

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSIMÉTRICAS DO
PERITÔNIO DE PACA (*Agouti paca*, LINNAEUS 1766) A
FRESCO, E CONSERVADOS EM GLICERINA**

Angela Daniele de Camargo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSIONOMÉTRICAS DO
PERITÔNIO DE PACA (*Agouti paca*, LINNAEUS 1766) A
FRESCO, E CONSERVADOS EM GLICERINA**

Angela Daniele de Camargo

Orientador: Profa. Dra. Marcia Rita Fernandes Machado

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Angela Daniele de Camargo – nascida em São Carlos/SP, no dia 01 de fevereiro de 1974. Graduada em Farmácia, no ano de 1997 pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC/PR e em Medicina Veterinária, pela Universidade Tuiuti do Paraná – UTP/PR no ano de 2002. Iniciou a Pós-graduação no curso de Mestrado em agosto do ano de 2003, em Cirurgia Veterinária na UNESP, Câmpus de Jaboticabal/SP, concluindo-o em fevereiro do ano de 2005. Ingressou no curso de Doutorado, em março de 2005, no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária desta mesma instituição. Atualmente trabalha na área de Odontologia veterinária, e está concluindo o curso de especialização pela Anclivepa/SP na área de Odontologia Veterinária.



*"A ciência nos traz conhecimento;
a vida sabedoria." (Will Durant)*

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista primeiramente a Deus!

À minha orientadora, Professora Dra Marcia Rita Fernandes Machado, que sempre esteve me apoiando, ensinando, acreditando em mim, me dando forças, sendo companheira e principalmente por ter me ensinado tanto sobre a vida. Obrigada por ter aberto as portas da sua casa me recebendo tão carinhosamente. Te admiro demais!!!!

Ao meu querido pai, Paulo, que se dispôs a noites mal dormidas e a longos finais de semana me orientando, ensinando e escrevendo junto comigo grande parte deste trabalho.

A minha irmã, Ana Isabel que participou diretamente me auxiliando com gráficos e tabelas. Obrigada pelo companheirismo, pelo seu tempo e paciência.

A minha irmã ,Marcia, por tantas vezes me ouvir desabafar e me incentivar.

A minha querida mãe, Marli, que com palavras sempre me incentivou nas horas mais difíceis e apoiou incansavelmente meu pai.

Ao meu marido, Arnaldo Jr e minha filha amada Isabela que suportaram juntos a minha ausência sem nunca reclamar. Sempre com muito amor e carinho me incentivando. Amo vocês!!!

Aos meus queridos amigos, Paulinha, Luciano, Marcio, Juliana e Cristina que se dispuseram a formatar, montar apresentações e ouvir meus ensaios pré qualificação e pré defesa. Obrigada pelo tempo de vocês, e principalmente pelos ouvidos.

Aos animais!

À VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr Carlos Shimano pela participação direta na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Batista Volpon, Maria Teresa e a todos os professores, funcionários e alunos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A Professora Maria Aparecida de Alcantara que foi minha professora de anatomia e se dispôs com tanto carinho a participar da minha banca de defesa, com dedicação e boa vontade.

Aos Professores Marcos Lania de Araújo, Paola Castro Moraes, Gilson Hélio Toniollo, João Guilherme Padilha Filho e Hélio Takachi Okuda pela participação em minhas bancas de qualificação e defesa, pelas sugestões de correção de minha tese.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, pelo tempo e dedicação.

A Claudinha, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (Unesp-Jaboticabal), pelo tempo e dedicação.

Ao Sr Orandir, que processou com muito carinho todas as minhas lâminas para análise a microscopia de luz.

Ao Sr Luís, pai da minha querida orientadora, que muitas vezes nos auxiliou na nossa complexa gramática portuguesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida.

Agradeço a todas as pessoas que se envolveram diretamente ou mesmo indiretamente neste trabalho.

O mérito é de todos nós. Obrigada!

SUMÁRIO	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aplicação das membranas biológicas.....	4
2.2 Meios de conservação de membranas biológicas.....	5
2.3 Ensaios mecânicos.....	9
2.4 Morfologia do peritônio.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais.....	17
3.2 Ensaio mecânico de tração.....	19
3.3 Estudo histológico.....	22
3.3.1 Microscopia de luz.....	22
3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	23
3.4. Análise dos dados.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Ensaios mecânicos de tração.....	25
4.1.1 Análise para parâmetros característicos dos materiais de interesse utilizando algarismos significativos.....	25
4.1.2 Análise estatística.....	32
4.2 Observações à microscopia de Luz.....	33
4.3 Observações à microscopia eletrônica de varredura.....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS.....	43
8 ANEXO.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Kg	Quilograma (s)
min	Minuto(s)
mm	Milímetro(mm)
mm ²	Milímetro(s) quadrado(s)
mm ³	Milímetro(s) cúbico(s)
N	Newton(s)
P	Nível de significância
%	Porcentagem
®	Marca registrada
µm	Micrômetro(s)
M	Mol, Molar
pH	Ponto hidrogeniônico
Kev	10 ³ elétrons-volt
MPa	Mili Pascoal
GPa	Giga Pascoal
Δ	Delta
F	Força
T	Tensão
CP	Corpo de prova
J/m ³	Joule por milímetro cúbico
µJ	Micro joule
R	Coeficiente de correlação
SD	Desvio padrão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios na avaliação do peritônio bovino, submetido ao ensaio mecânico a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, sendo avaliados os seguintes parâmetros: Espessura (mm); Largura (mm); Área (mm ²); Força máxima(N); Tensão Máxima (MPa) e Alongamento (mm).....	14
Tabela 2	Constante elástica, densidade de energia e energia total gasta nos diferentes períodos de armazenamento da membrana.....	26
Tabela 3	Valores de força máxima,, tensão máxima, tensão média dos valores máximo, deformação máxima para os ensaios realizados com a membrana de peritônio de paca .(Deformação máxima e deformação média dos valores máximos são deformações relativas ao comprimento inicial que é de 5,0cm).....	27
Tabela 4	Valores referentes à avaliação do peritônio de paca submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Jaboticabal, 2009.....	32
Tabela 5	Equações das regressões lineares para as variáveis (espessura, força, alongamento, área) representados pela letra y, em função de x (dias).....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Curva típica de ensaio de tração em sólidos (curva tensão por taxa de deformação). A figura 1 ilustra o comportamento não linear que é característicos do material em estudo. Pode-se considerar que a curva $T \times \Delta L/L$ é composta de trechos lineares com constantes elásticas diferentes em cada região de comportamento suposto elástico e linear. A descontinuidade pode representar rompimento de estruturas internas ou deslizamento do material. A curvatura pode ser associada à diminuição da área da secção transversal do material e o ponto onde a tensão começa diminuir corresponde ao início da ruptura do material.....	11
FIGURA 2.	Imagem fotográfica da colheita do peritônio. Em A se observa a localização do peritônio revestindo as paredes abdominais laterais de uma paca adulta (●). Em B , pode-se constatar o descolamento parcial do peritônio parietal (seta vazada), o qual está bem evidenciado (■), em C . Em D , destaca-se o retalho peritonial (P) e o local da parede abdominal lateral (seta), de onde foi colhido.....	18
FIGURA 3.	Imagem fotográfica da máquina universal de ensaio EMIC ^{®1} (modelo DL10000), na qual foram realizados o ensaio mecânico de tração nas amostras peritoniais (seta) de paca.....	21
FIGURA 4.	Registro do corpo de prova (seta vazada) acoplado à máquina com o auxílio de acessório que contém ranhuras em sua superfície (*), para a realização do ensaio mecânico de tração.....	22
FIGURA 5.	Representação gráfica dos pontos em dois trechos considerados lineares. Nota-se que no trecho inicial (preto tracejado) a constante elástica é de 10,1 MPa, enquanto que no segundo trecho o valor é de 6,95 MPa. Este valor decresce na medida que as deformações crescem mostrando claramente o comportamento não linear deste material. Assim reata-nos estabelecer a ordem de grandeza da constante elástica do material que esta entre 1MPa e aproximadamente 10MPa neste caso.....	28
FIGURA 6.	Representação gráfica do ajuste linear nos diferentes períodos analisados.....	29
FIGURA 7.	Amostra não exposta a glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.....	30
FIGURA 8.	Amostra conservada 30 dias em glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.....	30
FIGURA 9.	Amostra conservada 60 dias em glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.....	31
FIGURA 10.	Amostra conservada 90 dias em glicerina. Superposição das curvas de	

	tensão X deformação.....	31
FIGURA 11.	Fotomicrografias de amostra de peritônio a fresco de paca adulta. Em A se verifica o mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄). Em B, observa-se além do mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄), a presença de tecido conjuntivo frouxo (seta vazada) além de células adiposas (AD) onde se alojam vasos sanguíneos (v). A – aumento de 20X e B – Aumento de 40X. HE.....	34
FIGURA 12.	Fotomicrografia de amostra de peritônio de paca adulta conservada em glicerina a 98% por 30 (A), 60 (B) e 90 (C). Observar o mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄), e células adiposas (AD). Notar a diferenciação na organização das fibras colágenas, o espaçamento entre elas aumenta mediante o período de seu acondicionamento na glicerina (seta vazada), também as células adiposas parecem aumentadas em decorrência desse armazenamento As células adiposas parecem aumentadas em decorrência de seu armazenamento. 40X HE.....	34
FIGURA 13.	Eletromicrografias de amostras de peritônio de pacas adultas, a fresco (A) e conservadas em glicerina a 98% por 30 (B), 60 (C) e 90 (D) dias. Em A , notar a organização normal do tecido conjuntivo dessa membrana. Em B observar a disposição organizada (seta) e desorganizada (seta vazada) das fibras colágenas, além da leve dissociação entre elas (*) e em C verificar a dissociação das fibras colágenas (seta). Em D verificar o aumento da dissociação das fibras de colágeno (*), além da disposição organizada (seta) e desorganizada (seta vazada) das fibras colágenas.....	35

PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSIOMÉTRICAS DO PERITÔNIO DE PACA (*Agouti paca*, LINNAEUS, 1766) A FRESCO, E CONSERVADOS EM GLICERINA

RESUMO: O objetivo desta investigação foi descrever o comportamento mecânico e as características histológicas de peritônio da paca (*Agouti paca*) a fresco e conservado em glicerina a 98%. Amostras frescas e conservadas em glicerina por períodos de 30, 60 e 90 dias foram submetidas a testes mecânicos de tração, e também caracterizadas pelos seus aspectos histológicos e microscópicos, utilizando-se microscopias de luz e eletrônica de varredura. Quatro animais adultos, machos e fêmeas, com peso corporal médio de 8 quilogramas, foram utilizadas para colheita de amostras de peritônio. Não foram observadas diferenças significativas na integridade estrutural e ultraestrutural dos elementos que constituem as amostras a fresco e conservadas em glicerina. Evidenciou-se, portanto, células mesoteliais e tecido conjuntivo (ou conectivo) sem grandes alterações. Todos os tecidos conservados em glicerina a 98% apresentaram diminuição na rigidez e aumento na ductibilidade e tenacidade, similarmente às amostra de bovinos. Pode-se concluir que a glicerina é uma substância eficiente para a conservação de membranas biológicas, melhorando as propriedades mecânicas e permitindo que as membranas suportem maiores forças de deformação.

Palavras-chaves: paca, ensaios mecânicos, histologia, membranas biológicas, glicerina a 98%.

**MORPHOLOGIC AND TENSIOMETRICS PROPERTIES OF THE
PERITONEUM OF THE PACA (*Agouti paca*, LINNAEUS, 1766) IN FRESH
SAMPLES AND CONSERVED IN GLYCERIN**

ABSTRACT- The purpose of this investigation is to describe the mechanical behavior and histological characteristics of fresh and 98% glycerin conserved *Agouti paca* peritoneum. Fresh samples and those conserved in glycerin for periods of 30, 60 and 90 days were submitted to mechanical traction tests, as well as characterized by its histological and microscopic aspects by optical and scanning electron microscopy. Four adult animals, males and females, about eight kilograms each, were used to collect peritoneum samples. There was no significant difference in structural and ultrastructural integrity of the elements that constitutes the samples of fresh and 98% glycerin conserved material, evidencing mesothelial cells and connecting tissue without large alterations. All the evaluated tissues conserved in 98% glycerin showed a decrease in their rigidness and also an increase in the ductility and tenacity similar to bovine. It can be concluded, that glycerin is efficient for the conservation of biological membranes, improving the mechanical properties allowing the membranes to handle larger forces and deformation.

Key-words: Agouti paca, mechanical tests, histology, peritoneum, biological membrane, 98% glycerin.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de membranas biológicas, como material de implante, para a reparação de vísceras e outras estruturas anatômicas na medicina veterinária, iniciou com o trabalho de PIGOSSI (1964), mediante utilização de dura-máter homóloga de cães, conservada em glicerina. O emprego de membranas biológicas deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade na estocagem e na sua utilização, salientando-se, neste caso, a ocorrência de pouca ou nenhuma reação tecidual (ALVARENGA, 1992).

Enfermidades que possam comprometer a função normal de um órgão, tais quais, neoplasias, traumatismos, abscessos, nódulos parasitários, entre outras, suscitaram não só a ampla utilização de implantes nas últimas décadas (BATISTA, 1996), como também, a realização de pesquisas com membranas biológicas visando avaliar sua viabilidade em procedimentos cirúrgicos nas diferentes regiões do organismo animal (PIGOSSI et al., 1971; DALECK et al., 1988; ALVARENGA, 1992; RODASKI et al., 2002).

Dentre as membranas biológicas estudadas, destacam-se o centro tendíneo, a dura-máter, a fáscia lata, o pericárdio e o peritônio (ALVARENGA, 1992). Entre estas se enfatiza o uso do peritônio bovino, composto quase que exclusivamente de colágeno, possuindo dessa forma, baixa antigenicidade, constituindo-se em prótese biológica de uso corrente, pois fornece uma área maior de tecido aproveitável, a qual se adapta às diversas situações da prática cirúrgica (DALECK et al., 1988). Pode-se também ressaltar a cartilagem auricular que tem sido utilizada por vários autores em cirurgias reparadoras, como se verifica nas pesquisas de CHEHUEN NETO et al. (1991) que a utilizaram para a restauração de traquéia; nos estudos de PIGATTO et al. (1998) referentes à esofagoplastia em cães, nos de CONTESINI et al. (2001a) sobre a reparação traqueal em cães; nos de CONTESINI et al. (2001b) no reparo tardio de fenda palatina em cães; também em sua aplicação em acetabuloplastia extracapsular de cães (COSTA et al., 2004) e nas observações de BAUNGARTEN et al. (2006) ao aplicarem-na nos casos de blefaroplastia em coelhos. Para evitar a rejeição, estas

membranas devem permanecer preservadas, por período mínimo de 30 dias, em glicerina (PIGOSSI, 1964; PIGOSSI et al., 1971; DALECK et al., 1992; SARTORI FILHO et al., 1997; COSTA NETO et al., 1999;), embora possam ser conservadas neste mesmo meio, por período de até seis meses ou mais (PIGOSSI, 1967).

