárdios bovinos, obtidos no Frigorífico Martinelli E Lima Ltda., na cidade de Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo, mediante autorização da equipe Veterinária responsável pelo Serviço de Inspeção local, pois estes não possuem valor comercial para açougues e então são descartados durante o abate.

As amostras foram colhidas imediatamente após o abate de bovinos saudáveis, machos ou fêmeas, com no mínimo 18 e máximo de 32 meses de idade.

Após a coleta do material, foi realizada limpeza com água corrente e removido o excesso de sangue e gordura restante nos pericárdios, seguido do congelamento até o uso. As membranas foram transportadas em bolsas térmicas até o Laboratório de Anatomia Animal da UNESP Jaboticabal, São Paulo, localizado a aproximadamente 100 quilômetros(km) de distância, onde foram mantidos congelados em freezer convencional.

Após uma semana de congelamento em aproximadamente -12 graus Celsius (°C), os pericárdios foram descongelados em água corrente e escolhidos os que se apresentavam íntegros, sem lesão aparente.

Com intuito de facilitar a coleta das amostras dos corpos de prova, cada saco pericárdio foi aberto, foi seccionado seguindo o sentido base-ápice do coração, para manutenção do referencial anatômico do maior eixo do coração.

Em cada saco pericárdio foram coletadas oito amostras, quatro perpendiculares e quatro paralelas ao maior eixo do coração, exemplificado na figura 1. Para isto foi utilizado um molde retangular de 1 x 4 centímetros (cm) de

inox, com auxílio de bisturi (Figura 2). As amostras coletadas foram imediatamente colocadas em potes identificados contendo solução de cloreto de sódio 0,9% para evitar o ressecamento até o momento da análise biomecânica, detalhada adiante.

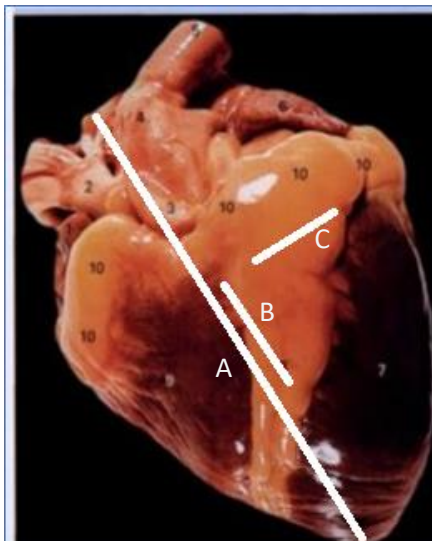


Figura 1. Imagem fotográfica do coração em que a letra A representa o maior eixo do coração utilizado como base para abertura do pericárdio, letra B sentido paralelo de coleta e letra C sentido perpendicular de coleta (Fonte: Brudas et al., 2009).

Foram coletados fragmentos no sentido perpendicular e paralelo do pericárdio e processadas histologicamente conforme descrição a seguir (figura 2, 3 e 4).



Figura 2. Imagem fotográfica do molde utilizado para coleta de fragmento de pericárdio bovino fresco antes do ensaio mecânico. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.



Figura 3. Imagem fotográfica do pericárdio bovino após o descongelamento e antes da coleta das amostras, paralelas ao maior eixo cardíaco (ápice-base). Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.



Figura 4. Imagem fotográfica da demonstração da coleta de amostras nos sentidos paralelo (1) e perpendicular (2) ao eixo maior do coração, em pericárdios bovinos frescos. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

Aqueles fragmentos destinados ao processamento histológico foram fixados em solução de Bouin por 8 horas. Após esse período, foram lavados em álcool 70% para retirada do excesso de fixador. Em seguida os fragmentos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), durante 4

horas. A seguir, realizou-se a diafanização com xilol, por aproximadamente 90 min, e após este procedimento, embebição do material em Histosec® por 90 min, na temperatura entre 60 e 70 °C para procedimento de inclusão.

A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 5 micrometros (μm) com auxílio de navalhas descartáveis. Em seguida foi colocado 2 vezes por 10 min cada em solução de xileno para desparafinar, e realizada passagem por soluções decrescentes de etanol (100 a 50%) por período de 10 min, para ser colocado em Hematoxilina férrica de Weigert. Após, foi lavado em água destilada por 3 min, e colocado em fucsina-escarlata por 5 min. Lavou-se o material com água destilada por 2 min e colocou-se durante 15 min em ácido fosfomolibdico a 5% em água destilada. Adicionou-se em verde luz a 2% por 10 min, realizando-se lavagem posterior por alguns segundos em água destilada, além de passagem por 3 min em ácido acético a 1% em água destilada e uma rápida desidratação em soluções crescente de álcool (80 a 100%) para diafanização em xilol.

3.1.2 Análise biomecânica

Para avaliação da resistência tecidual, foi utilizada uma Máquina Universal de Ensaio EMIC® - modelo DL-2000 (figura 5), presente no Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal. A célula de carga usada foi de 500N, velocidade de aplicação de carga de 100 milímetros/minuto (mm/min) e espaço livre entre as garras de preensão do material de 20 milímetros (mm).



Figura 5. Imagem fotográfica da máquina universal de ensaios biomecânicos (EMIC® DL 2000) utilizada para o teste de tração das amostras de pericárdio bovino fresco visando a prática da cirurgia veterinária. Equipamento pertencente ao Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

3.2 Segunda fase do projeto

3.2.1 Pericárdios em meio de conservação

Após avaliação e comparação da FMR suportada pelas amostras de pericárdio bovino, tanto paralelas quanto perpendiculares, decidiu-se por coletar apenas as amostras perpendiculares, sendo estas o padrão adotado neste experimento.

Foram coletadas amostras de pericárdio provenientes de 36 bovinos com idades entre 18 e 48 meses, mestiços, machos e fêmeas, colhidas no mesmo frigorífico e seguindo a metodologia já descrita.

Os pericárdios foram então divididos e acondicionados em recipientes contendo glicerina a 98%, EG, AE, PPG, butanol e NaCl 150%, as amostras foram

avaliadas quanto à força máxima de ruptura a cada 30 dias até os 120 dias pós-coleta.

Os meios de conservação foram preparados e colocados em recipientes de plásticos (figura 6) com capacidade para 10 litros, previamente lavados e submetidos à antissepsia com hipoclorito de sódio. As amostras foram previamente lavadas com solução salina a 0,9%. Em cada recipiente contendo as soluções conservantes foram introduzidos 14 pericárdios, ficando estes totalmente submersos na solução e colocada uma compressa cirúrgica estéril no sobrenadante com a finalidade de manter os pericárdios cobertos e imersos (figura 7). Ao término da coleta os recipientes foram fechados e abertos a cada 30 dias apenas para realização das coletas, em temperatura ambiente. Portanto foram realizadas coletas do material a fresco (D0), com 30 dias de conservação (D30), com 60 dias de conservação (D60), com 90 dias de conservação (D90) e com 120 dias de conservação (D120).



