

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TENSIOMÉTRICA DE
PERICÁRDIOS BOVINOS PRÉ-TRATADOS EM GLUTARALDEÍDO E
CONSERVADOS EM GLICERINA

DIEGO GONZALEZ VIVAS

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TENSIMÉTRICA DE
PERICÁRDIOS BOVINOS PRÉ-TRATADOS EM GLUTARALDEÍDO E
CONSERVADOS EM GLICERINA

DIEGO GONZALEZ VIVAS

Sob orientação da Professora

Marta Fernanda Albuquerque da Silva

Seropédica, RJ

Abril, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DIEGO GONZALEZ VIVAS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

Dissertação aprovada em 30/04/2013.

Marta Fernanda de Albuquerque da Silva, MV, Dr., UFRRJ

Marilene de Farias Brito, MV, Dr., UFRRJ

André Lacerda de Abreu Oliveira, MV, Dr., UENF

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos meus pais José Maria dos Santos Vivas e Neila Márcia Gonzalez Vivas por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos para que pudesse vencer cada dificuldade.

À minha irmã Caroline Vivas pelo apoio e carinho em toda minha caminhada. À minha namorada Marina Ribeiro pelo amor, incentivo e motivação de todos os dias.

À Professora e orientadora Marta Fernanda de Albuquerque da Silva, por acreditar em mim e em nosso trabalho, pela sua amizade e dedicação durante o desenvolvimento deste projeto, e inspiração como profissional a qual me espelho.

À profa. Vivian Nogueira pela sua co-orientação e ajuda nas interpretações histológicas do nosso projeto.

Ao prof. Ricardo Siqueira, profa. Heloísa Justen e Rosana Botelho pelos ensinamentos passados e pela confiança em meu trabalho.

As professoras Elen Pacheco, Lys Sirelli e Viviane Alves Escócio, do Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano da UFRJ pela ajuda na realização e interpretação das análises mecânicas.

Aos alunos da Pós Graduação Alessandra Feijó e Adriano Sodré, que também atuam na minha linha de pesquisa, pela ajuda no trabalho.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, professor Paulo Botteon, pelo auxílio e disponibilidade ao longo da pós-graduação e à professora Rita de Cássia Campbell Botteon, pela incansável ajuda e “dicas” ao longo do curso.

“O homem enérgico e bem sucedido é aquele que consegue transmutar as fantasias do desejo em realidades.”

Sigmund Freud

RESUMO

VIVAS, Diego Gonzalez. **Avaliação morfológica e tensiométrica de pericárdios bovinos pré-tratados em glutaraldeído e conservados em glicerina.** 2013, 26p. Dissertação

(Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

As membranas biológicas são utilizadas em procedimentos cirúrgicos para fornecer um arcabouço e orientar o desenvolvimento de novos tecidos, mediante processos de reparação, para que restabeleçam a estrutura e a função dos tecidos lesados. Ainda não há uma uniformidade quanto à padronização de uma membrana a ser utilizada, metodologia de tratamento e conservação, tipos de solução e suas concentrações e biocompatibilidade, como no caso do pericárdio bovino que possui diferentes tipos de tratamentos na medicina e na medicina veterinária. O presente estudo tem por objetivo descrever o comportamento morfológico e mecânico do pericárdio bovino tratado em glutaraldeído nas concentrações de 0,625%, 0,8% e 1,0% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias. Foram coletados pericárdios bovinos, com idade entre 30 a 36 meses, machos e fêmeas em um matadouro de fiscalização estadual. Estes foram devidamente transportados em temperatura apropriada e limpos para sua preservação. Os pericárdios foram divididos nos grupos experimentais em controle (fragmentos de pericárdios bovinos conservados unicamente em glicerina a 98% por 30 dias seguidos), I (fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 0,625% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos), II (fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 0,8% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos) e III (fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 1,0% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos), para avaliação histológica; para os ensaios de tração foi adicionado o grupo *in natura* (pericárdio bovino recém obtido sem nenhum tipo de tratamento ou conservação). Foram observadas alterações no aspecto físico quanto à coloração e textura das membranas tratadas com glutaraldeído comparadas ao do grupo controle. Não houve alteração histológica do pericárdio bovino do grupo controle para os grupos experimentais I, II e III. No ensaio de tração, não observaram modificações significativas entre os grupos tratados previamente com glutaral com conservação em glicerol, do grupo unicamente conservado em glicerol e das membranas *in natura*; mostrando, portanto, que a associação do glutaraldeído com a glicerina para preservação do pericárdio bovino apresentou morfologia e um comportamento dinâmico semelhante ao do grupo controle, sendo assim, considerado satisfatório para uma possível aplicação clínica.

Palavras-chaves: membranas biológicas, glicerol, glutaral.

ABSTRACT|

VIVAS, Diego Gonzalez. **Morphological and tensiometrical evaluation glutaraldehyde-treated bovine pericardium preserved in glycerin**. 2013, 26p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Science). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Biological membranes are used in surgical procedures to supply a skeleton and to guide the development of new tissues, under repairing processes, which re-establish the structure and the function of injured tissues. Although there is no uniformity in the standardization of a membrane to be used, method of treatment and maintenance, solution types and their concentrations and biocompatibility, such as bovine pericardium that has different treatments in medicine and veterinary. The present study aims to describe the morphological and mechanical behavior of bovine pericardium treated with glutaraldehyde for 18 days with subsequent preservation in glycerin for 30 days. Bovine pericardium were collected from crossbred animals, between 30 and 36 months of age, males and females. These were transported in appropriate temperature and clean for its preservation. The pericardium was divided into the experimental groups in control (fragments of bovine pericardium preserved only in glycerin for 30 consecutive days), I (fragments of bovine pericardium treated with 0.625% glutaraldehyde for 18 days with subsequent preservation in glycerin for 30 consecutive days), II (fragments of bovine pericardium treated with 0.8% glutaraldehyde for 18 days with subsequent preservation in glycerin for 30 consecutive days) and III (fragments of bovine pericardium treated with 1.0 % glutaraldehyde for 18 days with subsequent preservation in glycerin for 30 consecutive days) for histological evaluation, the group *in natura* (fresh bovine pericardium) was created for physical evaluation. We observed changes in physical appearance for coloration and texture of glutaraldehyde-treated membranes compared to the control group. There was no histological abnormality of the pericardium in the control group to the experimental groups I, II and III. In tensiometric testing, no significant changes were observed between the groups previously treated with glutaral with conservation of glycerol, only the group treated with glycerol and membranes *in natura*, showing therefore that the combination of glutaraldehyde with glycerin for preservation of the bovine pericardium showed morphology and dynamic behavior similar to the control group, so satisfactory for a possible clinical application.

Key words: Biological membranes, glycerol, glutaral.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Valores referentes à força máxima (F. Max) e tensão máxima (T. Max) dos 16 fragmentos de pericárdio bovino submetidos ao ensaio mecânico de tração nos grupos

in natura, grupo G (Controle-glicerina 98%) e os grupos experimentais I (glutaraldeído 0,625% + glicerina 98%), II (glutaraldeído 0,8% + glicerina 98%), e III (glutaraldeído 1% + glicerina 98%), expressos em valores médios \pm desvio padrão.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comportamento Força versus Tempo durante um ensaio de resistência à tração de um corpo de prova de pericárdio bovino com aplicação de carga na direção uniaxial ao eixo longitudinal, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

15

16

Gráfico 2- Representação gráfica dos valores médios da tensão máxima e desvio padrão dos corpos de prova dos pericárdios bovinos submetidos aos ensaios de tração nos diferentes grupos: *in natura*, grupo G (Controle-glicerina 98%) e grupos

experimentais I (glutaraldeído 0,625% + glicerina 98%), II (glutaraldeído 0,8% + glicerina 98%), e III (glutaraldeído 1% + glicerina 98%), UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Frascos estéreis sob proteção luminosa contendo um fragmento de pericárdio bovino nos grupos experimentais G, I, II, III. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2013. 10
- Figura 2- Foto da máquina universal de ensaio AME ® localizada no Instituto de Macromoléculas da UFRJ, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2013. 12
- Figura 3- Aspecto físico dos pericárdios bovinos após a rehidratação com solução salina estéril por 20 minutos. A. Pericárdio bovino conservado somente em glicerina por 30 dias. B. Pericárdio bovino pré-tratado em glutaraldeído por 18 dias e conservado em glicerina por 30 dias. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2013. 13
- Figura 4- Fotodocumentação das lâminas dos grupos experimentais G, I e III nos aumentos de 6,3X e 40X. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2013. 14

LISTAS DE ABREVIACOES

%	porcentagem
°	graus
°C	graus celsius
DNM	tecido conjuntivo denso não modelado
cm	centímetro
cm/mim	centímetro/minuto
cm/kg	centímetro/quilo
E	espessura do corpo de prova
F	força
g	gramas
G	Grupo controle- glicerina
HE	coloração Hematoxilina-eosina
IMA	Instituto de Macromoléculas da UFRJ
Kg	quilograma
Kgf	quilogramafora
kN	quilo-Newton
L	largura do corpo de prova
MPa	Mega Pascal
mm	milímetro
mm/mim	milímetro/minuto
mm/seg	milímetro/segundo
N	Newton
N/m	Newton/metro
N/mm	Newton/milímetro
Pa	Pascal
PBS	Phosphate-Bufferid Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	rea
T	tensão
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Membranas Biológicas	3
2.2 Estrutura do Pericárdio	4
2.2.1 Anatomia	4
2.2.2 Histologia	4
2.3 Tratamento e Conservação de Membranas Biológicas	4
2.3.1 Glicerina	4
2.3.2 Glutaraldeído	5
2.3.3 Associações de Soluções	6
2.4 Avaliação Tensiométrica	6
2.5 Avaliação Morfológica	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Obtenção dos Pericárdios Bovinos	9
3.2 Grupos Experimentais	9
3.3 Preparo dos Pericárdio Bovinos	9
3.4 Avaliação Macroscópica	10
3.5 Avaliação Histológica	10
3.6 Ensaios de Tração	10
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO	17
6 CONCLUSÃO	20
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO

A utilização de membranas biológicas como material de implante, para a reparação de órgãos e tecidos vem sendo praticada na medicina e na medicina veterinária. O seu emprego deve-se, principalmente, à facilidade de sua obtenção, baixo custo, preparo simples, fácil estocagem e pouca ou nenhuma reação tecidual.

