

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CAMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE BIOMECÂNICA EM CADÁVERES DE CÃES  
SUBMETIDOS A FIXAÇÃO POR MEIO DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA  
SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO VISANDO AO ENSINO DA  
ANATOMIA E DA CIRURGIA VETERINÁRIA**

**Sergio Silva Alves Junior  
Médico Veterinário**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CAMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE BIOMECÂNICA EM CADÁVERES DE CÃES  
SUBMETIDOS A FIXAÇÃO POR MEIO DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA  
SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO VISANDO AO ENSINO DA  
ANATOMIA E DA CIRURGIA VETERINÁRIA**

**Sergio Silva Alves Junior**

**Orientador: Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira**

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

**2022**

A474a Alves Junior, Sergio Silva  
Análise biomecânica em cadáveres de cães submetidos a fixação por meio de diferentes protocolos e análise microbiológica da solução de conservação visando ao ensino da anatomia e da cirurgia veterinária / Sergio Silva Alves Junior. -- Jaboticabal, 2022  
71 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Fabrício Singaretti de Oliveira

1. Álcool etílico. 2. Cloreto de sódio. 3. Formaldeído. 4. Sal de cura.  
5. Técnicas anatômicas. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** ANÁLISE BIOMECÂNICA E MICROBIOLÓGICA EM CADÁVERES DE CÃES SUBMETIDOS À FIXAÇÃO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁLCOOL ETÍLICO E FORMALDEÍDO VISANDO AO ENSINO DA ANATOMIA E DA CIRURGIA VETERINÁRIA

**AUTOR:** SERGIO SILVA ALVES JUNIOR

**ORIENTADOR:** FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA

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

Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal



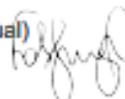
Prof. Dr. LEANDRO LUÍS MARTINS (Participação Virtual)  
Departamento de Anatomia / Universidade Estadual de Londrina - UEL / Londrina/PR



Prof.Dr. THIAGO ANDRÉ SALVITTI DE SÁ ROCHA (Participação Virtual)  
Universidade Brasil / Descalvado/SP



Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Virtual)  
Universidade de Franca - UNIFRAN / Franca/SP



Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Jaboticabal, 27 de janeiro de 2022

## **DADOS CURRIRULARES DO AUTOR**

Sergio Silva Alves Junior, nascido em Atibaia, São Paulo, em 26 de junho de 1985. Graduou-se em Medicina Veterinária – UNIFEOB, São João da Boa Vista, no ano de 2007. Durante a graduação, foi monitor de Anatomia dos Animais Domésticos de 2004 até 2007. Realizou Mestrado em Ciência Animal em 2010 na UNESP de Araçatuba. É Professor de Anatomia dos Animais Domésticos I e II para o curso de graduação em Medicina Veterinária na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, campus Poços de Caldas desde 2014. Em fevereiro de 2018, iniciou o curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na FCAV – UNESP Campus de Jaboticabal, SP, com pesquisa na área de Anatomia Cirúrgica.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Sergio e Ivani, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, vocês foram a base para que um dia eu pudesse realizar este sonho. O senhor e a senhora souberam mostrar a importância de se levar o estudo a sério para ter um futuro melhor.

Às minhas irmãs, Luciana e Débora, pela cumplicidade e companheirismo, que mesmo não estando muito presente nos momentos familiares, sempre quando nos encontramos é uma grande alegria.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Cirúrgica e de Pós Graduação. Raphael, obrigado pela amizade, parceria e aprendizado, nossa amizade será para sempre. Thiago, que conheci pela primeira vez quando vim fazer o curso de anatomia topográfica cirúrgica de pequenos animais, sempre atencioso e solícito, muito obrigado pela parceria e aprendizado. Andrea, obrigado por toda ajuda e aprendizado, muita gratidão a todos vocês.

Às alunas da graduação em Medicina Veterinária, Natália, Geovanna, Isabela e Giovana, por toda ajuda durante o período do experimento, pelas risadas, trocas de experiência, vocês foram incríveis.

Aos demais Pós Graduandos companheiros de disciplina do Doutorado, pela amizade, trocas de experiência e muito aprendizado.

Agradeço o pessoal da República onde fiquei e pude rever alguns ex moradores desde os tempos de estágio obrigatório e disciplinas do Mestrado.

Agradeço ao professor Fabrício Singaretti de Oliveira pela oportunidade de tê-lo como orientador de Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, que proporcionou meu aprendizado.

Aos Professores e amigos de trabalho da PUC Minas Campus Poços de Caldas, Cabral e Aauto, que foram meus ex-professores e que agora são colegas de profissão, uma honra muito grande, agradeço também em especial ao Professor Marcelo que além de amigo auxiliou na realização da análise estatística da presente Tese, muito obrigado.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

Obrigado!

## Sumário

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.Introdução.....	1
2.Revisão de literatura.....	2
2.1 Fixadores e Conservantes em Laboratórios de Anatomia.....	2
2.2 Teste biomecânico.....	5
2.3 Conservantes na indústria alimentícia.....	6
2.4 Aspectos microbiológicos na conservação de peças anatômicas.....	7
2.5 Uso de cadáveres caninos no ensino da anatomia e da cirurgia veterinária.....	8
3. OBJETIVOS.....	10
4.REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2 – Análise biomecânica em cadáveres de cães submetidos a fixação por meio de diferentes protocolos e análise microbiológica da solução de conservação visando ao ensino da anatomia e da cirurgia veterinária. ....	18
CAPÍTULO 2 – Biomechanical analysis of dog cadavers submitted to fixation using different protocols and microbiological analysis of the conservation solution aiming at teaching anatomy and veterinary surgery. ....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Os Animais.....	21
Técnica Anatômica Utilizada.....	21
Coleta do Material.....	24
Análise Quanto à Resistência dos Tecidos.....	29

Avaliação Microbiológica e Contagem de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Mesófilas Totais .....	30
Identificação Bacteriana .....	31
Análise subjetiva da coloração muscular .....	32
Análise Estatística .....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO .....	47
REFERÊNCIAS .....	48

## CEUA – certificado de comprovação



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 “**Cadáveres de cães e gatos quimicamente preparados mediante emprego de diferentes soluções fixadoras/conservadoras**”, protocolo nº 004593/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabricio 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 11 de abril de 2019.

Vigência do Projeto	20/04/2019 a 10/04/2021
Espécie / Linhagem	Canino/ SRD; Gatos/ SRD (cadáveres)
Nº de animais	40
Peso / Idade	3 a 15 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro de controle de Zoonoses de Ribeirão Preto, SP (processo 02.2014/000027-1, já aprovado pelo Departamento Jurídico Municipal).

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Pilarski  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil  
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

## ANÁLISE BIOMECÂNICA EM CADÁVERES DE CÃES SUBMETIDOS A FIXADOS POR MEIO DE DIFERENTES PROTOCOLOS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO VISANDO AO ENSINO DA ANATOMIA E DA CIRURGIA VETERINÁRIA

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi determinar a viabilidade de novos protocolos relacionados com técnicas anatômicas para fixação e conservação de cadáveres de cães, por meio da injeção da solução de sal de cura, previamente ao agente fixador composto por álcool etílico (AE) e formaldeído em diferentes proporções e solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) na conservação. Análises biomecânicas e microbiológicas foram realizadas durante a fixação e conservação. Antes da injeção de sal de cura e do processo de fixação dos cadáveres foi realizada a coleta das amostras frescas da pele e jejuno para serem utilizadas como amostras controle. Os cadáveres foram sorteados em 4 grupos composto por oito animais e fixados: G1 (100% formaldeído), G2 (30% formaldeído e 70% AE), G3 (70% formaldeído e 30% AE) e G4 (50% formaldeído e 50% AE) e conservação em SACS 30% nos tempos D0 (9 dias após fixação), 30, 60, 90 e 120 dias. Os testes biomecânicos de tração foram realizados em amostra de pele e jejuno em todos os momentos sendo fresco (amostra controle), pós fixação e conservação. Também foram realizadas análises microbiológicas (utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade) da solução ao final da fixação e durante a conservação em SACS 30%. A análise de variância de uma classificação (One-Way ANOVA) foi utilizada para medidas repetidas (tempos) para cada tratamento separadamente. Ainda para cada tratamento, foi realizada a comparação entre as amostras controle (frescas) e as amostras obtidas em tempos de tratamento com o teste T pareado. Não houve diferença estatística na força máxima de ruptura (FMR) da pele e jejuno entre o controle e os momentos de fixação e conservação. Comparando amostra fresca com o tempo D120, as menores variações foram observadas nos grupos G2 e G3 que apresentaram a FMR das amostras com diferença entre médias de pele (-14,2N) e jejuno (-0,28N) respectivamente. Em relação ao alongamento para ruptura (AR) da pele houve diferenças significativas no D30 no G2 e G3 e no D120 em todos os grupos, já em relação ao jejuno houve diferença significativa no D120 no G1 e G2. O G3 e G4 apresentaram menores variações no AR das amostras, com diferença entre médias de pele (1,32mm) e jejuno (0,23mm) respectivamente. Na análise microbiológica da SACS 30% não foram identificados microrganismos aeróbios e anaeróbios nos Grupos 1, 2, 3 e no grupo 4 foi encontrado, no tempo D120, a presença de *Bacillus sp* na quantidade de  $1,0 \times 10$  UFC/mL. Sugere-se que o G3 (sal de cura, 30% AE e 70% de formaldeído) seja a melhor opção para fixação de cadáveres para uso como peças permanentes, que poderiam ser utilizadas tanto em aulas de anatomia como de cirurgia veterinária, pela maior proximidade com cadáveres fresco, coloração dos tecidos, além de controle microbiológico.

**Palavras-chave:** álcool etílico, cloreto de sódio, formaldeído, sal de cura, técnicas anatômicas.

## **BIOMECHANICAL ANALYSIS IN DOGS CASES SUBMITTED TO FIXED THROUGH DIFFERENT PROTOCOLS AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF THE CONSERVATION SOLUTION AIMING TO TEACH ANATOMY AND VETERINARY SURGERY**

**ABSTRACT** – The objective of the present study was to determine the feasibility of new protocols related to anatomical techniques for fixation and conservation of dog cadavers, through the injection of a curing salt solution, prior to the fixation agent composed of ethyl alcohol (EA) and formaldehyde in different proportions and 30% sodium chloride aqueous solution (30% SACS) in storage. Biomechanical and microbiological analyzes were performed during fixation and conservation. Before the injection of curing salt and the process of fixing the corpses, fresh samples of the skin and jejunum were collected to be used as control samples. The cadavers were randomly assigned into 4 groups composed of eight animals and fixed: G1 (100% formaldehyde), G2 (30% formaldehyde and 70% AE), G3 (70% formaldehyde and 30% AE) and G4 (50% formaldehyde and 50 % AE) and conservation in SACS 30% at times D0 (9 days after fixation), 30, 60, 90 and 120 days. The biomechanical traction tests were performed on skin and jejunum samples at all times, being fresh (control sample), post fixation and conservation. Microbiological analyzes were also performed (using the deep plating technique) of the solution at the end of fixation and during storage in 30% SACS. One-way analysis of variance (One-Way ANOVA) was used for repeated measures (times) for each treatment separately. Also, for each treatment, a comparison was made between the control samples (fresh) and the samples obtained at treatment times with the paired T test. There was no statistical difference in the skin and jejunum maximum rupture force (RMF) between the control and the fixation and conservation moments. Comparing fresh samples with time D120, the smallest variations were observed in groups G2 and G3, which presented the FMR of the samples with difference between skin (-14.2N) and jejunum (-0.28N) means, respectively. Regarding the stretching to rupture (RA) of the skin, there were significant differences at D30 in G2 and G3 and at D120 in all groups, whereas in relation to the jejunum there was a significant difference at D120 in G1 and G2. G3 and G4 showed smaller variations in the AR of the samples, with a difference between skin (1.32mm) and jejunum (0.23mm) means, respectively. In the microbiological analysis of the 30% SACS, no aerobic and anaerobic microorganisms were identified in Groups 1, 2, 3 and in group 4, at D120, the presence of Bacillus sp was found in the amount of  $1.0 \times 10$  CFU/mL. It is suggested that G3 (curing salt, 30% AE and 70% formaldehyde) is the best option for fixing cadavers for use as permanent pieces, which could be used both in anatomy and veterinary surgery classes, for proximity to fresh cadavers, tissue staining, and microbiological control.

**Keywords:** ethyl alcohol, sodium chloride, formaldehyde, curing salt, anatomical techniques.

**LISTA DE ABREVIACÕES**

<b>AE</b> .....	<b>Álcool etílico</b>
<b>AMR</b> .....	<b>Alongamento máximo de ruptura</b>
<b>ANOVA</b> .....	<b>Análise de variância</b>
<b>CEUA</b> .....	<b>Comissões de Ética Institucionais ao Uso de Animais</b>
<b>cm</b> .....	<b>Centímetro</b>
<b>F</b> .....	<b>Formaldeído</b>
<b>FCAV</b> .....	<b>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias</b>
<b>FMR</b> .....	<b>Força máxima de ruptura</b>
<b>g</b> .....	<b>Gramas</b>
<b>GL</b> .....	<b>Grau Lussac</b>
<b>h</b> .....	<b>Hora</b>
<b>kg</b> .....	<b>Quilogramas</b>
<b>Kgf</b> .....	<b>Quilograma força</b>
<b>Km</b> .....	<b>Quilômetro</b>
<b>min</b> .....	<b>Minuto</b>
<b>mL</b> .....	<b>Mililitro</b>
<b>mm</b> .....	<b>Milímetros</b>
<b>MYP</b> .....	<b>Mannitol Yolk Polymixin</b>
<b>N</b> .....	<b>Newtons</b>
<b>NaCl</b> .....	<b>Cloreto de Sódio</b>
<b>RE</b> .....	<b>Rupture Elongation</b>
<b>SACS 30%</b> .....	<b>Solução Aquosa de Cloreto de Sódio à 30%</b>
<b>SC</b> .....	<b>Sal de cura</b>
<b>SPS</b> .....	<b>Sulfato Polimixina Sulfadizina</b>
<b>UFC</b> .....	<b>Unidade formadora de colônia</b>
<b>Unesp</b> .....	<b>Universidade Estadual Paulista</b>

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 2 - Análise biomecânica em cadáveres de cães submetidos a fixação por meio de diferentes protocolos e análise microbiológica da solução de conservação visando ao ensino da anatomia e da cirurgia veterinária**

- Tabela 1.** Média e desvio padrão do peso corporal dos cadáveres de cães e técnicas anatômicas utilizadas por grupo), após infusão de solução de sal de cura... 22
- Tabela 2.** Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) da pele de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias..... 35
- Tabela 3.** Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) do jejuno de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias..... 36
- Tabela 4.** Média e desvio padrão do alongamento máximo de ruptura (mm) da pele de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias..... 37
- Tabela 5.** Média e desvio padrão do alongamento máximo de ruptura (mm) do jejuno de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias..... 38
- Tabela 6.** Escore atribuído a coloração da musculatura em região de membro torácico e pélvico após 120 dias de conservação em SACS 30%..... 41