A glicerina atua desidratando o tecido e removendo a maior parte da água intracelular, sem, contudo, alterar as concentrações iônicas das células, sendo por isso eficaz fixador e protetor da integridade celular. Aumenta resistência à tração e não altera a elasticidade. Age ainda como poderoso antisséptico, exceto contra as formas esporuladas. A ausência de reações inflamatórias agudas dos implantes indica a baixa antigenicidade do transplante obtido por este meio de conservação, somado ao baixo custo e facilidade de manuseio do produto (LEITE et al., 1979). Além disso, a glicerina é biologicamente inerte e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) na composição de cosméticos e medicamentos de uso tópico (WELLS et al., 2006).

Considerando-se que por meio de estudos biomecânicos determinam-se as propriedades mecânicas de um material, o qual, dependendo de suas características físicas, poderá se submeter a ensaios de tração, torção, compressão e flexão (BATISTA et al., 1996), julga-se que para complementar os experimentos atinentes ao emprego de membranas biológicas, como implantes, seja fundamental a realização desse tipo de estudo, e assim avaliar as propriedades biomecânicas de uma membrana que poderá ser utilizada clinicamente.

Na busca constante, tanto de material biológico alternativo para a realização de implantes, quanto de novas opções de modelos de experimentação animal, surge a paca (*Agouti paca*), a qual, segundo REDFORD & EISENBERG (1992) é uma espécie pertencente à ordem dos roedores típica de regiões tropicais e que, depois da capivara é o maior roedor brasileiro.

Espécie de corpo robusto e vigoroso (COLLET, 1981), os machos adultos medem, do focinho à ponta da cauda, 70 cm em média e as fêmeas, um pouco menores, apresentam para este comprimento a média de 60 cm (MONDOLFI, 1972; BENTTI, 1981); o peso corpóreo varia de 5 a 10 kg, podendo chegar até aos 14 kg (MATAMOROS, 1982).

Dessa forma, não se podem ignorar as alusões de BJÖRKMAN et al. (1989) sobre o fato de que os roedores, juntamente com os lagomorfos, possam ser considerados grupos de animais experimentais “ad hoc”, em virtude de apresentarem aspectos característicos tais como, tamanho adequado, preço acessível e curto período de prenhez.

As observações de HAMLETT & RASWEILER IV (1993), também devem ser ponderadas, pois evidenciam a necessidade da busca de novos exemplares, entre os animais, para serem utilizados como modelos experimentais adequados e assim colaborarem com o desenvolvimento de pesquisas vitais tanto ao homem, quanto a outras espécies.

Além disso, a paca, como componente da fauna silvestre brasileira, até o momento não teve sua morfologia amplamente estudada, merecendo maior atenção dos pesquisadores da área, pois existem ainda grandes lacunas quanto à descrição específica de muitos de seus aspectos anatômicos.

Diante de tais informações e dos escassos relatos sobre a morfologia detalhada deste animal, com este estudo objetivou-se descrever o comportamento do peritônio da paca, quando submetido a ensaios mecânicos de tração, estando essa membrana, tanto fresca quanto conservada em glicerina a 98%, durante 30, 60 e 90 dias, bem como avaliar suas características morfológicas mediante análises à microscopia de luz e ultraestrutural.

Quanto aos parâmetros mecânicos, especificamente, buscou-se compará-los com outros materiais conhecidos. Vale ressaltar que diante das dificuldades na reprodutibilidade e na acurácia de medidas simples como a largura e espessura das amostras, além da inevitável ocorrência de erros sistemáticos inerentes ao ensaio de tração mecânica, procedeu-se à análise estatística e a uma apreciação, considerando-se o erro provável estimado para cada medida e sua propagação nos cálculos efetuados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aplicações das Biomembranas

Frequentemente os animais são acometidos por moléstias tais como, neoplasias, traumatismos, abscessos, nódulos parasitários, entre outras, que comprometem a função de um órgão, tornando necessária a utilização de implantes, como membranas biológicas (BATISTA, et al., 1996).

Os tecidos ou membranas biológicas têm sido pesquisados com o objetivo de verificar a eficácia de sua utilização no reparo de alterações anatômicas congênitas, adquiridas, ou de ambas, visando propor soluções para tais afecções, tanto no homem quanto nos animais (ALVARENGA, 1992), sendo amplamente utilizadas em cirurgias reparadoras na medicina veterinária desde 1964, quando Pigossi utilizou, em cães, dura-máter homóloga conservada em glicerina, demonstrando que este material era excelente meio de conservação e esterilização possuindo, inclusive, a propriedade de diminuir a antigenicidade do implante (BRANDÃO et al, 2006).

As membranas podem ser de natureza orgânica ou inorgânica (PIGOSSI et al., 1971), absorvíveis ou não, de origem sintética ou biológica, apresentando como principal característica a capacidade de se incorporarem ao tecido receptor, permanecendo temporária ou permanentemente, sem causar reações que promovam sua rejeição e consequente eliminação (ALVARENGA, 1992; BASTOS et al., 2005).

Desse modo, classificam-se os implantes biológicos, segundo a relação doador-receptor, nos seguintes tipos: autógeno, homogêneo, isógeno e xenógeno. Autógeno, quando o receptor é, ao mesmo tempo, o doador. Nos implantes homogêneos, o receptor e o doador são da mesma espécie, mas não compartilham antígenos de histocompatibilidade. Os casos de isogênia ocorrem quando doador e receptor possuem antígenos de histocompatibilidade; já, implantes classificados como xenógenos ocorrem quando o receptor e o doador pertencem a diferentes espécies (ALVARENGA, 1992).

Qualquer enxerto não autógeno deve satisfazer alguns critérios, tais como, não ser antigênico ou carcinogênico, ser facilmente incorporado pelo hospedeiro e funcionar

por toda a vida do receptor; também deve estimular as propriedades mecânicas do segmento original e ser facilmente armazenado e implantável (VÁMHIDY et al., 1990).

A busca por implantes que possuam ao mesmo tempo baixa antigenicidade e alta resistência é constante e membranas biológicas de caninos, bovinos, equinos e suínos, preservadas em diferentes meios, são estudadas há aproximadamente quatro décadas (PIGOSSI, 1964; INATOMI et al., 1980; DALECK et al., 1987; DALECK et al., 1988; VÁMHIDY et al., 1990; ALVARENGA, 1992; DALECK et al., 1992; REYES, 1993; SARTORI FILHO et al. 1997; BATISTA et al. 1996; COSTA NETO et al., 1999; MOTA et al., 2002; NOLASCO et al., 2003).

Membranas biológicas provenientes de bovinos têm sido utilizadas em estudos experimentais, apresentando resultados satisfatórios. Assim, utilizou-se em cães, o peritônio bovino conservado em glicerina na substituição de retalho diafragmático (DALECK et al. 1988), na reparação de hérnia perineal (DALECK et al., 1992), na tenoplastia do tendão calcâneo comum (COSTA NETO et al., 1999) e na esfinteroplastia do músculo esfíncter anal externo (RODASKI et al., 2002).

Em ratos testou-se a viabilidade do peritônio bovino, como alternativa para tela cirúrgica implantada na parede abdominal, visto que ele pode ser captado e submetido à mesma técnica de preparo, consagrada para o pericárdio bovino, além de fornecer área maior de tecido aproveitável e adaptável às diversas situações da prática cirúrgica (BASTOS et al., 2005). Estes autores verificaram que os valores da resistência do peritônio à tração, observados nos períodos do 7º e 28º dia pós cirurgia, em média, foram de 2,30 e 16,57 N (Newton), respectivamente.

2.2. Meios de Conservação de Membranas Biológicas

Durante décadas vem se procurando o melhor método para conservação de materiais biológicos, sejam pelo crescente uso dos transplantes homogêneos e xenógenos em cirurgia restauradora ou por suas vantagens sobre os demais (LEITE et al., 1979).

A preservação dos implantes não pressupõe a manutenção da viabilidade celular e, a eficiência da cirurgia reparadora, geralmente, está associada à reação biológica de

reparação e não à sobrevida dos elementos celulares presentes no implante, uma vez que este funciona como um arcabouço ou suporte temporário à migração de fibroblastos. Além disso, os agentes conservantes são substâncias dotadas de ação germicida ou germiostática, as quais se destinam a evitar as alterações provenientes de proliferação microbiana que possam ocorrer em qualquer material conservado (PRISTA et al., 1990).

Como características principais, os meios de preservação utilizados para manter as membranas biológicas devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos, preservar ao máximo a integridade celular, aumentar a resistência à tração e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA, 1992; MOTA et al., 2002). Assim, os métodos de conservação para os diferentes tecidos animais podem ser classificados em duas grandes categorias: os que mantêm a vitalidade celular e os que não mantêm (LEITE et al., 1979), embora ausência da vitalidade da membrana seja uma condição que não interfere no sucesso de sua implantação, uma vez que este é diretamente relacionado à reação de reparação do tecido hospedeiro (PIGOSSI, 1964, 1967).

A glicerina a 98% está na categoria dos meios de preservação que não mantêm a vitalidade celular das membranas e, atualmente, é um dos meios de conservação mais utilizado, tanto em casos clínicos, quanto em estudos experimentais (COSTA NETO et al., 1999; DALECK et al., 1992).

Uma das principais características da glicerina é a capacidade de desidratação celular (PIGOSSI, 1964; DALECK et al., 1987; ALVARENGA, 1992) a qual se atribui à sua ação antisséptica, atuando contra fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas, com exceção para as formas esporuladas (PIGOSSI, 1967). Cabe ressaltar que a desidratação obtida com a glicerina não altera a concentração iônica das células, mantendo a integridade celular (PIGOSSI, 1964).

A glicerina também reduz a antigenicidade dos tecidos conservados, dispensando a necessidade de utilização de fármacos imunossupressores durante os períodos trans e pós-operatórios. Após a implantação, os materiais biológicos mantidos

em glicerina atuam como uma estrutura de sustentação temporária e orientam o crescimento do tecido vivo no leito receptor (PIGOSSI, 1964; PIGOSSI, 1967).

As observações provenientes dos estudos que vem sendo realizados, ainda não esclareceram suficientemente os aspectos inerentes à reversibilidade da glicerina, ou seja, de seu mecanismo de ação junto aos tecidos. No entanto, sabe-se que esta substância estabiliza os monômeros de colágeno, mas desestabiliza as fibrilas colágenas precipitadas. Assim, quando um tecido é imerso na glicerina, a água é osmoticamente retirada em proporção que depende da densidade da fibra, da concentração da glicerina e da temperatura. Após a reidratação, as membranas recuperam suas pontes de hidrogênio e se comportam como tecidos naturais, sugerindo que esse meio não é reativo com a matriz extracelular, sendo um agente quimicamente seguro para a redução da degeneração tecidual (WELLS et al., 2006).

Os tecidos preservados devem ser reidratados antes da realização dos enxertos (ALVARENGA, 1992). O tempo de reidratação pode variar de acordo com a forma, espessura e tamanho do material, podendo chegar a 24 horas. Segundo as indicações de SARTORI FILHO et al. (1997), a hidratação deve ser de pelo menos 15 minutos para tecidos conservados em glicerina.

Trabalhos foram desenvolvidos em busca de um meio alternativo de conservação que apresentasse características desidratantes, antissépticas e anti-imunogênicas semelhantes ou superiores à glicerina. Para isso testaram-se solução hipersaturada de açúcar (MOTA et al., 2002), álcool absoluto, vaselina (ALVARENGA, 1992), glutaraldeído (ALVARENGA, 1992; POMERANTZEFF et al., 1997; RABELO et al., 2004), solução alcoólica de timerosal (1:1000), polivinil pirrolidona a 5% (ALVARENGA, 1992; MOTA et al., 2002; NOLASCO et al., 2003), além do processo de congelamento (REYES, 1993).

Recentemente, o 1,4 dioxano foi utilizado para preservar pericárdio bovino, resultando no aumento de sua biocompatibilidade e de suas propriedades mecânicas, tais como melhor estabilidade térmica e diminuição na biodegradabilidade. No entanto, as reações cruzadas promovidas pelo dioxano reduziram as propriedades naturais do

colágeno, diminuíram a resposta imune, a toxicidade, assim como a habilidade de promover a ligação e o crescimento celular (FORTI et al., 2006).

DALECK et al. (1988), ao analisarem histologicamente o tecido proveniente de implantes de peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias, observaram semelhança às amostras do peritônio a fresco. Somente algumas fibras apareceram mais acidófilas, retraídas e com núcleos condensados. Também foi observado por DALECK et al. (1992), que o peritônio bovino, sob as mesmas condições de conservação exibia, após 180 dias, células mesoteliais e fibras conjuntivas semelhantes ao material processado a fresco. No entanto, apresentavam células mesoteliais com núcleos ligeiramente retraídos e mais basófilos em relação ao peritônio fresco.

MOTA et al. (2002) analisaram a ultraestrutura da túnica muscular do intestino delgado de cães preservados em diferentes meios (solução supersaturada de açúcar a 300%, glicerina a 98%, polivinil pirrolidona a 5% e solução alcoólica de timerosal 1:1000). Os autores concluíram que nenhuma das soluções estudadas foi capaz de manter a integridade celular; porém, dos meios avaliados, tanto a solução supersaturada de açúcar a 300% quanto a glicerina a 98%, foram as que melhor apresentaram resultados.

GUIMARÃES et al. (2008) descreveram comparativamente o comportamento do centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos a ensaios mecânicos de tração a fresco e conservados em glicerina a 98% durante 30, 60 e 90 dias, bem como, suas características morfológicas à microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Estes autores não verificaram diferenças marcantes quanto à integridade estrutural e ultraestrutural dos elementos que constituíam tanto as amostras do material a fresco, quanto àqueles conservados em glicerina a 98%.

Ao compararem os testes de resistência à tração do material fresco com os conservados em glicerina, GUIMARÃES et al. (2008) constataram que o centro tendíneo do diafragma e o peritônio não sofreram alteração significativa para os valores de tensão. Entretanto, observaram que todos os tecidos avaliados exibiram aumento significativo para os valores de alongamento quando conservados em glicerina 98% por

até 90 dias, ressaltando que o pericárdio é a membrana que suporta as maiores tensões, ou seja, maior força de tração por área de secção.

2.3. Ensaios Mecânicos

Alguns parâmetros que determinam com precisão as características mecânicas dos materiais estão apresentados em sequência.