Figura 6. Imagem fotográfica dos recipientes plásticos em que foram armazenados os pericárdios bovinos. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.



Figura 7. Imagem fotográfica de um recipiente de armazenamento dos sacos pericárdio em solução de cloreto de sódio 150%. Observa-se compressas cirúrgicas no sobrenadante para garantir a imersão total das amostras. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

Os pericárdios foram retirados dos meios de preservação, realizadas coletas de amostras utilizando molde de inox de 4cm de comprimento e 1cm de largura, contornando por lâmina de bisturi nº24. Após a coleta os pericárdios foram recolocados nos meios que foram retirados. As amostras conservadas foram reidratadas em 1 L de solução de cloreto de sódio 0,9% entre 60 e 90 min antes de entrarem na avaliação biomecânica.

3.2.2 Análise microbiológica

A cada coleta de amostras para os testes de tração, foram coletados uma fração do meio (10 ml) para estudo microbiológico, com o objetivo de quantificar bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas viáveis, por meio da técnica de revestimento superficial.

Nessa técnica a amostra foi diluída até 5 vezes (figura 8) e, a partir de cada diluição, foram usados 100 microlitros (μ l) como inóculo e a solução foi distribuída em placas esterilizadas no meio de ágar (figura 9), para contagem tanto de microrganismos aeróbicos, as quais foram armazenadas diretamente em uma incubadora bacteriológica, como a de microrganismos anaeróbicos, em que as

placas foram armazenadas em frascos anaeróbicos usando Anaeroback (Probac), sendo todas incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas por ml usando uma lupa (Vanderzant e Splittstoesser, 1992).



Figura 8. Imagem fotográfica ilustrando o processo de avaliação microbiológica dos diferentes meios de preservação utilizados para conservação dos sacos pericárdicos, no momento da diluição dos meios para homogeneização da amostra recolhida, realizando a diluição em até 5 vezes. Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

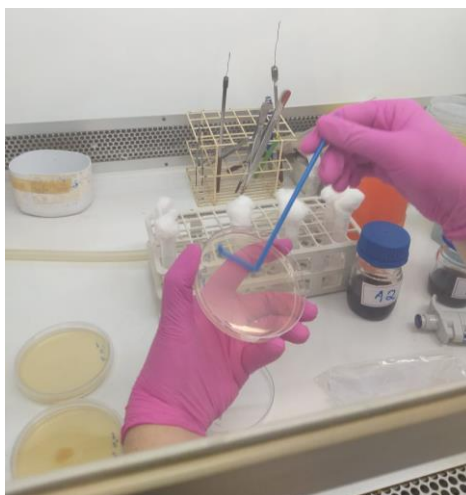


Figura 9. Imagem fotográfica ilustrando o processo de distribuição de 100µl de inóculo em placas de petri com ágar, utilizando alça de Drigalski. Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

Em seguida, cinco colônias isoladas de cada placa foram incubadas à 37°C em ágar Brain Heart Infusion (BHI) durante 24 horas, com diferentes características do meio de cultura, para identificação dos diferentes gêneros de *Clostridium* sp. utilizado o ágar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS). Para identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli* foi utilizado ágar Mac Conkey e para isolamento de *Bacillus* sp. ágar manitol-york-polymyxin (MYP Base).

Todas as culturas foram avaliadas quanto à morfologia celular, presença de esporos, classificação de Gram, para confirmar espécie ou gênero, após 24 horas de incubação a 37°C (Barrow & Feltham 1993).

3.2.3 Análises estatísticas e apresentação dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados por meio de teste de Tukey ($p \leq 0,0001$). Os dados obtidos serão apresentados como valores médios $\pm$ erro padrão (EPM), na forma de tabelas e figuras.

4. RESULTADOS

4.1 Primeira fase

Na avaliação dessas primeiras 180 amostras frescas separadas em 90 em corte perpendicular e 90 em cortes paralelos, foi observada diferença entre as FMR suportadas pelos tecidos. No sentido perpendicular, a média de forças foi de 57,72 N $\pm$ 24,15; já no sentido paralelo, a média de força foi de 44,04N $\pm$ 21,75 (Tabela 1). Portanto foi escolhido o sentido perpendicular como padrão para as coletas dos pericárdios que seriam mantidos em meio de conservação.

Tabela 1- Média e desvio padrão (DP) da força máxima de ruptura e deformação de ruptura dos sentidos perpendicular e paralelo ao maior eixo do coração de pericárdios bovino a fresco.

	Perpendicular		Paralelo	
	Força Max (N)	Deformação de ruptura (mm)	Força Max (N)	Deformação de ruptura (mm)
Média $\pm$ DP	57,71 $\pm$ 24,15	3,70 $\pm$ 1,87	44,04 $\pm$ 21,75	3,19 $\pm$ 1,93

As médias das FMR dos pericárdios em sentido perpendicular se mostraram bem diferentes numericamente (cerca de 30%). Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se distribuição paramétrica para o deslocamento necessário para ruptura, mas não para a força máxima. Pelo teste de Mann-Whitney, houve diferença significativa entre os grupos perpendicular e paralelo ($p= 0,0001$), direcionando as coletas dos pericárdios armazenados no sentido perpendicular ao maior eixo do coração, o sentido de coleta dos pericárdios que foram armazenados nos meios de preservação.

Em cortes transversais, há maior quantidade de fibras colágenas e fibras mais organizadas em relação aos cortes longitudinais, com duas camadas periféricas de fibroblastos, dispostos paralelamente. Na parte central, as fibras colágenas se dispõem de forma perpendicular às periféricas, com fibroblastos em maior quantidade na região central (figura 10).