<b>Tabela 7.</b> Análise microbiológica da solução de conservação de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização com meio a base de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em conservação com formaldeído por 7 (sete) dias e em SACS 30% por até 120 dias.....	42
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2 - Análise biomecânica em cadáveres de cães submetidos a fixação por meio de diferentes protocolos e análise microbiológica da solução de conservação visando ao ensino da anatomia e da cirurgia veterinária**

- Figura 1.** Etapas da infusão de solução de sal de cura e solução de fixação na artéria carótida. A: Incisão na região ventral e mediana cervical de cadáver canino; B: Artéria carótida comum com cânula inserida; C: Infusão de solução de sal de cura seguida da infusão da solução de fixação..... 23
- Figura 2.** Imagem fotográfica das caixas plásticas com 180 litros de solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) contendo em cada caixa 8 cães, demonstrando em A (caixa fechada), B (caixa aberta com cães devidamente armazenados)..... 24
- Figura 3.** Imagem fotográfica do uso do molde de aço inoxidável de 1 x 5 cm utilizado durante coleta das amostras de pele e jejuno para os ensaios biomecânicos em cadáveres de cães quimicamente preparados..... 25
- Figura 4.** Cronograma de preparo dos cadáveres para posterior coleta de amostras de pele e jejuno nos tempos numerados em 1 (coleta das amostras controle e preparação dos cadáveres utilizando sal de cura previamente ao agente fixador); 2 (conservação em formaldeído 10%); 3 Período de lavagem em água antes de coloca-los em SACS 30% e início de permanência dos cadáveres conservados em SACS 30% (D0); 4 (D30); 5 (D60); 6 (D90) e 7 (D120) no grupo 1 (100%F), grupo 2 (30%F e 70%AE), grupo 3 (70%F e 30%AE) e grupo 4 (50%F e 50%AE)..... 26
- Figura 5.** Imagens fotográficas dos locais de coletas de pele de cadáveres de cães quimicamente preservados. A: Antímero esquerdo e coleta das amostras em

triplicata nos momentos fresco (amostra controle), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e D30 (30 dias de conservação em SACS 30%) setas com número 1, 2 e 3 respectivamente; B: Antímero direito e coleta das amostras em triplicata nos momentos D60 (60 dias de conservação em SACS 30%), D90 (90 dias de conservação em SACS 30%) e D120 (120 dias de conservação em SACS 30%) setas com número 4, 5 e 6 respectivamente. Locais de coletas de pele de cães quimicamente preservados..... 27

**Figura 6.** Imagem fotográfica demonstrando as etapas do procedimento de coleta amostral de jejuno. A: posicionamento do jejuno por meio do molde e corte do fragmento intestinal após a flexura duodenojejunal; B: Posicionamento do molde para obtenção do padrão de comprimento das amostras; C: Corte do outro segmento intestinal; D: Fechamento da alça intestinal com fio após remoção do fragmento intestinal; E: Corte do fragmento intestinal na face mesentérica em sentido longitudinal..... 28

**Figura 7.** Imagem fotográfica da máquina universal de ensaios biomecânicos (EMIC® DL 2000) utilizada para o teste de tração das amostras de pele e jejuno de cão submetidos à fixação com diferentes proporções de álcool etílico e formaldeído e conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30%. A: garra de acionamento por compressão manual, acoplada em célula de carga de 500 N; B: detalhe de amostra de pele presa nas garras de compressão manual..... 29

**Figura 8.** Imagens fotográficas do procedimento de semeadura das amostras do meio de conservação a base de formaldeído aos 7 (sete) dias e aos 30, 60, 90 e 120 dias em meio composto por SACS 30% de cadáveres de cães fixados com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções, para análise microbiológica, sendo em A: Diluição; B: Esfregaço e C: Cultivo nas Placas de Petri..... 31

**Figura 9.** Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) e do alongamento máximo de ruptura (mm) da pele e jejuno de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias..... 34

**Figura 10.** Imagem fotográfica de cadáver canino ilustrando os locais onde foram realizadas as incisões para avaliação visual da coloração dos músculos nos grupos estudados..... 39

**Figura 11.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região do membro pélvico por meio da secção dos músculos bíceps femoral e vasto lateral após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B..... 39

**Figura 12.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região glútea por meio da secção dos músculos glúteo superficial e glúteo médio após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar

a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B..... 40

**Figura 13.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região do braço por meio da secção dos músculos deltoide porção escapular, tríceps braquial cabeça longa e tríceps braquial cabeça lateral após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B..... 40

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.Introdução**

O uso de substâncias tóxicas em laboratórios de anatomia está cada vez mais controlado no Brasil e no Mundo. Trata-se de uma questão de saúde ocupacional e ambiental, pois muitos destes agentes utilizados na fixação e conservação de cadáveres geram resíduos extremamente nocivos ao meio ambiente, contaminando o solo e reservas de água.

Além disso, é imperioso ter muito critério quanto ao uso de animais em pesquisa e atividades de ensino e, conseqüentemente, a busca por métodos alternativos a este uso e que não tragam prejuízo acadêmico ou científico é essencial.

Para regulamentar o uso de animais em pesquisas e atividades de ensino, foi implementada em 2008 a Lei n. 11.794 (Lei Arouca), que cria as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) controlem as atividades de ensino e pesquisa nas Universidades, auxiliando os profissionais da área biomédica, e cadastrando a Instituição junto ao Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Brasil, 2008). A Lei Arouca foi oficializada pelo Decreto 6.899 de 2009 (Brasil, 2009) e pode auxiliar na formação dos novos profissionais, agregando valores éticos de responsabilidade e respeito para com a vida (Oliveira et al. 2013).

Cria-se, assim, a demanda pela criação de novas técnicas voltadas ao ensino envolvendo animais. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a viabilidade de uma nova técnica anatômica de preparo de cadáveres de cães para o ensino da anatomia e da cirurgia veterinária utilizando injeção de sal de cura, e fixação com álcool etílico (AE) e formaldeído à 10% em diferentes proporções.

## **2.Revisão de literatura**

### **2.1 Fixadores e Conservantes em Laboratórios de Anatomia**

Em laboratórios de anatomia, a contaminação das peças anatômicas por fungos pode desencadear, em alunos e profissionais, quadros de alergia em decorrência a essa grande exposição aos esporos suspensos no ar (Neto e Colombo, 2015) que por tempo prolongado pode levar a problemas neurológicos, respiratórios e imunes (Johanning et al. 1996).

Para que não haja deterioração dos tecidos, as peças anatômicas são fixadas. A fixação é extremamente importante, pois mantém os tecidos firmes, insolúveis e protegidos (Rodrigues, 2010), evitando assim, a proliferação de patógenos que poderão causar doenças nas pessoas que frequentam o laboratório (Neto e Colombo, 2015).

A desidratação é outra técnica anatômica que pode ser utilizada com sucesso para preservação de peças anatômicas dispensando o uso de agentes conservantes, porém apresenta a desvantagem da retração tecidual, trazendo limitação considerável ao estudo anatômico, podendo ser um fator desestimulante aos estudantes, professores e até mesmo aos funcionários de laboratório. A retração dos tecidos é uma característica inevitável devido a total perda de água da peça utilizada (Freitas et al. 2009).

Para a conservação em meios líquidos são utilizadas substâncias que impedem a proliferação de microrganismos. As mais comuns são o formaldeído, a glicerina, o álcool etílico e o fenol (Rodrigues, 2010).

O formaldeído é um produto químico orgânico, vendido comercialmente em solução aquosa entre 30 a 50% de concentração. É acrescido de estabilizante, como o metanol, na proporção de 6 a 15% para limitar a oxidação e a polimerização do produto químico e o restante é formado por resinas fenólicas e metais pesados como conservantes antissépticos. Este produto, em temperatura ambiente, torna-se um gás extremamente volátil e incolor, que apresenta forte odor pungente e sufocante devido à sua solubilidade e rápida absorção metabólica no trato respiratório e gastrointestinal. Além

disto, se absorvido na superfície cutânea, inalado ou ingerido é tóxico ao organismo (Brasil, 2012).

O formaldeído é o fixador e conservante mais utilizado, comumente em solução aquosa a 10%. Por ser barato e penetrar rapidamente nos tecidos (seis milímetros em doze horas) é amplamente utilizado nos laboratórios de anatomia (Rodrigues, 2010). Além de prejudicial à saúde ele traz sérios riscos ambientais, pois o manuseio e descarte inadequado de carcaças e efluentes podem contaminar o meio ambiente (WHO, 1991).

Em pesquisa realizada nos laboratórios de Anatomia Patológica do HUB/UnB (Hospital Universitário de Brasília da Universidade de Brasília) e da Secretaria de Saúde, foi constatado que mesmo sabendo a forma correta de descarte do formaldeído, armazenado em recipientes para posterior incineração, mais de 85% dos entrevistados descartam esses rejeitos na pia, o que é extremamente tóxico para a vida aquática (Silva, 2010). Em 1995, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) o classificou como cancerígeno e teratogênico (IARC, 2006).

Em uma técnica anatômica, devem ser considerados vários aspectos, como toxicidade, custo, manuseio das peças após o preparo, necessidade de manutenção morfológica, pigmentação mais próxima do real, odor e irritação de mucosas do manipulador (Silva et al. 2008).

A glicerina é um conservante até dez vezes mais caro que o formaldeído (Krug et al. 2011), tem ação desidratante e antisséptica, atuando contra fungos e bactérias (Alvarenga, 1992), e evita odores prejudiciais à saúde como os liberados pelo formaldeído (Cury et al. 2013).

Há vários outros exemplos de soluções fixadoras que são capazes de conservar cadáveres para uso cirúrgico, dentre os quais, a solução de Thiel (composta de ácido bórico, etilenoglicol, nitrato de potássio, clorometilfenol, sulfato de sódio e formaldeído (Groscurth et al. 2001), a solução de Klotz (cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, hidrato de cloral, formaldeído e água), a solução de Jores (água destilada, formaldeído, sulfato de sódio, sulfato de potássio, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, glicerina e acetato de sódio ou potássio (Rodrigues, 1998), ou seja, todas possuem formaldeído.

A solução modificada de Larssen contém 100mL de formaldeído a 10%, 400mL de glicerina, 200g de hidrato de cloral, 200g de sulfato de sódio, 200g de bicarbonato de sodio, 180g de cloreto de sódio e 2 litros de água destilada (Silva et al. 2004). A solução de Larssen é descrita como o método de conservação que mantém a consistência, cor e características originais do material biológico e é capaz de remover coágulos sanguíneos (Sampaio, 1989). Na solução original de Larssen não há a glicerina líquida (Menezes, 2012).

A solução de Laskowski contém 800mL de glicerina, 200mL de etanol, 50g de ácido fênico e 50g de ácido bórico e demanda conservação dos cadáveres em temperatura de 0°C até o uso em aulas de cirurgias. Entre duas aulas consecutivas, eles permanecem no freezer e o descongelamento ocorre em água por 24h antes de cada aula. Com esta solução, os tecidos tornam-se excessivamente escuros (Silva et al. 2007).

A análise de músculos peitorais de galinhas submetidos à fixação e conservação em álcool etílico 96°GL (graus Gay-Lussac) mostrou diminuição da maciez, tornando-os quase cinco vezes mais rígidos ao corte durante os primeiros seis meses, e três vezes mais rígidos após um ano de imersão no agente conservante (Nunes et al. 2011).

Durante 5 anos, foi avaliada, com sucesso a utilização da Solução Aquosa de Cloreto de Sódio a 30% (SACS 30%) na conservação de peças anatômicas previamente fixadas por formaldeído, sem contaminação visual, presença de odores de putrefação e alteração de cor e maciez (Oliveira, 2014). Já foi descrita, também, e com sucesso, a utilização da solução hipersaturada de cloreto de sódio em pericárdio (Brun et al. 2002) e centro frênico de cães (Brun et al. 2004), ambos para fins cirúrgicos, ou na conservação de cadáveres animais (Lombardero et al. 2017). Os cadáveres preservados com esta solução mantêm a cor, textura, movimento articular e flexibilidade mais realista quando comparados a solução de formaldeído (Nam et al. 2020; Begger et al. 2020).

## 2.2 Teste biomecânico

A análise biomecânica de tecidos animais é realizada por testes em máquinas universais de ensaios mecânicos que promovem a tração, flexão e compressão dos corpos de prova gerando dados computacionais e tabelas. Nos ensaios de tração, o material estudado sofre forças externas crescentes, promovendo deformações uniformes em todo o corpo de prova, permitindo medir de maneira satisfatória a resistência da amostra avaliada (Souza, 1982).

É crescente o interesse pelas propriedades biomecânicas dos tecidos biológicos de animais. Os ensaios biomecânicos de tração têm sido amplamente utilizados para investigação das propriedades mecânicas de músculos e ligamentos, submetidos à diferentes condições, como por exemplo, na presença de lesões por esmagamento e estiramento (Silva, 2002). Recentemente, enfoque maior é dado aos estudos comparativos entre os tecidos submetidos à fixação e tecidos frescos, gerando dados que contribuem ao aprimoramento de técnicas cirúrgicas na busca de material biológico alternativo para a realização de treinamento de técnicas operatórias e de novas opções de modelos de experimentação animal (Camargo et al. 2014).

Em estudo sobre as propriedades tensiométricas de fragmentos do diafragma, pericárdio e peritônio bovino, sem conservação e com conservação em glicerina 98%, submetidos a ensaios mecânicos de tração, a glicerina reduziu a rigidez dos tecidos avaliados (Guimarães et al. 2008). Ao compararem peritônio de paca (*Cuniculus paca*) fresco e conservado em glicerina 98%, observou-se melhora da propriedade tênsil do peritônio conservado, sugerindo sua utilização como mais uma opção de material biológico para o uso em cirurgias reconstrutivas (Camargo et al. 2014). A solução supersaturada de açúcar a 300%, ao ser utilizada na conservação de peritônio de paca, mostrou-se eficaz, garantindo a melhoria da maleabilidade do biomaterial no ato cirúrgico (Leal et al. 2014).

### 2.3 Conservantes na indústria alimentícia

A cura de produtos cárneos baseia-se na aplicação de aditivos alimentares como sais de nitrito, nitrato, cloreto de sódio e açúcares, que contribuem para a fixação da cor avermelhada da carne curada, ação bacteriostática cientificamente comprovada e manutenção das características físico-químicas. Tanto os nitratos quanto os nitritos são muito utilizados na indústria alimentícia e são adicionados aos alimentos para retardar ou impedir ações enzimáticas ou microbianas, inibindo a deterioração dos alimentos. O nitrito é agente de cura que conserva a carne contra a deterioração bacteriana, inibindo principalmente o crescimento do *Clostridium botulinum* bactéria Gram-positiva anaeróbia, que pode causar infecções e/ou intoxicações alimentares ao organismo humano, por sua toxina ser a do botulismo (Iamarino et al. 2015).

As temperaturas elevadas promovem à putrefação da massa muscular interna da carne, favorecendo o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, sendo o *Clostridium perfringens* o principal agente encontrado. A refrigeração rápida inibe o crescimento bacteriano e a putrefação (Rosset, 1994).

O principal objetivo da refrigeração da carne é reduzir a temperatura para que a taxa de crescimento bacteriano seja severamente retardada, como no resfriamento, ou interrompida, como no congelamento. Assim, eliminam-se os riscos do desenvolvimento de microrganismos patogênicos causadores de toxinfecções e aumenta o tempo de prateleira, sem alterar o sabor, odor e a cor da carne (Aidani et al. 2014).