Neste trabalho o interesse teve-se na resistência mecânica à tração, como parâmetro aplicável a materiais de implante. Dessa forma, utilizaram-se constantes elásticas, referentes aos parâmetros que medem a relação entre as tensões aplicadas e as deformações sofridas. No entanto, deve-se ponderar que o material biológico não apresenta um comportamento linear; assim, a cada trecho linear considerou-se uma constante elástica diferente.

Obtém-se a tensão aplicada dividindo-se a força pela área da secção transversal de onde se aplica essa força. Normalmente esta grandeza é expressa em Newton/m^2 que é o Pascal - Pa (sistema internacional). No presente caso se expressou a tensão aplicada em milhões de Pa (MPa) ou 10^6Pa ((SCHAPERY, 2000).

Em um regime viscoelástico (com característica intermediária entre o viscoso e o elástico) surge o conceito de linearidade se, a um dado tempo, a tensão aplicada for proporcional à deformação; entretanto, se as deformações tornarem-se maiores que um ou dois por cento (ou mesmo menos), o comportamento exibirá não linearidade (FINDLEY et al, 1976). Materiais biológicos, geralmente de grande importância na aplicação cirúrgica, apresentam significativo comportamento viscoelástico não linear quando submetidos a carregamento mecânico (SCHAPERY, 2000).

Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2001), para cada material em questão sujeito ao impacto mecânico, a tenacidade é definida como a energia gasta na deformação total (elástica e plástica).

Desta forma, considerando-se que as membranas biológicas não estão incluídas entre esses materiais, estabeleceu-se para a membrana ora analisada, um parâmetro equivalente à sua tenacidade. Esse parâmetro corresponde à densidade de energia da membrana e foi calculada mediante a divisão da energia requerida na sua deformação

até o início de sua ruptura, pelo volume inicial da amostra, sendo expressa em Joules/m^3 .

Contrastando com os materiais ditos frágeis, como é o caso dos vidros, têm-se os materiais dúcteis que podem deformar-se muito sem se romper, tal qual ocorre nos metais, como no cobre. Assim, a resistência de um material deve ser considerada levando-se em conta a função a que se destina. Se o material necessita deformar-se e recuperar suas dimensões iniciais, ele precisa ter altas constantes elásticas. Porém, se o material deve deformar-se sem romper-se, mas não necessita recuperar sua forma inicial, como é o caso de certos parafusos, então ele precisa ser dúctil e não precisa ter constantes elásticas altas.

O ensaio de tração por ser relativamente simples e de realização rápida é amplamente utilizado e tem a vantagem de poder fornecer dados quantitativos das características mecânicas dos materiais, entre elas: tensão e deformação máximas; módulo de elasticidade; módulo de tenacidade; ductilidade; fragilidade. O resultado do teste de tração é a análise da curva de tensão de tração pela deformação sofrida pelo corpo, conforme ilustrado na Figura 1.

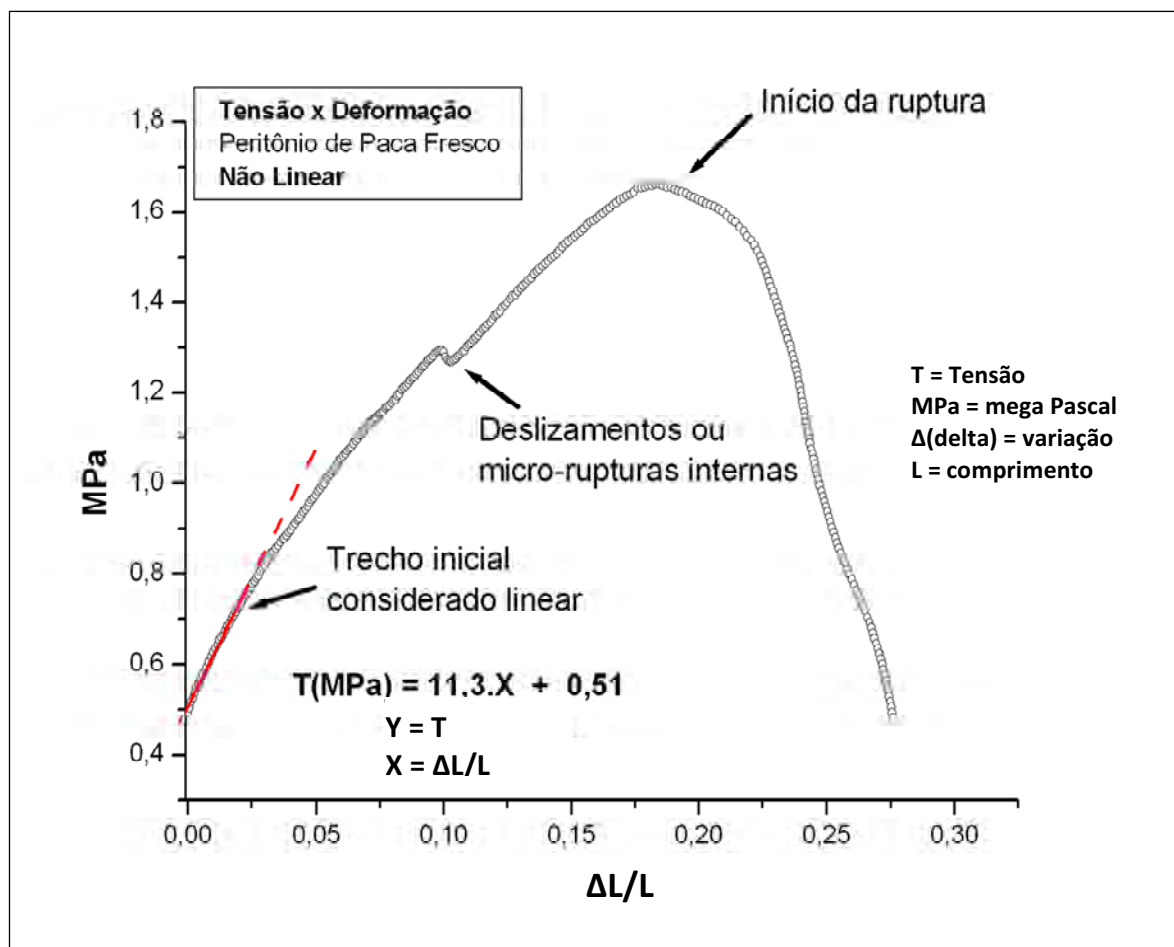


FIGURA 1. Curva típica tensão por taxa de deformação obtidas nos ensaios realizados. Esta ilustra o comportamento não linear que é característico do material em estudo. Pode-se considerar que a curva $T \times \Delta L/L$ (T = tensão e $\Delta L/L$ = variação relativa do comprimento) é composta de trechos lineares com constantes elásticas diferentes em cada região. A descontinuidade pode representar rompimento de estruturas internas ou deslizamento do material. A curvatura pode ser associada à diminuição da área da seção transversal do material e o ponto onde a tensão começa diminuir corresponde ao início da ruptura do material.

Embora o ensaio de tração mecânica uniaxial, aplicado nas membranas biológicas até sua ruptura, forneça detalhes importantes, principalmente os relacionados às variações na sua resistência quando utilizada como implante, a tentativa de obtenção das características mecânicas gerais desse material, é dificultada pela sua constituição e por seu comportamento não linear, mesmo para baixas deformações. No entanto, os parâmetros determinados dentro de limites lineares

fornece referência ao menos da ordem de grandeza da constante elástica nesses limites.

É necessário considerar que as amostras não se apresentavam totalmente uniformes, pois, trata-se de material biológico com características que não permitem medidas com grande resolução e nem precisão (reprodutibilidade), dada às suas peculiaridades estruturais.

Deve-se também, atentar ao fato de que o módulo de elasticidade calculado pela inclinação da região linear inicial da curva (conforme a figura 01 - tensão versus deformação), pode apresentar grande margem de erro em tecidos biológicos, visto que mesmo a região inicial da curva pode não ser linear. Estes aspectos levam a dificuldades na interpretação e no tratamento estatístico, uma vez que os erros podem ter caráter sistemático e a priori desconhecido. Portanto, um erro provável significativo deve ser considerado na avaliação dos resultados, especialmente quando se pretende comparar os parâmetros obtidos de experimentos diferentes (BRENDOLAN et al., 2001).

Considerando-se que com este trabalho objetivou-se, além de descrever a morfologia, estabelecer parâmetros mecânicos relevantes na análise das possibilidades e conveniência da utilização do peritônio de paca como implante, optou-se por apresentar os parâmetros elásticos característicos utilizando Algarismos Significativos, considerando como base um erro provável estimativo, sem os detalhes do cálculo de variações estatísticas (HALLIDAY et al., 2001). A estimativa de erros para o estabelecimento do número de Algarismos Significativos levou em conta os instrumentos, as amostras e as condições das medidas dessas amostras (BEVINGTON, 1969).

Optou-se pela estimativa de erros intrínsecos de cada medida nas curvas de força por deslocamento, procurando-se observar tendências gerais e buscando fornecer ao leitor um parâmetro equivalente ao módulo de Young da mecânica, que corresponde a tensão mecânica em Mega Pascal (MPa) dividida pela resposta (taxa de deformação) em trechos considerados lineares, com número de pontos escolhidos arbitrariamente (ASBY & JONES, 1996).

A mensuração da resistência do material implantado em animais de laboratório avalia a capacidade desses implantes em suportar tensão caso venham a ser utilizados clinicamente (BASTOS et al., 2005).

São raros os estudos que avaliaram a resistência dessas membranas. PIGOSSI (1964) analisou a resistência à tração e o alongamento, até a ruptura, da dura-máter canina conservada em glicerina, constatando aumento da resistência à tração, sem alteração no grau de elasticidade.

ABRAHÃO et al. (1992) analisaram a influência da glicerina nas propriedades mecânicas do peritônio bovino. As dimensões dos corpos de prova foram assim padronizadas: largura de 20 mm; comprimento de 125 mm; espessura média de 0,4 mm; área de secção de 8 mm². A velocidade da carga foi de 6 mm/min, com a aplicação de pré-carga de 5 N. Os exemplares foram submetidos aos ensaios sem que fossem reidratados. Segundo estes autores, o aumento do tempo de conservação em glicerina promove a diminuição da rigidez do material, aumentando sua elasticidade.

REYES (1993) realizou testes físicos comparativos entre membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco. Concluiu que o pericárdio equino, conservado em glicerina a 98% e à temperatura ambiente, por 30 ou 40 dias, apresentava aumento significativo para os valores dos alongamentos até a ruptura, ao comparar estes resultados com as preparações não preservadas. Os mesmos achados foram verificados na fâscia lata de equino conservada em glicerina a 98% e congeladas (- 16°C), durante o período de 30 e 40 dias. De fato, a conservação em glicerina aumentou a ductilidade daquelas membranas.

BATISTA et al. (1996), ao compararem a resistência à tração, entre peritônio canino, bovino, equino e suíno, fresco e conservado em glicerina a 98%, padronizaram as dimensões dos corpos de prova em 6 mm para largura e 50 mm para comprimento. Quando analisados os alongamentos do material fresco, em função das cargas aplicadas observaram comportamento heterogêneo e o ponto de ruptura das membranas diferiu entre as espécies, demonstrando ser o peritônio bovino o mais

resistente entre os espécimes analisados. Também foi constatada alteração da resistência, das membranas conservadas, durante período de até 60 dias.

RABELO et al. (2004) testaram a resistência à tração e o alongamento até a ruptura do centro tendíneo bovino a fresco, conservado em glicerina a 98% e em glutaraldeído a 4%, por 30 dias. Estes autores encontraram os seguintes valores médios para a força máxima de tração das amostras: a fresco ($4,61 \pm 0,97$ N), em glicerina ($4,28 \pm 0,79$ N) e em glutaraldeído ($5,58 \pm 1,25$ N), indicando que o material conservado em glutaraldeído apresenta incremento significativo em sua resistência quando comparado ao material preservado em glicerina a 98%.

Os valores médios obtidos por GUIMARÃES et al. (2008) na avaliação do peritônio bovino, submetido ao ensaio mecânico a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, mediante a avaliação dos seguintes parâmetros: Espessura (mm); Largura (mm); Área (mm²); Força máxima(N); Tensão Máxima (MPa) e Alongamento (mm) estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios referentes à avaliação do peritônio parietal bovino submetido ao ensaio mecânico de tração sem conservação (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, sendo avaliados os seguintes parâmetros: Espessura (mm); Largura (mm); Área (mm²); Força máxima(N); Tensão Máxima (MPa) e Alongamento (mm) Ribeirão Preto – SP – 2007. (Adaptado de GUIMARÃES et al., 2008).

Parâmetros	Períodos analisados (dias)			
	0	30	60	90
Espessura (mm)	0,61	0,49	0,53	0,46
Largura (mm)	17,71	19,27	19,73	20,22
Área (mm²)	10,74	9,53	10,5	9,27
Força Max (N)	38,17	44,94	41,95	44,68
Tensão Max (MPa)	3,73	5,61	4,21	4,93
Alongamento (mm)	18,43	25,03	26,49	24,3

Independentemente do método aplicado, todos os testes são passíveis de erros. Sendo assim, uma das características primordiais durante o desenvolvimento de um modelo experimental é tentar minimizar as variáveis que possam interferir na obtenção de resultados mais precisos e completos (WU et al., 2004).

Os meios de conservação utilizados para manter as membranas biológicas, devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e crescimento de microorganismos, além de preservar ao máximo a integridade celular, aumentar a resistência a tração do tecido e atuar por longo período de tempo. (ALVARENGA, 1992; MOTTA et al., 2002).

Conforme relatou PIGOSSI (1967), a glicerina age como antimicrobiano de amplo espectro de ação, executando-se as formas bacterianas esporuladas. Descreve-se também que a glicerina pura é um agente fixador e desidratante de rápida ação, aumentando a ductibilidade das membranas. Como vantagem da conservação dos tecidos em glicerina foi relatado que as membranas conservada em glicerina mantém a vitalidade das células, não perdem as características fundamentais de textura e elasticidade, e não sofrem contaminação (PIGOSSI, 1967; STOLF & ZERBINE, 1974; LEITE et al., 1979).

O peritônio é uma membrana biológica de origem animal, composta majoritariamente de colágeno, possuindo baixa antigenicidade. Além disso, é de fácil obtenção, estocagem, esterilizável e possui baixo custo. Estudos comprovam que a conservação deste material em glicerina (98%) à temperatura ambiente, mantém preservado por período superior a 30 dias, garantindo sua elasticidade, resistência e textura (DALECK; et al., 1987; DALECK et al., 1988; ALVARENGA, 1992).