Grande parte dos trabalhos envolvendo membranas biológicas busca avaliar a viabilidade em procedimentos cirúrgicos nas diferentes regiões do organismo animal. O pericárdio é uma das membranas mais comumente estudadas, por possuir como característica principal a constituição quase exclusiva de colágeno. Quanto aos meios de preservação destacam-se o glutaraldeído, formaldeído a 4%, a glicerina a 98%, solução hipersaturada de açúcar a 300%, vaselina, entre outros.

O meio de tratamento e conservação de membranas mais utilizado em medicina veterinária é a glicerina a 98% em temperatura ambiente, que apresenta como vantagem o baixo custo e propriedade antisséptica, e na concentração igual ou maior que 25% age como desinfetante. Esta solução age também contra bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e fungos, porém não atua contra formas esporuladas e vírus como demonstrado por Coronado et al. (2000) e Trani (2006). As membranas utilizadas em cirurgia reconstrutora na espécie humana são em maioria tratadas pelo glutaraldeído, por ser considerado um agente esterilizante que promove aumento da resistência devido a ligações cruzadas nas fibras colágenas e maior conservação das membranas.

A forma clássica de preservação das membranas biológicas para suas diversas aplicações consiste no tratamento com glutaraldeído em variadas concentrações e posterior conservação em formaldeído 4%, uma vez que a instabilidade das soluções de glutaraldeído impede a manutenção por períodos prolongados. Em contrapartida, a ampla experiência da utilização do glicerol (glicerina 98%) na conservação de biomembranas em medicina veterinária, aponta esta substância como vantajosa na substituição do formaldeído, por suas características de facilidade e baixo custo de manejo, além de excelente biocompatibilidade.

O conhecimento sobre a resistência das membranas biológicas conservadas é uma característica importante quando se planeja sua implantação para substituição de áreas das paredes corporais ou de vísceras ocas. Na avaliação histológica de membranas conservadas é possível observar-se alterações no padrão de organização tecidual, que influenciam na sua resistência. A avaliação mecânica é um método que vem sendo usado para estudo das características físicas das membranas biológicas após tratamento.

A reconstrução cirúrgica com utilização de membranas biológicas ainda é um desafio no sentido da padronização de biomateriais, metodologia de tratamento e conservação, tipos e concentração de soluções, biocompatibilidade, adequação à finalidade cirúrgica, dentre outras questões a serem uniformizadas. Os tratamentos tradicionais do pericárdio bovino na medicina e na medicina veterinária, quais sejam, associação de glutaraldeído 0,5% ou 0,625% a formaldeído 4%, e glicerina 98% como solução única, deixam a desejar pelo alto nível de toxidez ou pela baixa efetividade antimicrobiana, respectivamente. Portanto, o presente trabalho se justifica por reunir a efetividade antimicrobiana do glutaraldeído à baixa toxidez e estabilidade do glicerol no tratamento e conservação do pericárdio bovino, que é a membrana mais amplamente utilizada em cirurgias reconstrutoras, seja na medicina ou na medicina veterinária.

De acordo com as informações da literatura, é esperado que o método de tratamento e conservação aqui proposto seja adequado na manutenção das características morfológicas e mecânicas do pericárdio bovino.

O presente trabalho tem como o objetivo descrever o aspecto macroscópico e histológico, além do comportamento mecânico de pericárdios bovinos pré-tratados em diferentes concentrações de glutaraldeído e conservados em glicerina a 98%.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Membranas Biológicas

As membranas biológicas são dispositivos médicos feitos para substituir ou atuar como uma estrutura biológica ausente do corpo, utilizadas na Medicina e na Medicina Veterinária (EURIDES et al., 1994). Os implantes para serem utilizados em cirurgia podem ser sintéticos ou biológicos; os enxertos biológicos podem ser ainda heterólogos (doador e receptor de espécies diferentes) ou homólogos (doador e receptor de mesma espécie) (CÁRDENAS-LAISLON et al., 1996; COVARRUBIAS et al., 2005).

Estas biopróteses podem ser utilizadas no tratamento de defeitos de paredes corporais (congenitos ou traumáticos) como hérnias umbilicais, perianais, diafragmáticas e inguinais. Também podem ser aplicadas na reconstrução de musculatura quando há, por exemplo, retirada de grandes massas tumorais, em traqueoplastias, cirurgias cardíacas, rafias intestinais, feridas cutâneas, perfurações viscerais, rafias de tendão (MAZZANTI et al., 2000), entre outras aplicações.

Sua vantagem na prática cirúrgica é o baixo custo, a fácil aquisição, o fácil manejo cirúrgico e sua baixa reação tecidual. Além disso, as membranas biológicas devem fornecer arcabouço para orientação e desenvolvimento de novos tecidos, mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e função do órgão afetado (ALVARENGA, 1992; PREVEL et al., 1995; GIROTTO et al., 2003; QUITZAN et al., 2003). De acordo com Mazzanti et al. (2003), o tecido biológico deve ser sempre escolhido, em relação aos materiais sintéticos, por possuir a vantagem de ser incorporado ao organismo receptor e de servir como suporte temporário para o processo cicatricial via formação de tecido conjuntivo fibroso.

O colágeno é um biomaterial de origem natural amplamente utilizado devido a algumas características como a biocompatibilidade, quimiotaxia para fibroblastos, ativação e atração de neutrófilos, sendo utilizado assim, como preenchimento no reparo ósseo, implantes para tratamentos de queimaduras e na reparação tecidual guiada (GASQUE et al., 2008).

O estudo pioneiro de utilização de membranas biológicas no Brasil foi realizado por Pigossi em 1967, no qual aplicou dura-máter homóloga em cão conservada em glicerina pura à temperatura ambiente e implantada em cães sem testes bacteriológicos prévios. Os animais foram acompanhados e sacrificados em períodos de 10 a 360 dias, sendo um animal por mês, e à necropsia apresentavam ausência de reação inflamatória aguda. De acordo com o autor, este fato indicou a esterilidade e uma baixa antigenicidade do material implantado, uma vez que os animais não receberam antibioticoterapia.

Destacam-se neste contexto, em Medicina Veterinária, por exemplo, o emprego de dura-máter homóloga em cão (PIGOSSI et al., 1971); do pericárdio equino em cão (BRUN et al., 2002); peritônio bovino em cão (DALECK et al., 1987; DALECK et al., 1988; NETO et al., 1999; BUSNARDO et al., 2009), peritônio bovino em ratos (OLIVEIRA et al., 2008); pericárdio bovino em cão (ALVARENGA, 1992; QUITZAN et al., 2003; BRANDÃO et al., 2006); pericárdio bovino em ovinos (COLLATUSSO et al., 2011); pericárdio bovino em ratos (COLLATUSSO et al., 2012); ligamento nucal bovino no cão (DALECK et al., 2000); do diafragma homólogo em cão (MAZZANTI, 2000); submucosa intestinal porcina como enxerto em veia cava de cães (GRECA et al., 2005); centro tendinoso de ovino em cão (MAZZANTI, 2000); membrana amniótica autógena em cães (ACETO et al., 2007); córnea homóloga em ceratoplastia lamelar em cães (GONÇALVES et al., 2000), cartilagem auricular

bovina em coelhos (SILVA et al., 2009), artéria carótida homóloga para uretroplastia em cães (PAULO et al., 2000).

2.2 Estrutura do Pericárdio

2.2.1 Anatomia

O pericárdio é uma membrana que forma um saco fibroso, grosso, translúcido, de dois folhetos. É composto por uma folha fibrosa externa que se adere ao esterno, aos grandes vasos e ao diafragma, e por uma membrana serosa interna. Sua capa fibrosa está coberta por uma lâmina serosa de células cubóides, que junto com a membrana serosa formam o pericárdio parietal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A membrana serosa, por sua vez, se reflete na superfície epicárdica formando o pericárdio visceral (COVARRUBIAS et al., 2005). O pericárdio é uma membrana altamente resistente, de fácil manejo cirúrgico, maleável, de fácil acesso e habitualmente representa um material de interesse no processo de fabricação principalmente de próteses cardíacas e para cirurgias toracoabdominais (SANTILLAN-DOHERTY et al., 1996)

2.2.2 Histologia

O pericárdio é constituído por um tecido conjuntivo denso não modelado, cujos principais componentes são as fibras de colágeno entrelaçadas entre si, diferentemente do tecido conjuntivo denso modelado, que apresenta orientação paralela e ordenada das fibras colágenas. As fibras de elastina também formam parte do pericárdio, no entanto são menos numerosas, não formam fibras densas e tendem a estar orientadas em ângulo reto com relação às fibras colágenas adjacentes.