Pelo potencial de conservação, o sal de nitrito (sal de aspecto mais fino e de fácil diluição) vem sendo utilizado na conservação de cadáveres, com bons resultados antimicrobianos em cadáveres com cavidades abertas e resultados satisfatórios em cadáveres inteiros, sem abertura de cavidades. Sua composição é de 23% de sal de nitrito, 30% de etanol e 20% de Pluriol E400, 0,1% de óleo de orégano, sendo este com o intuito de melhorar o odor, 3% de ácido ascórbico e 23,9% de água (Janczyk et al. 2011).

## 2.4 Aspectos microbiológicos na conservação de peças anatômicas

A exposição de alunos e profissionais aos esporos suspensos no ar em laboratórios de anatomia pode levar a quadros alérgicos, acarretando, de acordo com a contaminação do ambiente e a intensidade da exposição, desordens do sistema nervoso central, respiratório e imune (Neto e Colombo, 2015).

A fixação das peças anatômicas é muito importante para que não haja contaminação, deterioração dos tecidos, e para garantir que se mantenham insolúveis, protegidas e firmes. Portanto, boas práticas de fixação e conservação são necessárias, para impedir a deterioração do material e a proliferação de patógenos causadores de doenças (Neto e Colombo, 2015; Rodrigues, 2010).

Ao ser avaliada a resistência de diferentes microrganismos ao formaldeído e seu efeito antimicrobiano em diversas concentrações, verificou-se que *Salmonella* sp. *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp. foram mais susceptíveis ao formaldeído que *Staphylococcus* sp. Os fungos mostraram-se mais resistentes que as bactérias, sendo o *Aspergillus niger* mais resistente que *Candida albicans* (Solomon, 1975).

A glicerina provoca desidratação de peças anatômicas, e possui ação antisséptica contra fungos e bactérias, bem como suprime odores prejudiciais à saúde como aqueles liberados pelo formaldeído (Krug et al. 2011).

A utilização de álcool etílico na fixação e de solução aquosa de cloreto de sódio à 30% na conservação de cadáveres de cães já foi avaliada com sucesso, apresentando baixa contagem microbiológica para os gêneros *Bacillus*, *E. coli* e *Pseudomonas*, e sem contaminação aparente à inspeção visual nos tanques e cadáveres, ausência de odor desagradável ou putrefação (Pereira et al. 2019).

## **2.5 Uso de cadáveres caninos no ensino da anatomia e da cirurgia veterinária**

Após a criação da lei Arouca (nº 11.794) e o estabelecimento das CEUAs, as quais controlam as atividades de ensino e pesquisas universitárias envolvendo animais, houve necessidade ainda maior da busca por métodos alternativos e éticos para o ensino e pesquisa que envolva animais.

Para a substituição do uso de animais vivos no ensino da cirurgia veterinária, vários métodos alternativos vêm sendo empregados sem que tragam prejuízo ao ensino das técnicas cirúrgicas (Rocha et al. 2019). Para isso, o trabalho conjunto das áreas de anatomia e cirurgia permitem a preservação adequada de cadáveres e ensino de excelência (Groscurth et al. 2001).

Modelos de ensino que utilizam cadáveres humanos são parte histórica da cirurgia. O uso secular destas técnicas continuam sendo o método de treinamento mais eficaz, devido a exposição à real anatomia e suas variações nos indivíduos, permitindo ao cirurgião em treinamento, apreciar os planos de dissecação e praticar o manuseio real dos tecidos (Stirling et al. 2014).

As técnicas de ensino ético em medicina veterinária vêm sendo utilizadas opondo-se à utilização de animais vivos na prática da técnica cirúrgica. O cadáver deve ser o mais semelhante possível em relação aos animais vivos, para que as técnicas estudadas possam ser utilizadas posteriormente em procedimentos cirúrgicos. A utilização de cadáveres, em determinadas situações, promove maior aprendizado, aumento na eficiência, diminuindo os custos, além da repetitividade do exercício, aprimorando as habilidades. O aumento da confiança e satisfação do aluno devido à diminuição do estresse durante o procedimento cirúrgico com cadáveres, beneficia o processo como um todo, desde que a fonte de cadáveres seja ética, e os animais sejam submetidos à eutanásia por razões médicas, morte natural ou acidentes (Silva et al. 2004; Knight, 2007).

O uso de cadáveres deve ser integrado ao modelo de ensino, como um treinamento das técnicas cirúrgicas necessárias a serem executadas nos animais vivos posteriormente, não indicando, alterações na performance cirúrgicas dos alunos (Carpenter et al. 1991). Em um estudo houve 95,7% de aceitação dos alunos em relação

a utilização de cadáveres quimicamente preparados e, 88,9% consideraram muito satisfatório o aprendizado utilizando-se os cadáveres (Silva et al. 2007), bem como 93,29% de aceitação a favor desse método de ensino com cadáveres quimicamente preparados (Silva et al. 2004).

Para o treinamento cirúrgico são utilizados animais que vieram a óbito em hospitais veterinários, abrigos, clínicas e que seriam descartados. Eles são fixados e utilizados como substitutos de animais vivos, preservando o respeito aos direitos dos animais e a consciência da bioética entre alunos, professores, pesquisadores e quaisquer profissionais que trabalhem com animais (Silva et al. 2007; Mathews et al. 2010).

No Brasil, 75,67% dos estudantes de uma Faculdade de medicina veterinária aprovaram o uso de cadáveres quimicamente preservados (com álcool etílico na fixação e solução de cloreto de sódio em tanques para conservação) no ensino de cirurgia e 81,08% eram a favor do treinamento cirúrgico inicial em cadáveres, seguido de prática em animais submetidos à cirurgia eletiva no Hospital Veterinário da FCAV Unesp Campus de Jaboticabal (Rocha et al. 2019).

O objetivo desse trabalho foi testar protocolos por meio do uso de conservante mais fixação e conservação anatômicas, em cadáveres de cães, com bom aspecto morfológico, biomecânico e microbiológico, visando ao ensino da anatomia e cirurgia veterinária.

### 3. OBJETIVOS

Objetivou-se, com este estudo:

- determinar a viabilidade de novos protocolos relacionados com técnicas anatômicas utilizando sal de cura previamente ao agente fixador composto por álcool etílico e formaldeído a 10% em diferentes proporções na fixação de cadáveres caninos;
- comparar se os cadáveres fixados e conservados apresentam resultados semelhantes aos cadáveres frescos no teste biomecânico tanto intragrupos quanto intergrupos, considerados ideais para treinamentos cirúrgicos por mimetizarem as condições de um cadáver fresco;
- averiguar se há presença de microrganismos na solução de conservação das amostras após fixação, bem como nos tempos de 30, 60, 90 e 120 dias em SACS a 30% por meio de teste microbiológico;
- analisar se a utilização do sal de cura interfere na coloração dos músculos de cadáveres de cães fixados com formaldeído associado ou não ao álcool etílico;

#### 4.REFERÊNCIAS

AIDANI, E.; AGHAMOHAMMADI, B.; AKBARIAN, M.; MORSHEDI, A.; HADIDI, M.; GHASEMKHANI, N.; AKBARIAN, A. (2014) Effect of chilling, freezing and thawing on meat quality: a review. **International Journal of Biosciences**, v.5, n.4, p.159-169.

ALVARENGA, J. (1992) Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: Daleck C. R. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia - Universidade Estadual Paulista. p. 33-39.

BEGER, O.; KARAGÜL, M.I.; KOÇ, T.; KAYAN, G.; CENGİZ, A.; YILMAZ, S.C.; OLGUNUS, Z.K. (2020) Effects of different cadaver preservation methods on muscles and tendons: a morphometric, biomechanical and histological study. **Anatomical Science International**, n. 295, p. 174-189.

BRASIL - **MINISTÉRIO DA SAÚDE** (2012) Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. 1.ed. Rio de Janeiro: Inca. 192p.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e estabelece as normas para seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 16 de julho 2009; (134): Seção 1; p. 2-5.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União**, 9 de outubro de 2008; (196): Seção 1; p. 1-4.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S. L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. (2002) Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, v. 32, p. 1019-1025. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782002000600016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782002000600016&lng=en&nrm=iso)>.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DRIEMEIER, D.; CONTESINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S. L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R.; SILVA, T. F. (2004) Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. **Ciência Rural**, v. 34, p. 147-153. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782004000100022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782004000100022&lng=en&nrm=iso)>.

CAMARGO, D. C.; CAMARGO, P. C.; LEAL, L. M.; FILHO, S. P. G.; MARTINS, L. L.; SHIMANO, A. C.; MACHADO, M. R. F. (2014) Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (Cuniculus paca) a fresco e conservado em glicerina 98%. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 34, v. 2, p. 185-191.

CARPENTER, L.G.; DONALD, L.; PIEMARTTEI, D.L.; SALMAN, M.D.; ORTON, C.; NELSON, A.W.; SMEAK, D.D.; JENNINGS, P.B.; TAYLOR, R.A. A (1991) Comparison of surgical training with live anesthezed dogs and cadavers. **Veterinary Surgery**, v.20, p. 373-378.

CURY, F. S.; CENSONI, J. B.; AMBRÓSIO, C. E. (2013) Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 33, p. 688-696. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100736X2013000500022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2013000500022&lng=en&nrm=iso)>.

FREITAS, I. B.; SOUZA, A. M.; SANTOS, R. M. B. (2009) Técnica anatômica aplicada na conservação de cortes segmentares em *Canis familiaris* e *Decapterus macarellus*. **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 9, UFRPE**, Recife. p. 1-3. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0721-2.pdf>

GROSCURTH, P.; EGGLI, P.; KAPFHAMMER, J.; RAGER, G. J.; HORNUNG, P.; FASEL, J.D.H. (2001) Gross Anatomy in the Surgical Curriculum in Switzerland: Improved Cadaver Preservation, Anatomical Models, and Course Development. **The Anatomical Record (New Anat.)** Wiley-Liss, Inc. n. 265, p. 254-256.

GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M. R. F.; SHIMANO, A. C.; TERÇARIOL, C. A. S.; VOLPON, J. B.; DALECK, C. R. (2008) Propriedades tensiométricas comparadas entre fragmentos do centro tendíneo do diafragma, pericárdio fibroso e peritônio parietal de bovinos não conservados e conservados em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 127-135.

IAMARINO, L.Z.; OLIVEIRA, M.C.; ANTUNES, M.M.; OLIVEIRA, M.; RODRIGUES, R.O.; ZANIN C.I.C.B; SCHIMILE. M.; LIMA, A.A. (2015) Nitratos em Produtos Cárneos Enlatados e/ou Embutidos. **Gestão em Foco**, n. 07, p. 246-251.

IARC – **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER** (2006) Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. v.88. Lyon France 497p.

JANCZYK, P.; WEIGNER, J.; LUEBKE-BECKER, A.; KAESSMEYER, S.; PLENDL, J. (2011) Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy--A study based on histo- and microbiological analyses. **Ann Anat**, n. 193, p. 71-75.

JOHANNING, E.; BIAGINI, R.; HULL, D.; MOREY, P.; JARVIS, B.; LANDSBERGIS, P. (1996) Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotryschartarum*) in a water-damaged office environment. **Internal Archives of Occupation and Environmental Health**, n. 68, v.4, p. 207-218.

KNIGHT, A. (2007) The Effectiveness of Humane Teaching Methods in Veterinary Education. **ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation** Tokyo, v. 24, n. 2, p. 91-109.

KRUG, L.; PAPPEN, F.; ZIMMERMANN, F.; DEZEN, D.; RAUBER, L.; SEMMELMANN, C.; ROMAN, L. I.; BARRETA, M. H. (2011) Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira. **Instituto Federal Catarinense**, Concórdia, SC. p. 1-6.

LEAL, L. M.; FERREIRA, A. R. S.; REIS, A. C. G.; MARTINS, L. L.; FILHO, S. P. G.; MACHADO, R. F. (2014) O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1383-1391.

LOMBARDERO, M.; YLLERA, M.M.; COSTA-E-SILVA, A.; OLIVEIRA, M.J.; FERREIRA, P.G. (2017) Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde free embalming method for veterinary gross anatomy. **Journal of Anatomy**, v. 2, n. 231, p. 309-317.

MATHEWS, K.G.; RILEY, K.; LASCELLES, B.D.X.; DERNELL, W.S. (2010) Preparation of Canine and Feline Cadavers for Surgical Laboratories. **Veterinary Surgery**, v.39, p.224-225.

MENEZES, C.L.M. (2012) Preservação de cadáver de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) com a solução de Larssen modificada para treinamento em cirurgia videolaparoscópica. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**. 82f.

NAM, S.M.; MOON, J.; YOON, H.; CHANG, B.; NAHM, S. (2020) Comparative evaluation of canine cadaver embalming methods for veterinary anatomy education. **Anatomical Science International**, n. 95, p. 498-507.

NETO, J.C.; COLOMBO, T.E. (2015) Isolation and identification of filamentous fungi in anatomical parts preserved formol. **Journal of the Health Sciences Institute**. v. 33, n.3, p. 218-222.

NUNES, T. C.; OLIVEIRA, F. S.; GAMON, T. H. M.; GUASTALLI, B. H. L.; CARMO, L.G.; DEL QUIQUI, E. M. (2011) Análise da textura de músculos peitorais submetidos á fixação e conservação em álcool. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, p. 464-467.

OLIVEIRA, F. S. (2014) Assessing the effectiveness of 30% sodium chloride aqueous solution for the preservation of fixed anatomical specimens: a 5-year follow-up study. **Journal of Anatomy**, n. 225, p. 118-121.

OLIVEIRA, L. N.; RODRIGUES, G. S.; GUALDI, C. B.; FEIJÓ, A. G. S. (2013) A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. **Revista Bioethikos**, v. 2, n. 7 p. 139-149.

PEREIRA, N.; CARDOZO, M.V.; ROCHA, T.A.S.S.; ÁVILA, F.A.; MACHADO, M.R.F.; OLIVEIRA, F.S. (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.

ROCHA, T.A.S.S.; SANTOS, C.C.C.; IOZZI, M.T.; DIAS, R.S.; ZERO, R.C.; CARDOZO, M.V.; OLIVEIRA, F.S. (2019) Chemically prepared dog cadavers in teaching of surgical technique - evaluation by students of a veterinary medicine course. **Acta Scientiae Anatomica**, v1, p.136-140.

RODRIGUES, H. (1998) **Técnicas Anatômicas**. 2ª ed. Arte Visual, Vitória, ES. p. 222.

RODRIGUES, H. (2010) **Técnicas anatômicas**. 3ª ed. GM GRÁFICA & EDITORA. Vitória-ES. p. 269.

ROSSET, R. (1994) Otras carnes y productos cárnicos. In: BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J., org. **Microbiología Alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria**. Zaragoza: Acribia, p.247-261.

SAMPAIO, F.J.B. (1989) Estudo do crescimento do rim humano durante o período fetal. p.102. **Tese (Doutorado em Morfologia)**, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

SILVA, E. C. (2002) Aspectos biomecânicos musculares relacionados à administração experimental de corticosteróide sistêmico. 2002. 94 f. **Dissertação (mestrado em Bioengenharia)** – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

SILVA, R. M. G.; MATERA, J. M.; RIBEIRO, A. A. C. M. (2004) Preservation of cadavers for surgical technique training. **Veterinary Surgery**, v.33, p. 606-608.