2.4. Morfologia do Peritônio

O peritônio é a membrana serosa considerada a mais extensa do organismo; é formado pelo peritônio parietal, que reveste a parede da cavidade abdominal e pelo peritônio visceral, o qual se relaciona diretamente com os órgãos; ambos são contínuos e por meio de reflexões, denominadas mesos, ligamentos e omentos fixam os órgãos e mantem a estática visceral (FRANDSON et al., 2005).

É formado por uma camada celular escamosa de origem mesotelial assentada sobre lâmina basal que, sustentada por tecido conjuntivo contendo fibras colágenas e elásticas, possibilita mobilidade em grau variado (CRUZ, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Em avaliação histológica de membranas biológicas bovinas, conservadas em glicerina e a fresco, GUIMARÃES et al. (2007) verificaram no peritônio presença de tecido conjuntivo denso modelado, cujas fibras mostraram-se acidófilas, dispostas longitudinalmente e justapostas, apresentando fibroblastos com núcleos levemente basófilos. Compondo as extremidades desta serosa, observaram a presença de uma camada de células mesoteliais apoiadas sobre delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos.

Os tecidos conjuntivos desempenham as funções de estabelecimento e manutenção da forma do corpo. a ampla variedade de tecidos conjuntivos reflete a variação na composição e na quantidade de seus três componentes que são as células, fibras e substancia amorfa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004)..

Dentre os tipos de tecido conjuntivo, o tecido conjuntivo denso caracteriza-se pelo predomínio de fibroblastos e fibras colágenas sendo assim adaptado para oferecer resistência e proteção. Dependendo do modo de organização dessas fibras, pode ser classificado em denso não modelado e denso modelado. O denso não modelado é formado por fibras colágenas entrelaçadas, dispostas em feixes que não apresentam orientação fixa, o que confere resistência e elasticidade, além de certa resistência às trações exercidas em qualquer direção. O denso modelado constitui-se de fibras colágenas dispostas em feixes com orientação fixa, alinhados com os fibroblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido conjuntivo denso não modelado ocorre nas cápsulas de órgãos e na derme profunda da pele. O tecido conjuntivo denso modelado constitui os tendões e os ligamentos apresentando como característica, orientação paralela e ordenada das fibras colágenas, embora, seu núcleo e suas fibras possam ter aspecto ondulado; a organização paralela e ordenada das fibras colágenas deste tipo de conjuntivo confere resistência quando uma grande tensão é aplicada (BANKS, 1992). Entretanto, YOUNG & HEATH (2000) descreveram que nos ligamentos a disposição das fibras colágenas é menos ordenada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

A metodologia adotada no desenvolvimento do presente estudo foi aprovada pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV – UNESP), segundo o protocolo nº 010455 (Anexo I).

Assim, foram utilizadas quatro pacas, sendo três machos e uma fêmea, todas adultas com peso médio de oito quilogramas. Os animais pertenciam ao plantel de pacas do setor de Animal Silvestres da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal (FCAVJ, UNESP), que é registrado no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, como criatório de espécimes da fauna brasileira para fins científicos.

Uma vez que o material deste trabalho (peritônio parietal) foi colhido de pacas utilizadas em outros experimentos, os quais estiveram em andamento concomitantemente a este, não foi necessário realizar a eutanásia de animais, exclusivamente para a obtenção do material desta pesquisa.

Logo após o óbito, o animal, que já se encontrava no Laboratório de Anatomia da FCAVJ, UNESP, foi posicionado em decúbito dorsal, sobre a mesa de dissecação e, em seguida, mediante incisão pré-retroumbilical na linha mediana, a cavidade abdominal foi acessada.

Após a exposição da face interna da parede abdominal, que é revestida por peritônio parietal em toda sua extensão, iniciou-se a colheita desta membrana, descolando-a cuidadosamente, tanto da parede abdominal direita, quanto da esquerda. (Figura 2).

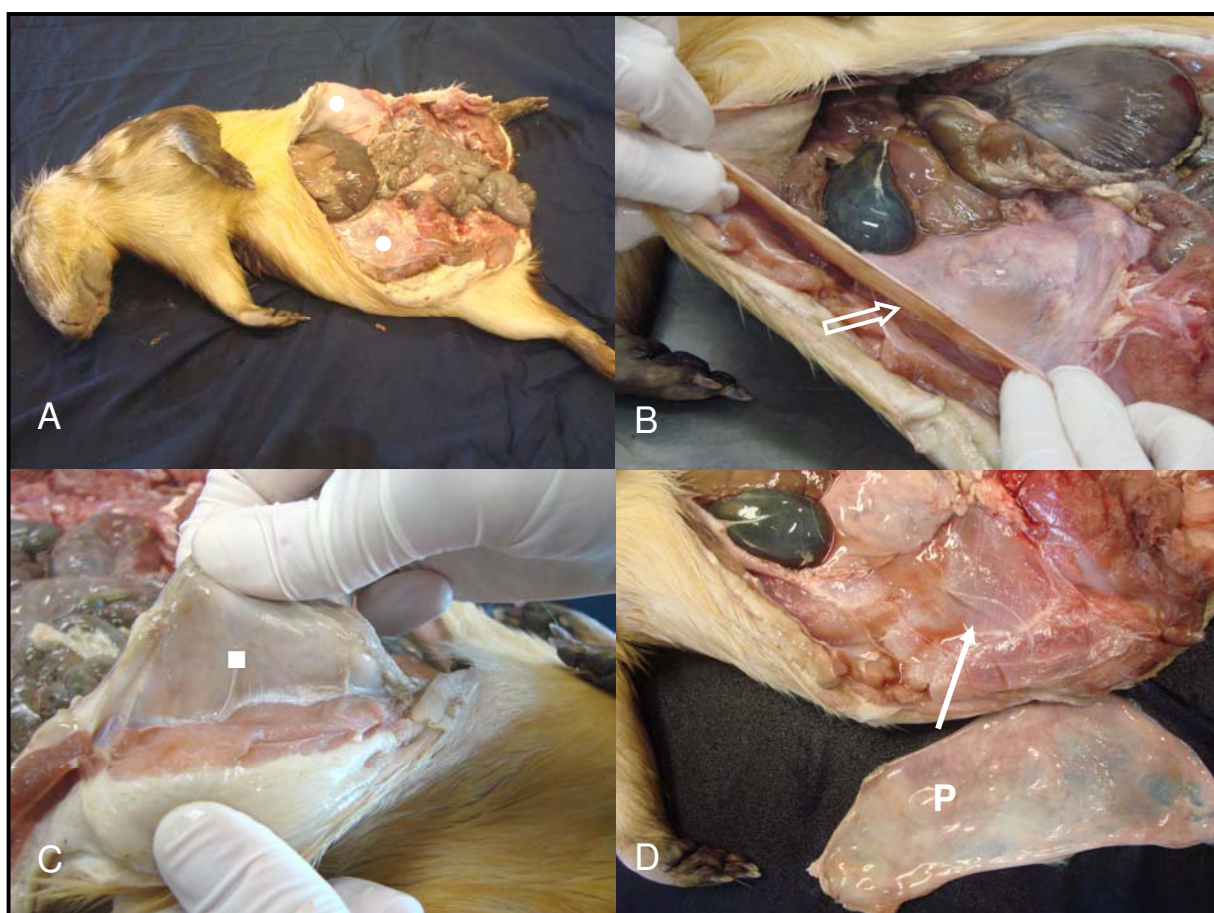


FIGURA 2. Imagem fotográfica da colheita do peritônio. Em **A** se observa a localização do peritônio revestindo as paredes abdominais laterais de uma paca adulta (●). Em **B**, pode-se constatar o descolamento parcial do peritônio parietal (seta vazada), o qual está bem evidenciado (■), em **C**. Em **D**, destaca-se o retalho peritonal (P) e o local da parede abdominal lateral (seta), de onde foi colhido.

Em seguida, mediante procedimento de ressecção do peritônio parietal, por toda a região dorsal da parede abdominal, retiravam-se uma faixa dessa membrana, com aproximadamente, 15 cm de comprimento e 12 cm de largura, de ambos os antímeros. Mesmo levando-se em conta a irregularidade desse revestimento, procurou-se manter certa homogeneidade entre as amostras.

As amostras foram lavadas em solução fisiológica para retirada de resíduos. Aquelas que foram encaminhadas para as avaliações a fresco foram acondicionadas, individualmente, em recipientes plásticos contendo solução fisiológica de NaCl 0,9%. As que foram avaliadas em períodos diferentes de conservação em glicerina a 98%, também foram conservadas individualmente em recipientes plásticos, que neste caso continham glicerina a 98%, em uma proporção de 20:1 (glicerina/membrana), permanecendo neste meio durante os períodos de 30, 60 e 90 dias.

Todos os recipientes foram devidamente identificados (nome do material, data da colheita e meio de preservação) e todas as amostras mantidas em temperatura ambiente.

3.2. Ensaio Mecânico de Tração

Estas provas foram realizadas no laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Para a avaliação do material procedeu-se inicialmente a obtenção das amostras, que se constituíram de dez retalhos peritoniais com aproximadamente, 10 mm de largura e 150mm de comprimento, para cada animal.

A confecção dessas amostras foi realizada inicialmente, mediante a lavagem em solução fisiologia de NaCl 0,9%, e limpeza do material, para a retirada de possíveis resíduos, gorduras e aderências remanescentes. Em seguida esse material passou por uma guilhotina adaptada, que constava de uma plataforma de apoio e duas navalhas paralelas, distantes 10 mm (milímetros) entre si, e obteve-se as amostras que constavam de retalhos peritoniais.

Os retalhos obtidos, anteriormente a realização dos ensaios mecânicos, foram reidratados em solução fisiológica de NaCl 0,9%, (cloreto de sódio) por 20 minutos, não excedendo 90 minutos, para representar as condições de colheita.

A partir daí, foram realizados os testes em máquina universal de ensaio EMIC^{®1} (modelo DL10000) (Figura 2). A máquina possui interface direta a um microcomputador, com um software Tesc^{®2}, capaz de gerar gráficos da carga versus alongamento para cada ensaio.

Para fixação dos corpos de prova na máquina foi utilizado acessório que contém ranhuras em sua superfície, as quais auxiliam esse processo, mediante compressão realizada pelo ajuste de um parafuso, evitando o escorregamento do material durante o ensaio (Figura 3 e 4).

No momento dos ensaios, os corpos de prova foram acoplados à máquina dada uma pré-carga de 1N (100g) por aproximadamente 30 segundos, para que houvesse a acomodação do sistema, evitando-se possíveis folgas no conjunto máquina, acessório e modelo ensaiado (Figura 4).

¹ EMIC[®] modelo DL10000 São José dos Pinhais-PR-Brasil

² TESC[®] Software São José dos Pinhais-PR-Brasil

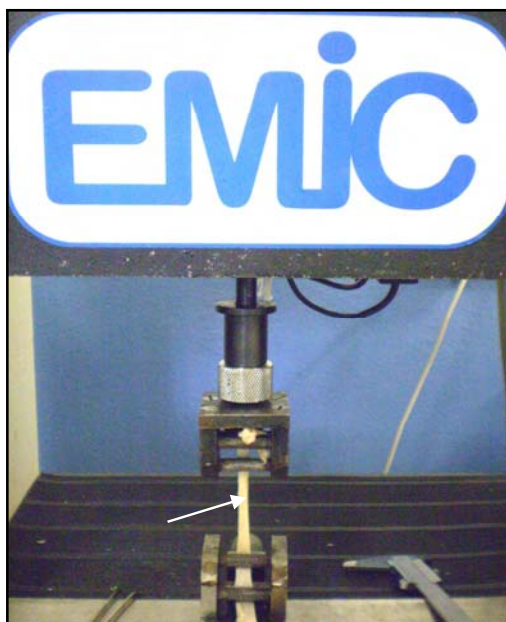


FIGURA 3. Imagem fotográfica da máquina universal de ensaio EMIC^{®3} (modelo DL10000), na qual foram realizados o ensaio mecânico de tração nas amostras peritoniais (seta) de paca.

³ EMIC[®] modelo DL10000 São José dos Pinhais-PR-Brasil

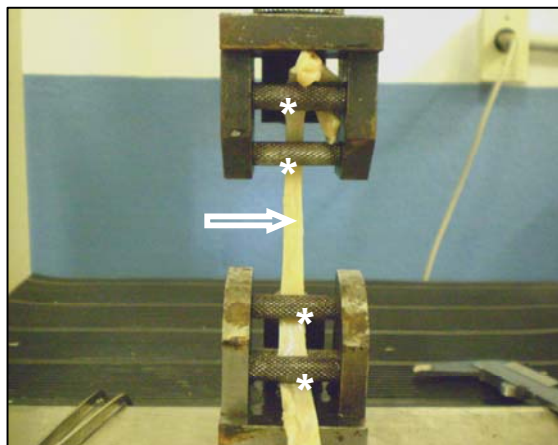


FIGURA 4. Registro do corpo de prova (seta vazada) acoplado à máquina com o auxílio de acessório que contém ranhuras em sua superfície (*), para a realização do ensaio mecânico de tração.

Com a amostra já acoplada na máquina, foi realizada a mensuração de sua largura e espessura com o auxílio de paquímetro Mytutoyo^{®4}, com um erro estimado que levou em conta a incerteza da medida, e se processou o ensaio propriamente dito.

Foram obtidos gráficos com o registro da carga “*versus*” alongamento de cada ensaio, nos quais foram analisadas as seguintes propriedades mecânicas: força máxima, tensão máxima, espessura e alongamento.

A força máxima é definida como aquela suportada antes do início da ruptura completa de um tecido ou parede, sem considerar suas dimensões, calculadas em Newton. A tensão é medida em termos de quantidade de força suportada por unidade de área de secção, ou seja, independe da área da seção transversal do tecido, sendo calculada em N/mm^2 e expressa em MPa (mega pascal).

3.3. Estudo Histológico

3.3.1. Microscopia de Luz

Para a análise da microscopia de luz foram colhidos fragmentos de todas as amostras de peritônio, seja a fresco, ou conservadas em glicerina a 98% em proporção de 20:1 (glicerina/membrana), nos períodos de 30, 60 e 90 dias. Esses fragmentos

⁴ Mytutoyo® Sul Americana, São Paulo, Brasil

foram fixados em solução de Bouin e encaminhados ao Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, onde foram processados e, em seguida examinados.

As amostras provenientes do material conservado em glicerina a 98% foram reidratados em solução fisiológica de NaCl 0,9% antes de entrarem na rotina histológica por pelo menos 20 min e fixados em solução de Bouin.