2.3 Tratamento e Conservação de Membranas Biológicas

Os implantes requerem técnicas de tratamento e conservação, no intuito de preservar sua viabilidade e diminuir sua antigenicidade. Meios de conservação utilizados são betapropiolactona, ácido acético glacial, glicerina, solução hipersaturada de açúcar, ácido peracético polivinil-pirolidona e o glutaraldeído (BAINES, 1996 apud NOLASCO et al., 2003).

2.3.1 Glicerina

A glicerina, também conhecida como glicerol ou propano- 1,2,3-triol, é um composto orgânico pertencente à função álcool, apresenta-se no estado líquido à temperatura ambiente, é inodoro, higroscópico, viscoso e adocicado (COLLINS, 2005).

A glicerina a 98% em temperatura ambiente é a solução mais comumente utilizada no tratamento de membranas biológicas na medicina veterinária e apresenta como vantagem principal o baixo custo e propriedade antisséptica, preservando a textura e a integridade celular do tecido (ALVARENGA, 1992; MOTA et al., 2002). Ela atua na desidratação do tecido, substituindo a maior parte da água intracelular, sem alterar a concentração iônica das células, funcionando assim como agente fixador e desidratante de rápida ação, e na concentração igual ou maior que 25% age como desinfetante, e possui ainda ação antibacteriana e antifúngica (PIGOSSI et al., 1971). Em 2000, Coronado et al. conservaram metatarsos felinos contaminados com o vírus da Leucemia Felina em solução de glicerol por quatro semanas, sendo estes ossos transplantados em gatos saudáveis. Foi constatado em 98%

dos animais do grupo a soropositividade para avaliação do enxerto, sendo que todos os enxertos avaliados foram positivos para o vírus da Leucemia Felina. Trani (2006) demonstrou também que, mesmo à temperatura ambiente e por período de 30 dias, o vírus rábico foi mantido em pelo menos 50% das amostras tratadas em glicerina a 98%.

De acordo com Leite et al. (1979) este agente químico proporciona ausência de reações inflamatórias agudas dos implantes, o que indica a baixa antigenicidade do transplante mantido neste meio de conservação. Segundo Neto et al. (1999), as membranas biológicas conservadas em glicerina apresentam menos reações imunológicas, diminuem os riscos de rejeição, induzem baixa reação inflamatória e servem como alicerce para o desenvolvimento de um novo tecido.

2.3.2 Glutaraldeído

O glutaraldeído (C₅H₈O₂) é um dialdeído saturado encontrado na forma líquida, incolor ou amarela, utilizada no tratamento químico, conservação e fixação de biomateriais. O glutaraldeído é pouco poluente devido à sua rápida biodegradação, não bioacumulativa e de pouca persistência no ar, solo e água, além de ser um excelente fixador de tecidos para a microscopia eletrônica (APECIH, 1998 apud COSTA, 2009). Segundo Cardenas-Lailson et al. (1997), a solução de glutaraldeído possui ação contra fungos, bactérias e tem ação esporicida, tendo assim ação anti-séptica e desinfetante.

Spinosa (1999) apud Rabelo et al. (2004) descreveram que a ação bactericida do glutaraldeído é determinada pela alquilação de grupos amino e sulfídricos de proteínas e do nitrogênio do anel da base purina dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) da célula bacteriana e também, que pode interferir nas proteínas da membrana e do citoplasma das bactérias. Relaciona-se como características positivas sua eficácia contra todos os tipos de microrganismos, inclusive vírus e esporos bacterianos. Entretanto, Trani (2006) em um experimento com pericárdios de camundongos tratados com glutaraldeído a 0,625%, observou a permanência do vírus rábico, mesmo quando as membranas foram mantidas na solução por 18 dias à temperatura ambiente, em 50% dos camundongos, demonstrando assim a necessidade de uma maior concentração de glutaraldeído para obter-se ação viricida, sem contudo causar toxicidade sistêmica e danos teciduais.

Concentrações acima de 10% são utilizadas para esterilização de material cirúrgico e endoscópio; para tratamento de material biológico utilizam-se concentrações abaixo de 2%, porém há controvérsias sobre a concentração ideal para a preparação, sendo que a maioria dos autores trabalha em concentração de 0,5 a 1,0% (GUTIERREZ-SAMPERIO et al., 2002). Gallo et al. (1982) utilizaram a solução de glutaraldeído para conservação do pericárdio bovino e suíno para fins de implantação, e verificaram que o conservante manteve inalteradas as estruturas morfológicas do implante nos aspectos macro e microscópios, além de garantir uma baixa antigenicidade.

Tang e Eaton (1995), em seu estudo sobre respostas inflamatórias em bioenxertos, concluíram que as respostas inflamatórias crônicas têm sido observadas ao redor de muitos tipos de implantes e têm sido associadas com várias complicações que afetam tanto o receptor quanto o implante. Costa (2009) observou reação inflamatória local exacerbada e incorporação insatisfatória naqueles implantes tratados com concentração de 1,5% de glutaraldeído, e obteve boa resposta local nos grupos com concentrações de glutaraldeído a 0,625% e 1%.

2.3.3 Associação de Soluções

Historicamente na medicina, a preservação das membranas biológicas para suas diversas aplicações consiste no tratamento com diferentes concentrações de glutaraldeído e posterior conservação em formaldeído a 4% (IONESCU et al., 1977; GAMA et al., 1979; BAUCIA et al., 2006; MIYAMOTTO et al., 2009). Isto ocorre devido à instabilidade das soluções de glutaraldeído que impede sua manutenção por períodos prolongados. Em 1993, Pinto et al. realizaram um estudo experimental para avaliação de biocompatibilidade de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 0,5%, conservados ou não em formaldeído, implantados no tecido subcutâneo da região abdominal de ratos. As análises histológicas revelaram que houve ausência de biocompatibilidade e toxicidade nas células mesmo após a lavagem abundante com solução salina antes do implante das membranas tratadas em glutaraldeído conservados ou não em formaldeído; revelando assim que tanto a solução de glutaraldeído quanto a de formaldeído são tóxicas para o organismo receptor.

Na medicina veterinária, a ampla experiência da utilização do glicerol como solução única na conservação de biomembranas por período mínimo de 30 dias, aponta esta substância como vantajosa na substituição do formaldeído, por suas características de facilidade e baixo custo de manejo, além de excelente biocompatibilidade (NETO et al., 1999; PAULO et al., 2000; RAPPETI et al., 2002; BRANDÃO et al., 2006; ACETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; BUSNARDO et al., 2009).

Rojo et al. (2009) utilizaram o glutaraldeído na concentração de 0,625% em uma solução tampão 0,1M de fosfato de sódio (pH 7,4) durante 24 horas e posterior conservação em glicerina a 98% do saco pericárdico bovino, para avaliação tensiométrica de fragmentos obtidos nos sentidos circunferencial e longitudinal, sem compará-las com o pericárdio preservado em outras soluções. Não há na literatura estudos que indicam a associação do glutaraldeído com a glicerina em relação às características físicas e histológicas, bem como à sua ação antimicrobiana na conservação de membranas biológicas.

2.4 Avaliação Tensiométrica

Os estudos biomecânicos têm como objetivo determinar as propriedades mecânicas de um material biológico e, dependendo de suas características físicas, pode-se submetê-lo aos ensaios de tração, torção, compressão e flexão. A mensuração da resistência dos materiais implantados avalia a capacidade destes em suportar tensão quando usados clinicamente (BATISTA et al., 1996).

A força máxima é um valor absoluto, expresso em quilograma-força (Kgf) ou Newton (N), e representa a maior força exercida pelo tensiômetro durante o ensaio de tração. A força de ruptura, também expressada por Kgf ou em N, representa uma força que se aplica no corpo de prova até sua ruptura total. A força de ruptura é a variável utilizada para calcular a tensão de ruptura, que é a razão entre a força (F) e a unidade de área (S); a letra S representa a área de secção transversa do corpo de prova, calculada pela fórmula $S=L.E$, onde L é a largura do remendo em milímetros e E, a espessura do material em milímetros. A tensão de ruptura é expressa em Newton/m² que corresponde a um Pascal (Pa, sistema internacional); quando a tensão é aplicada em milhões de Pa, usa-se MPa (N/mm²) ou 10⁶ Pa (SCHAPERLY, 2000). Segundo Miyamoto et al. (2009), a espessura do pericárdio bovino tem em média 0,3 milímetros (variação de 0,25 a 0,35mm), retirada de um corte transversal do pericárdio e usando-se uma régua para microscopia óptica em aumento de 40 vezes.

Gutiérrez-Samperio et al. (2002) realizaram um estudo a respeito de pericárdio bovino, tratado em solução de glutaraldeído em diferentes concentrações (0,5%; 1,0%; 2,0%; 2,5% e

5,0%) por 15 dias seguidos, no qual observou-se que as membranas conservadas em 1% apresentaram maior resistência tensiométrica e elasticidade quando comparada às conservadas a 0,5%, porém estas últimas foram mais fáceis de manejar.