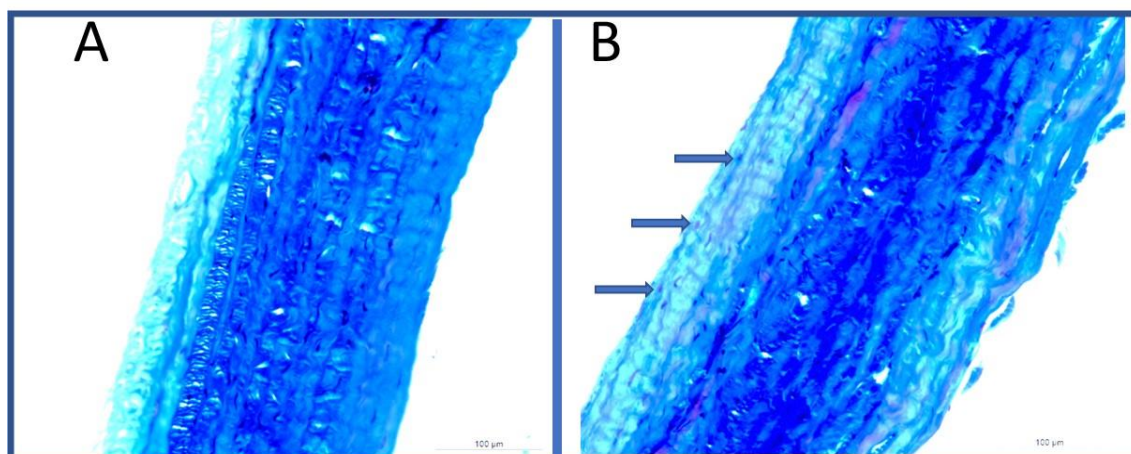


Figura 10. Imagem fotográfica de microscopia do pericárdio bovino a fresco, em corte transversal (A) e paralelo (B) ao maior eixo do coração, em Tricômico de Masson, aumento de 20x. Em cortes transversais, há maior quantidade de fibra colágenas além de estarem mais organizadas em relação aos cortes longitudinais, com duas camadas periféricas de fibroblastos (setas), dispostas paralelamente. Na parte central, as fibras colágenas se dispõem de forma perpendicular às periféricas, com fibroblastos em maior quantidade na região central.

4.2 Segunda fase

Foi observada manipulação mais fácil para a coleta do NaCl 150%, AE, butanol, PPG e EG. Para a manipulação da membrana em butanol, foi necessário a utilização de máscara de proteção respiratória com carvão ativado, minimizando o odor gerado e garantindo a segurança na manipulação. Já os pericárdios que foram armazenados em glicerina apresentaram maior dificuldade na manipulação devido à menor maleabilidade. Nas tabelas de 2 a 8 observa-se os valores encontrados quanto a FMR e DR dos meios de conservação.

Tabela 2- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina 98% nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	52,74±22,70 ^a	54,21±21,17 ^a	56,95±30,32 ^a	56,09±30,57 ^a	61,67±34,92 ^a
Média± DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	5,14±1,58 ^c	6,19±2,07 ^{bc}	6,32±1,71 ^{bc}	8,21±2,05 ^a	7,50±2,36 ^{ab}
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 3- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em butanol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	52,28±23,81 ^b	71,74±25,57 ^a	76,26±19,77 ^a	63,83±32,65 ^{ab}	73,16±25,38 ^a
Média±DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	4,32±1,69 ^c	8,07±2,16 ^b	7,01±1,83 ^b	10,93±2,70 ^a	9,97±2,15 ^a
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 4- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em propilenoglicol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	53,34±17,26 ^a	62,53±31,83 ^a	62,93±24,01 ^a	66,74±26,23 ^a	59,96±21,44 ^a
Média±DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	5,35±2,41 ^c	6,63±1,57 ^b	6,42±2,30 ^{bc}	9,66±2,13 ^a	8,90±1,42 ^a
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 5- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em álcool etílico nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	61,32±20,90 ^a	72,86±28,98 ^a	78,74±23,77 ^a	74,21±20,54 ^a	74,18±34,14 ^a
Média±DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	5,56±1,48 ^b	7,27±1,35 ^a	7,59±3,84 ^{ab}	7,79±3,11 ^a	8,01±1,90 ^a
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 6- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em etilenoglicol nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	50,93±20,99 ^b	65,83±18,78 ^a	64,82±31,19 ^{ab}	55,53±21,66 ^{ab}	62,43±18,30 ^{ab}
Média±DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	4,37±0,94 ^c	7,58±1,16 ^b	7,10±1,10 ^b	8,13±2,20 ^b	9,18±2,28 ^a
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 7- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura e deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em solução de cloreto de sódio (NaCl) 150% nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Dias	D0	D30	D60	D90	D120
Força					
Máxima(N)	66,97±23,87 ^a	66,35±26,96 ^a	62,09±20,02 ^a	66,02±21,30 ^a	58,74±14,438 ^a
Média±DP					
Deformação de					
ruptura (mm)	5,91±1,58 ^a	5,51±1,46 ^a	5,41±1,72 ^a	7,15±3,20 ^a	7,02±2,61 ^a
Média±DP					

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Com relação a FMR, foi observado aumento significativo dos valores no butanol com 30, 60 e 120 dias de armazenamento, e etilenoglicol com 30 dias (tabela 3 e 6).

No entanto, apesar de não ser observada diferença estatística nos outros meios e entre os momentos, foi observada a manutenção da FMR nos tecidos conservados. A maioria dos corpos de prova testados apresentaram ruptura próximo ao centro ou próximo aos pontos de fixação (figura 11 e 12).

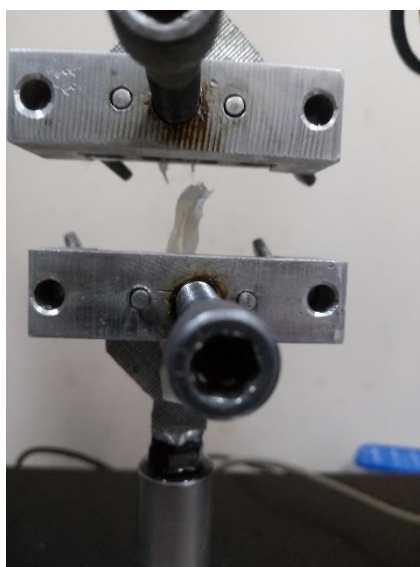


Figura 11. Imagem fotográfica do momento da ruptura da membrana, fixada em garras com ranhuras durante ensaio mecânico de tração. Observa-se que o ponto que ocorreu a ruptura foi bem próximo dos pontos de fixação. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

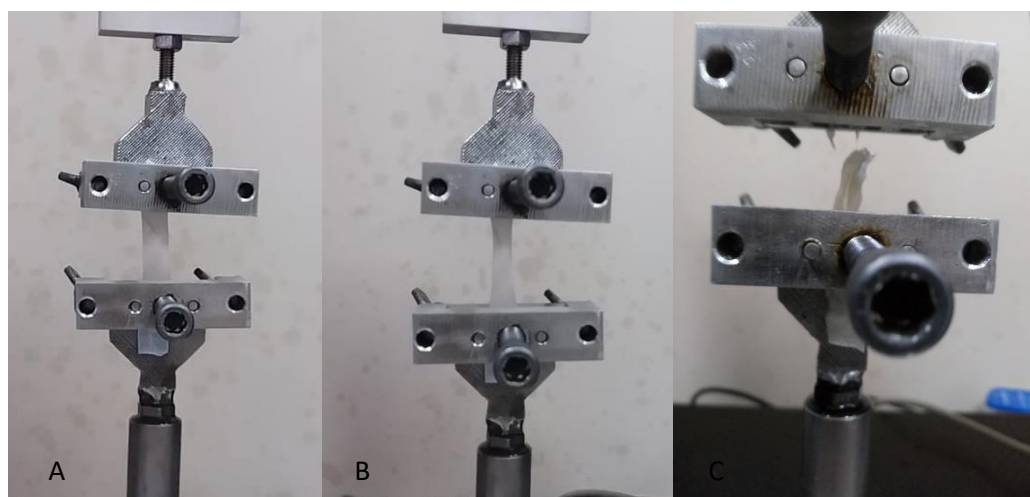


Figura 12. Imagem fotográfica de pericárdio submetida ao teste biomecânico. Imagem A: amostra antes do início do teste; imagem B: tração durante o teste; imagem C: após a ruptura. Fonte: Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, 2021.