O material permaneceu em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período, foi lavado em álcool a 70% para retirada do excesso de fixador. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação, em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), durante quatro horas. A seguir, realizou-se a diafanização com xilol, por aproximadamente 90 min, e após este procedimento, embebeu-se o material em Histosec^{®5} por 90 min, na temperatura entre 60 e 70°C para o procedimento da inclusão.

A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 5 µm com auxílio de navalhas descartáveis, os quais foram submetidos à coloração por hematoxilina-eosina (HE) de acordo com as técnicas descritas por TOLOSA et al. (2003). As preparações histológicas foram analisadas em fotomicroscópio (Leica, DM5000 B), ao qual está acoplada a máquina Leica^{®6} DFC 300FX pela qual capturaram-se algumas imagens para a documentação.

3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Seguindo metodologia estabelecida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV - UNESP, as amostras colhidas, isto é, fragmentos de peritônio, a fresco fixados em glicerina a 98% em proporção de 20:1 (glicerina/membrana), nos períodos de 30, 60 e 90 dias foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) por 48 horas, lavadas em tampão fosfato, tratados com ósmio a 1% , lavados novamente em tampão fosfato, desidratados em série crescente de

⁵ Histotec® Merck

⁶ Leica® AOTEC Instrumentos Científicos LTDA-São Paulo

alcoóis (30 a 100%), durante pelo menos 20 min cada etapa, secas ao ponto crítico no aparelho EMS[®] 850, metalizadas com átomos de ouro em aparelho DESK II^{®7} e examinados ao microscópio eletrônico de varredura JEOL^{®8}, operando com feixe de elétrons de 15 keV, onde, alguns espécimes foram documentados.

3.4. Análise dos dados

Considerando-se que com este estudo destaca-se estabelecer parâmetros mecânicos que sejam relevantes dentre as possibilidades e a conveniência da utilização do peritônio de paca como implante, optou-se por analisar os parâmetros elásticos característicos com os respectivos Algarismos Significativos, determinados com base no erro provável, levando-se em conta os instrumentos, as amostras e as condições de medidas. Optou-se pela estimativa de erros intrínsecos de cada medida nas curvas de força por deslocamento, procurando-se observar tendências gerais e buscando fornecer ao leitor um parâmetro equivalente ao módulo de Young da mecânica, que corresponde a tensão mecânica em MPa (Mega Pascal) dividida pela taxa de deformação em trechos lineares, com números de pontos escolhidos arbitrariamente. Os resultados apresentados foram todos tratados com o programa Microsoft Origin 6.0.

Os resultados também foram submetidos a uma análise estatística a fim de preservar, para comparação, o melhor método de análise dos dados de trabalhos anteriores. Nesta análise os dados foram comparados pelo teste F da análise de variância, e quando significativo ajustaram-se polinômios ortogonais para melhor explicar estas diferenças. Todos os resultados da análise estatística foram obtidos no “software” Minitab (1992).

⁷ DESK II[®]-DETON VACCUN NJ, EUA

⁸ JEOL[®] -JSM 5410 Tokyo-Japão

4. RESULTADOS

4.1. Ensaaios Mecânicos de Tração

4.1.1. Análise para obtenção de parâmetros característicos dos materiais de interesse utilizando Algarismos Significativos

Os principais resultados dos ensaios mecânicos são apresentados nas tabelas 2, 3, 4 e 5 e nas figuras 5 até 10.

As tabelas 2 a 5 relacionam dados de espessura, largura, área da secção transversal, força máxima, tensão máxima e alongamento máximo, com a estimativa dos erros de cada medida e sua propagação devida aos cálculos efetuados, conforme descrição detalhada a seguir.

Os erros indicados para as medidas individuais, correspondem a uma estimativa plausível considerando os instrumentos, as condições de realização das medidas e a propagação do erro nas operações de multiplicação e de divisão realizadas, com o objetivo de representar-se o número máximo aceitável de algarismos significativos. A estimativa de erro da força máxima considerou os valores típicos em torno do valor máximo, assim como na determinação do alongamento na posição de máximo. As principais fontes de erro são as medidas de largura e de espessura. O erro na determinação da espessura e da largura das membranas é intrínseco do material que não tem geometria fixa e bem determinada.

Tomando a linha do corpo de prova de número um, como exemplo, vemos que o erro na espessura, com valor de 0,50mm foi considerado $\pm 0,05$ mm, corresponde a metade de 0,1 mm que é a menor leitura que se consegue determinar com confiança razoável. Assim a leitura correta deve estar entre 0,55 e 0,65.

No caso da largura, todas as amostras foram cortadas com 10 mm. Observando a não uniformidade e irregularidades das amostras, estimou-se um erro de ± 1 mm, ou seja, as larguras reais deverão estar entre $10-1=9$ mm e $10+1=11$ mm.

Os erros nas medidas de espessura e largura não são aleatórios, assim não foi determinado seu valor médio.

Os erros nas áreas foram calculados considerando que na multiplicação os erros relativos se somam.

A estimativa de erro na força máxima e na deformação neste ponto foram obtidas diretamente da leitura das coordenadas correspondentes a força e a deformação nas vizinhanças destes pontos.

A tensão expressa em mega Pascal (MPa) foi obtida dividindo-se a força pela área correspondente. O erro na tensão foi obtido a partir da soma dos erros relativos na área somado ao erro relativo da leitura da força máxima.

A força máxima depende diretamente da área da secção transversal inicial, assim existe um erro sistemático que compromete o uso da estatística, pois, naturalmente a força máxima será menor para áreas de secção transversal menores. O máximo alongamento também depende das peculiaridades das amostras e da secção transversal, assim o erro nesta variável é não aleatório.

Tabela 2. Constante elástica, densidade de energia e energia total gasta nos diferentes períodos de armazenamento da membrana.

Parâmetros	Períodos analisados (dias)			
	0	30	60	90
Constante elástica	7,12	3,36	2,58	3,97
Densidade de Energia (MJ/m³)	0,153	0,128	0,329	0,861
Energia Total Gasta (mJ)	9,0	8,0	10,4	17,4

Para facilitar a compreensão dos resultados, observa-se na Tabela 7 os valores de força máxima, tensão máxima, tensão média dos valores máximo, deformação máxima e para os ensaios realizados.

Tabela 3. Valores de força máxima, tensão máxima, tensão média dos valores máximo, deformação máxima e para os ensaios realizados com a membrana de peritônio de paca. (Deformação máxima e deformação média dos valores máximos são deformações relativas ao comprimento inicial que é de 5,0cm).

Parâmetros	Períodos analisados (dias)			
	0	30	60	90
Força Máxima (N)	14	16	22	31
Tensão Máxima (MPa)	2,80	2,80	4,0	3,8
Tensão Média dos Valores Máximos (MPa)	1,84	1,74	1,74	2,8
Deformação máxima	0,30	0,49	0,78	0,93

Para a obtenção de parâmetros característicos do peritônio da paca considerou-se que as amostras estudadas não seguiam um padrão linear na curvas que relacionam força e deformação, optando-se por escolher pontos arbitrários somente em trechos considerados lineares como se verifica na Figura 5.

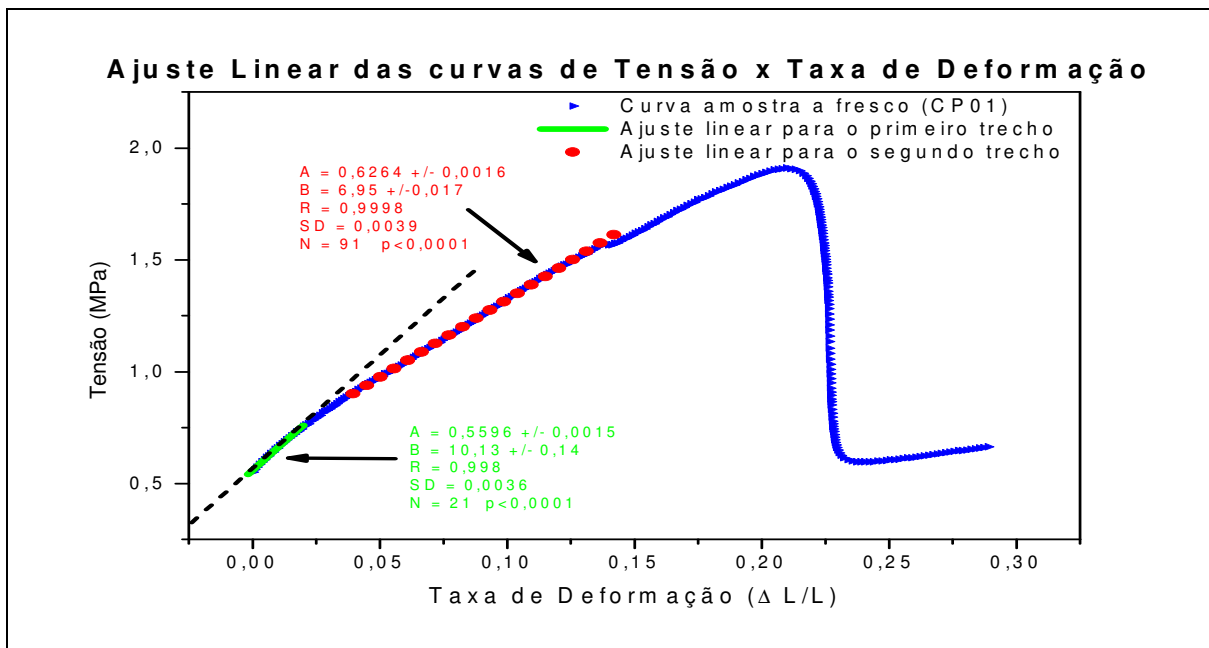


FIGURA 5. Representação gráfica dos pontos em dois trechos considerados lineares. Nota-se que no trecho inicial (preto tracejado) a constante elástica é de 10,1 MPa, enquanto que no segundo trecho o valor é de 6,95 MPa. Este valor decresce na medida em que as deformações crescem mostrando claramente o comportamento não linear deste material. Assim julga-se estabelecer a ordem de grandeza da constante elástica do material que está entre 1MPa e, aproximadamente 10MPa, neste caso.

Uma visão geral do comportamento da tensão x taxa de deformação nas condições; fresco, 30, 60 e 90 dias conservadas em glicerina a 98% com indicação do ajuste linear para determinação das constantes elásticas de cada condição são ilustradas na Figura 6. Aumentando os valores de tensão e de deformação máxima, as membranas tornam-se mais flexíveis e deformáveis, deslocando o ponto de ruptura para deformações maiores do que aquelas das amostras não expostas à glicerina

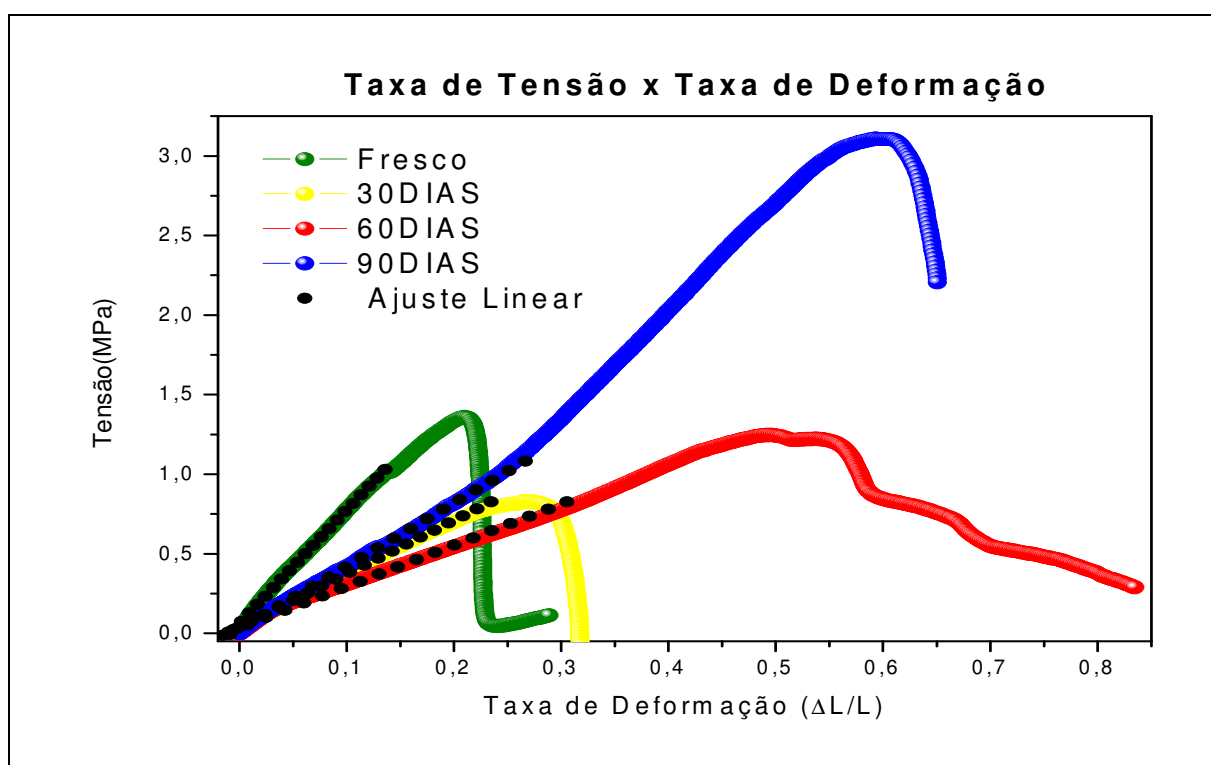


FIGURA 6. Representação gráfica do ajuste linear nos diferentes períodos analisados.

Para facilitar a compreensão dos resultados outro parâmetro relevante a ser considerado é a energia gasta com o trabalho de deformação por tração a partir da tensão inicial até a tensão máxima (WU et al., 2004). Os valores da densidade de energia estão relacionados na Tabela 6 e foram obtidos pela determinação da área sob as curvas Tensão (MPa) X deformação (mm/mm), que correspondem a energia requerida em cada ensaio. Valores de constante de elasticidade também estão expressos na Tabela 6.

Em sequência seguem as figuras referentes a todos os ensaios realizados em todos os corpos de prova nos diferentes períodos de tempo (a fresco, 30, 60 e 90 dias), apenas com a finalidade de comparar a ação da glicerina a 98% na membrana.