Guimarães et al. (2008), avaliaram as propriedades tensiométricas de centro tendíneo de diafragma, peritônio e pericárdios bovinos conservados por 30, 60 e 90 dias em glicerina e das membranas a fresco, e constataram que o pericárdio bovino suportou maiores tensões, ou seja, uma maior força de tração por área de seção comparados aos centro tendíneo de diafragma e ao peritônio. Miyamoto et al. (2009), realizaram análise comparativa quanto à resistência tensional do pericárdio bovino tratado em glutaraldeído a 0,5% e conservado em solução de formaldeído a 4% com a da veia safena magna retirada da região proximal da coxa para realização de endarterectomia de carótida. Os autores concluíram que a resistência do pericárdio bovino à ruptura é significativamente maior do que a da veia safena magna e observou-se que, quanto maior a espessura do remendo em ambos os grupos, maior será a resistência à ruptura.

Segmentos de pericárdio bovino retirados em sentidos distintos apresentam resistência diferenciada à tração. Rojo et al. (2009) demonstraram que os corpos de prova extraídos no sentido circunferencial do saco pericárdico exigem forças mais elevadas para sua ruptura, porém aqueles obtidos no sentido longitudinal (ápice-base) mostraram maior elasticidade, o que, segundo os autores, pode estar relacionado ao arranjo mais desordenado entre as fibras, que confere melhor resistência à tração em diversos sentidos.

2.5 Avaliação Morfológica

Gutiérrez-Samperio et al. (2002) após realizarem testes tensiométricos avaliaram histologicamente os pericárdios bovinos tratados nas diferentes concentrações do glutaraldeído (0,5%; 1,0%; 2,0%; 2,5% e 5,0%) e observaram que nas concentrações de 2%, 2,5% e 5% havia uma deformidade nas células mesoteliais e nos fibroblastos, além da retração das fibras colágenas. Analisando os testes mecânicos e morfológicos, concluíram que o pericárdio bovino conservado a 1% seria a melhor membrana para ser implantada experimentalmente para reconstrução de parede abdominal em ratos.

Em uma avaliação histológica de pericárdios bovinos conservados em glicerina a 98% por 15, 30, 60 e 90 dias e a fresco, realizado por Guimarães et al. (2007), os autores não verificaram diferenças marcantes quanto à integridade estrutural dos pericárdios conservados em glicerina a 98% por 15 e 60 dias com o grupo controle (pericárdio a fresco).

Nolasco et al. (2003) avaliaram histologicamente tendões bovinos preservados por 70 dias nas concentrações de polivinil-pirrolidona a 0,5%, solução hipersaturada de açúcar a 300%, glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,5%, com rehidratação por 24 horas em solução fisiológica estéril a 0,9%. Ao compararem estas membranas com os tendões a fresco, os autores observaram que o açúcar ocasionou pequenos e raros espaçamentos entre as fibras, destruiu totalmente o citoplasma dos fibrócitos sem desagregação do núcleo. A glicerina apresentou alterações semelhantes às do açúcar, porém em um grau mais evidente, demonstrando assim não ser o preservador ideal para tendões. Na preservação pelo polivinil-pirrolidona, observaram destruição dos fibrócitos, inclusive dos núcleos e total desagregação das fibras colágenas com frequentes espaços. No grupo preservado pelo glutaraldeído, notaram fibrilas colágenas e prolongamento citoplasmático de fibrócitos íntegros, semelhante ao grupo controle, mostrando-se assim como solução mais adequada na preservação do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos Pericárdios Bovinos

Os pericárdios bovinos foram obtidos de animais com idade entre 30 a 36 meses, sem raça definida, machos e fêmeas, colhidos após o abate, em matadouro com Fiscalização Estadual na cidade de Três Rios – RJ. Os pericárdios foram extraídos pelo pessoal técnico do matadouro, na sequência da linha de abate, com uso de luvas de procedimento sobre mesa inoxidável e com instrumental de corte próprio do setor; os sacos pericárdicos eram cortados na região da base, sendo então separados inteiros do coração, colocado em sacos plásticos transparentes e acondicionado em geladeira por aproximadamente duas horas até o transporte.

Para o transporte do material, foi utilizada uma embalagem plástica nova mantida em recipiente térmico com gelo, para manutenção dos pericárdios em temperatura de aproximadamente 10°C, conforme preconizado por Pinto et al. (1993), até a chegada ao laboratório no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em prosseguimento, foi realizada a limpeza pericárdica, retirando-se a gordura para que o seu tratamento e conservação fossem iniciados.

3.2 Grupos Experimentais

Grupo G (controle) – fragmentos de pericárdios bovinos conservados unicamente em glicerina a 98% por 30 dias seguidos.

Grupo I – fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 0,625% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos.

Grupo II - fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 0,8% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos.

Grupo III - fragmentos de pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído a 1,0% por 18 dias com posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias seguidos.

Grupo *in natura* – somente para a Avaliação Tensiométrica - corpos de prova de pericárdio bovino recém-adquirido sem nenhum tipo de tratamento ou conservação química; mantidos resfriados a 10°C durante o transporte (aproximadamente 90 minutos).

3.3 Preparo dos Pericárdios Bovinos

As soluções em questão foram elaboradas no laboratório do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foi produzida uma solução PBS (Phosphate-Buffered Saline), composta por fosfato monopotássio, fosfato dissódico, cloreto de sódio e água destilada para o tamponamento das soluções de glicerina bidestilada 98% e de glutaraldeído 25%, sendo esta última solução diluída em água destilada até chegar-se nas concentrações de 0,625%, 0,8% e 1,0%, tamponada com solução PBS (pH de 7,4), assim como a glicerina 98%.

Os pericárdios bovinos, após a limpeza, foram fracionados no sentido base-ápice em partes com áreas equivalentes a 2,0cm² (análise morfológica) e, 10 cm² (análise tensiométrica) em seguida, colocado um fragmento em cada frasco estéril de solução com capacidade de 70mL, sendo cinco fragmentos para cada grupo experimental. Todos os frascos, devidamente identificados, permaneceram armazenados em temperatura ambiente sob proteção da luz (Figura1).



Figura 1- Frascos estéreis contendo um exemplar de fragmento de pericárdio bovino de cada grupo experimental: Grupo G (Controle - glicerina 98%), Grupo I (0,625% de glutaraldeído), Grupo II (0,8% de glutaraldeído) e Grupo III (1,0% de glutaraldeído), protegidos da exposição luminosa.

3.4 Avaliação Macroscópica

Aspectos macroscópicos foram observados nos diferentes grupos após os períodos de tratamento específicos, comparando-se com a membrana *in natura* e também entre os grupos experimentais. As características avaliadas consistiram em coloração, textura e forma das membranas após o período de hidratação preconizado (20 minutos).

3.5 Avaliação Histológica

A análise histológica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram confeccionadas 20 amostras teciduais de pericárdios bovinos medindo 2,0cm², as quais foram devidamente tratadas, conservadas e identificadas como descrito anteriormente. Após a retirada dos fragmentos de seus respectivos frascos, estes foram lavados em solução salina estéril e reidratados. Os fragmentos foram fixados em formaldeído

tamponado a 10% e processados pelo método rotineiro para realização dos cortes histológicos em um micrótomo rotativo, obtendo-se cortes de 5µm com auxílio de navalhas descartáveis, que foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE), sendo as fotos documentadas utilizando-se câmera digital acoplada ao microscópico óptico.

3.6 Ensaios de Tração

O ensaio mecânico de tração foi realizado no Laboratório de Macromoléculas Eloísa Mano na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os grupos experimentais foram os mesmos do ensaio histológico, porém com acréscimo do grupo *in natura*, constituído pelos corpos de prova de pericárdio bovino recém-adquirido sem nenhum tipo de tratamento ou conservação química, somente hidratada em solução fisiológica estéril a 0,9%, totalizando assim 25 corpos de provas. Os fragmentos preparados mediam 2,0cm de largura e 10cm de comprimento. As espessuras dos pericárdios foram mensuradas utilizando-se um paquímetro, o qual revelou a medida de 0,8mm em média.

No laboratório, o material foi devidamente retirado de seus respectivos frascos e lavado em solução salina estéril (cloreto de sódio a 0,9%) para retirada dos resíduos de sua superfície, e reidratados por 20 minutos no mesmo tipo de solução. Em seguida, os cinco corpos de prova de cada grupo foram devidamente enumerados para uma correta comparação e identificação.

Os testes foram realizados na máquina universal de ensaio AME ® (Técnica Industrial Oswaldo Filizola) com capacidade de 5kN (Figura 2). A máquina possui interface direta a um microcomputador com o software DynaView Standard/Pro M, capaz de gerar gráficos da carga *versus* tempo para cada ensaio. No momento do ensaio, os corpos de prova sofreram uma pré-carga de 2 Newton durante 30 segundos, com o intuito de promover acomodação do sistema, evitando-se possíveis folgas no conjunto de máquinas, acessório e modelo ensaiado.

Em seguida, a pré-carga prosseguiu com velocidade pré-estabelecida de 10mm/mim iniciando o ensaio de tração até a ruptura da membrana. A carga aplicada foi registrada pelo software em intervalos regulares de tempo até o momento da ruptura da membrana. A tensão de cada grupo de prova é, por definição, a razão força máxima aplicada/área de secção. Os dados foram agrupados e descritos estatisticamente por meio de valores médios e desvio padrão, utilizou-se teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$) adotado em todas as comparações dos grupos estudados.