Tabela 8- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da força máxima de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina, butanol, propilenoglicol, álcool etílico, etilenoglicol e cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Média ±Desvio Padrão da força máxima de ruptura(N)					
Momento	D0	D30	D60	D90	D120
Glicerina	52,74±22,70 ^a	54,21±21,17 ^a	56,95±30,32 ^a	56,09±30,57 ^a	61,67±34,92 ^a
Butanol	52,28±23,81 ^b	71,74±25,57 ^a	76,26±19,77 ^a	63,83±32,65 ^{ab}	73,16±25,38 ^a
Propilenoglicol	53,34±17,26 ^a	62,53±31,83 ^a	62,93±24,01 ^a	66,74±26,23 ^a	59,96±21,44 ^a
Álcool etílico	61,32±20,90 ^a	72,86±28,98 ^a	78,74±23,77 ^a	74,21±20,54 ^a	74,18±34,14 ^a
Etilenoglicol	50,93±20,99 ^b	65,83±18,78 ^a	64,82±31,19 ^{ab}	55,53±21,66 ^{ab}	62,43±18,30 ^{ab}
Cloreto de sódio 150%	66,97±23,87 ^a	66,35±26,96 ^a	62,09±20,02 ^a	66,02±21,30 ^a	58,74±14,438 ^a

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Foi observado aumento da DR em todos os meios, exceto no NaCl 150%, ou seja, a glicerina, o EG, PPG, AE e butanol, conferiram maior deformação a estes (tabela 9 e figura 13).

Tabela 9- Média e desvio padrão (DP) da avaliação da deformação de ruptura do pericárdio bovino conservado em glicerina, butanol, propilenoglicol, álcool etílico, etilenoglicol e cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D0, D30, D60, D90 e D120.

Média ±Desvio Padrão da deformação de ruptura (em mm)					
Momento	D0	D30	D60	D90	D120
Glicerina	5,14±1,58 ^c	6,19±2,07 ^{bc}	6,32±1,71 ^{bc}	8,21±2,05 ^a	7,50±2,36 ^{ab}
Butanol	4,32±1,69 ^c	8,07±2,16 ^b	7,01±1,83 ^b	10,93±2,70 ^a	9,97±2,15 ^a
Propilenoglicol	5,35±2,41 ^c	6,63±1,57 ^b	6,42±2,30 ^{bc}	9,66±2,13 ^a	8,90±1,42 ^a
Álcool etílico	5,56±1,48 ^b	7,27±1,35 ^a	7,59±3,84 ^{ab}	7,79±3,11 ^a	8,01±1,90 ^a
Etilenoglicol	4,37±0,94 ^c	7,58±1,16 ^b	7,10±1,10 ^b	8,13±2,20 ^b	9,18±2,28 ^a
Cloreto de sódio 150%	5,91±1,58 ^a	5,51±1,46 ^a	5,41±1,72 ^a	7,15±3,20 ^a	7,02±2,61 ^a

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

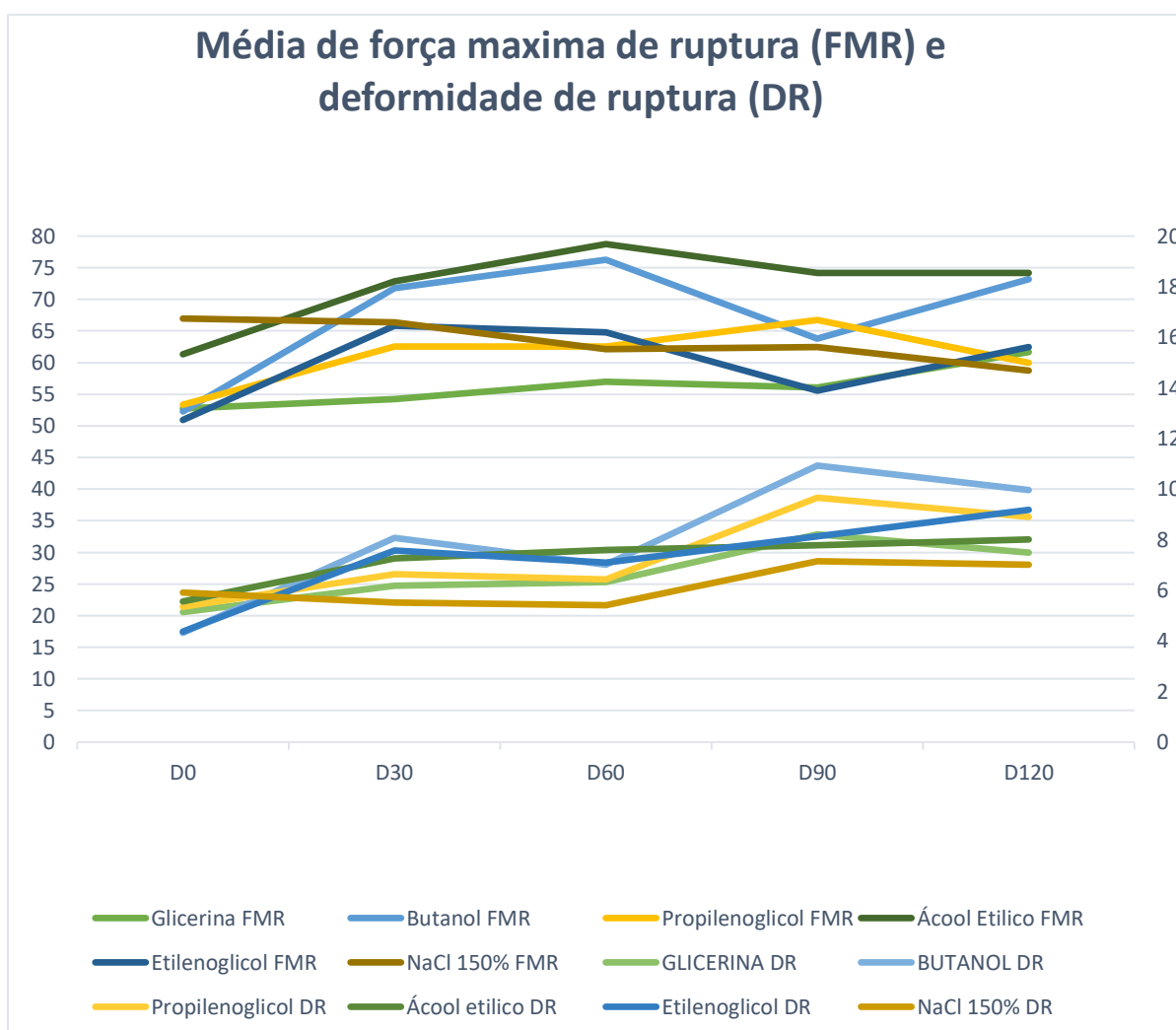


Figura 13. Média da força máxima de ruptura (FMR) e deformidade de ruptura (DR) dos meios: glicerina, butanol, propilenoglicol, etilenoglicol, álcool etílico e cloreto de sódio 150%(NaCl), nos períodos D0, D30, D60, D90 e D120.