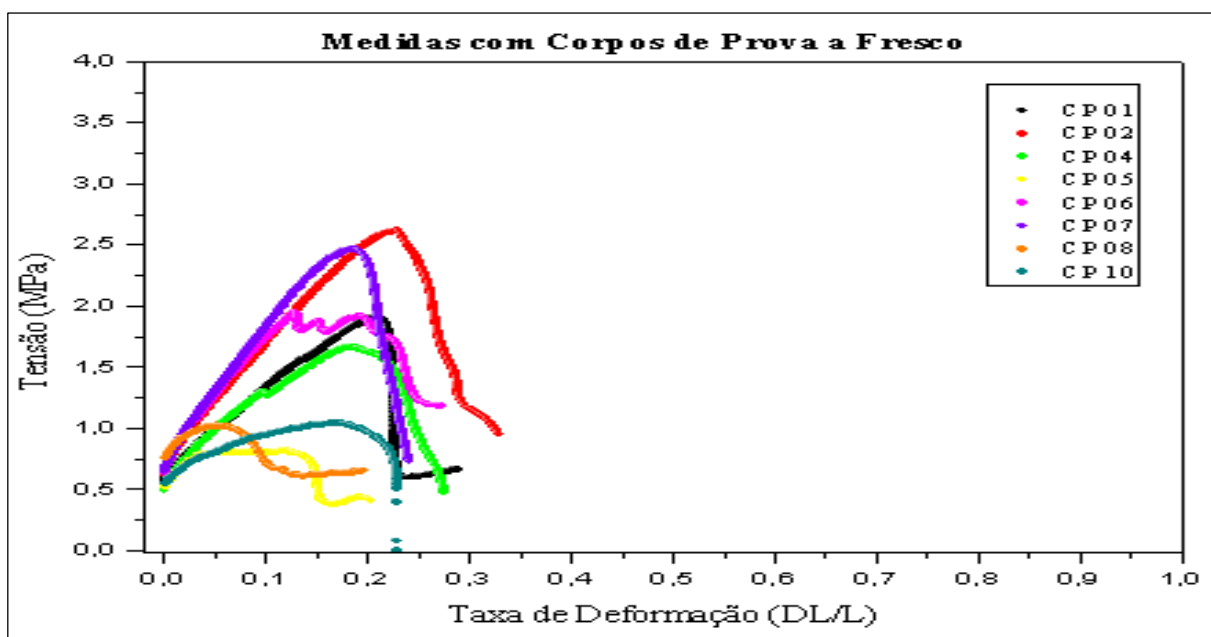
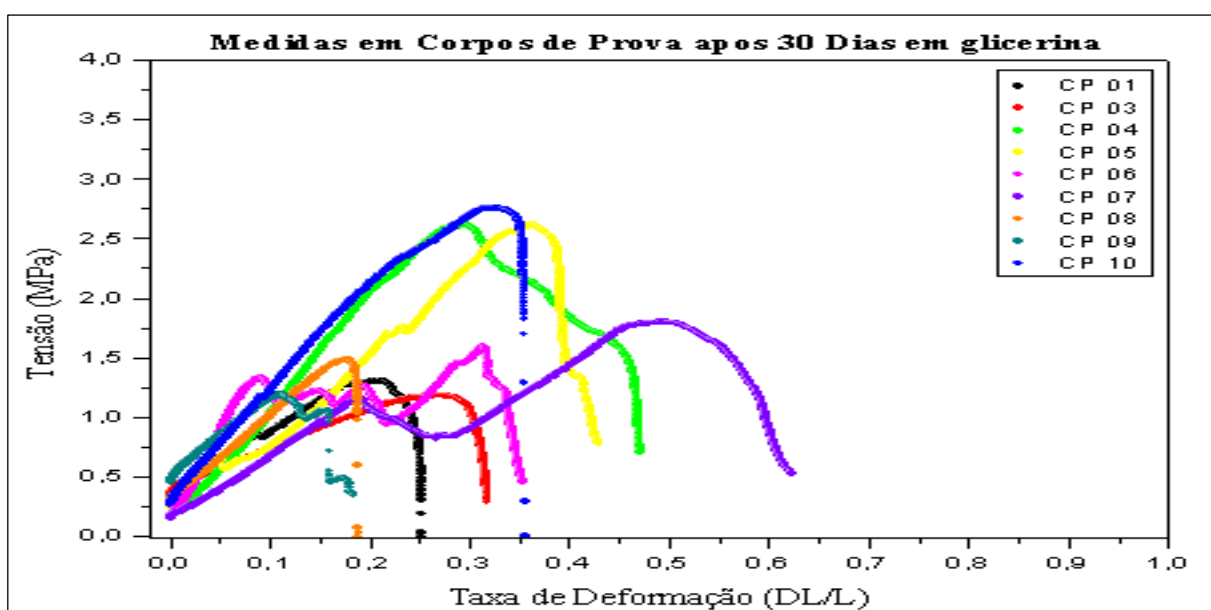


FIGURA 7. Amostra não exposta a glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.



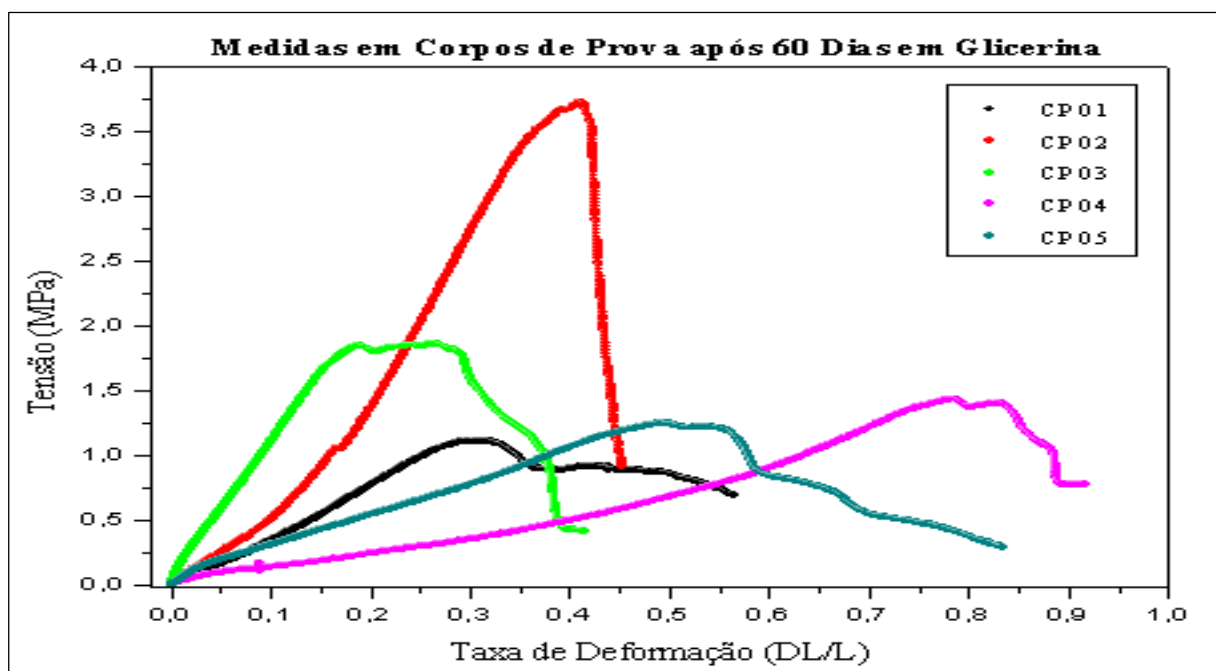


FIGURA 9. Amostra conservada 60 dias em glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.

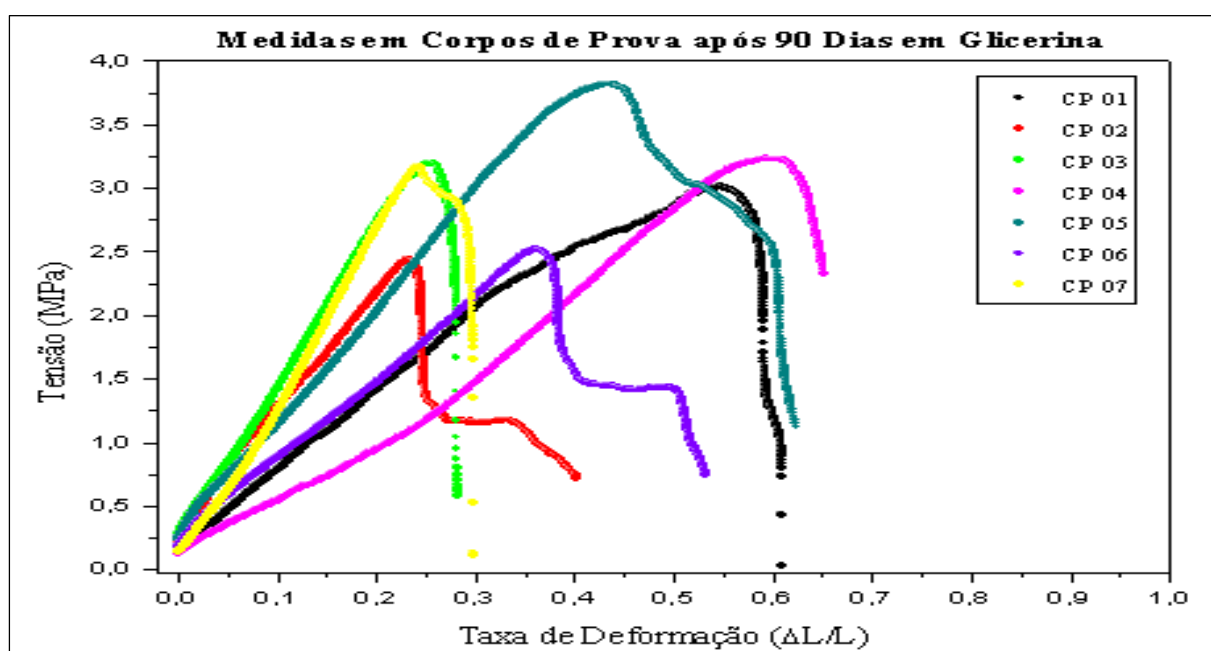


FIGURA 10. Amostra conservada 90 dias em glicerina. Superposição das curvas de tensão X deformação.

As figuras acima não deixam dúvida que o efeito da glicerina é de aumentar tanto a tensão máxima quanto a deformação máxima.

4.1.2. Análise Estatística

Analizando-se o gráfico referente à força “versus” alongamento, obtidos por meio do *software* Tesc[®], foi possível determinar algumas propriedades mecânicas dos corpos de prova estudados. Estas propriedades incluem mensurações de espessura, área, força de tração, tensão e alongamento, do material a fresco e conservados em glicerina a 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Valores referentes à avaliação do peritônio de paca submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Jaboticabal, 2009.

Dias	Espessura (mm)	Área (mm ²)	Força Máxima (N)	Tensão (MPa)	Alongamento (mm)
0	0,5 $\pm$ 0,07	5,40 $\pm$ 0,70	9,86 $\pm$ 3,59	1,84 $\pm$ 6,96	9,00 $\pm$ 3,48
30	0,45 $\pm$ 0,15	4,50 $\pm$ 1,51	7,97 $\pm$ 4,16	1,75 $\pm$ 6,79	14,94 $\pm$ 5,97
60	0,90 $\pm$ 0,45	9,00 $\pm$ 4,55	16,10 $\pm$ 4,69	2,18 $\pm$ 1,12	19,86 $\pm$ 7,84
90	0,72 $\pm$ 0,30	7,20 $\pm$ 3,05	18,83 $\pm$ 7,33	2,79 $\pm$ 2,79	22,18 $\pm$ 10,70

Todas as variáveis apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$), entre os tratamentos (dias), exceto a variável tensão máxima (T máxima), que não foi significativa ($p > 0,05$). A regressão polinomial que melhor se ajustou as variáveis significativas foi a regressão linear as quais estão expressas na Tabela 5.

Tabela 5. Equações das regressões lineares para as variáveis (espessura, força, alongamento, área) representados pela letra y, em função de x (dias).

Variável (y)	Regressão ($y=a+b.x$)	Valor de p*
Espessura (mm)	$0.500+0.0033.x$	0.030*
Força (N)	$7.931+0.1168.x$	0.000**
Alongamento (mm)	$9.826+0.1482.x$	0.000**
Área (mm²)	$5.040+0.033.x$	0.030*

* $p \leq 0,05$ significativo a 5%.

** $p \leq 0,01$ significativo a 1% de probabilidade

Considerando-se a força máxima aplicada ao peritônio, evidenciou-se aumento nos valores para o material a fresco (9,86 N) conservado em glicerina a 98%, por 30 dias (7,97 N), 60 dias (16,10 N) e 90 dias (18,83 N), sendo estes significativos ($p < 0,01$).

Com relação a variável alongamento, notou-se aumento nos valores relativos aos materiais conservados em glicerina, verificando-se diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores das amostras a fresco (9,00 mm) e os preservados por períodos de 30 dias (14,94 mm), 60 dias (19,86 mm) e 90 dias (22,18 mm), indicando que as amostras aumentaram em relação ao alongamento em 0,1482 mm por dia.

A variável área também se apresentou significativa ($p < 0,01$) entre os valores das amostras a fresco (5,40 mm²) e os preservados em glicerina pelos períodos de 30 dias (4,50 mm²), 60 dias (9,00 mm²) e 90 dias (7,20 mm²), indicando assim, que a área desta membrana aumentou em 0,033 mm² por dia.

4.2 Observações à microscopia de luz

Ao serem observadas ao microscópio de luz constatou-se para todas as amostras de peritônio de paca ora avaliadas, tanto as a fresco quanto as conservadas em glicerina a 98%, nos dias 30, 60 e 90, a mesma constituição estrutural geral, embora, no caso do material conservado em glicerina, algumas alterações referentes ao espaçamento entre as fibras de colágeno, puderam ser evidenciadas.

Assim, as amostras de peritônio parietal a fresco, constituíam-se de mesotélio apoiado em tecido conjuntivo, que variava de frouxo a denso, e este apresentava-se

modelado e não modelado; a este arranjo entremeavam-se células adiposas agrupadas em maior ou menor concentração (Figura 11).