Figura 2- Foto da máquina universal de ensaio AME ® (Técnica Industrial Oswaldo Filizola) capacidade de 5kN localizada no Instituto de Macromoléculas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Nota-se o pericárdio bovino em repouso posicionado no aparelho, destacado pela seta.

4 RESULTADOS

Alterações no aspecto físico das membranas foram observadas principalmente nos grupos tratados com glutaraldeído nas diferentes concentrações e conservados em glicerina. Em comparação aos pericárdios bovinos *in natura*, houve mudança significativa na coloração, de branco leitoso para amarelo acastanhado. A textura macia das membranas a fresco mostrou-se pouco alterada pela conservação em glicerina, porém a adição do tratamento com o glutaraldeído conferiu aspecto “emborrachado” em todas as concentrações utilizadas, acompanhado de alteração na forma das membranas, que mostravam leve encurvamento das margens dos retalhos (Figura 3).

Todas as membranas analisadas histologicamente, tanto as conservadas por glicerina a 98% por 30 dias quanto as pré-tratadas em glutaraldeído nas concentrações de 0,625%, 0,8% e 1,0% por 18 dias para posterior conservação em glicerina por mais 30 dias, apresentaram a mesma constituição estrutural. Verificou-se ainda no material conservado em glicerina e no tratado com glutaraldeído e conservado em glicerina, baixa afinidade tintorial para a eosina e alta para a hematoxilina. Observou-se a presença de tecido conjuntivo denso não modelado com fibras pouco acidófilas dispostas longitudinalmente sem orientação fixa, bem próximas entre si com núcleos acentuadamente basófilos. Comparando-se o grupo controle (Grupo G) com os grupos experimentais, não verificou-se diferenças histológicas e estruturais entre as amostras (Figura 4).

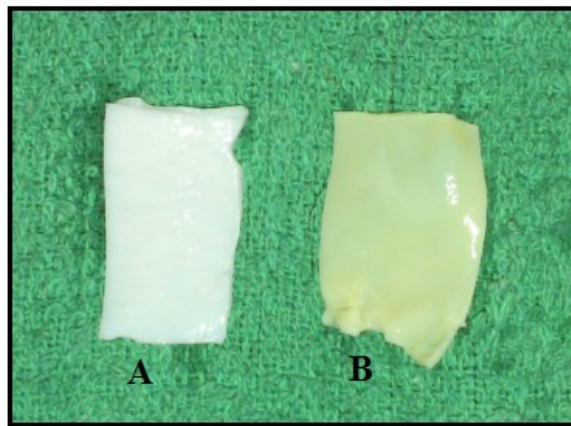


Figura 3- Aspecto físico dos pericárdios bovinos após a rehidratação com solução salina estéril por 20 minutos. **A.** Pericárdio bovino conservado somente em glicerina por 30 dias. **B.** Pericárdio bovino pré-tratado em glutaraldeído por 18 dias e conservado em glicerina por 30 dias.

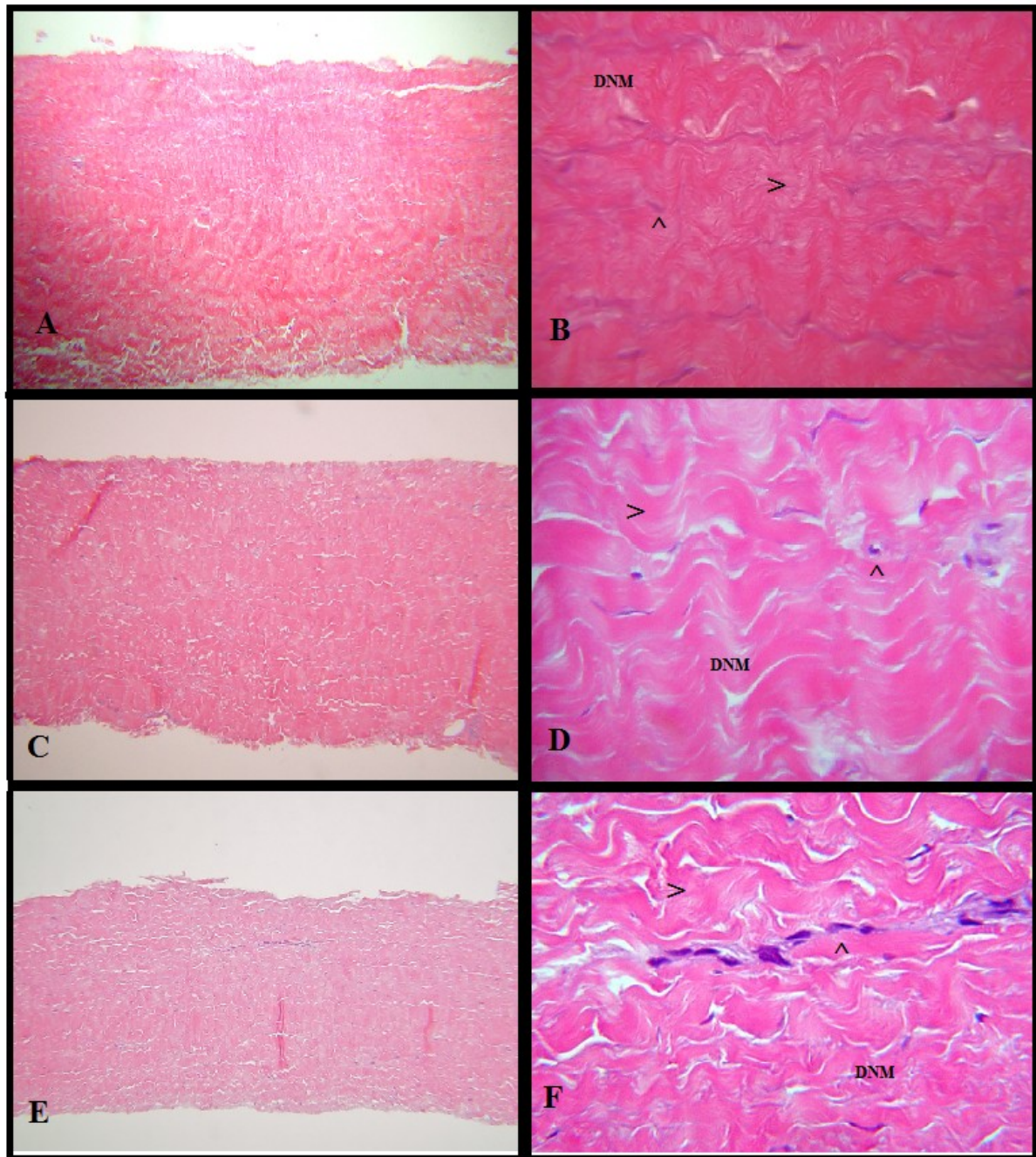


Figura 4- Fotomicrografias das amostras dos pericárdios bovinos na coloração HE. **A.** Grupo controle (aumento 6,3x). **B.** Grupo controle (aumento 40x). **C.** Grupo experimental I (aumento 6,3x). **D.** Grupo experimental I (aumento 40x). **E.** Grupo experimental III (aumento 6,3x). **F.** Grupo experimental III (aumento 40x). Nota-se que não há diferença histológica entre o grupo controle e os grupos experimentais, nos quais se observa tecido conjuntivo denso não modelado (DNM), fibras em disposição longitudinal (>) e núcleos acentuadamente basófilos (^).

Nas análises tensiométricas a ruptura dos corpos de prova ocorreu quase em sua totalidade na sua região central, embora em alguns exemplares tenha ocorrido próximo de uma de suas extremidades, modificando assim o ponto de ruptura para uma região mais distal.

Foram obtidas e analisadas as seguintes propriedades mecânicas: Força máxima de tração e Tensão máxima.

O Gráfico 1 mostra um exemplo do comportamento de resposta à tração de um corpo de prova do pericárdio bovino, aplicada na direção uniaxial até a força que causou a ruptura (Força máxima de tração) representada em Newtons. Pela análise do gráfico, pode-se observar que à medida que o tempo passa e a força de tração aumenta, vai ocorrendo seu alongamento, o que pode ser visualizado ao longo do teste. O comportamento da membrana submetida à tração pode ser dividido em três partes, definidas no gráfico. Inicialmente, ocorre o alongamento para pequenos valores de força (trecho 1). No trecho 2, ocorre um aumento considerável de força à medida que o corpo de prova se alonga mais intensamente. E por fim, no trecho 3, esse comportamento alcança a força máxima, as fibras da membrana se rompem gradualmente, neste instante a força decresce enquanto ocorre o aumento visual do alongamento do corpo de prova.