Não foi realizada análise microbiológica no dia 0 (amostras controle) pois as membranas possuíam possivelmente, uma microbiota do ambiente ou da manipulação no abatedouro.

A partir dos 30 dias, a análise microbiológica é demonstrada na (tabela 10).

Tabela 10. Análise microbiológica dos meios glicerina, álcool etílico, butanol, propilenoglicol, etilenoglicol e solução de cloreto de sódio a 150% (NaCl 150%) nos momentos D30, D60, D90 e D120 dias. Coleta do meio feita após coleta do pericárdio.

Data coleta	Amostras	Aeróbios totais (UFC/mL)	Anaeróbios totais (UFC/mL)
D30	Álcool etílico	0	0
	Butanol	0	0
	Etilenoglicol	0	0
	Cloreto de sódio 150%	0	0
	Glicerina	0	0
	Propilenoglicol	0	0
D60	Álcool etílico	0	0
	Butanol	0	0
	Cloreto de sódio 150%	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10
	Etilenoglicol	< 1,0 x 10	0
	Glicerina	0	0
	Propilenoglicol	0	0
D90	Álcool etílico	0	0
	Glicerina	0	0
	Cloreto de sódio 150%	0	0
	Butanol	0	0
	Propilenoglicol	0	0
	Etilenoglicol	0	0
D120	Butanol	0	0
	Cloreto de sódio 150%	0	0
	Etanol	0	0
	Etilenoglicol	0	0
	Glicerina	0	0
	Propilenoglicol	0	0

5. DISCUSSÃO

O pericárdio foi coletado pela base cardíaca, liberado-o dos grandes vasos sanguíneos da região (König e Liebich, 2016), desta forma evitando a possível contaminação de tecido dos grandes vasos (Rosa et al., 2006).

Foi realizada padronização do sentido de coleta para comparação biomecânica similarmente ao descrito no avestruz (Paez et al., 2005) no qual o coração foi aberto do ápice para a base. Corantes, como o azul de metileno, também podem ser

utilizados para marcação de fibras e direcionamento da coleta, caso o interesse seja a padronização dessa maneira (Perruzo, 2013).

A túnica albugínea testicular bovina também já foi utilizada (Queiroz et al., 2012) após conservação em glicerina 98%, em dois sentidos de coleta longitudinal ou perpendicular ao testículo, sem diferenças biomecânicas encontradas em teste de tração. Resultado este que difere do presente trabalho em que o sentido perpendicular suporta maior FMR, interferindo nos resultados das membranas consequentemente, pode interferir na implantação dessas membranas como arcabouços devido maior suporte de tensão.

Dentre os meios para conservação de membranas biológicas destacam-se a glicerina (Pigossi, 1964; Guimares, 2006), NaCl 150% (Brun et al., 2004), AE (Nunes et al., 2011). Entretanto, o butanol, EG e PPG são meios ainda não descritos para essa finalidade, embora sejam promissores pois são compostos da família dos álcoois (Medeiros et al., 2010) promovendo a desidratação rápida do tecido e a conservação tecidual (Alvarenga, 1992).

A glicerina, o butanol, o PPG e o AE, utilizados na conservação dos pericárdios por até 120 dias demonstraram ser muito eficientes no controle microbiológico. Dentre os meios que promovem o controle microbiológico, há a glicerina, que se destaca há décadas (Pigossi, 1964) na conservação da dura-máter canina para cirurgias reparadoras.

O EG e a NaCl 150% não se mostraram eficientes no controle microbiológico no momento 60, apenas, inviabilizando o possível transplante das membranas devido à contaminação naquele tempo. Nos demais momentos analisados não foi encontrado contaminante, talvez devido à presença de microrganismos esporulados, sendo necessário teste microbiológico por período pré-determinado (Alvarenga, 1992). Diferentemente, a NaCl 150% (Brun et al., 2004) não apresentou contaminação em centros frênicos caninos armazenadas e transplantados em ratos após 90 dias. Após 60 dias de conservação em solução de açúcar a 300% de pericárdio bovino, também observou-se crescimento microbiano (Bariani Junior et al., 2014)

O glutaraldeído nas concentrações de 0,5 a 0,625% é considerado esterilizante, exceto contra o vírus da Raiva, e também é um conservante que pode

ser utilizado em membranas biológicas (Martins, 2009). Concentrações superiores a 0,625% promovem a esterilização, mas também promovem o aumento da reação inflamatória local, dificultando a incorporação do implante (Costa et al., 2016).

Os pericárdios foram facilmente obtidos e o preparo foi muito simples, com facilidade na estocagem (Alvarenga, 1992) e razoável período de viabilidade visando uma eventual cirurgia (Brun et al., 2002). As amostras puderam ser coletadas com muita facilidade com o molde inox, talvez pela constituição quase que exclusiva de colágeno nesse tipo de material biológico (Alvarenga, 1992). O molde possuiu a função de padronizar as amostras, pois a diferença de largura do material coletado pode influenciar na biomecânica (Paez et al., 2006). A padronização dos corpos de prova biológicos sempre deve e pode ser realizada por equipamentos similares à guilhotina (Guimarães, 2006) ou ainda por cortes à laser, com emprego, inclusive, de corantes específicos para evidênciação de fibras colágenas (Perruzo, 2013).

Amostras de pericárdio já foram coletadas com corpo de prova no formato de ampulheta, com as extremidades mais amplas que o centro, para direcionamento do local de ruptura após tração (Perruzo, 2013), diferentemente do que realizamos nesse trabalho, com amostras retangulares.