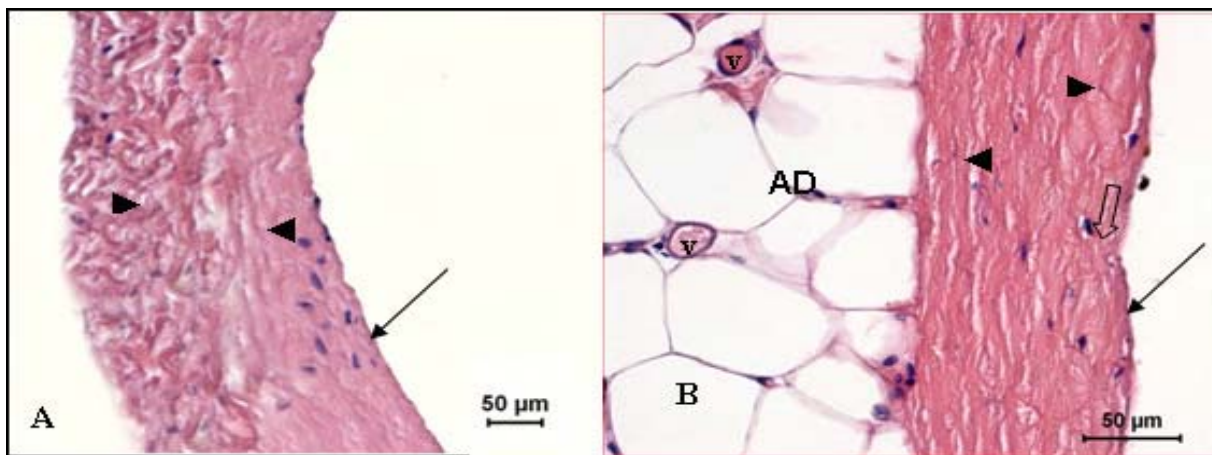


FIGURA 11. Fotomicrografias de amostra de peritônio a fresco de paca adulta. Em A se verifica o mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄). Em B, observa-se além do mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄), a presença de tecido conjuntivo frouxo (seta vazada) além de células adiposas (AD) onde se alojam vasos sanguíneos (v). A – aumento de 20X e B – Aumento de 40X. HE.

Nas amostras de peritônio parietal conservadas em glicerina a 98%, nos dias 30, 60 e 90, foi observada uma desorganização tecidual gradual, em todos os períodos (Figura 12).

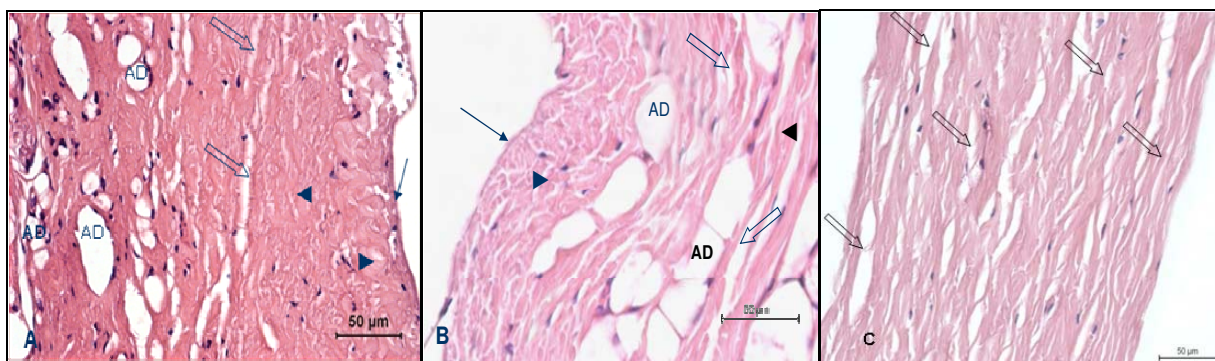


FIGURA 12. Fotomicrografia de amostra de peritônio de paca adulta conservada em glicerina a 98% por 30 (A), 60 (B) e 90 (C). Observar o mesotélio (seta), tecido conjuntivo denso não modelado (►) e modelado (◄), e células adiposas (AD). Notar a diferenciação na organização das fibras colágenas, o espaçamento entre elas aumenta mediante o período de seu acondicionamento na glicerina (seta vazada), também as células adiposas parecem aumentadas em decorrência desse armazenamento. 40X HE.

4.3. Observações à microscopia eletrônica de varredura

À microscopia eletrônica de varredura verificou-se com melhor acuidade a estrutura do peritônio da paca. Assim, tanto no material a fresco, quanto no conservado em glicerina a 98% durante os períodos de 30, 60 e 90 dias, observou-se integridade e organização tecidual semelhantes, porém um desarranjo mínimo entre as fibras colágenas desse material foi evidenciado Figura 13.

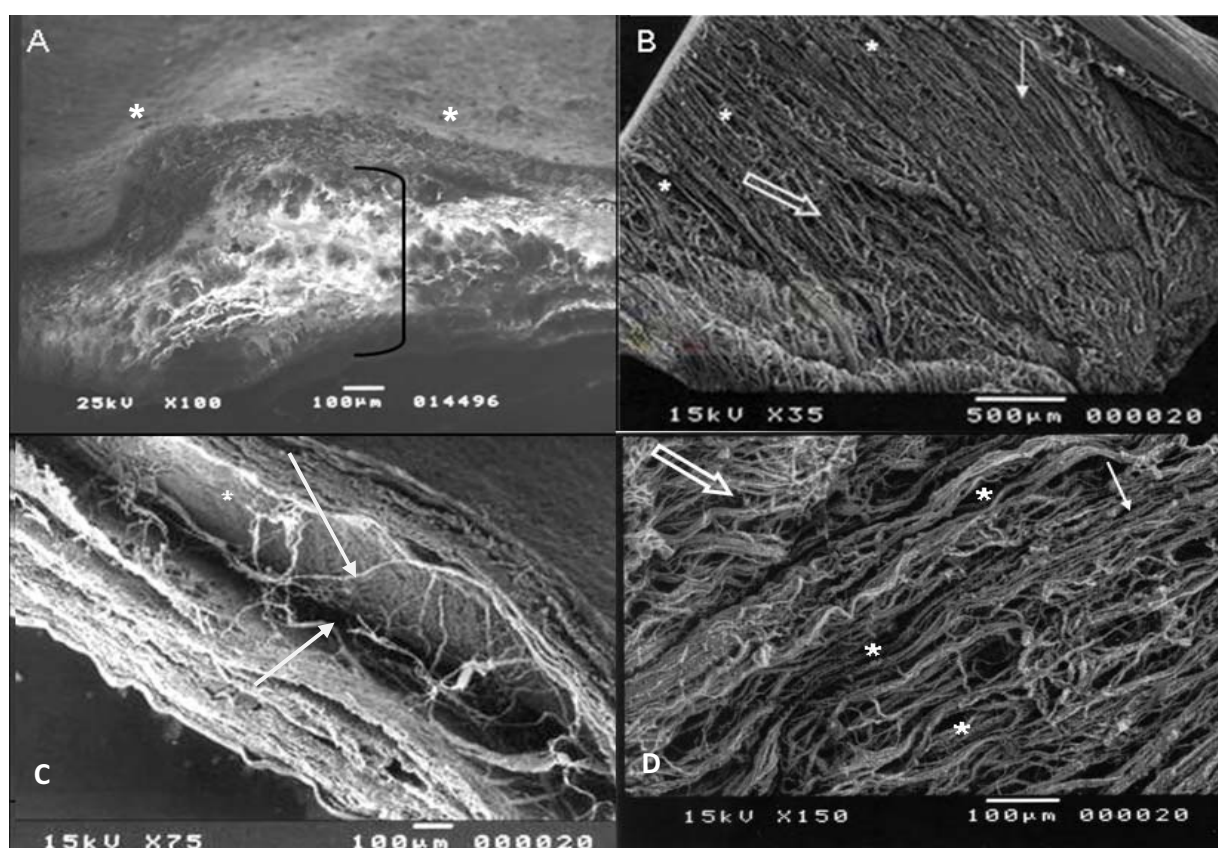


FIGURA 13. Eletromicrografias de amostras de peritônio de pacas adultas, a fresco (A) e conservadas em glicerina a 98% por 30 (B), 60 (C) e 90 (D) dias. Em A, notar a organização normal do tecido conjuntivo dessa membrana. Em B observar a disposição organizada (seta) e desorganizada (seta vazada) das fibras colágenas, além da leve dissociação entre elas (*) e em C verificar a dissociação das fibras colágenas (seta). Em D verificar o aumento da dissociação das fibras de colágeno (*), além da disposição organizada (seta) e desorganizada (seta vazada) das fibras colágenas.

5. DISCUSSÃO

Estudos relativos à morfologia microscópica e ultraestrutural, acrescidos dos testes de resistência à tração de uma membrana biológica, tal qual se realizou neste estudo com o peritônio de paca, revestem-se de importância pelo fato de que esta estrutura apresenta ampla aplicação como material de implante (PIGOSSI, 1964; ALVARENGA, 1992; DALECK et al. 1992), tanto em experimentos com animais de laboratório (BASTOS et al., 2005) quanto na prática da clínica veterinária (INATOMI et al. 1980; DALECK et al. 1988; DALECK et al. 1992; COSTA NETO et al. 1999; RODASKI et al. 2002).

As curvas de força F (N) contra deformação Δx (mm), normalmente obtidas em ensaios mecânicos, podem ser apresentadas na forma de tensão T (Pa) contra a deformação relativa $\Delta x/x$. A taxa de variação da tensão dividida pela taxa de variação da deformação é, a princípio, independente das dimensões iniciais do material. Assim o parâmetro $\Delta T/(\Delta x/x)$, ou seja, a inclinação dos trechos lineares é um parâmetro que mede a constante elástica do trecho considerado (ASBY & JONES, 1996). No caso de materiais complexos como polímeros, borrachas e membranas biológicas, mesmo para pequenas deformações, o comportamento mecânico pode não seguir um regime linear com relações entre força e deformação que dependem da própria deformação, este é o caso das amostras investigadas neste trabalho como ilustrado na figura 5.

As constantes elásticas determinadas em cada trecho e consideradas “linear” na figura 5, podem ser comparadas ao módulo de Young dos materiais elásticos. Considerando a semelhança do comportamento entre o peritônio de paca (Tabela 4) e o peritônio bovino analisado por GUIMARÃES et al. (2006) (Tabela 1), nota-se que a glicerina diminui a rigidez dos tecidos evidenciando um aumento da elasticidade.

Observando os valores de força máxima, tensão máxima, tensão média dos valores máximo, deformação máxima para os ensaios realizados e suas representações gráficas, observaram-se que o efeito da glicerina é de aumentar tanto a tensão máxima quanto a deformação máxima.

Verificou-se ainda, que o aumento no tempo de conservação em glicerina, promovia diminuição da rigidez da membrana. Tal situação foi evidenciada pela diferença nos valores de alongamento observados tanto nas amostras analisadas a fresco, quanto naquelas conservadas em glicerina pelos períodos de 30 dias, 60 dias e 90 dias. Estas informações se assemelham às observações de ABRAHÃO et al. (1992), ao relatarem diferenças significativas para o alongamento do peritônio bovino a fresco e conservado em glicerina por 60 dias.

Outro aspecto a ser considerado na análise das curvas (Tensão “versus” Taxa de deformação) é que o aumento do comprimento devido à tração mecânica implica em uma redução da área da secção transversal. Assim, nas deformações plásticas o material escoar, levando a diminuição da secção transversal associada ao aumento do comprimento. Este fenômeno é evidenciado na queda da tensão nominal (que considera a área da secção transversal constante) antes do rompimento do material. (ASBY & JONES, 1996).

Ao se analisar atentamente a Figura 5, verifica-se uma brusca variação na tensão, situação que se apresenta de forma semelhante na ilustração da Figura 6 (deslizamento de discordâncias) e corresponde possivelmente às alterações estruturais ou ao rompimento de estruturas, ocorrência esta, predominante nas amostras a fresco.

Analisando-se a Tabela 2 nota-se um substancial aumento da densidade de energia das amostras de peritônio de paca conservadas em glicerina, consistindo-se assim em um parâmetro indicador da melhoria das propriedades mecânicas das membranas armazenadas em glicerina, observações também exaradas por GUIMARÃES et al., 2008.

Ao testarem e compararem a resistência à tração e ao alongamento, até a ruptura do centro tendíneo bovino a fresco, conservado em glicerina a 98% e conservado em glutaraldeído a 4%, por 30 dias, RABELO et al. (2004) concluíram, mediante análise dos valores médios obtidos para a força máxima de tração, que o material conservado em glutaraldeído a 4% apresentava incremento significativo em sua resistência, quando comparado ao material preservado em glicerina a 98%. O entendimento do real significado destes resultados fica comprometido, pois a força

máxima depende também da espessura do material, medida cuja acurácia pode ser comprometida, por erros sistemáticos e também pelas próprias características do material; assim, no presente trabalho preferiu-se determinar e analisar as curvas de tensão x deformação relativa.

Neste trabalho buscou-se estabelecer parâmetros de referência com base na estimativa dos erros envolvidos, procurando representar somente os Algarismos que podem ser significativos e voltando a atenção para dois parâmetros principais: uma constante elástica definida na região inicial do alongamento, ou seja, com deformação relativa, variando em torno de 0,05 (5%) e na integração das curvas tensão contra deformação relativa, que fornece a densidade de energia envolvida na deformação do material.

Assim, verificou-se que as constantes elásticas típicas estão entre alguns MPa, podendo chegar próximo de 20 MPa. As tensões e deformações relativas máximas para as membranas de peritônio de paca, embora, menores que a dos bovinos, apresentam características muito semelhantes com relação à armazenagem em glicerina, ou seja, a glicerina torna as forças de ruptura e as deformações relativas maiores do que aquelas amostras que não foram armazenadas nesta substância.

A densidade de energia mecânica de cada material é um parâmetro bastante característico e que representa bem o fato da glicerina contribuir para a chamada melhoria das propriedades elásticas das membranas. Este parâmetro mostra valores que crescem de $0,2\text{MJ/m}^3$ para o peritônio de paca a fresco até $0,9\text{MJ/m}^3$, no caso do peritônio conservado em glicerina 98% por 90 dias. A energia requerida para deformações definidas pode ser calculada a partir da densidade de energia determinada em experimentos de tração, consistindo em parâmetro útil na avaliação de desempenho da membrana.

Quanto à constituição histológica observada para as amostras de peritônio de paca, tanto as a fresco quanto as conservadas em glicerina a 98%, apresentava a mesma estrutura geral descrita por CRUZ (2002) e JUNQUEIRA & CARNEIRO (2004), embora estes autores não citem a presença de ambos os tecidos conjuntivos densos, modelado e não modelado, na composição dessa serosa, fato que se destaca no

peritônio da paca e foi bem evidenciado nas observações à microscopia eletrônica de varredura, realizadas neste trabalho, mas que também não foi observado por GUIMARÃES et al. (2007) no peritônio bovino conservado em glicerina e a fresco.