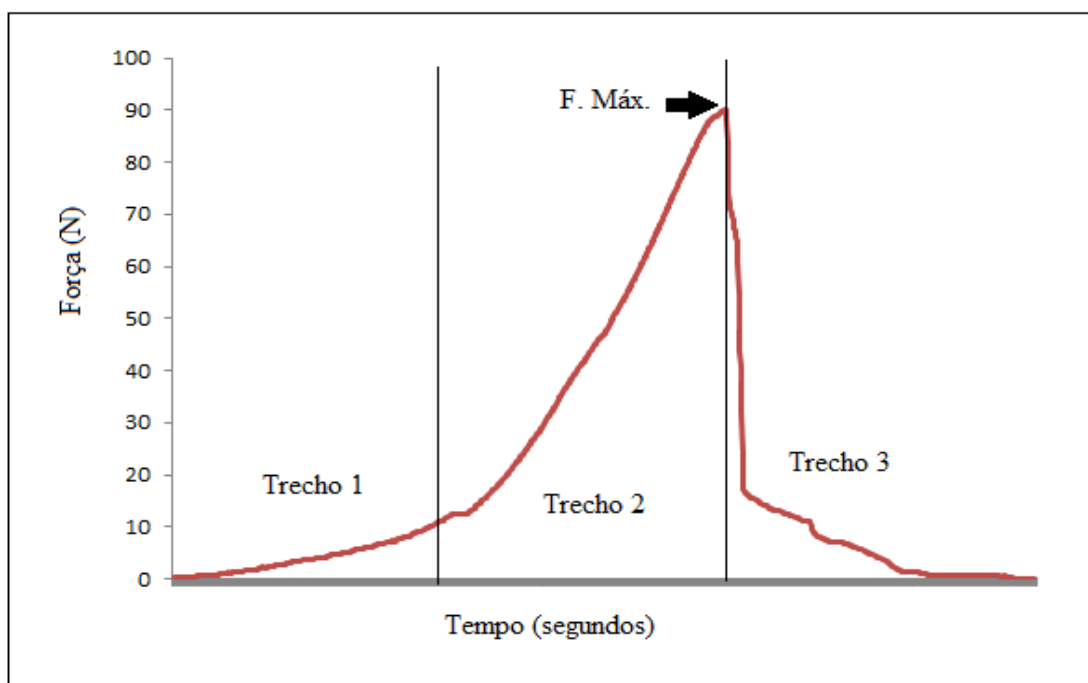


Gráfico 1- Comportamento Força *versus* Tempo durante um ensaio de resistência à tração de um corpo de prova de pericárdio bovino com aplicação de carga na direção uniaxial ao eixo longitudinal. Legenda: F.Máx. (Força Máxima).

Das observações referentes aos testes físicos com o pericárdio bovino (Tabela 1), constatou-se que a força máxima calculada foi em média 86,08N para amostras *in natura*, 97,64N para os pericárdios conservados em glicerina a 98% por 30 dias, 146,2N para os pericárdios que sofreram pré tratamento com glutaraldeído a 0,625% e conservação em glicerina por 30 dias, 101,96N nas amostras tratadas a 0,8% de glutaraldeído e 119,36N nas tratadas por glutaraldeído a 1,0% (tabela1).

A área utilizada no cálculo da tensão máxima para os grupos de pericárdios bovinos foi de 16mm². A tensão máxima média calculada nesta amostra foi de 5,38N/mm² para o grupo *in natura*; 6,10N/mm² para o grupo G; 9,13N/mm² para o grupo I, no grupo II a tensão máxima foi de 6,37N/mm² e no grupo III observou-se tensão de 7,46N/mm² (Tabela1 e Gráfico 2).

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa para os valores de Força Máxima e de Tensão Máxima entre os diferentes grupos.

Tabela 1- Valores referentes à força máxima (F. Max) e tensão máxima (T. Max) dos fragmentos de pericárdio bovino submetidos ao ensaio mecânico de tração nos grupos *In natura*, grupo G (Controle-glicerina 98%) e os grupos experimentais I (glutaraldeído 0,625% + glicerina 98%), II (glutaraldeído 0,8% + glicerina 98%), e III (glutaraldeído 1% + glicerina 98%), expressos em valores médios \pm desvio padrão.

PARÂMETROS	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	<i>In natura</i>	G	I	II	III
Força Max. (N)	86,08 \pm 23,63	97,64 \pm 33,32	146,20 \pm 42,65	101,96 \pm 30,69	119,36 \pm 36,97
Tensão Max. (N/mm ²)	5,38 \pm 1,11	6,10 \pm 0,93	9,13 \pm 1,29	6,37 \pm 1,35	7,46 \pm 1,23

Gráfico 2- Representação gráfica dos valores médios da tensão máxima e desvio padrão dos corpos de prova dos pericárdios bovinos submetidos aos ensaios de tração nos diferentes grupos: *In natura*, grupo G (Controle-glicerina 98%) e grupos experimentais I (glutaraldeído 0,625% + glicerina 98%), II (glutaraldeído 0,8% + glicerina 98%), e III (glutaraldeído 1% + glicerina 98%).

5 DISCUSSÃO

O pericárdio bovino foi obtido sem custos e com segurança em um abatedouro de inspeção estadual, comprovando-se os relatos de literatura que consideram-no uma membrana de fácil aquisição (ALVARENGA, 1992; SANTILLAN-DOHERTY et al., 1995). Pode-se afirmar também que o tratamento com glutaraldeído, assim como a manutenção em glicerina, é de fácil implementação, exigindo equipamentos simples e procedimentos de fácil execução.

A utilização da glicerina como conservadora de tecidos biológicos é difundida na medicina veterinária pelos seus efeitos antibacterianos, sendo questionada, entretanto, por sua ação antiviral (CORONADO et al., 2000 e TRANI, 2006). É relatada, na maioria das vezes, como solução única no tratamento de várias membranas: dura-máter de cães (PIGOSSI et al, 1971), pericárdio equino (BRUN et al 2002), peritônio bovino (DALECK et al 1987; DALECK et al, 1988; NETO et al, 1999; BUSNARDO et al, 2009), pericárdio bovino (ALVARENGA, 1992; QUITZAN et al, 2003; BRANDÃO et al, 2006; MIYAMOTTO et al, 2009), pericárdio bovino para utilização em ovinos (COLLATUSSO et al, 2011); pericárdio bovino em ratos (COLLATUSSO et al, 2012); ligamento nugal bovino (DALECK et al, 2000), diafragma canino (MAZZANTI, 2000), centro tendinoso ovino (MAZZANTI, 2000), membrana amniótica (ACETO et al, 2007), córnea de cães (GONÇALVES et al, 2000) e cartilagem auricular bovina (SILVA et al, 2009), entre outras. O intuito de se propor, no presente trabalho, o pré-tratamento dos pericárdios bovinos com o glutaraldeído, é o de possibilitar uma forma de utilização mais segura quanto à possibilidade de transmissão de patógenos, mantendo-se entretanto as características de baixo custo e praticidade do protocolo tradicional em nosso meio, que é a utilização da glicerina como meio único de tratamento e conservação.

O glutaraldeído é considerado como uma substância esterilizante e é utilizado no tratamento de biopróteses, com maior frequência nas concentrações de 0,5% ou 0,625%. Porém, na concentração de 0,625%, Trani (2006) observou que não foi obtida eliminação de partículas de vírus rábico nas amostras positivas de pericárdios de camundongos. Costa (2009) utilizou concentrações de glicerina e glutaraldeído semelhantes às utilizadas no presente experimento. Este autor verificou que concentrações de glutaraldeído acima de 1,5% causam elevada toxicidade no local do implante, reforçando a segurança da utilização das concentrações entre 0,625% a 1,0% de glutaraldeído quanto à sua biocompatibilidade no tratamento de pericárdios bovinos. Martins et al. (2011) observaram que estas mesmas biopróteses não provocaram lesões macroscópicas ou histológicas nos rins, fígado e baço de 60 camundongos implantados. Estes resultados, oriundos de trabalhos do mesmo grupo de pesquisa do presente estudo, motivou a determinação das concentrações de glutaraldeído aqui utilizadas.

Apesar da implantação cirúrgica em animais não fazer parte do protocolo experimental seguiu-se os procedimentos indicados para o uso cirúrgico da membrana na prática, portanto procedeu-se à reidratação que, segundo Raiser et al. (2001), é fundamental pois a glicerina tem um poder de desidratação, o que lhe dá sua característica conservadora. Segundo estes autores o tempo mínima varia de acordo com a densidade do material. O método de reidratação dos pericárdios bovinos seguiu a indicação de Rojo et al. (2009), que utilizaram solução fisiológica a 0.9% em temperatura ambiente (20°C) durante 20 minutos, uma vez que foi o único relato encontrado da associação do glutaraldeído com a glicerina para o tratamento das membranas.

O arranjo das fibras colágenas sabidamente influencia na resistência das membranas. Os cortes de pericárdio bovino avaliados microscopicamente mostraram o característico tecido conjuntivo denso não modelado que segundo Junqueira e Carneiro (2004), constitui os revestimentos viscerais fibrosos. Este arranjo, apesar de característico da membrana pericárdica, não é uniforme em toda a sua extensão, conforme relatado por Rojo et al. (2009). Os autores estudaram a resistência de cortes de pericárdio bovino em dois diferentes sentidos – longitudinal (ápice/base) e circunferencial, observando que a resistência dos cortes circunferenciais é mais elevada, devido à disposição mais uniforme das fibras colágenas dos

fragmentos obtidos desta forma; entretanto, os mesmos autores consideram que uma distribuição mais desordenada das fibras confere maior elasticidade aos fragmentos e, portanto, pode-se sugerir uma flexibilidade mais adequada à aplicação cirúrgica, que geralmente envolve a substituição de paredes corporais ou viscerais, as quais sofrem tensão em diversos sentidos. Seguindo-se a ideia de que o modelo experimental visa contemplar as situações de aplicação clínica, os fragmentos foram produzidos, tanto para análise histológica quanto tensiométrica, no sentido longitudinal da membrana (ápice/base), para a avaliação de retalhos apropriados à utilização em cirurgias reconstrutoras.