Os pericárdios puderam ser mantidos por período maior (120 dias) que o recomendado para perda da capacidade de rejeição visando cirurgias, que é de 30 dias (Pigossi et al., 1971; Daleck et al., 1992; Sartori filho et al., 1997; Costa Neto et al., 1999), e embora não tenham sido conservado por seis meses ou mais (Vidor et al., 2013) nessa pesquisa, percebemos que não houve alteração estatisticamente significativa na resistência das amostras mantidas em glicerina, AE, PPG e NaCl 150%, mediante teste de tração. No entanto, foi observado aumento significativo da FMR no butanol em três momentos avaliados e no EG em apenas um momento, característica desejada e que difere dos resultados encontrados em glicerina (Batista et al., 1996; Guimarães, 2006). Em relação à DR, o único meio conservante em que não foi observado diferença significativa entre a membrana a fresco comparada com a conservada em NaCl 150%, causando menor capacidade de distensão em relação às amostras mantidas em outras soluções. Similarmente (Guimaraes, 2006), não foi observado diferença estatística quanto à

FMR até o período de 90 dias do pericárdio bovino conservado em glicerina e aumento significativo da DR apenas entre 60 e 90 dias.

Talvez pelo fato da glicerina possuir capacidade de desidratação celular muito eficiente (Alvarenga, 1992), com ação antisséptica contra fungos e bactérias (Brun et al., 2002), não tenha sido observada contaminação em nenhuma amostra ao longo dos 120 dias de conservação, mesmo não utilizando ambientes estéreis ou com alto controle sanitário, já que as caixas com as amostras foram mantidas dentro do Laboratório de Anatomia Animal durante todo o processo.

A solução salina a 0,9% foi utilizada para reidratação das membranas por período de 60 min (Raiser et al., 2001; Queiroz et al., 2012), utilizando-se volume de 1 L. Esta também já foi descrita em 3 lavagens do material com apenas 10ml, sendo as duas primeiras por período de 10 min e a última por 30 min (Martins, 2009; Costa et al., 2016). Também foi descrita a hidratação da membrana por única passagem em solução salina 0,9% por 15 min, após conservação em solução salina ou glicerina, e sendo considerada eficiente para transplante posterior em ratos (Brun et al., 2004). Observou-se boa retirada dos conservantes, percebido pelo manuseio, previamente aos testes biomecânicos.

O valor médio para ruptura dos pericárdios frescos ou conservados nos meios variou entre 50-80N, bem abaixo dos 124N descritos também em pericárdios bovinos frescos ou conservados em glicerina (Guimaraes, 2006) ou acima dos 28N já reportados para essas membranas frescas (Costa et al., 2005). Tais diferenças ocorrem, pois, cada teste biomecânico segue um determinado *script*, com velocidade de tração e espaçamento entre garras de preensão diferentes, além do formato e tamanho do corpo de prova.

Os valores também foram inferiores aos 130N necessários para ruptura da pele fresca (Rocha et al., 2018) ou aos 110N a 177N para a pele de cães pesando $7,6 \pm 2,7$ kg mantidos por até 4 meses em tanques de AE (Rocha et al., 2018). Entretanto, foi muito maior que os 19,98N para causar ruptura em veias jugulares externas de cães ou dos 21N a 26N necessários para romper as veias jugulares daqueles cães mantidos em tanques de AE por até 4 meses (Pelógia et al., 2018). Nossos valores também foram mais elevados quando comparados à força para

ruptura em artérias carótidas comuns de cães frescos ($25,77 \pm 15,43\text{N}$) ou mantidos naqueles tanques ($16,44 \pm 31,79\text{N}$).

Testes mecânicos em tela de polipropileno após 7 dias de implante em ratos com peritonite e sem peritonite revelaram valores de 62N (grupo peritonite) e 50N (grupo controle) para a FMR, o que é similar ao encontrado neste estudo para as amostras frescas, em todos os meios testados, com aumento dos valores encontrados no meios butanol e AE superiores à 70N, o que pode sugerir a possibilidade de utilização do pericárdio bovino conservado em qualquer um dos meios avaliados nesse tipo de cirurgia experimental (Barbuto et al., 2014).

A ausência de microrganismos durante a conservação foi muito positiva para a viabilização dessa técnica visando implantes em procedimentos cirúrgicos. Sabe-se que a concentração utilizada para uma bactéria ser capaz de causar doença em um hospedeiro é de 10^9 UFC/mL (Rigobelo et al., 2016). Algumas técnicas anatômicas, como a utilizada em cães preparados quimicamente com AE e conservados em solução de cloreto de sódio a 30%, mesmo utilizando o animal inteiro no processo, também apresentaram ótimos resultados microbiológicos, nunca ultrapassando 9×10^1 UFC/mL nos aeróbios totais e 7×10^1 UFC/mL em anaeróbios totais (Pereira et al., 2019).

Apesar do EG apresentar maior toxicidade entre os meios testados (Hatch et al., 1992), o PPG causar possivelmente reação de sensibilidade da pele proporcionalmente com a concentração (Larson et al., 2002) e o butanol possuir elevada volatilidade (Brandão, 2017), não necessariamente estas irão promover a toxicidade ou reação tecidual ao serem transplantadas. Este fato pode ser corroborado pela utilização de glutaraldeído como meio conservante ou ser utilizado em alguma fase da conservação da membrana (Martins, 2009). O glutaraldeído possui elevada toxicidade apresentando tanto absorção via cutânea ou via respiratória, provocando manifestações cutâneas, síndromes respiratórias, oftálmicas e até neurológicas (Ribeiro et al., 2007).

Pericárdios bovinos conservados em glicerina e em diferentes concentrações de glutaraldeído não causaram alteração macroscópica em rim, fígado e baço em cirurgia de reconstrução da parede abdominal (Martins, 2009). No entanto, pericárdio ovino conservado em glutaraldeído a 1% utilizado na

reparação de bexiga urinária de coelhos causou apenas discreta alteração na função renal dos animais por até 30 dias, indicando um processo agudo e transitório. Ainda, macroscopicamente não foi observado alteração nos tecidos renais, mas destaca-se a necessidade de lavagem/hidratação do tecido a ser implantado tentando-se retirar o máximo possível do meio, além da correta utilização da concentração dos meios conservantes para se evitar toxicidade (Novaes, 2015).

Em pericárdio bovino mantido em NaCl 150% por 60 dias, após hidratação com solução salina 0,9% e posterior análise histológica, se evidenciaram fibras colágenas sem coesão, quando se comparadas ao grupo controle, indicando possível início de autólise (Bariani Junior et al., 2014). No presente trabalho, a NaCl 150% foi o único que não apresentou aumento significativo do DR das membranas, podendo este fator estar ligado com a autólise de parte do tecido elástico e colágeno.

6. CONCLUSÃO

O sentido de coleta no pericárdio bovino interfere diretamente na resistência da amostra.

Todos os meios foram eficientes na conservação da membrana. No entanto, o butanol e o etilenoglicol são bastante promissores como conservantes de pericárdios para fins cirúrgicos.

7. REFERÊNCIAS

Almeida Filho E, Assis CM, Vercik LO, Guastaldi AC (2007). Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-CP modificada por aspersão térmica. **Revista Química Nova**, v. 30 n.5 1229-1232.