SILVA, R. M. G.; MATERA, J.M.; RIBEIRO, A.A.C.M. (2007) New Alternative Methods to Teach Surgical techniques for Veterinary Medicine Students despite the Absence of Living Animals. Is that an Academic Paradox? **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.36, p. 220-224.

SILVA, E. M.; DIAS, G.; TAVARES, M.; MARQUES, T.; FURTADO, J.M. (2008) Estudo analítico da técnica de glicerinação para conservação de peças anatômicas – Experiência da disciplina de anatomia humana do departamento de morfologia do UniFOA. **Pós Graduação**. Caderno UniFOA Edição Especial. 4p.

SILVA, M.Z.M. (2010) A importância da biossegurança nos laboratórios de anatomia patológica dos hospitais públicos diante do manuseio do formol. 62p. **Dissertação (Monografia de pós graduação)** – UNB, Brasília.

SOLOMON, W.R. (1975) Assessing fungus prevalence in domestic interiors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.56, n.3, p. 235-242.

SOUZA, S. A. (1982) Ensaio de tração. In: Ensaio mecânicos de material metálico. 3ª ed. São Paulo, **Editora Blücher Ltda**. cap. 1, p. 3-58.

STIRLING, E.R.B.; LEWIS, T.L.; FERRAN, N.A. (2014) Surgical skills simulation in trauma and orthopaedic training. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. v.9 p.126-135.

WHO (1991) – World Health Organization - IPCS International Programme on Chemical Safety – Formaldehyde - **Health and Safety Guide**, n. 57, 1991. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>.

## **CAPÍTULO 2 – Análise biomecânica em cadáveres de cães submetidos a fixação por meio de diferentes protocolos e análise microbiológica da solução de conservação visando ao ensino da anatomia e da cirurgia veterinária.**

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi determinar a viabilidade de novos protocolos relacionados com técnicas anatômicas para fixação e conservação de cadáveres de cães, por meio da injeção da solução de sal de cura, previamente ao agente fixador composto por álcool etílico (AE) e formaldeído em diferentes proporções e solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) na conservação. Análises biomecânicas e microbiológicas foram realizadas durante a fixação e conservação. Antes da injeção de sal de cura e do processo de fixação dos cadáveres foi realizada a coleta das amostras frescas da pele e jejuno para serem utilizadas como amostras controle. Os cadáveres de cães foram sorteados em 4 grupos composto por oito animais e fixados: G1 (100% formaldeído), G2 (30% formaldeído e 70% AE), G3 (70% formaldeído e 30% AE) e G4 (50% formaldeído e 50% AE) e conservação em SACS 30% nos tempos D0 (9 dias após fixação), 30, 60, 90 e 120 dias. Os testes biomecânicos de tração foram realizados em amostra de pele e jejuno em todos os momentos sendo fresco (amostra controle), pós fixação e conservação. Também foram realizadas análises microbiológicas (utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade) da solução ao final da fixação e durante a conservação em SACS 30%. A análise de variância de uma classificação (One-Way ANOVA) foi utilizada para medidas repetidas (tempos) para cada tratamento separadamente, bem como foi realizada a comparação entre as amostras controle (frescas) e as amostras obtidas em tempos de tratamento com o teste T pareado. Não houve diferença significativa na força máxima de ruptura (FMR) da pele e do jejuno entre o controle e os momentos de fixação e conservação. Comparando amostra fresca com o tempo D120, as menores variações foram observadas nos grupos G2 e G3 que apresentaram a FMR das amostras com diferença entre médias de pele (-14,2N) e jejuno (-0,28). Houve diferenças significativas em todos os momentos para o alongamento máximo de ruptura (AR) da pele e do jejuno. Os G3 e G4 apresentaram menores variações no AR (1,32 mm na pele e 0,23 mm no jejuno). As análises microbiológicas não mostraram qualquer contaminação (microrganismos aeróbios e anaeróbios) para os Grupos 1, 2, 3. Para o G4 no tempo D120, *Bacillus spp.* foram identificados na quantidade de  $1,0 \times 10$ . Este estudo sugeriu que o G3 (sal de cura, 30% AE e 70% de formaldeído) é a melhor opção para fixação de cadáveres para espécimes permanentes nas aulas de anatomia e cirurgia devido à melhor maleabilidade e coloração dos espécimes por meio da análise subjetiva nos músculos da região de membro torácico e pélvico, além de controle microbiológico.

**Palavras-chave:** álcool etílico, cloreto de sódio, formaldeído, sal de cura, técnicas anatômicas.

## **CAPÍTULO 2 – Biomechanical analysis of dog cadavers submitted to fixation using different protocols and microbiological analysis of the conservation solution aiming at teaching anatomy and veterinary surgery.**

**ABSTRACT** - The objective of the present study was to determine the feasibility of new protocols related to anatomical techniques for fixation and conservation of dog cadavers, through the injection of a curing salt solution, prior to the fixation agent composed of ethyl alcohol (EA) and formaldehyde in different proportions and 30% sodium chloride aqueous solution (30% SACS) in storage. Biomechanical and microbiological analyzes were performed during fixation and conservation. Before the injection of curing salt and the process of fixing the corpses, fresh samples of the skin and jejunum were collected to be used as control samples. The dog cadavers were randomly assigned to 4 groups consisting of eight animals and fixed: G1 (100% formaldehyde), G2 (30% formaldehyde and 70% AE), G3 (70% formaldehyde and 30% AE) and G4 (50% formaldehyde and 50% AE) and conservation in SACS 30% at times D0 (9 days after fixation), 30, 60, 90 and 120 days. The biomechanical traction tests were performed on skin and jejunum samples at all times, being fresh (control sample), post fixation and conservation. Microbiological analyzes were also performed (using the deep plating technique) of the solution at the end of fixation and during storage in 30% SACS. The analysis of variance of a classification (One-Way ANOVA) was used for repeated measures (times) for each treatment separately, as well as the comparison between control samples (fresh) and samples obtained at treatment times with the test T paired. There was no significant difference in skin and jejunal maximum rupture force (MRF) between control and fixation and conservation times. Comparing the fresh sample with the D120 time, the smallest variations were observed in the G2 and G3 groups that presented the FMR of the samples with a difference between the skin (-14.2N) and jejunum (-0.28) means. There were significant differences at all time points for the maximum elongation at break (RA) of the skin and jejunum. The G3 and G4 presented smaller variations in the AR (1.32 mm in the skin and 0.23 mm in the jejunum). Microbiological analyzes did not show any contamination (aerobic and anaerobic microorganisms) for Groups 1, 2, 3. For G4 at time D120, *Bacillus* spp. were identified in the amount of  $1.0 \times 10$ . This study suggested that G3 (curing salt, 30% AE and 70% formaldehyde) is the best option for fixing cadavers for permanent specimens in anatomy and surgery classes due to the better malleability and coloration of specimens through subjective analysis in the muscles of the thoracic and pelvic limb region, in addition to microbiological control.

**Keyword:** ethyl alcohol, sodium chloride, formaldehyde, curing salt, anatomical techniques.

## INTRODUÇÃO

Como prática laboratorial, com estudo de cadáveres permite o conhecimento da anatomia macroscópica, necessita-se de material que proporcione aprendizado de maneira equivalente ao tecido de um cadáver fresco (Lombardero et al. 2017; Nam et al. 2020).

Ademais o ensino e pesquisa na medicina veterinária deve, sempre, levar em consideração o bem estar animal, visto que a Lei n. 11794 (Lei Arouca), foi criada em 2008 e passou a reger as atividades de experimentação animal por meio das Comissões de Ética Institucionais ao Uso de Animais (CEUA) (Oliveira et al. 2013; Nam et al. 2020).

Neste cenário, a obtenção de modelos anatômicos alternativos, é necessário por meio da realização de técnicas de fixação e conservação. Com isso, a função do fixador é prevenir autólise, facilitar o corte dos tecidos e tornar a fração proteica do tecido insolúvel, preservando componentes estruturais, sua histologia por meio das propriedades antissépticas. Já os conservantes têm por objetivo manter a estrutura fixada íntegra, para que permita o uso duradouro da peça anatômica (Rodrigues, 2010).

Dentre as soluções utilizadas para esta finalidade, o formaldeído a 10% é o meio mais utilizado tanto para fixação como conservação de cadáveres, no entanto, este agente apresenta forte odor pungente e sufocante para Professores, alunos e técnicos de laboratório que trabalham constantemente neste ambiente. O cadáver apresenta aspecto enrijecido e coloração muscular acinzentada dificultando o aprendizado tanto anatômico e cirúrgico (Rodrigues, 2010; Neto & Colombo, 2015).

A solução saturada de cloreto de sódio é utilizada na preservação de cadáveres (Oliveira, 2014; Lombardero et al. 2017). Os cadáveres preservados com esta solução mantêm a cor, textura, movimento articular e flexibilidade mais realistas que quando comparados àqueles preservados em formaldeído (Nam et al. 2020; Beger et al. 2020).

Buscando sobrepor os efeitos indesejáveis da solução de formaldeído a 10% e no anseio de desenvolver um protocolo de fixação e conservação permanentes de cadáveres de cães com aspecto morfológico e biomecânico similares ao de corpos frescos, prospectou-se o presente estudo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Os Animais**

No estudo foram utilizados 32 cadáveres de cães, 13 machos e 19 fêmeas, adultos, que vieram a óbito por causas que não envolviam alterações morfológicas evidentes, tais como, grandes massas tumorais, traumas lacerantes extensos ou fraturas ósseas. Todos foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão Preto, SP, após aprovação pelo Departamento Jurídico Municipal (processo 02.2014/000027-1) e já possuem aprovação do comitê de ética da Unesp Campus de Jaboticabal para utilização (processo 4593/19). Logo após o óbito, os animais foram congelados (freezer a -18°C) por um período de dois meses e transportados ao Laboratório de Anatomia Animal da Unesp de Jaboticabal, SP, localizado a 50 Km de distância.

Animais com peso corporal entre 5 a 15 kg e com escore de condição corporal de 4 (costelas facilmente palpáveis, com mínima cobertura de gordura; cintura abdominal facilmente notada, quando vista dorsalmente; prega abdominal evidente) ou 5 (costelas palpáveis e sem excesso de cobertura de gordura; cintura abdominal observada caudalmente às costelas quando vista dorsalmente; prega abdominal evidente quando vista lateralmente), considerando ideais por Laflamme (1997), numa escala de 1 a 9, foram selecionados no presente experimento.

Todos receberam identificação individual, mediante utilização de película plástica demarcada com pirógrafo, referindo ao grupo, número e peso do animal e posteriormente fixada no membro torácico com barbante, na altura da articulação cubital direita.

### **Técnica Anatômica Utilizada**

Os animais foram pesados e descongelados em água por 12h em temperatura ambiente (quando não encontrado alterações cadavéricas que pudessem comprometer o processo de fixação e conservação), foram distribuídos aleatoriamente por meio de sorteio em quatro grupos de oito animais cada.

Tricotomia prévia com lâmina de aço inoxidável foi realizada em todos os animais com cuidado especial as regiões torácica e abdominal para não lesar a pele em nenhum momento, pois a retirada do pelo minimiza a contaminação microbiana da solução de conservação em que estes cadáveres permaneceram em todo o período do experimento.

Nos oito animais de cada grupo, antes de iniciar a injeção da solução de sal de cura (SC) e a solução de fixação, foi coletado amostra de pele e jejuno, considerado amostra controle (amostra fresca). Posteriormente foi infundida a solução de sal de cura, seguida da solução de fixação composto por álcool etílico e formaldeído a 10% em diferentes proporções (Tabela 1).

**Tabela 1:** Média e desvio padrão do peso corporal dos cadáveres de cães e técnicas anatômicas utilizadas por grupo), após infusão de solução de sal de cura

Grupo	Número de cadáveres	Peso (Kg)	Técnica anatomia utilizada	
			Álcool etílico (AE)	Formaldeído a 10% (F)
G1	8	8,33±2,35	–	100%
G2	8	7,94±2,04	70%	30%
G3	8	8,29±2,14	30%	70%
G4	8	8,91±3,22	50%	50%

Inicialmente, foi injetada solução de sal de cura (20% de NaCl + 1% de Nitrito + 1% de Nitrato de sódio e 78% de água), na quantidade de 120 mL/kg, via artéria carótida comum, com cânula 40 x 16 mm (16 G). Em seguida, injetou-se, na mesma via, a solução composta por álcool etílico e formaldeído, em diferentes proporções, na quantidade de 150 mL/Kg (Figura 1).

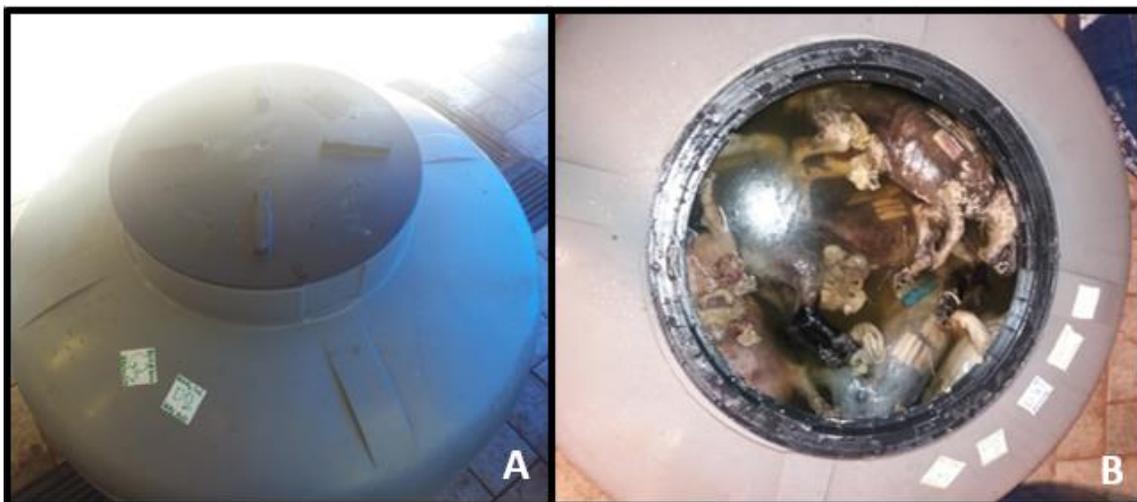


Figura 1. Etapas da infusão de solução de sal de cura e solução de fixação na artéria carótida. A: Incisão na região ventral e mediana cervical de cadáver canino; B: Artéria carótida comum com cânula inserida; C: Infusão de solução de sal de cura seguida da infusão da solução de fixação.

Após a injeção do fixador, foi realizada incisão de, aproximadamente, 14 cm na linha média do abdome, para remover o líquido acumulado (resultante da perfusão da solução de sal de cura e da solução de fixação) na cavidade abdominal mediante utilização de água corrente. Para retirada de excretas da região de colo descendente e reto foi realizada limpeza desta localidade para diminuir a contaminação da solução de conservação, em que os cadáveres permaneceram durante todo o experimento, com solução de hipoclorito de sódio a 0,25% para saída de excretas utilizando uma sonda uretral de 20 cm de comprimento acoplada a uma seringa de 60 mL.