A mensuração da espessura dos pericárdios bovinos mostrou média muito superior àquela relatada por Myamoto et al. (2009). A aferição com paquímetro pode ter fornecido resultados imprecisos quando comparada à medida com régua microscópica, que foi realizada por estes autores. Deve-se considerar ainda as variáveis dos diferentes grupo de animais, com possível interferência de raça, idade, tamanho, sexo, entre outras.

Alterações morfológicas macroscópicas foram observadas nos grupos pré-tratados com glutaraldeído, como mudanças na cor e textura das membranas, o que se esperava ser acompanhado nas alterações histológicas quanto à organização das fibras e no aumento da resistência mecânica, porém isto não foi observado. Sugere-se que a conservação em glicerina por 30 dias, após o tratamento com glutaraldeído, pode ter tido influência nos resultados histológicos e tensiométricos do presente estudo, o que, entretanto, ainda precisa ser examinado.

O efeito do tratamento e conservação com glicerina sobre a estrutura morfológica das membranas biológicas vem sendo estudado ao longo do tempo e os trabalhos demonstram que não há influência desta substância sobre a organização tecidual. Em uma avaliação histológica de diversas membranas realizada por Guimarães et al. (2007), dentre as quais o pericárdio bovino, conservadas em glicerina a 98% por 15, 30, 60 e 90 dias e a fresco, os autores não verificaram diferenças marcantes quanto à integridade estrutural dos pericárdios conservados em glicerina a 98% por 15 e 60 dias em comparação com o grupo controle (pericárdio a fresco). Daleck et al. (1987) não observaram também alterações no aspecto das células mesoteliais e das fibras conjuntivas do peritônio canino autógeno ou homólogo conservado em glicerina, implantados em cães, assim como Daleck et al. (1988), que verificaram que o peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias apresentava um aspecto estrutural semelhante ao peritônio a fresco. Nos três estudos, sugere-se que a glicerina possui uma ação inibitória enzimática que impede a degeneração das fibras do material conservado, e promove a preservação por uma ação desidratante, sem alteração das características da textura do tecido. Com base nestes dados da literatura, os pericárdios bovinos tratados com glicerina 98% foram considerados como Grupo Controle na avaliação morfológica do presente estudo.

Os resultados da avaliação microscópica confirmaram os achados de Gutierrez-Samperio et al. (2002), quando testaram o tratamento de pericárdio bovino com glutaraldeído em concentrações até 1%, apesar de concentrações a partir de 2% terem promovido deformidade de células mesoteliais e dos fibroblastos e retração das fibras colágenas. Estes autores não indicaram o motivo das baixas concentrações de glutaraldeído não causarem alterações histológicas significativas, o que também não se pode explicar com os achados aqui obtidos, já que as alterações macroscópicas foram evidentes e esperava-se que viessem acompanhadas de algum nível de rearranjo estrutural. É possível que modificações a nível ultraestrutural ou molecular sejam a causa da mudança na aparência das membranas, o que ainda precisa ser investigado. De qualquer forma, concentrações acima de 1% são contraindicadas por não serem biocompatíveis, visto que Costa (2009) observou reação inflamatória moderada nos implantes de pericárdio bovino quando aplicados em parede abdominal de ratos.

Leite et al. (1979) relatam que o provável esmaecimento nas lâminas coradas por hematoxilina-eosina das amostras de membranas biológicas mantidas em glicerina, deve-se ao fato de que esta solução é um álcool tri-ídrico de fórmula molecular ($C_3H_8O_3$), que reage com o citoplasma da célula diminuindo a afinidade tintorial para a eosina e aumentando para a hematoxilina. Supõe-se que mecanismo semelhante ocorra em relação ao glutaraldeído, uma vez que, tanto no material conservado em glicerina quanto no tratado com glutaraldeído e conservado em glicerina neste estudo, foi observada baixa afinidade tintorial para a eosina e alta para a hematoxilina.

A força máxima foi o principal parâmetro utilizado para comparar a diferença de resistência tecidual entre os grupos estudados, que representa a maior força aplicada durante o ensaio de tração. Ao ultrapassar o limite elástico (Força Máxima), a deformação do material será irreversível. A força máxima é uma propriedade mecânica analisada na fase plástica da deformação do tecido testado, na qual provavelmente algumas fibras foram rompidas e outras já estavam deformadas, mesmo se a força de ruptura não for atingida. Seu significado biológico é de grande importância porque, antes mesmo de sofrer a ruptura, um implante cirúrgico perde a função se ocorrer sua deformação permanente.

Segundo Herrero et al. (1999) e Miyamoto et al. (2009), a forma de tratamento do pericárdio pode influenciar na sua resistência à tração. Estes autores argumentam que o glutaraldeído estabelece ligações cruzadas entre os grupos aldeídos e amina das fibras colágenas, aumentando a estabilidade do tecido e, conseqüentemente, aumentando a resistência do material de forma mais eficaz que outras substâncias alternativas que podem ser utilizadas para este fim: difenilfosfarilazida e o etildimetilaminopropil carbodiamida. Os resultados obtidos demonstraram que os retalhos de pericárdios pré-tratados em glutaraldeído nas concentrações de 0,625%, 0,8% e 1,0% por 18 dias para posterior conservação em glicerina a 98% por 30 dias, não tiveram sua resistência mecânica notavelmente alterada, visto pelos resultados de força máxima e tensão máxima dos pericárdios sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparados com os grupos *in natura* e Glicerina. Assim como na avaliação histológica, sugere-se que as baixas concentrações utilizadas podem ter sido responsáveis por este resultado ou, ainda, que a conservação em glicerina por 30 dias pode ter tido influência nos resultados tensiométricos, o que, entretanto, precisa ser melhor examinado. Deve-se considerar que o aumento de resistência das membranas biológicas imputado ao tratamento com glutaraldeído não é o objeto desta pesquisa, uma vez que o pericárdio bovino conservado em glicerina 98% ou tratado com soluções de glutaraldeído nas concentrações estudadas mostrou resistência adequada para seu uso clínico.

Vinculando-se as atividades antimicrobianas conhecidas do glutaraldeído e a praticidade da glicerina 98% na conservação de membranas biológicas, aos resultados aqui apresentados de compatibilidade destas soluções na manutenção das características morfológicas e mecânicas do pericárdio bovino, sugere-se que o método proposto é adequado para tratamento desta bioprótese, o que permite sua utilização com segurança.

6 CONCLUSÕES

O tratamento do pericárdio bovino com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,625%, 0,8% e 1%) previamente à conservação com glicerina 98% altera sua coloração e textura, comparativamente ao tratamento tradicional desta membrana na medicina veterinária, que é a conservação em glicerina 98% como solução única, e à membrana *in natura*.

Não ocorre desestruturação histológica do pericárdio bovino tratado com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,625%, 0,8% e 1%) previamente à conservação com glicerina 98% quando comparado ao tratamento único com glicerina 98%.

A resistência mecânica do pericárdio bovino não é modificada significativamente pelo tratamento com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,625%, 0,8% e 1%) previamente à conservação com glicerina 98% quando comparado ao tratamento único com glicerina 98% e com a membrana a fresco.

O pericárdio bovino submetido à associação do tratamento com glutaraldeído e conservação em glicerina 98%, mostrou comportamento morfológico e mecânico semelhante ao da membrana tratada de forma tradicional (glicerina 98%).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. 1992.
- ACETO, M. L.; COELHO, M. C. O. C.; MONTEIRO, V. L. C.; CARNEIRO-LEÃO.; A. M. A.; MELO- JUNIOR, M. M. Membrana amniótica e pericárdio canino como curativo biológico na preparação de leito receptor para enxertos cutâneo autógenos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 358-362, 2007.
- 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, v. 33, supl., p. 305-312, dez. 1996.
- BAUCIA, J. A.; LEAL, R. M.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído; comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 21, n.2, p. 180-187, 2006.
- 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. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n.1, p.73-83, 2006.
- BRUN, M.V.; PIGATTO, J. A. T.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, L.O.; BECK, C. A. C.; AGUIAR, E. V.; FREIRE, C. D.; GAIGA, L. H. Traqueoplastia em cães com pericárdio eqüino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 60-67. 2002.
- BUSNARDO, C. A.; FREITAS, P. M. C.; EURIDES, D.; RONCETTI, G. R.; NUNES, L. C.; BELETTI, M. E. Peritônio de bovino como bandagem de queimaduras cutâneas experimentais em coelhos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 823-828, 2009.
- CARDENAS-LAILSON, L. E.; GLÁVAN-MONTAÑO, A.; MALAGÓN-HIDALGO, H. O. Modelo experimental del uso de pericárdio de bovino tratado com glutaraldeído, comparado malla de silicón para el tratamiento de los defectos congênitos de la parede abdominal. **Cirurgía. General**, v. 19, n. 2, p. 116-119, 1996.
- CARPENTIER, A.; DELOCHE, A.; RELLAND, J.; FABIANI, J. N.; FORMAN, J.; CAMILLERI, J. P.; SOYER, R.; DUBOST, C. H; MALM, J. R. Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 68, n. 5, p. 771-782. 1974.
- COLLINS, P. M. **Dictionary of carbohydrates**. CRC. Press: Cambridge, p. 1282, 2005.
- COLLATUSO, C.; RODERJAN, J.G.; VIEIRA, E.D.; VIEIRA, E. D.; MYAGUE, N. I.; NORONHA, L.; COSTA, F. D. A. Descelularização como método anticalcificante em

próteses valvares de pericárdio bovino sem suporte: estudo em ovinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 6, n. 26, p. 419-426, 2011.