Alvarenga J (1992) Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: Daleck, C. R.; Baptista, L. C.; Mukal, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, p. 33-42.

Amendola, GF et al. (2008) Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p.1341-1345.

Barbuto RC, Duval-Araujo I, Barral SM, Rocha RG, Bechara CS, Barbosa AJA (2014). Uso de telas inorgânicas em feridas abdominais de ratos com peritonite induzida. **ABCD Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestivo**, v. 27, p. 26-29.

Bariani Junior AF, Lopes, GC, Crisci, AR, Ferracini Junior R, Guimarães CSO, Guimarães GC, (2014) Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em glicerina, açúcar, mel ou sal. **Veterinária Notícia**, v.20 n.2 p.15-24.

Bastos ELS, et al. (2005) Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 256-260.

Batista LC. et al. (1996) Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 305-312.

Baucia JA, LeaL Neto RM, Rogero JR, Nascimento N (2006) Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. **Journal Brazilian Cardiovasc Surgery** v.21, n.2, p.180-187.

Brandão LFP (2017) **Estudo do 1-butanol e 2-Metl-1-propanol em misturas com a gasolina e o diesel: uma análise sob a perspectiva da especificação brasileira**. 157 f. Dissertação de doutorado Universidade de Brasília.

Bravo D, Rigley TH; Gibran N, Strong DM, Newman-gage H (2000) Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. **Burns** v26, p.367-378.

Bretas Viana FA, Oliveira J, Palhares MS, BORGES KDA (2006) **Fundamentos de terapêutica veterinária**, Belo Horizonte. p. 65-69.

Brun MV et al. (2002) Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1019-1025.

Burn MV et al. (2004) Solução hipersaturada de sal ou de glicerina como conservante de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.147-153.

Burn MV et al. (2002) Traqueoplastia em cães com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p. 133-142.

Camargo AD, Camargo PC, Leal LM, Filho SPG, Martins LL, Shimano AC, Machado MRF (2014) Propriedades morfológicas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*) a fresco e conservado em glicerina 98%. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.34, n.2, p185-191.

Cardoso LD (2018) **Avaliação histológica de cartilagens elásticas submetidas a diferentes processos de conservação e tratamento alcalino**. 65 f. Dissertação Mestrado em Biociência Animal- Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí.

Costa Neto JM et al. (1999) Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 697-703.

Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goissis G, Stolf NAG (2005) Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de bioproteses valvares cardíacas. **Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular**. v.20 n.1, p.14-22.

Costa CB, Silva MFA, Andrade GB (2016) Aspectos patológicos do implante de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído e pela glicerina em parede abdominal de camundongos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44, p. 1-7.

Costa JBZ, Silva F, Dultra CA, Souza LF, Santos MCNE (2016) O uso de membranas biológicas para regeneração óssea guiada em implantodontia. **Revista Bahiana de Odontologia**. V.7, n.1, p.14-21.

Daamen WF, Veerkamp JH. Van Hest JCM, Kuppevelt TH, (2007) Elastin as a biomaterial for tissue engineering. **Biomaterials**. v.28, p. 4378-4398.

Daleck CR et al. (1988) Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 53-61.

Daleck CR et al. (1992) Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-183.

Didio LJA (1985) Anatomia aplicada do pericárdio humano **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.44, n.6 p373-376.

Ferreira DK et al. (2015) Métodos de conservação, obtenção e avaliação de implantes cartilaginosos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia**, v.11, n22, p. 2214-2234.

Filho EVM et al. (2011) Mecânica e microbiologia de placas produzidas a partir de osso bovino, conservadas em diferentes meios. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.4, p.660-666.

Forti FL, Goissis G, Plepis AMG (2006) Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Jornal of Biomaterials Applications**, London, v.20, n.3, p 267-285.

Frandsen RD, Lee Wilke W, Dee Falls A (2005) **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.11-13.

Gaiga LH. Schossler JEW (2003) Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em mel em pombos domésticos (columba livia). **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 709-715.

Garg U, Lowry J, Algren DA (2019) **Ethylene glycol and other glycols: analytical and interpretation issues**. In: **DASGUPTA A**. Critical Issues in Alcohol and Drugs of abuse testing. Washington, p. 29-39.

Gasque KCS, Oliveira RC, Ceolin D, Cestari TM, Taga R, Taga EM, Corrêa A, Paiva KB, Takyia CM, Granjeiro JM (2008) Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos **Ciência Odontológica Brasileira**, v.11, p.58-66.

Gigek T, Martins de Oliveira JE, Neto ACA, Carvalho WL, Pereira FV, Almeida AH (2009) Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos **V Simpósio de Ciências da UNESP – Dracena** p 43-45.

Groscurth P, Eggli P, Kapfhammer J, Rager G, Hornung JP, Fazer JDH (2001) **Gross anatomy in the surgical curriculum in Switzerland: improved cadáver preservation, anatomical models, and course development.** The Anatomical Record, p.254-256.

Guimarães GC (2006) **Propriedades morfológicas e tensiométricas comparadas de centro tendíneo, pericárdio e peritônio de bovinos a fresco e conservados em glicerina.** 65 f. Dissertação doutorado em cirurgia veterinária-Unesp, Jaboticabal.

Hatch RC, (1992) Venenos causadores de insuficiência respiratória in: Booth HN, McDONALD LE **Farmacologia e Terapêutica em veterinária.** Rio de Janeiro p.845-849.

Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC (2001) In vitro construction of a potencial skin substitute through directi human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Blackwell Science** v. 25 n. 11 p. 901-906.

Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J (2011) Nitrite pickling salt as alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy- A study based on histo- and microbiological analyses. **Annals of Anatomy**, p.71-75.

Junqueira LC, Carneiro J (2004) **Histologia básica:** texto e atlas. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p.568.

Junqueira LC, Carneiro J (2017) **Histologia Básica – Texto & Atlas.** Rio de janeiro: Guanabara Koogan. 13 ed. p.568.

Klein AL, Abbara S, Agler DA, Appleton CP, Asher CR, Hoit B, Hung J, Garcia MJ, Kronzon I, OH JK, Rodriguez R, Schaff HV, Schoenhagen P, Tan CD, White RD (2013) American Society of Echocardiography clinical recommendations for multimodality cardiovascular imaging of patients with pericardial disease: endorsed by the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance and Society of Cardiovascular Computed Tomography. **Journal of the American Society Echocardiography.** v. 26, p.965–1012.

Konig EH, Liebich HG (2004) **Anatomia dos animais domésticos: texto e altas colorido.** Porto Alegre: Artmed, v2, p 1-14.

Konig HE, Liebich HG (2016) **Anatomia dos animais domésticos - Texto e Atlas Coloridos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 452-453.