A seguir, os cadáveres foram acondicionados em caixas plásticas com capacidade total de 310 litros (1 caixa por grupo contendo 8 animais) e tampa rosqueável, contendo 180 litros de formaldeído a 10% e permanecendo neste meio durante 7 dias para completar o processo de fixação. Os cadáveres foram lavados em água corrente durante

dois dias para serem, então, acondicionados em caixas com 180 litros de solução aquosa de cloreto de sódio a 30% para conservação (Figura 2).



**Figura 2.** Imagem fotográfica das caixas plásticas com 180 litros de solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) contendo em cada caixa 8 cães, demonstrando em A (caixa fechada), B (caixa aberta com cães devidamente armazenados).

### **Coleta do Material**

As amostras de pele e jejuno foram coletadas nos oito animais de cada grupo, em triplicata, porém, antes da infusão das soluções de fixação e conservação, essas amostras foram submetidas imediatamente ao teste de tração biomecânico. Desta forma, as amostras frescas serviram de controle (amostras controle), pois estes cadáveres foram fixados e, posteriormente foi realizada a conservação.

Para a colheita das amostras de pele e jejuno, foi utilizado um molde de aço inoxidável de 1 x 5 cm elaborada especificamente para a realização do experimento, podendo assim padronizar o tamanho da amostra. (Figura 3)



**Figura 3.** Imagem fotográfica do uso do molde de aço inoxidável de 1 x 5 cm utilizado durante coleta das amostras de pele e jejuno para os ensaios biomecânicos em cadáveres de cães quimicamente preparados.

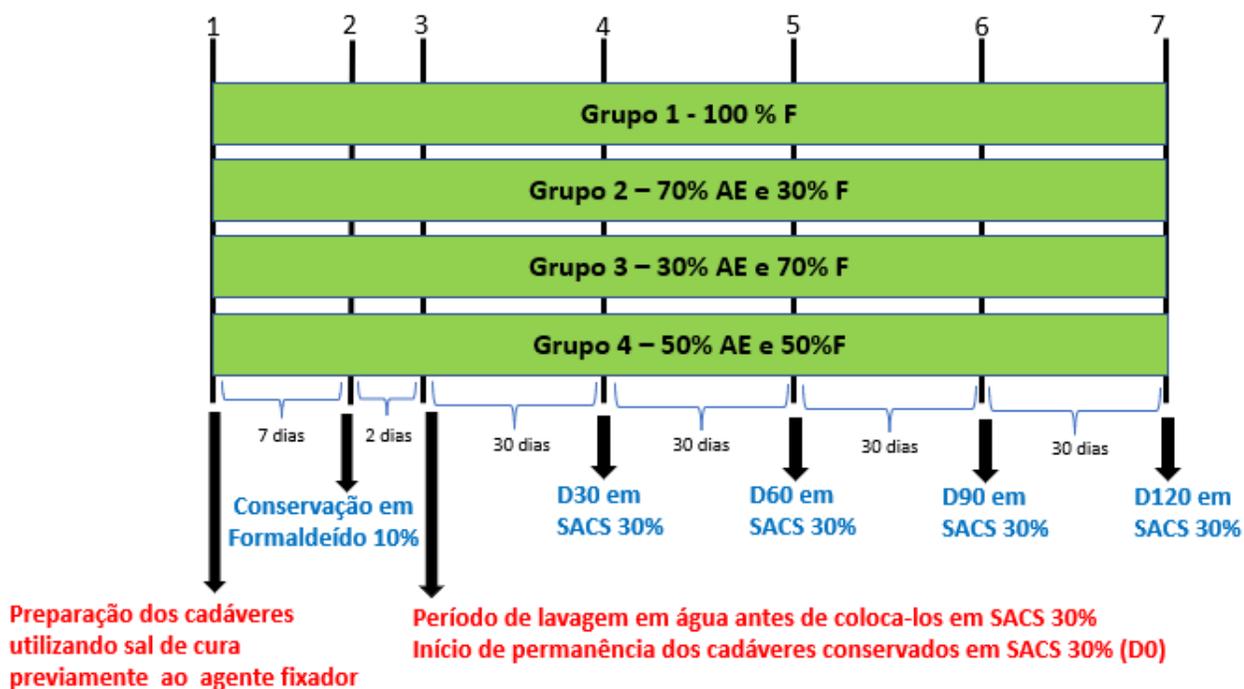
Optou-se pela utilização da pele e do jejuno devido à maior disponibilidade amostral tecidual e pela grande utilização destes no ensino da técnica cirúrgica. Após a coleta das amostras controle, procedeu as demais coletas também em triplicata, nos seguintes momentos demonstrados abaixo, bem como na figura 4:

- Grupo 1 (100%F): controle (cadáveres frescos); Dia 0 (considerando os sete dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10%, mais dois dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação em SACS 30%.

- Grupo 2 (30%F e 70%AE): controle (cadáveres frescos); Dia 0 (considerando os sete dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10%, mais dois dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação em SACS 30%.

- Grupo 3 (70%F e 30%AE): controle (cadáveres frescos); Dia 0 (considerando os sete dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10%, mais dois dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação em SACS 30%.

- Grupo 4 (50%F e 50%AE): controle (cadáveres frescos); Dia 0 (considerando os sete dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10%, mais dois dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação em SACS 30%.

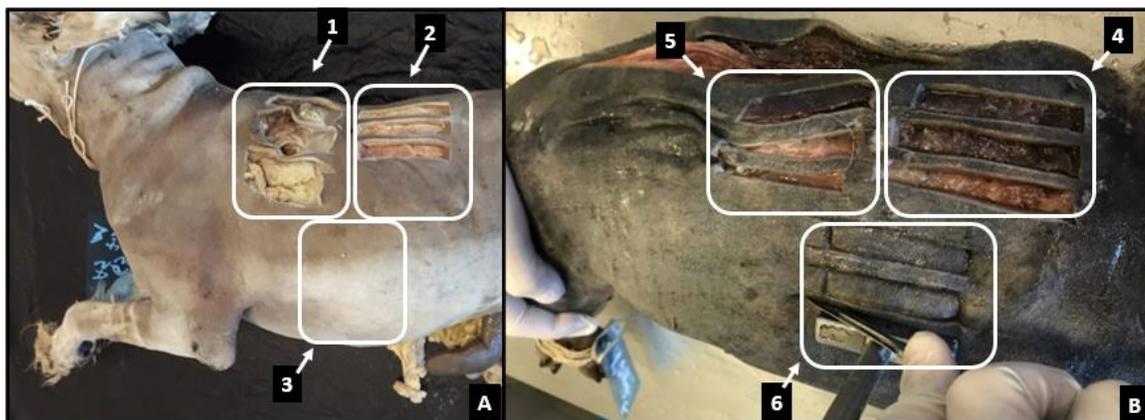


**Figura 4.** Cronograma de preparo dos cadáveres para posterior coleta de amostras de pele e jejuno nos tempos numerados em 1 (coleta das amostras controle e preparação dos cadáveres utilizando sal de cura previamente ao agente fixador); 2 (conservação em formaldeído 10%); 3 Período de lavagem em água antes de coloca-los em SACS 30% e início de permanência dos cadáveres conservados em SACS 30% (D0); 4 (D30); 5 (D60); 6 (D90) e 7 (D120) no grupo 1 (100%F), grupo 2 (30%F e 70%AE), grupo 3 (70%F e 30%AE) e grupo 4 (50%F e 50%AE)

Para a colheita das três amostras de pele, posicionava-se o cadáver em decúbito lateral direito. Com o auxílio de bisturi (lâmina número 24), contornava-se o molde excisando os fragmentos cutâneos de pele, em região lateral de tórax e abdome, coletados longitudinalmente (craniocaudal), que é a direção que proporciona maior resistência à tração, conforme demonstrado em ovelhas (Jacinto et al. 2004, Haar et al. 2013). As colheitas de pele referente ao momento fresco (amostra controle), D0 e D30 foram realizadas no antímero esquerdo e no momento D60, D90 e D120, no antímero direito, em todos os grupos (Figura 5).

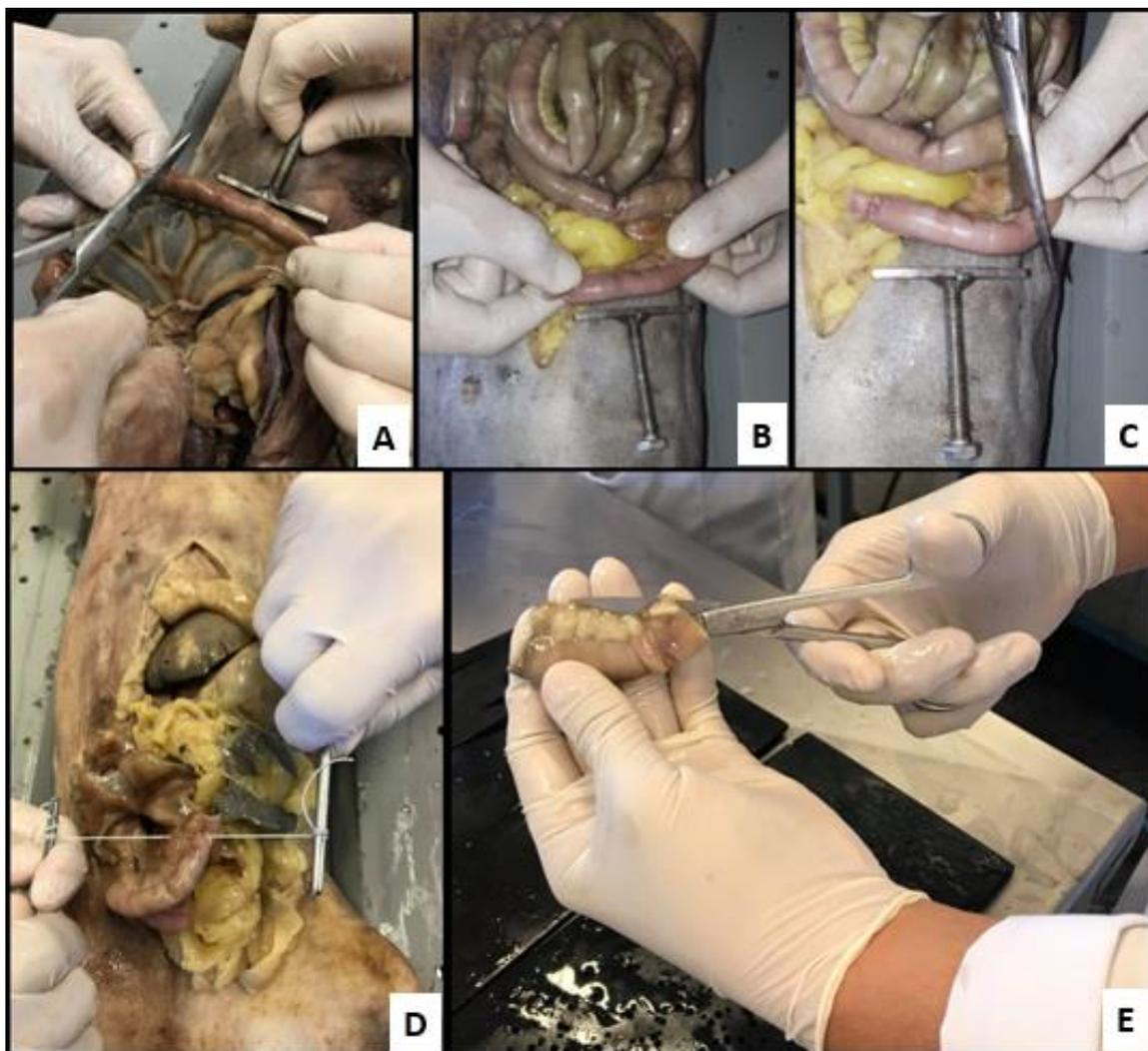
Para a colheita das três amostras de jejuno, os animais foram posicionados em decúbito dorsal utilizando uma maca confeccionada para posicionar o animal de forma adequada, exteriorizando-se o jejuno por tração manual por meio da celiotomia mediana.

Após a identificação da flexura duodenojejunal, posicionava-se o molde de aço sobre o intestino, delimitando-o e seccionando-o com tesoura de Metzenbaum, em sentido longitudinal. Posteriormente, foi realizada a secção da face mesentérica, expondo-se o lúmen sob o qual foi posicionado o molde para incisão com lâmina de bisturi (Figura 6).



**Figura 5.** Imagens fotográficas dos locais de coletas de pele de cadáveres de cães quimicamente preservados. A: Antímero esquerdo e coleta das amostras em triplicata nos momentos fresco (amostra controle), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem antes de colocar no tanque com SACS 30%) e D30 (30 dias de conservação em SACS 30%) setas com número 1, 2 e 3 respectivamente; B: Antímero direito e coleta das amostras em triplicata nos momentos D60 (60 dias de conservação em SACS 30%), D90 (90 dias de conservação em SACS 30%) e D120 (120 dias de conservação em SACS 30%) setas com número 4, 5 e 6 respectivamente.

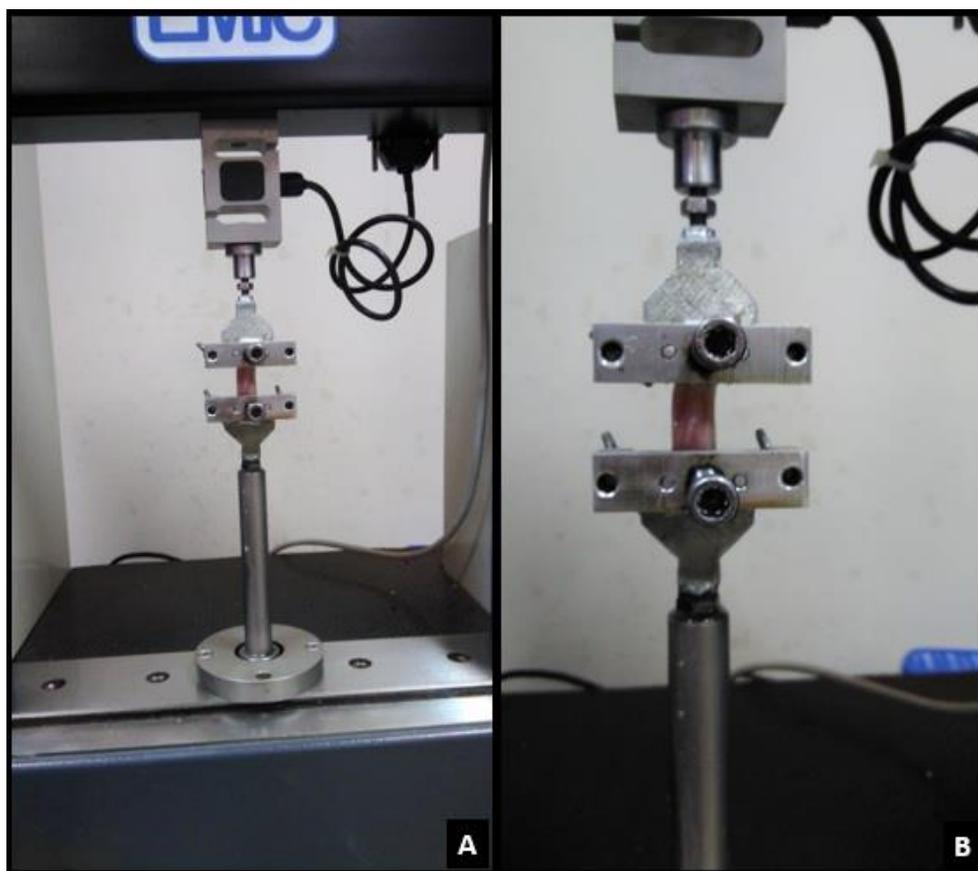
Logo após a coleta das amostras de pele e jejuno, estas foram acondicionadas em frascos identificados individualmente, protegidas de desidratação por exposição e imediatamente transportados ao Laboratório de Anatomia Cirúrgica, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – Unesp de Jaboticabal, para as análises biomecânicas.