COLLATUSO, C.; RODERJAN, J.G.; VIEIRA, E.D.; COSTA, F. D. A.; NORONHA, L.; FORNAZARI, D.F. Efeito de descelularização com SDS na preservação da calcificação em pericárdio bovino fixado em glutaraldeído. Estudo em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.17, n.1, p.88-96, 2012.

CORONADO, G. S.; SWENSON, C. L.; MARTINEZ, S. A.; BURKHARDT, K, S.; ARNO CZKY, S. P. Effects of a 98% solution of glycerol or sterilization with ethylene oxide on FELV in bone allografts and effects on bone incorporation of allografts in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 665-671, 2000.

COSTA, C. B. Anatomohistopatologia de implantes de pericárdio bovino conservado em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de camundongos, 2009. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária)- Instituto de Veterinária. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

COVARRUBIAS, D.P.; VEJA, A. S.; JASSO VICTORIA, R.; OLMOS ZÚÑIGA, J. R.; CALOCA, J.V.; SALGADO, J.A.S.; SANTILLÁN-DOHERTY, P. Uso del pericárdio bovino tratado con glutaraldeído. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**. v.18, n.3, p. 224-229, 2005.

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.; DALECK, C. L. M.; ALESSI, A. C.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. 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, jun. 1988.

DALECK, C. R.; COSTA NETO, J. M.; ALESSI, A. C.; VICENTI, F. A. M.; FANTINATTI, A. P.; FRANCISCO, M. M. S.; MARTINS, M. R. Reparação cirúrgica da pars musculares do diafragma por ligamento nugal xenólogo conservado em glicerina a 98%: estudo experimental em cão. In: **Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**. 2000.

EURIDES, D.; NIGRO, A. J. T.; GOLDENBERG, S. Reparo de defeito provocado do diafragma de cães com segmento livre peritônio-muscular. Estudo experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 9, p. 131-135, 1994.

GAMA, H. A. P.; ANSELMO, W. J.; FILHO, M. H.; FOCHI, H. Emprego da prótese valvar de pericárdio bovino em glutaraldeído: 18 meses de seguimento. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.33, n.2, p.121-123, 1979.

GALLO, J.I.; ARTIÑANO, E.; VAL, F.; DURAN, C.G. Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects: experimental study. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**. v.83, n.6, p.905-908, 1982.

GASQUE, K. C.; OLIVEIRA, R. C.; CEOLIN, D.; CESTARI, T. M.; TAGA, R.; TAGA, E. M.; CORREA, A. Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblasto. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 58-66, 2008.

GIROTTI; J. A.; CHICRAMONTE, M.; MENON, N. G.; SINGH, N.; SILVERMAN, R.; TUFARO, A. P.; NAHABEDIAN, M.; GOLDBEG, N. H.; MANSON, P. N. Recalcitrant abdominal wall hernias: long-term superiority of autologous tissue repair. **Plastic and Reconstructive Surgery**; Baltimore. v. 112, p 106-114, 2003.

GONÇALVES, G.F.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; OLIVEIRA, S. T.; MAZZANTO, A.; STADILLE, R. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, suplemento, p. 161. 2000.

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

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**, v. 23, n, 3, p. 120-127, July-Sept. 2007.

GUTIÉRREZ-SAMPERIO, C.; VERA-GARCIA, F. J.; FIGUEROA-CÁRDENAS, J. D.; GALLEOS-CORONA, M. A.. Bioprótesis de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído en la reconstrucción de la pared abdominal. **Cirugia y Cirujanos**, v.70, p. 257-266, 2002.

GRECA, F. H.; NORONHA, L. COSTA, F. D. A.; FILHO, Z. A. S.; SOCCOL, A. T.; FERES, A. N.; DUDA, J. R.; ADAMS, E. Estudo comparativo da biocompatibilidade da submucosa intestinal porcina e pericárdio bovino usados como enxertos na veia cava de cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.4, p.317-322, 2005.

HERRERO, E. J.; FERNANDEZ, P.; TURNAY, J.; OLMO, N.; CALERO, P.; GARCIA, R.; FREILE, I.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Influence of diferente chemical cross-linking treatment on the properties of bovine pericardium and collagen. **Biomaterials**, v.20, n.6, p.539-545, 1999

IONESCU, M. I.; TANDON, A. P.; MARY, D. A. S.; ABID, A.; McGOON, D. C. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 73, n. 1, p. 31-42. 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 487, 2004.

LEITE, J.B.F.; MARQUES, A.F.; GOMES, O.M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação dos tecidos. **Revista Paulista Médica**, v.93, p.81-4, 1979.

MARTINS, C.R.P.; SILVA, M.F.A.; NOGUEIRA, V.A.; PRADO, J. S; BRITO, M. F. Avaliação anatomopatológica de rins, fígado e baço de camundongo submetidos a implante de

pericárdio bovino conservado em glicerina e glutaraldeído em ferida cirúrgica de parede abdominal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, p. 103-110, 2011.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, A. F.; EURIDES, D.; FARO, R. X.; GONÇALVES, G. F.; GUEDES, A. G. P.; RIOS, M. V. Restauração da traqueia de cães com membrana de cordão umbilical de bovinos conservados em glicerina. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 4, 2000.

MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; ALVES, A. S.; FARIA, R. X.; ALIEVI, M. M.; BRAGA, F. A.; SALBEGO, F. Z. Hernioplastia diafragmática em cão com pericárdio bovino conservado em solução supersaturada de açúcar. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p. 677-684, 2003.

MIYAMOTTO, M; DEL VALLE, C. E.; MOREIRA, R. C. R.; TIMI, J. R. R. Resistência tensional do pericárdio bovino fixado em glutaraldeído comparado com a da veia safena magna. **Jornal Vascular Brasileiro**. V. 8, n. 2, p. 103-111, 2009.

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.

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

OLIVEIRA, T. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; MAZZUCATTO, B. C. Cistoplastia experimental em coelhos com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2218-2224, 2008.

PAULO, N. M.; FISCHER, P.; MATOS, M. P. C.; CONCEIÇÃO, M.; FREITAS, J. S.; FILHO, W. A. S.; BRITO, W. C. R.; AMARAL, A. V. C. Uretroplastia experimental de substituição em cães com segmentos homólogos de artéria carótida conservada em glicerina. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.1, p.65-71, 2000.

PIGOSSI, N. Implantação da dura-máter homogênea conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 22, p. 204-212, 1967.

PIGOSSI, N.; RAIA A ALEX A.; GAMA A. H; SOMOSEN O.; HADDAD J.; STOLF, N.A.G.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico de dura-máter homóloga conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971.

PINTO, T.J. A.; SAITO, T.; GLERAN, A.. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio de bovino e Dacron. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 185-189. 1993.

PREVEL, C.D.; EPPLEY, B.L.; SUMMERLIN, D.J.; JACKSON, J.R.; MCCARTY, M.; BADYLAK, S.F. Small intestinal submucosa: utilization for repair of rodent abdominal wall defects. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, v.35, p.374-80, 1995.

QUITZAN, J. G.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; CROCCI, A. J. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 4. 2003.

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**, v.5, n. 4, p. 229-238, 2004

RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; PIPPI, N.L.; ZINN, L. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDIN, A. I.; BAIOTTO, G. C.; RIOS, M. V.; SILVEIRA, A. F. HOMOIMPLANTE ORTOPÉDICO DE TENDÃO CALCÂNEO EM CÃES. Conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.89-94, 2001.

RAPPETI, J. C. S.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; FILHO, S. T. L.P.; ALVES, S. D. L.; STIGGER, A. L.; WANDER, A. W.; SILVA, M. F. E.; DALMOLIN, F.; THOMAZ, J. Reconstituição experimental da parede torácica de gatos com implante heterógeno de cartilagem auricular conservado em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, v. 33, n.6, p.1089-1094, 2003.

ROJO, F. J.; ATIENZA, J. M.; JORGE-HERRERO, E.; GARCIA-PÁEZ, J. M.; GUINEA, G. V. Resistencia a tracción de membranas de pericárdio para válvulas cardíacas biológicas. **Anales de Mecanica de la Fractura**, v. 1, n. 26, p.33-36, 2009.

SANTILLAN-DOHERTY, P.; JASSO-VICTORIA, R.; SOTRES-VEGA, A.; OLMOS, R.; ARREOLA, J. L.; GARCIA, D.; VANDA, B.; GAXIOLA, M.; SANTIBANEZ, A.; MARTINS, S.; CABELLO, R. Thoracoabdominal wall repair with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. **Journal of Investigative Surgery**, v. 9, n. 1, p. 45-55. 1996.

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

SILVA, L. A. F.; FRANCO, L. C.; MENEZES, L. B.; MAURA, V. M. B. B.; BERNARDES, K. M.; SOUZA, M. A. Hernioplastia em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 61, n. 3, p.606-612, 2009.

TANG, L.; EATON, J. W. Inflammatory Responses to Biomaterials. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 103, p.466-471, 1995.

TRANI, R.A.S. Eficácia das soluções de Glicerina 98% e Glutaraldeído 0,625% na desinfecção de pericárdio de camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente inoculados com vírus da Raiva. 2006. 68p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.