Embora o tecido conjuntivo denso modelado seja descrito como o constituinte de tendões e de ligamentos (BANKS, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO), há relatos de que nos ligamentos a disposição das fibras colágenas é menos ordenada (YOUNG & HEATH, 2000), sugerindo uma estruturação próxima a do peritônio da paca. Funcionalmente a organização paralela e ordenada das fibras colágenas do denso modelado confere resistência quando uma grande tensão é aplicada (BANKS, 1992) e o arranjo desordenado do denso não modelado oferece resistência e elasticidade, principalmente certa resistência às trações exercidas em qualquer direção (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Quanto à integridade morfológica e estrutural dos elementos que constituem as amostras colhidas da membrana avaliada, tanto a fresco quanto àquelas conservadas em glicerina a 98%, por períodos de 30 dias, 60 dias e 90 dias, verificadas neste estudo, principalmente mediante a análise à microscopia eletrônica de varredura, estas se assemelham aos relatos de DALECK et al. (1987) sobre o peritônio canino autógeno ou homogêneo conservado em glicerina, durante 30 dias, 90 dias ou 240 dias, implantados em cães; com as constatações de DALECK et al. (1988), ao observarem, que o peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias apresentava-se semelhante ao peritônio a fresco; e ainda, com as descrições de GUIMARÃES et al. (2007) sobre a histologia do peritônio bovino fresco e conservado em glicerina a 98%, por períodos de 30 dias, 60 dias e 90 dias.

GUIMARÃES et al. (2007), ao comparar todas as preparações de membranas conservadas em glicerina nos diferentes períodos de tempo, com as do material a fresco, verificaram um esmaecimento na coloração geral e melhor evidenciação dos núcleos no material conservado em glicerina. Não se observou tal ocorrência nas amostras de peritônio de paca e, embora GUIMARÃES et al. (2007) atribuam essas características ao provável fato de que a glicerina, tratando-se de um álcool triídrico de fórmula molecular $C_3H_8O_3$ (LEITE et al. 1979) possa reagir com o

citoplasma da célula, diminuindo a afinidade tintorial para a eosina e aumentando para a hematoxilina, há de se considerar a qualidade e o grau de conservação dos corantes utilizados nas técnicas histológicas, assim como a diferença morfológica da membrana estudada..

Assim como relatou GUIMARÃES et al. (2007), também se observou à microscopia de luz e pela microscopia eletrônica de varredura a dissociação entre as fibras de colágeno das preparações oriundas somente de peritônio conservado em glicerina a 98%. Quanto a esta ocorrência, deve-se avaliar o fato da glicerina apresentar acentuada hidrofília, devido a sua polaridade, que ao tornar-se livre é capaz de atrair átomos de hidrogênio das moléculas vizinhas, sem contudo promover uma reação química, preservando a arquitetura tecidual geral. Porém, tanto a glicerina quanto a água, ambas moléculas polares, apresentam o fenômeno físico-químico de atração mútua, que promove a condensação do volume, caracterizando uma ação desidratante, que a rigor, consiste em uma diminuição de volume exercida pela glicerina nas preparações que nela forem conservadas. Propriedade esta, fundamental para explicar a ocorrência do deslocamento das camadas do colágeno (PIGOSSI et al., 1971).

Considerando-se as duas formas de análise dos dados, isto é:

As análises dos parâmetros elásticos característicos com os respectivos Algarismos Significativos, determinados com base no erro provável, levando-se em conta os instrumentos, as amostras e as condições de medidas, optando-se pela estimativa de erros intrínsecos de cada medida nas curvas de força por deslocamento, procurando-se observar tendências gerais, sendo os resultados apresentados todos tratados com o programa Microsoft Origin 6.0.

A análise estatística dos dados que foram comparados pelo teste F da análise de variância e quando significativo ajustaram-se polinômios ortogonais para melhor explicar estas diferenças. Todos os resultados dessa análise foram obtidos no “software” Minitab (1992).

Constatou-se que ambas culminaram em resultados semelhantes, embora os valores de tensão, na análise estatística, apresentaram desvios padrões maiores que a

própria média (Tabela 4), perdendo-se assim o significado destes erros, que indicariam a possibilidade de constantes elásticas negativas.

Os resultados obtidos nos ensaios mecânicos e nas análises morfológica e ultraestrutural do peritônio da paca sugerem sua utilização como mais uma opção de material biológico, entretanto para se avaliar o real papel funcional dessa estrutura, quando utilizado como implante, é fundamental a realização de estudos detalhados e aplicados, também deve-se considerar que o sucesso do implante de uma membrana dependerá, em grande parte, da reação biológica no processo de reparação e regeneração tecidual, evidenciando a necessidade de investigações mais específicas sobre esses eventos, principalmente, aquelas relacionadas às experimentações “in vivo”, respeitando a ética e o bem estar animal.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho e baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que:

6.1. Na constituição morfológica do peritônio da paca destaca-se o arranjo entre o tecido conjuntivo denso modelado e o tecido conjuntivo denso não modelado;

6.2 Não houve modificações significativas na integridade tecidual da membrana ora estudada, quando submetida à ação da glicerina;

6.3 O peritônio da paca apresenta comportamento mecânico semelhantes ao peritônio de bovino, com relação a alteração das características elásticas apenas quando o material é conservado em glicerina a 98%;

6.4 Constatou-se que ambas as análises dos dados culminaram em resultados semelhantes, embora os valores de tensão, na análise estatística, apresentaram desvios padrões maiores que a própria média, perdendo-se assim o significado destes erros, que indicariam a possibilidade de constantes elásticas negativas. Assim sendo, a análise estatística quando aplicada em membranas biológicas muitas vezes desconsidera erros sistemáticos, concluindo-se então que uma análise baseada em parâmetros elásticos característicos com Algarismos Significativos, tendo como base um erro provável estimativo, sem os detalhes do cálculo de variações estatísticas muitas vezes pode ser mais fidedigna.

7. REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2001. 20p.
- ABRAHÃO, M. S.; SHIMANO, A. C.; PAULIN, J. B. P.; DALECK, C. R. Estudo comparativo da resistência a tração do peritônio de bovino a fresco e conservado em glicerina. In: FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM SAÚDE, 1., 1992, Caxambu, MG. **RESUMO EXPANDIDO...** Caxambu: SBEB, 1992. P. 22-25.
- ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. (Ed.). **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1992. p. 33-42.
- ASBY, M. F.; JONES, D. R. H. **"Engineering Materials 1: An Introduction to Their Properties & Applications"**. Second Edition, Great Britain: Butterworth Heinemann, 1996. p. 88, 94, 96.
- BASTOS, E. L. S.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.; NOVO, N. F.; SILVADO, R. A. B. peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 256-260, set./out., 2005.
- BATISTA, L. C.; DALECK, C. R. ; SHIMANO, A. C.; ALESSI A. C.; ABRAHÃO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, eqüino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, vol. 33, supl., pág. 305-312, 1996.
- BAUNGARTEN, L. B.; FREITAS, P. M. C.; SALGADO, A. E. P.; EURIDES, D.; CAMILLI, R. A.; SILVA, G. M.; DALECK, C. R.; SILVA, L. A. F. Avaliação Clínica da Blefaroplastia em Coelhos com Cartilagem Auricular Alógena Conservada em Solução Saturada de Sal (NaCl). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 32, set. 2006.
- BENTTI, S. B. Roedores da América Tropical. **Natura**. Caracas, n. 70-71, p. 40-44, 1981.

BJÖRKMAN, N.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative Placentation in Laboratory Animals a Review. **Scandinavian Journal of Animal Science**. Stockholm. v.16, n.4, p. 129-58, 1989.

BRANDÃO, C. V. S.; MINTO, B. W.; ROCHA, N. S.; PEREIRA, G. J. C.; RANZANI, J. J. T.; MOTTA, T. Avaliação macro e microscópica da reconstituição da cápsula articular utilizando pericárdio bovino na luxação coxofemoral experimental em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 73-83, 2006.

BRENDOLAN, A.P. et al. Propriedades biomecânicas da fâscia lata e do ligamento cruzado cranial de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.53 n.1 Belo Horizonte Feb. 2001**.

CHEHUEN NETO, J.A. et al. Restauração traqueal com enxerto cartilaginoso autólogo de pavilhão auricular: estudo experimental em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 169-176, 1991.

COLLET, S. F. Population characteristics of *Agouti paca* (Rodentia) in Colombia. Michigan: Michigan State University, 1981. 601p. (Biological Series, v. 5, n. 7).

CONTESINI, E. A. et al. Reparação traqueal em cães; transplante autógeno vs implante homogêneo conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 633-637, 2001a.

CONTESINI, E. A. et al. Influência antibiotica no reparo tardio com uso da pina auricular conservada em glicerina a 98% em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 22., 2001b, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Ciência animal, 2001, 289p. p.166.

COSTA, J. L. O.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA, C. M. B.; SANTOS, P. C. Acetabuloplastia Extracapsular em Cães com Cartilagem Auricular de Bovino Conservada em Glicerina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ed. ACEG/FAEF Associação Cultural e Educacional de Garça, SP. v. 2, p. 1-2, 2004. <http://www.revista.inf.br/veterinaria02/>

COSTA, J. N. L.; POMERANTZEFF, P. M. A.; BRAILE, D. M.; RAMIREZ, V. A.; GOISSIS, G.; STOLF, N. A. G. Comparação entre o pericárdio bovino descelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.20, n.1, p. 14-22, jan/fev, 2005.

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p. 697-703, out./dez.1999.

CRUZ, P. A. **Peritonitis**. 2002 Disponível em: <http://www.educacionmedica.pri.sld.cu/datas/areaclinica/diplomadoci/p2/Terapia%20Intensiva%20%20Caballero/Secci%F3n12Sepsis/103%20PERITONITIS.doc>. Acesso em 01 fev. 2006.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; GANDOLFI, W.; ALESSI, A. C. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina – “estudo experimental”. **ARS Veterinária**. Jaboticabal, v.3, n. 2, p. 195-202, dez.1987.

DALECK C. R.; ALESSI A. C.; COSTA-NETO, J. M. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 53-61, 1988.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Reparação de hernia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p.179-183, mai./ago.1992.

FINDLEY, W.N.; LAI, J.S.; ONARAN, K. **Creep and relaxation of nonlinear viscoelastic materials, with an introduction to linear viscoelasticity**. 2.ed. North-Holland Publishing Company, 1976.

FORTI, F. L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Journal of Biomaterials Applications**, London, v. 20, n. 3, p. 267-285, jan., 2006.

FRANDSON, R.D. et al. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 454p.

GUIMARÃES, G. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; CRUZ, C.; CAPALBO, A. C.; SANTOS, A. L. Q. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p.120-127, July./Sept., 2007.

GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M. R. F.; SHIMANO, A. C; TERÇARIOL, C. A. S.; VOLPON, J. B ; DALECK, Carlos Roberto . Propriedades tensiométricas comparadas do centro tendíneo, pericárdio e peritônio de bovinos a fresco e conservados em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 127-135, 2008.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; KRANE, K.S.; **Fundamentos de Física** v.1, 6ª. ed., Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001

HAMLET, W. C.; RASWEILER IV, J. J. Comparative gestation and placentation in vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**. Philadelphia, v. 266, p. 343-6, 1993.

INATOMI, L. S.; PRANTONI, G. A.; ARAÚJO, F. C.; RAISER, A. G.; PEREIRA, S. N.; CARDOSO, G.; BARROS, S. S.; SANTOS, M. N. Implante de dura-máter heteróloga em cães. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, jun./jul.1980.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In:_____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. p.92-124.

LEITE, J. B. F.; MARQUES, A. F.; GOMES, O. M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação dos tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, v. 93, n. 3-4, pag. 81-84, mai./jun. 1979.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; BELLETTI, M. E.; FREITAS, P. M. C.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em

diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1/6, p. 13-17, dez., 2002.

MATAMOROS, Y. Anatomia e histologia dei sistema reproductor dei tepezcuinte (Cunicullus paca). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 29, n. 1, p. 155-164, 1982.

MONDOLFI, E. La lapa o paca. Defensa de la Naturaleza. Caracas, v. 2, n. 5, p. 4-16, 1972.

NOLASCO, R. M.; BELETTI, M. E.; EURIDES, D.; SILVA, F. O. C. E.; COELHO, H. E.; DALECK, C. R.; SILVA, L. A. F. Avaliação histológica e ultra-estrutural de tendões de bovinos preservados em diferentes meios. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p.210-215, dez.2003.

PIGATTO, J. A. T. et al. Esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p.617-621,1998.

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

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

PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A.; GAMA, A. H.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante da dura-máter homogêna conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 263-278, out. 1971.

POMERANTZEFF, P. M. A.; BRANDÃO, C. M. A.; CAUDURO, P.; PUIG, L. B.; GRINBERG, M.; TARASOUTCHI, F.; CARDOSO, L. F.; LERNER, A.; STOLF, N. A. G.; VERGINELLI, G.; JATENE, A. D. Biopróteses de pericárdio bovino Fisics-InCor: 15

anos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 12, n.4, p. 359-366, out-/dez.1997.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste, 1990. V. 2., 508 p.

RABELO, R. E.; TAVARES, G. A.; PAULO, N. M.; SILVA, L. A. F.; DAMASCENO, A. D.; ANDRADE, M. A.; MARTINS, F. G.; ROMANI, A. F.; SILVA, O. C.; TRINDADE, B. R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, n. 4, p. 229-238, out./dez.2004.

REDFORD K. H.; EISENBERG J. F. **Mammals of the Neotropics. 2. The southern cone**. University of Chicago Press, Chicago, 1992. 430p.

REYES, E. E. F. **Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco**. 1993. 85f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

RODASKI, S.; CUNHA, O.; DE NARDI, A. B.; RIOS, A.; COMAR, F. A.; CASTRO, J. H. T. Artroplastia acetábulo-femoral em cães com pericárdio bovino conservado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 179-187, 2002.

SARTORI FILHO, F; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E. P. Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootenia**, São Paulo, 9, p.69_77,1997.

SCHAPERLY, R.A. **Nonlinear viscoelastic solids**. International Journal of Solids and Structures, v.37, p.359-366, 2000.

STOLF, N. A.; ZERBINE, E. J. Correção de hérnia diafragmática utilizando dura-máter homóloga conservada em glicerina. 1974.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, A. O.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 37.

VÁMHIDY, L.; STRAUCH, B.; BIRÓ, V. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a review. **Acta Chirurgica Hungarica**, Budapest, v. 31, n. 3, p. 209-215, 1990.

YOUNG, B., HEATH, J. **Histologia funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 407p.

WELLS, P. B.; YEH, A. T.; HUMPHREY, J. D. Influence of glycerol on the mechanical reversibility and thermal damage susceptibility of collagenous tissues. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, New York, v. 53, n. 4, p. 747-753, apr. 2006.

WOODS, C. A.; KILPATRICK, C. W. *Infraorder Hystricognathi*. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2005. v. 2, p. 1538-1600.

WU, C.; LEE, H. D.; MACHADO, R. B.; DALMÁS, S.; COY, C. S. R.; GÓES, J. R. N.; FAGUNDES, J. J. Apresentação do teste energia total de ruptura para avaliação de material biológico com propriedade viscoelástico não-linear. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 609-619, Nov./dez.2004.