**Figura 6.** Imagem fotográfica demonstrando as etapas do procedimento de coleta amostral de jejuno. A: posicionamento do jejuno por meio do molde e corte do fragmento intestinal após a flexura duodenojejunal; B: Posicionamento do molde para obtenção do padrão de comprimento das amostras; C: Corte do outro segmento intestinal; D: Fechamento da alça intestinal com fio após remoção do fragmento intestinal; E: Corte do fragmento intestinal na face mesentérica em sentido longitudinal.

## Análise Quanto à Resistência dos Tecidos

Para avaliação da resistência tecidual, foi utilizado uma Máquina Universal de Ensaio (Modelo Emic DL 2000), com célula de carga de 500 N e suporte de acionamento eletromecânico, com velocidade de 100 mm/min. Também foram utilizadas garras de tração por acionamento de compressão manual. O equipamento é pertencente ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal (Figura 7).



**Figura 7.** Imagem fotográfica da máquina universal de ensaios biomecânicos (EMIC® DL 2000) utilizada para o teste de tração das amostras de pele e jejuno de cão submetidos à fixação com diferentes proporções de álcool etílico e formaldeído e conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30%. A: garra de acionamento por compressão manual, acoplada em célula de carga de 500 N; B: detalhe de amostra de pele presa nas garras de compressão manual.

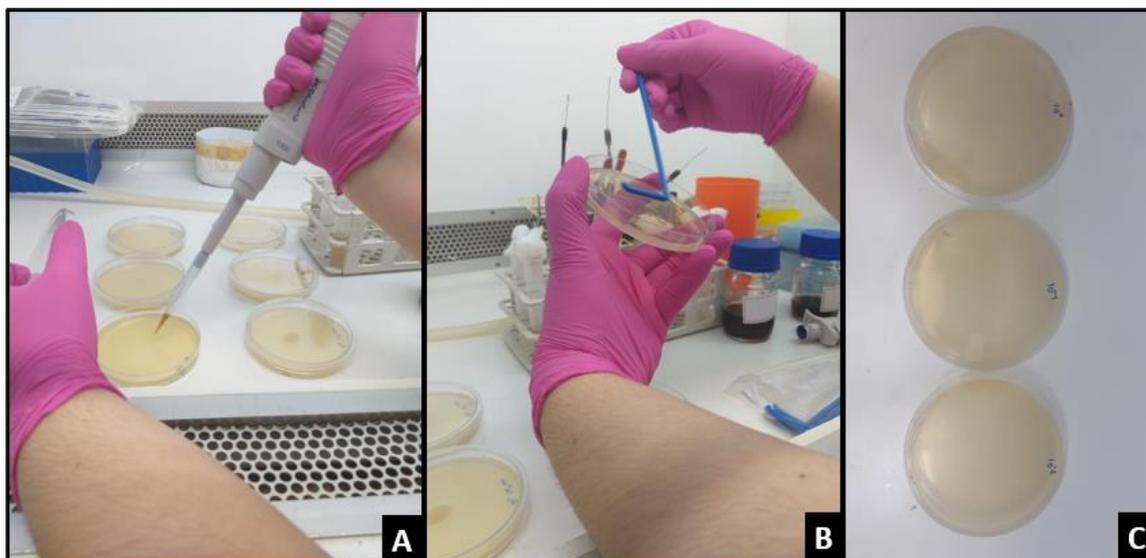
As amostras de pele e jejuno foram submetidas ao teste de tração analisando a força e deslocamento (alongamento), até o rompimento tecidual completo, gerando-se valores referentes à força máxima aplicada Newtons (N) ou Quilograma força (Kgf) e deslocamento (alongamento) em (mm).

### **Avaliação Microbiológica e Contagem de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Mesófilas Totais**

Amostras foram colhidas ao final da fixação e durante a conservação, exceto no D0, ou seja, após sete dias no formaldeído e nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias em SACS 30%. Um frasco de 100mL com tampa previamente esterilizado, identificado quanto ao meio fixação/conservação, data, grupo e momento avaliado. Após a coleta, o material foi devidamente encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da FCAV-UNESP Jaboticabal para a realização das análises microbiológicas.

A quantificação das bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis foi realizada utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade, também conhecida como *Pour Plate*. Nesta técnica, dilui-se a amostra em até cinco vezes, em que para cada diluição, utiliza-se 1,0 mL como inóculo, em duplicata, distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas. Posteriormente, verte-se o meio fundido e esfriado a 45°C em banho-maria, sobre a placa de Petri contendo a suspensão diluída da amostra. O material é homogeneizado por meio de movimentos circulares no sentido horário e anti-horário, repetidos por cerca de 10 vezes. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufas na temperatura e atmosfera apropriadas, por 24 horas (Figura 8).

As placas para contagem de microrganismos aeróbios foram armazenadas diretamente em estufa bacteriológica, enquanto as placas para contagem de microrganismos anaeróbios foram armazenadas em jarras de anaerobiose com a utilização de Aneroback (Probac) a 37°C por 24 horas. A contagem da Unidade Formadora de Colônia (UFC) foi realizada por meio de lupa.



**Figura 8.** Imagens fotográficas do procedimento de semeadura das amostras do meio de conservação a base de formaldeído aos 7 (sete) dias e aos 30, 60, 90 e 120 dias em meio composto por SACS 30% de cadáveres de cães fixados com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções, para análise microbiológica, sendo em A: Diluição; B: Esfregaço e C: Cultivo nas Placas de Petri.

Após a contagem, foram isoladas cinco colônias de cada placa, com características fenotípicas diferentes entre elas, em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) sendo então incubadas a 37°C por 24 horas para posterior identificação.

### Identificação Bacteriana

As colônias foram submetidas à coloração de Gram para classificação inicial e então semeadas em meios de cultura seletivos para os gêneros analisados, sendo eles: Agar Mac Conkey, para avaliação de *Pseudomonas* e *Escherichia coli*; Agar Sulfato Polimixina Sulfadizina (SPS), para identificação do gênero *Clostridium*; Agar Base Mannitol Yolk Polymixin (MYP), para isolamento de *Bacillus* e Agar Sangue Azida para identificação de *Staphylococcus*.

Após incubação à 37°C por 24 horas, os isolados foram avaliados novamente pelo método de Gram quanto à morfologia celular e posteriormente, foram submetidas às

provas bioquímicas específicas para confirmação de cada gênero ou espécie (Barrow & Feltham, 1993).

### **Análise subjetiva da coloração muscular**

Após o período de conservação em SACS 30%, foram realizadas incisões nos músculos bíceps femoral e vasto lateral, glúteo superficial e glúteo médio, e músculos deltoide porção escapular, tríceps braquial cabeça longa e tríceps braquial cabeça lateral para avaliação da musculatura atribuindo os escores de 1 a 5, sendo, para coloração amarelada (escore 1), vermelho-claro (escore 2), vermelho-vivo (escore 3), vermelho-escuro (escore 4) e acinzentado (escore 5).

A avaliação dos escores foi sempre feita pelo mesmo observador, médico veterinário com experiência em preparo de material anatômico.

### **Análise Estatística**

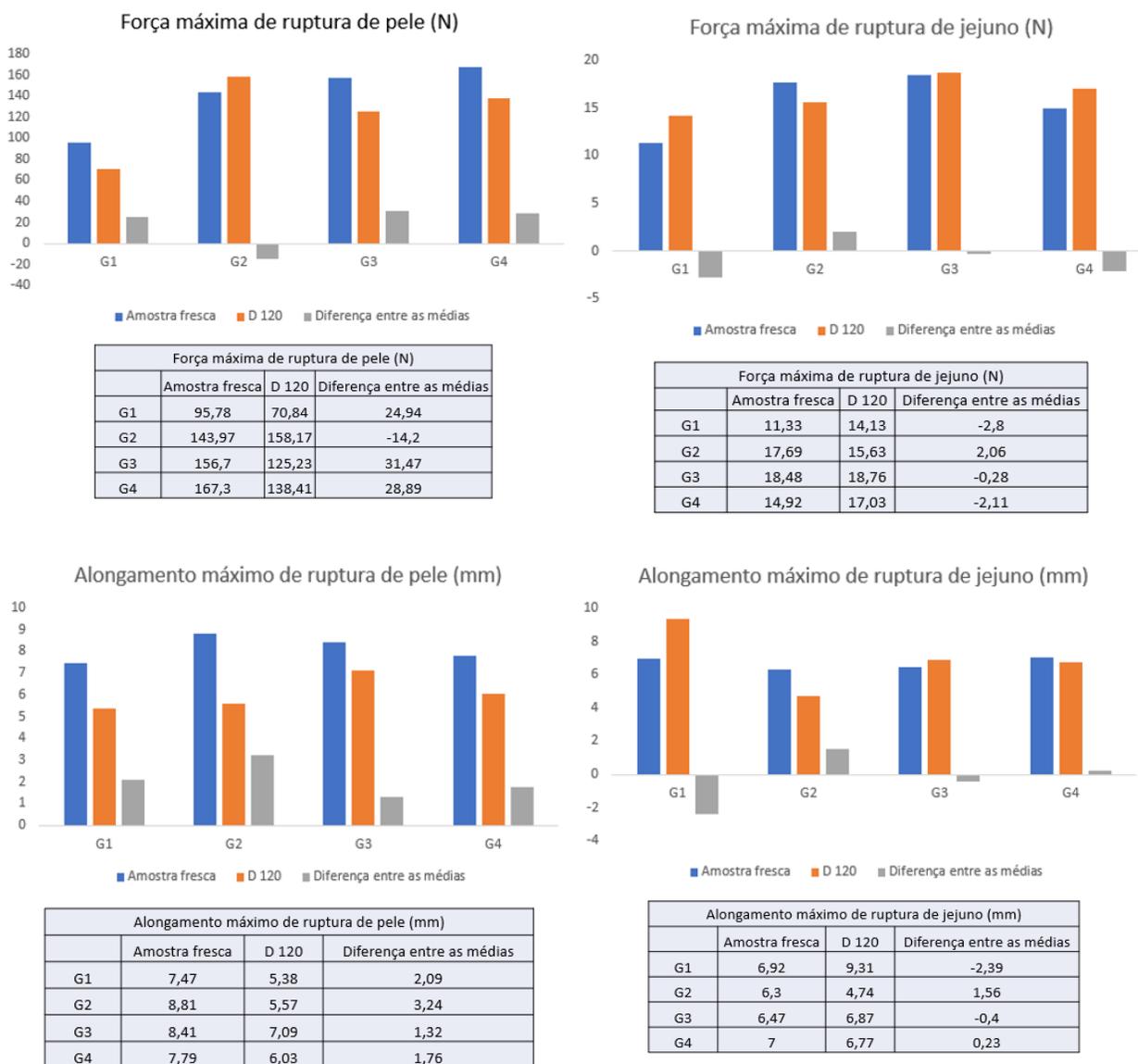
As medições foram realizadas em triplicata, e cada dado foi obtido a partir da média aritmética de cada tréplica. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar se as variáveis seguiam distribuição normal, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste Brown-Forsythe. A análise de variância de uma classificação (One-Way ANOVA) foi utilizada para as medidas repetidas (TEMPOS) para cada tratamento separadamente. Ainda para cada tratamento, foi realizada a comparação entre amostras controle (FRESCO) e amostras dos grupos obtidos em tempos posteriores com o teste T pareado. Quando necessário, foram empregados testes não paramétricos (Friedman para medidas repetidas e Wilcoxon para dados pareados). Para a comparação entre tratamentos foi utilizada a análise de variância de dupla classificação para medidas repetidas (Two-Way ANOVA). O nível de significância adotado foi de 5%, e o pacote estatístico utilizado nas análises foi o SigmaPlot 12.0.

## RESULTADOS

A aplicação da técnica anatômica utilizando solução de sal de cura seguida pela fixação com AE e formaldeído em diferentes proporções, e posteriormente conservação em SACS 30%, mostrou-se eficaz para fixação e conservação, respectivamente, dos cães durante todo o experimento. Após o período de conservação em formaldeído a 10% por 7 dias, bem como após o período de conservação em SACS 30%, houve pouca liberação de gordura dos cadáveres na solução presente nas caixas plásticas. Observou-se maior maleabilidade dos cadáveres à manipulação após a conservação na SACS 30%, tanto em relação aos membros torácicos e pélvicos, como das amostras a serem coletadas (pele e jejuno). Nos grupos 2 e 3 houve maior liberação de gordura, e esta foi diminuindo com o passar do tempo na SACS 30%. Em nenhum momento houve dificuldade na manipulação e colheita das amostras.

Devido à utilização do sal de cura, observou-se a manutenção da coloração avermelhada da musculatura, deixando-a próxima de seu aspecto real (cadáver fresco), evitando o aspecto acinzentado dos músculos após injeção do formaldeído, bem como o aspecto amarelado quando se emprega maior quantidade de álcool etílico na fixação/conservação.

Os valores do teste de significância ( $p$ ) dos tratamentos referentes à força máxima de ruptura (FMR) e alongamento máximo de ruptura (AMR) estão demonstrados nas tabelas a seguir ao nível de significância de 5% pela análise de variância One-Way ANOVA (Figura 9 e Tabelas 2, 3, 4 e 5).



**Figura 9.** Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) e do alongamento máximo de ruptura (mm) da pele e jejunum de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias

**Tabela 2** – Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) da pele de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias.

Grupo	Parâmetros	Momentos avaliados					
		Controle	D0	D30	D60	D90	D120
G1	Força (N)	95,78	89,73a	90,88a	82,36a	73,16b	70,84a
	Desvio Padrão	48,35	49,01	-	39,37	-	-
	Diferença entre as médias	-	6,05	4,9	13,42	22,62	24,94
	Valor de P	-	0,432	0,742	0,052	0,008	0,195
G2	Força (N)	143,97	162,98a	174,88a	148,52a	144,78a	158,17a
	Desvio Padrão	-	-	-	-	-	92,76
	Diferença entre as médias	-	-19,01	-30,91	-4,55	-0,81	-14,2
	Valor de P	-	0,383	0,742	0,547	0,844	0,82
G3	Força (N)	156,7	145,52a	162,73a	145,46a	135,01a	125,23a
	Desvio Padrão	73,55	60,03	74,17	64,52	67,5	36,73
	Diferença entre as médias	-	11,18	-6,03	11,24	21,69	31,47
	Valor de P	-	0,501	0,773	0,309	0,279	0,12
G4	Força (N)	167,3	149,91a	119,62a	142,18a	114,53a	138,41a
	Desvio Padrão	123,61	130,72	-	93,35	-	81,62
	Diferença entre as médias	-	17,39	47,68	25,12	52,77	28,89
	Valor de P	-	0,6	0,148	0,197	0,383	0,352

\* Momentos: Controle (amostras frescas), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem em água corrente), D30 (30 dias), D60 (60 dias), D90 (90 dias) e D120 (120 dias) em SACS 30%. Observação: Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha difere entre si ao nível de significância de 5% pela análise de variância One-Way ANOVA.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão da força máxima de ruptura (N) do jejuno de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias.