Larson CE, Farias MR, Andrade SF, Brito AF (2002) Terapêutica tópica e sistêmica: pele, ouvido e olhos in: ANDRADE, S. F et al; **Manual de terapêutica Veterinária.** São Paulo, p.120-126.

Leite JBF et al. (1979) A glicerina e a preservação de tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 93, n. 3-4, p. 81-84.

Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, Macneil S, Freedlander E, Kudesia G (1995) Effect of glycerol on intracellular vírus survival: implication for the clinical use of glycerol-preserved cadáver skin. **Bruns**, v.21, n.5, p356-361.

Martins CRP (2009) **Avaliação anatomopatológica de rim, fígado e baço de camundongos submetidos ao reparo de feridas cirúrgicas em parede abdominal com fragmentos de pericárdio bovino conservado em glicerina e glutaraldeído**. 45 f. Dissertação de mestrado em medicina veterinária- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Mazzanti A et al. (2001) Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para a reparação de grande defeito no diafragma de cão. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.277-283.

Medeiros PSG, Barbosa CRF, Fontes FAO (2010) Propriedades termofísicas de fluidos secundários à base de álcool para termoacumulação. **HOLOS**, v. 4, p. 74-87.

Mota FCD et al. (2002) Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1/6, p. 13-17.

Mota FCD et al. (2003) Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciência Animal Brasileira**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 117-123.

Nunes TC, Oliveira FS, Gamón THM, Guastalli HL, Carmo LG, Del Quiqui EM (2011) Análise da textura de músculos peitorais submetidos à fixação e conservação em álcool. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.6, p. 464-467.

Novaes ASM (2015) **Efeitos sistêmicos da implantação de pericárdio ovino tratado pelo glutaraldeído 1% e conservado em glicerina 98% na vesicular urinária de coelhos**. 32 f. Dissertação de mestrado em Medicina veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Oliveira TC (2007) **Estudo comparativo entre peritônio bovino e biomembrana de látex natural na substituição de fragmento da parede da bexiga em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 105 f. Dissertação de mestrado em Cirurgia Veterinária- Unesp Jaboticabal.

Páez JMG, et al. (2006) Determination of the force necessary for the propagation of tears in ostrich and calf pericardium. **Journal of Biomedical Materials Research Parte B**, p.229-235.

Pelogia MES, Cerqueira EEF, Silveira CPB, Rolim GS, Fechis ADS, Rocha TAS, Laus JL, Oliveira FS (2018) Suture and venous traction test analysis in dogs fixed in alcohol and preserved in saline solution. **Pesquisa veterinária Brasileira** v.38, n.9 p.1834-1837.

Pereira N, Cardozo MV, Rocha TASS, Àvila FA, Machado MRF, Oliveira FS (2019) Microbiological analysis of a new anatomical specimen preparation technique for use in veterinary surgery. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n.6, p. 3099-3106.

Peruzzo AM (2013) **Avaliação mecânica e histológica de pericárdio bovino descelularizado submetido à pressão**. 76 f. Dissertação(Mestrado em Engenharia Biomédica)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

Pigossi N (1964) **Implantação de dura-máter homogênea conservada em glicerina – estudo experimental em cães**. 41 f. Tese (Doutorado em Medicina) -Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pigossi N (1967) **A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental**. 83 f. Tese (Livre Docência) -Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pigossi N et al. (1971) Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 263-278, out.

Pires LA, Bierhalz ACK, Moraes AM (2015) Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Revista Química Nova**, v. 38, n.7, p. 957-971, <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

Pomerantzeff PM, Brandão CMA, Caudo P, Puig LB, Grinberg M, Tarasoutchi F, Cardoso LF, Lerner A, Stolf NAG, Verginelli G, Janete AD (1997) Biopróteses de pericárdio bovino Físico-In Cor: 15 anos. **Revista Brasileira de cirurgia Cardiovascular**, São Jose do Rio Preto, v. 12, n. 4, p. 359-366.

Queiroz FF, Cordeiro GC, Rodrigues ABF, Silveira LS (2012) Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservada em glicerina 98% para utilização como membrana biológica. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.501-506.

Rabelo RE, et al (2004) Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n4, p.229-238.

Raiser AG, Graça DL, Pippi NL, Zinn LL, Silveira DS, Bordin AI, Baiotto GC, Rios VM, Silveira AF (2001) Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães, conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural** v. 31, n. 1, p.89-94.

Ribeiro LCM, et al. (2009) Risco ocupacional pela exposição ao glutaraldeído em trabalhadores de serviço de endoscopia. **Revista Eletrônica de Enfermagem** v. 11, n. 3, p. 509-517

Richters CD, Hoekstra MJ, Baare JV, Pont JS, Kamperdijk WA (1996) Morphology of glycerol-preserved human cadáver skin. **Burns** v 22, n.2 p.113-116.

Rocha TASS, Yanagihara GR, Shimano AC, Rolim GS, Santos CCC, Fechis ADS, Oliveira FS (2018) Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. **Journal of Pastination**. V. 30, p.16-23.

Romanos GE, Hotz STK, Beyer F, Strub JR (1998) Influence of collagen membranes and collagenous sponge material in the connective tissue matrix during wound healing: immunohistochemical study. **Biological Matrices and Tissue Reconstruction**.

Rosa GRS, Costa FDA, Vilani RGDC, Reichert L, Costa ISEA (2006) Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. **Braz J. Cradiovasc Surg**, v. 21, n.3, p 304-313.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. **Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association**, 6 ed., p. 592-593.

Sartori Filho F, Gandolfi W, Bandarra EP (1997) Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-77.

Silva NP, (1991) Esterilização e desinfecção in: TRABUCI, L.R., et al **Microbiologia**. São Paulo, p 99-102.

Sionkowska A, (2011) Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review. **Progress in Polymer Science** v.36, p. 1254-1276.

Soares MP, Rossi CAR, Mezzalira A, Cecim M (2002) Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n.4, p.649-655.

Stelmann UJP, et al. (2010) Utilização de pericárdio bovino como reforço da rafia do peritônio no tratamento cirúrgico de eventração em equino: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 2, n.14.

Tudury EA, Potier GMA (2009) **Tratado de Técnica Cirúrgica**. São Paulo p.56-57.

Vidor SB, et al. (2012) Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos. **Acta Scientiae Veterinariae**.

Vulcani VAS, Marcoris DG, Plepis AMG (2008) Membrana biológica homóloga preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em equinos. **Ciência Rural**. v.38, n.5, p1329-1334.

Well PB, Yeh AT, Humphrey JD (2006) Influence of glycerol on the mechanical reversibility and thermal damage susceptibility of collagenous tissues. **Biomedical Engineering**, v. 53, n.4, p.747-753.

Uttam G, Jennifer L, Adam A (2019) Ethylene glycol and other glycols: analytical and interpretation issues. **Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing**, ed. 2, p 59-69, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815607-0.00005-8>.