Grupo	Parâmetros	Momentos avaliados					
		Controle	D0	D30	D60	D90	D120
G1	Força (N)	11,33	11,96a	18,51b	16,28a	15,69a	14,13a
	Desvio Padrão	5,33	8,27	5,89	6,51	9,2	4,7
	Diferença entre as médias	-	-0,63	-7,18	-4,95	-4,36	-2,8
	Valor de P	-	0,631	0,026	0,059	0,112	0,154
G2	Força (N)	17,69	13,14a	16,73a	19,66a	15,73a	15,63a
	Desvio Padrão	8,66	6,79	5,87		5,45	9
	Diferença entre as médias	-	4,55	0,96	-1,97	1,96	2,06
	Valor de P	-	0,103	0,747	0,25	0,561	0,345
G3	Força (N)	18,48	14,61a	19,59a	20,3a	18,25a	18,76a
	Desvio Padrão	5,48	9,01	9,51	7,98	3,27	6,18
	Diferença entre as médias	-	3,87	-1,11	-1,82	0,23	-0,28
	Valor de P	-	0,304	0,712	0,45	0,874	0,894
G4	Força (N)	14,92	12,71a	13,04a	14,48a	15,12a	17,03a
	Desvio Padrão	7,86	8,63	5,15	6	6,34	7,91
	Diferença entre as médias	-	2,21	1,88	0,44	-0,2	-2,11
	Valor de P	-	0,382	0,585	0,895	0,958	0,637

\* Momentos: Controle (amostras frescas), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem em água corrente), D30 (30 dias), D60 (60 dias), D90 (90 dias) e D120 (120 dias) em SACS 30%. Observação: Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha difere entre si ao nível de significância de 5% pela análise de variância One-Way ANOVA.

**Tabela 4** – Média e desvio padrão do alongamento máximo de ruptura (mm) da pele de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias.

Grupo	Parâmetros	Momentos avaliados					
		Controle	D0	D30	D60	D90	D120
G1	Alongamento (mm)	7,47	7,42a	6,57a	7,7a	5,64b	5,38b
	Desvio Padrão	1,12	1,06	0,94	0,8	0,84	1,09
	Diferença entre as médias	–	0,05	0,9	-0,23	1,83	2,09
	Valor de P	–	0,917	0,094	0,527	0,005	<0,001
G2	Alongamento (mm)	8,81	8,73a	7,43b	7,8a	5,41b	5,57b
	Desvio Padrão	1	1,62	1,13	–	1,19	0,97
	Diferença entre as médias	–	0,08	1,38	1,01	3,4	3,24
	Valor de P	–	0,882	0,013	0,25	<0,001	<0,001
G3	Alongamento (mm)	8,41	8,04a	7,17b	7,48a	5,23b	7,09a
	Desvio Padrão	0,88	1,16	–	1,81	0,63	2,03
	Diferença entre as médias	–	0,37	1,24	0,93	3,18	1,32
	Valor de P	–	0,458	0,008	0,499	<0,001	0,148
G4	Alongamento (mm)	7,79	7,33a	6,55a	7,11a	5,6b	6,03b
	Desvio Padrão	2,06	1,51	0,82	1,72	0,84	1,14
	Diferença entre as médias	–	0,46	1,24	0,68	2,19	1,76
	Valor de P	–	0,463	0,078	0,205	0,004	0,005

\* Momentos: Controle (amostras frescas), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem em água corrente), D30 (30 dias), D60 (60 dias), D90 (90 dias) e D120 (120 dias) em SACS 30%. Observação: Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem pelo teste t pareado.

**Tabela 5** – Média e desvio padrão do alongamento máximo de ruptura (mm) do jejuno de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização da solução de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em SACS 30% por até 120 dias

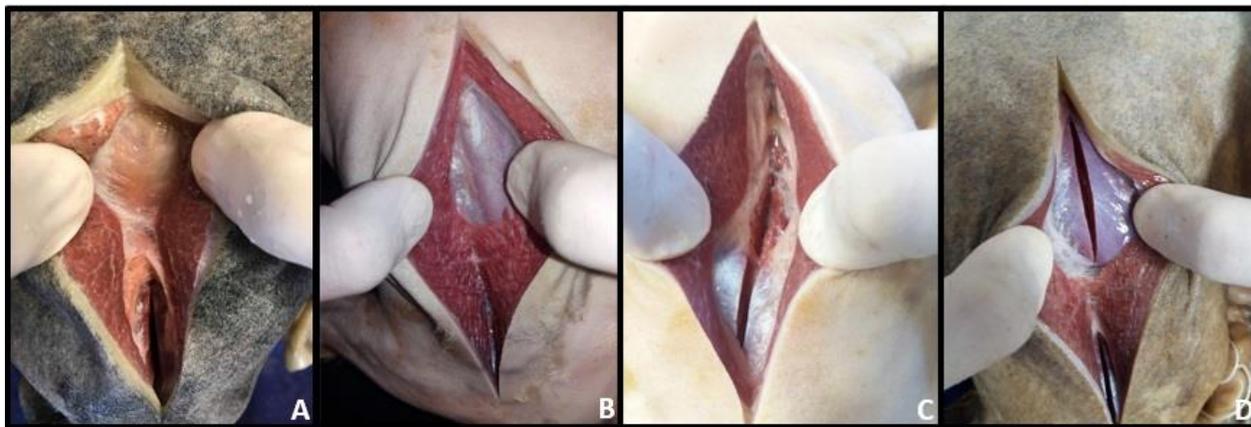
Grupo	Parâmetros	Momentos avaliados					
		Controle	D0	D30	D60	D90	D120
G1	Alongamento (mm)	6,92	6,99a	9,22a	8,14a	6,61a	9,31b
	Desvio Padrão	2,27	3,62	3,85	3,84	2,09	2,77
	Diferença entre as médias	-	-0,07	-2,3	-1,22	0,31	-2,39
	Valor de P	-	0,962	0,113	0,336	0,628	0,004
G2	Alongamento (mm)	6,3	5,41a	6,71a	8,06a	7,89a	4,74b
	Desvio Padrão	1,89	0,88	3,99	4,08	3,43	1,49
	Diferença entre as médias	-	0,89	-0,41	-1,76	-1,59	1,56
	Valor de P	-	0,164	0,67	0,086	0,177	0,042
G3	Alongamento (mm)	6,47	5,95a	7,76a	6,61a	6,51a	6,87a
	Desvio Padrão	3	3,31	3,42	2,15	2,84	3,06
	Diferença entre as médias	-	0,52	-1,29	-0,14	-0,04	-0,4
	Valor de P	-	0,691	0,15	0,863	0,97	0,687
G4	Alongamento (mm)	7	6,87a	6,95a	8,16a	7,67a	6,77a
	Desvio Padrão	2,24	4,19	3,86	4,22	3,48	2,83
	Diferença entre as médias	-	0,13	0,05	-1,16	-0,67	0,23
	Valor de P	-	0,906	0,958	0,312	0,456	0,518

\* Momentos: Controle (amostras frescas), D0 (considerando os 7 dias que os cadáveres ficaram imersos em solução de formaldeído a 10% mais 2 (dois) dias de lavagem em água corrente), D30 (30 dias), D60 (60 dias), D90 (90 dias) e D120 (120 dias) em SACS 30%. Observação: Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem pelo teste t pareado

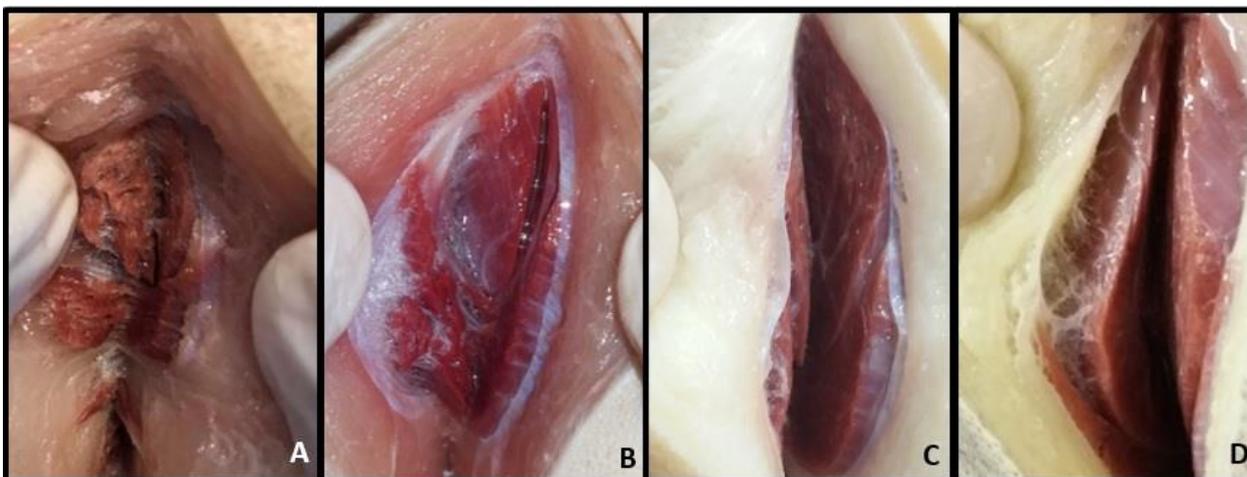
Aos 120 dias de conservação nos diferentes Grupos, G1, G2, G3, G4 foram realizadas incisões em músculos para observação da coloração (Figura 10, 11, 12, 13 e Tabela 6).



**Figura 10.** Imagem fotográfica de cadáver canino ilustrando os locais onde foram realizadas as incisões para avaliação visual da coloração dos músculos nos grupos estudados.



**Figura 11.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região do membro pélvico por meio da secção dos músculos bíceps femoral e vasto lateral após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B.



**Figura 12.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região glútea por meio da secção dos músculos glúteo superficial e glúteo médio após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B.



**Figura 13.** Imagem fotográfica do aspecto muscular da região do braço por meio da secção dos músculos deltoide porção escapular, tríceps braquial cabeça longa e tríceps braquial cabeça lateral após 120 dias de conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) sendo A (fixação com 100% de formaldeído), B (fixação com 70% de álcool etílico e 30% de formaldeído), C (fixação com 30% de álcool etílico e 70% de formaldeído) e D (fixação com 50% de álcool etílico e 50% de formaldeído). Todos os grupos foram infundidos com meio a base de sal de cura previamente ao agente fixador. Notar a coloração avermelhada em todos os grupos, sendo mais destacada na imagem B.

Em relação à análise microbiológica da solução de conservação dos cadáveres caninos armazenados em SACS a 30% referente ao Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 bem como no período de armazenagem no tanque com formaldeído a 10% após 7 (sete) dias e posteriormente nos tempos D30, D60 e D90 não foram identificados microrganismos (ou bactérias) aeróbios e anaeróbios. Com relação ao tempo D120 referente ao grupo 4, foram encontrados *Bacillus spp.* aeróbios na quantidade inferior a  $1,0 \times 10$  como mostra na tabela 7.

**Tabela 6** – Escore atribuído a coloração da musculatura em região de membro torácico e pélvico após 120 dias de conservação em SACS 30%

Região muscular	Grupos	Escore				
		1	2	3	4	5
Região de coxa	Grupo 1 - 100% F				X	
	Grupo 2 - 30% F e 70% AE			X		
	Grupo 3 - 70% F e 30% AE			X		
	Grupo 4 - 50% F e 50% AE		X			
Região glútea	Grupo 1 - 100% F				X	
	Grupo 2 - 30% F e 70% AE			X		
	Grupo 3 - 70% F e 30% AE		X			
	Grupo 4 - 50% F e 50% AE		X			
Região de membro torácico	Grupo 1 - 100% F				X	
	Grupo 2 - 30% F e 70% AE			X		
	Grupo 3 - 70% F e 30% AE		X			
	Grupo 4 - 50% F e 50% AE	X				

\* Escore 1 (amarelado), Escore 2 (vermelho claro), Escore 3 (vermelho vivo), Escore 4 (vermelho escuro), Escore 5 (acinzentado).

**Tabela 7** – Análise microbiológica da solução de conservação de cadáveres de cães preparados quimicamente com a utilização com meio a base de sal de cura seguida pela fixação com álcool etílico e formaldeído em diferentes proporções e mantidos em conservação com formaldeído por 7 (sete) dias e em SACS 30% por até 120 dias

	Grupo	Total aeróbios (CFU/mL)	Total Anaeróbios (CFU/mL)	Microrganismos
Meio de conservação a base de formaldeído	G1	0	0	<i>Ausente</i>
	G2	0	0	<i>Ausente</i>
	G3	0	0	<i>Ausente</i>
	G4	0	0	<i>Ausente</i>
D 30	G1	0	0	<i>ausente</i>
	G2	0	0	<i>ausente</i>
	G3	0	0	<i>ausente</i>
	G4	0	0	<i>ausente</i>
D 60	G1	0	0	<i>ausente</i>
	G2	0	0	<i>ausente</i>
	G3	0	0	<i>ausente</i>
	G4	0	0	<i>ausente</i>
D90	G1	0	0	<i>ausente</i>
	G2	0	0	<i>ausente</i>
	G3	0	0	<i>ausente</i>
	G4	0	0	<i>ausente</i>
D 120	G1	0	0	<i>ausente</i>
	G2	0	0	<i>ausente</i>
	G3	0	0	<i>ausente</i>
	G4	1,0 x 10	0	<i>Bacillus sp</i>

## DISCUSSÃO

O protocolo envolvendo a infusão de SC previamente ao agente fixador composto por AE e formaldeído, em diferentes proporções na fixação de cadáveres de cães, além da SACS 30% para a conservação, foi eficiente durante todo o processo, havendo pouca liberação de gordura dos espécimes. Isso é similar ao descrito em trabalhos que utilizaram fixação em tanques de AE (sem formaldeído e SC) e conservação em SACS 30% (Zero et al. 2020), principalmente quando se utilizou maior período de fixação na solução (90 e 120 dias), comparando-se com períodos mais curtos (30 e 60 dias), devido, provavelmente, à ação solvente de gordura ao AE.

A utilização de AE como fixador também foi eficaz em cadáveres de gatos por 90 dias (Fração et al. 2019), de cães por 120 dias (Rocha et al. 2018), na análise de vísceras de suínos por meio do uso de bexiga e intestino delgado de suínos frescos (jejuno), obtidos de frigoríficos, fixados em álcool etílico (EA) 99,8% e conservados em SACS 30%, por 7, 14 e 21 dias (Guaraná et al. 2021), ambos utilizados para o treinamento cirúrgico, além de cadáveres humanos por 6 meses a 1 ano, com os tecidos se mantendo similares aos de cadáveres frescos (Goyri-O'Neill et al. 2013). Neste presente estudo, os cadáveres não apresentaram contaminação ou deterioração tecidual, a solução manteve a coloração e maciez muscular e a mobilidade das articulações após 30 dias de conservação em SACS 30%, de maneira similar ao ocorrido em cadáveres humanos injetados com AE e glicerina, e conservação em timol (Hammer et al. 2011; Hammer et al. 2012) e solução de Thiel Modificada (Hammer et al. 2014).

A SACS 30% foi avaliada por 5 anos para conservação de cadáveres utilizados em aula de anatomia, que foram previamente fixados com formaldeído. Os tecidos se mantiveram firmes, sem contaminação visual ou odor desagradável, sem perda da maciez e da cor (Oliveira, 2014). Essa solução mostrou-se eficaz na conservação de cadáveres de cães fixados com AE por 120 dias (Rocha et al. 2018), em cadáveres de gatos fixados e conservados com a mesma técnica anatômica por 120 dias, para treinamento cirúrgico (Zero et al. 2020). Quando se adicionam nitrito e nitrato de sódio ao cloreto de sódio, forma-se o sal de cura, o qual já foi utilizado em cadáveres de gatos fixados juntamente

com AE e refrigerados por 90 dias (Fração et al. 2019), e em cadáveres de gatos e cães mantidos refrigerados e à vácuo por 7 dias (Queiroz et al. 2022, Del Ponti et al. 2021). Em todos os estudos previamente citados, a concentração de sais sempre foi superior a 20%, como recomendado para a conservação de cadáveres (Friker et al. 2007).

Para determinar os efeitos biomecânicos dependendo das porções do intestino de cadáveres de cães frescos. A força máxima e o alongamento da ruptura do duodeno, jejuno e cólon foram testados, e comparados entre eles para que futuras pesquisas em biomecânica possam conhecer as resistências e elasticidade dessas três regiões intestinais, sendo que fragmentos frescos de jejuno de cadáveres de cães apresentam FMR de  $23,30N \pm 9,92N$  e AR de  $4,07mm \pm 0,45mm$ , o que não é muito diferente dos  $16,4N$  e AR de  $6,92mm$ , valor médio de todos os grupos ao final do período de conservação no presente trabalho (Queiroz et al. 2019).

Neste estudo, a FMR de pele e jejuno (no final da conservação em SACS 30%) variou de  $70,84N$  a  $158,17N$  (média de  $123,2N$ ) e de  $14,13N$  a  $18,76N$  (média de  $16,4N$ ), respectivamente. Em cadáveres de cães fixados com álcool etílico e mantidos em SACS 30%, a FMR nesses tecidos variou de  $106,7N$  a  $177,5N$  (média de  $142,1N$ ) e de  $12,9$  a  $27,6N$  (média de  $20,2N$ ) respectivamente, demonstrando um efeito discreto na biomecânica, mesmo com a utilização do formaldeído, o que pode sugerir bom efeito tecidual causado pelo uso de SACS30%. Embalagens a vácuo e refrigeração, após fixação de cadáveres de cães com AE e SC, também apresentaram pouca variação nos valores da biomecânica na FMR da pele entre  $179,9N$  a  $139,7N$  (média de  $156,2N$ ) por 7 dias (Del Ponti et al. 2021) e entre  $125,9N$  e  $95,78N$  durante 4 meses (Ferreira et al. 2021).

Análise biomecânica de pele de cadáveres de gato submetidos à fixação com AE e SC, mantidos em refrigeração, revelou FMR aos 90 dias variando de  $234,7N$  a  $108,17N$ , valores estes maiores que os reportados neste trabalho pois a espécie felina apresenta maior elasticidade em relação aos cães (Fração et al. 2019). Pelo mesmo motivo, nossos valores também são bem menores se forem comparados às amostras de gatos quimicamente preparados em tanques com AE (até 90 dias) e mantidos em SACS 30% (até 120 dias); nesses animais, a FMR de pele de  $156,8N$  a  $217,3N$  (média de  $180,9N$ ) e de jejuno de  $21,9N$  a  $25,09N$  (média de  $23,6N$ ) (Zero et al. 2020). Com refrigeração, após

fixação com AE e SC, cadáveres de gatos apresentaram FMR da pele e jejuno variando de 237,5N a 337,8N (média de 270,8N) e de 19,6N a 27,6N (média de 22,95N), respectivamente, ou seja, houve pouca variação biomecânica em relação às amostras frescas ou com a técnica anatômica descrita nesse projeto.

Apenas em um dos 20 momentos analisados (grupo 4, D120) houve crescimento bacteriano (*Bacillus sp*) mas em baixa quantidade ( $1 \times 10$  UFC/mL), diferentemente da contaminação frequentemente reportada em cavidade oral, superfície de tórax e ânus de cadáveres caninos fixados com solução de cloreto de sódio (4 kg/4,52 L de água) armazenado no refrigerador a 4°C após 1 mês de aula prática laboratorial (Nam et al. 2020). Essa baixa contaminação é similar ao reportado em cadáveres de gatos preparados com AE e SC e mantidos em refrigeração por 1 semana, a vácuo, nunca ultrapassando contagem bacteriana de  $10^4$  UFC/mL para aeróbios e anaeróbios totais (*Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphilococcus sp*) (Queiroz et al. 2022). O maior tempo de refrigeração e vácuo (4 meses), de gatos preparados quimicamente com essa mesma técnica, representou contaminação microbiológica menor ainda, não excedendo  $8 \times 10^2$  UFC/mL em aeróbios totais e  $5 \times 10^2$  UFC/mL em anaeróbios totais (*Bacillus sp*, *Staphylococcus sp* e Leveduras). No presente estudo, provavelmente, a imersão dos cadáveres em SACS 30% por até 4 meses reduziu consideravelmente a contaminação devido à hiperosmolaridade do meio (Gauthier et al. 1987; Munro et al. 1989), similarmente ao que ocorre no mar morto ou em cubas de armazenagem de cadáveres previamente fixados por formaldeído (Nissenbaum, 1975; Oliveira, 2014).

A solução para fixação e preservação contendo 23% de cloreto de sódio enriquecido com nitrito, 30% de etanol e 20% de Pluriol® E 400 e Óleo de orégano e 23,9% de água da torneira também pode ser utilizada como alternativa ao formaldeído para embalsamamento de cadáveres de cães, embora possa haver contaminação microbiológica por *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* e *Clostridium perfringens* após 24 semanas em tanques com temperatura variando entre 4° a 6°) (Janczyk et al. 2011). Tal solução, similarmente à aplicada no presente estudo, proporcionou boa manutenção da coloração muscular, textura e movimentos articulares, principalmente quando se utilizou maior percentual de AE na proporção de

30% e mesmo quando foi aplicado apenas formaldeído, pois todos os cadáveres receberam SC previamente à fixação, o qual atuou como protetor da coloração natural tecidual, independentemente da combinação de agentes fixadores utilizados. Não houve amarelamento tecidual, como quando se utiliza antioxidante (Nam et al. 2020).

## **CONCLUSÃO**

A nova técnica anatômica proposta composta por sal de cura, 30% de AE e 70% de formaldeído a 10%, proporciona cadáveres quimicamente preparados com aspecto morfológico e biomecânico com boa similaridade ao cadáver fresco, além de ótimo controle microbiológico para uso em aula de anatomia e cirurgia veterinária.

## REFERÊNCIAS

BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. (1993). Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. 3.ed. Cambridge: **Cambridge University**, p. 331.

BEGER, O.; KARAGÜL, M.I.; KOÇ, T.; KAYAN, G.; CENGİZ, A.; YILMAZ, S.C.; OLGUNUS, Z.K. (2020) Effects of different cadaver preservation methods on muscles and tendons: a morphometric, biomechanical and histological study. **Anatomical Science International**, n. 295, p. 174-189.

DEL PONTI, I.; VIEIRA, G.C.; SOARES, L.G.; RODRIGUES, A.; COSTA, N.T.B.; FERREIRA, G.C.; FECHIS, A.D.S.; QUEIROZ, A.B.P.S.; OLIVEIRA, F.S. (2021) Vacuum packaged embalmed dogs for veterinary surgery practicing. **Eur J Anat.** n. 25, p. 473-480.

FERREIRA, G.C.; COSTA, N.T.B.; CARDOZO, M.V.; QUEIROZ, A.B.P.S.; ROCHA, T.A.S.S.; OLIVEIRA, F.S. (2021) Cadáveres de caninos conservados con alcohol etílico y sal de cura y embalados al vacío para la enseñanza de la cirugía veterinaria. **Rev Inv Vet Perú.** v. 32, n.4, p.19075.

FRAÇÃO, V.C.; ZERO, R.C.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, B.N.; FECHIS, A.D.S.; ROCHA, T.A.S.S.; IOZZI, M.T.; OLIVEIRA, F.S. (2019) Analysis of the Skin of Cats' Corpses Chemically Prepared with Ethylic Alcohol and Curing Salt Aiming Veterinary Surgical Practice - Chronic Effect on Biomechanics and Students' Evaluation. **CPQ Medicine**, v.6, n. 4, p. 01-08.

FRIKER, J.; ZEILER, E.; MCDANIEL, B.J. (2007). From formalin to salt. Development and introduction on a salt-based preserving solution for macroscopic anatomic specimens. **Tierärztl. Praxis**, v. 35, p. 243-248.

GAUTHIER, M.J.; MUNRO, P.M.; MOHAJER, S. (1987) Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. **Curr Microbiol**, n. 15, p. 5-10.

GOYRI-O'NEILL, J.; PAIS, D.; FREIRE DE ANDRADE, F.; RIBEIRO, P.; BELO, A.; O'NEILL, A.; RAMOS, S.; NEVES MARQUES, C. (2013) Improvement of the embalming perfusion method: The innovation and the results by light and scanning electron microscopy. **Acta Médica Portuguesa**. n. 26, p. 188-194.

GUARANÁ, J.B.; MÜLLER, A.F.; STREFEZZI, R.F.; OLIVEIRA, F.S.; MACHADO, L.C.; AMBRÓSIO, C.E.; DÓRIA, R.G.S.; FREITAS, S.H. (2021) Swine viscera preservation in hypersaturated salt solution after alcohol fixation as a preparation method for educational purposes. **Anat Histol Embryol**. n. 00, p. 1-11.

HAAR, G.; BUIKS, S.C.; VAN DELDEN, M.; REIJNTJES, T.; SANCHEZ, R.F.; KIRPENSTEIJN, J. (2013) Skin tension. In: KIRPENSTEIJN, J.; HAAR, G. Reconstructive surgery and wound management of the dog and the cat. **London**, p.12-14.

HAMMER, N.; LÖFFLER, S.; FEJA, C.; BECHMANN, I.; STEINKE, H. (2011) Substitution of Formaldehyde in Cross Anatomy Is Possible. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n.7, p. 610–611.

HAMMER, N.; LÖFFLER, S.; FEJA; SANDROCK, M.; SCHMIDT W.; BECHMANN, I.; STEINKE, H. (2012) Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: A potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. **Anat Sci Educ**, v.5, n.4, p. 0–0.

HAMMER, N.; LÖFFLER, S.; BECHMANN, I.; STEINKE, H.; HADRICH, C.; FEJA, C. (2014) Comparison of Modified Thiel Embalming and Ethanol-Glycerin Fixation in an Anatomy Environment: Potentials and Limitations of Two Complementary Techniques. **Anatomical Sciences Education** n. 00, p. 0-0.

JACINTO, M.A.C.; SILVA SOBRINHO, A.G.; COSTA, T.G. (2004) Características anátomo-estruturais da pele de ovinos (*Ovis áries*) lanados e deslanados, relacionadas com o aspecto físico-mecânico do couro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1001-1008.

JANCZYK, P.; WEIGNER, J.; LUEBKE-BECKER, A.; KAESSMEYER, S.; PLENDL, J. (2011) Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy--A study based on histo- and microbiological analyses. **Ann Anat**, n. 193, p. 71-75.

LAFLAMME D. (1997). Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. **Feline Practice**, v.25, p.13-18.

LOMBARDERO, M.; YLLERA, M.M.; COSTA-E-SILVA, A.; OLIVEIRA, M.J.; FERREIRA, P.G. (2017) Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde free embalming method for veterinary gross anatomy. **Journal of Anatomy**, v. 2, n. 231, p. 309-317.

MUNRO, P.M.; GAUTHIER, M.J.; BREITTMAYER, V.A.; BONGIOVANNI, J. (1989) Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. **American Society for Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2017-2024.

NAM, S.M.; MOON, J.; YOON, H.; CHANG, B.; NAHM, S. (2020) Comparative evaluation of canine cadaver embalming methods for veterinary anatomy education. **Anatomical Science International**, n. 95, p. 498-507.

NETO, J.C.; COLOMBO, T.E. (2015) Isolation and identification of filamentous fungi in anatomical parts preserved formol. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 33, n.3, p. 218-222.

NISSENBAUM, A. (1975) The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. **Microb Ecol**, n. 2, p. 139-161.

OLIVEIRA, L.N.; RODRIGUES, G.S.; GUALDI, C.B.; FEIJÓ, A.G.S. (2013) A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. **Rev. Bioethikos – Centro Universitário São Camilo**, v. 7, n. 2, p. 139-149.

OLIVEIRA, F.S. (2014) Assessing the effectiveness of 30% sodium chloride aqueous solution for the preservation of fixed anatomical specimens: a 5-year follow-up study. **Journal of Anatomy**, n. 225, p. 118-121.

QUEIROZ, A.B.P.S.; SOARES, L.G.; VIEIRA, G.C.; DEL PONTI, I.; FECHIS, A.D.S.; ROCHA, T.A.S.S.; OLIVEIRA, F.S. (2019) Biomechanics analysis of duodenum, jejunum and colon of dog's cadavers. **CPQ Medicine**, n.8, p. 01-05.

QUEIROZ, A.B.P.S.; RODRIGUES, A.; CARDOZO, M.V.; COSTA, N.T.B.; SOARES, L.G.; FECHIS, A.D.S.; OLIVEIRA, F.S. (2022) Biomechanical and microbiological analysis of embalmed cats – acute effect of conservation. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 94, n.1, p. 1-9.

ROCHA, T.A.S.S.; YANAGIHARA, G.R.; SHIMANO, A.C.; ROLIM, G.S.; SANTOS, C.C.C.; FECHIS, A.D.S.; OLIVEIRA, F.S. (2018) Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. **The Journal of Plastination**, v. 30, p.16-23.

RODRIGUES, H. (2010) **Técnicas anatômicas**. 3ª ed. GM GRÁFICA & EDITORA. Vitória-ES. p. 269.

ZERO, R.C.; SHIMANO, A.C.; CARDOSO, M.V.; SANTOS, C.C.C.; FECHIS, A.D.S.; ROCHA, T.A.S.S.; OLIVEIRA, F.S. (2020) Cadáveres de gatos preparados químicamente para la enseñanza de técnicas cirúrgicas: análisis biomecánico de piel y yeyuno. **Rev. investig. vet.** Perú, v. 31, n. 2, p.16172.