

MOEMA LOPES RAMOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FIXADORES NA QUALIDADE  
HISTOLÓGICA DE TECIDOS PREVIAMENTE PLASTINADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R175a  
2018

Ramos, Moema Lopes, 1974-  
Avaliação de diferentes fixadores na qualidade histológica de tecidos previamente plastinados / Moema Lopes Ramos. – Viçosa, MG, 2018.  
x, 59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 56-59.

1. Histologia veterinária. 2. Fixação (Histologia).  
3. Plastinação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

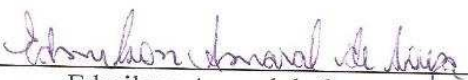
CDD 22. ed. 636.0891018

MOEMA LOPES RAMOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FIXADORES NA QUALIDADE  
HISTOLÓGICA DE TECIDOS PREVIAMENTE PLASTINADOS**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de julho de 2018.

  
Edmilson Amaral de Souza

  
Fabrício Luciani Valente

  
Waleska de Melo Ferreira Dantas

  
Regina Bueno

  
Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

Aos meus pais, Maria Célia e José, como forma de agradecimento por todos os esforços para me ofertar tudo de melhor em termos de amor e educação.

Ao meu esposo Marco Lúcio, pelo amor e pela compreensão das horas ausentes consumidas durante este trabalho.

À minha avó Mariinha, por estar sempre presente no meu coração!

Obrigada. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese foi utilizar tão poucas palavras para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória. Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há tributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Início os agradecimentos pelos meus pais José Mota Ramos e Maria Célia Lopes Ramos pelo amor incondicional dedicado a mim.

Ao meu marido, Marco Lúcio Gesualdo Pesce, por me acompanhar ao longo dessa nossa trajetória de vida.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*), que se fazem presentes em cada momento da minha vida.

O meu obrigado também aos meus queridos familiares.

Agradeço às minhas lindas Frida e Jade, ao Kaiser (*in memoriam*), por sempre estarem ao meu lado!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Tarcízio Antônio Rego de Paula pela competência científica, acompanhamento, confiança e por ter acreditado neste projeto e por fazer do laboratório de plastinação uma realidade.

Agradeço à Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa oferecida para realizar um período de treinamento no exterior (doutorado sanduíche) na Universidade de Murcia, Espanha.

Agradeço à Sociedade Internacional de Plastinação pelo apoio em eventos internacionais.

Agradeço aos meus tutores espanhóis Prof. Dr. Rafael Latorre Reviriego (Universidade de Múrcia, Espanha) e Prof. Dr. Octávio Lopéz Albors (Universidade de Múrcia, Espanha) pela competência científica, pelo tempo dedicado a me ensinar, pela acolhida no laboratório de plastinação da Universidade de Murcia e pelo exemplo de profissionalismo.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho, com especial deferência ao Prof. Dr. Cláudio Fonseca Furtado.

Aos colegas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, do campus de Rio Paranaíba da UFV.

Aos professores Dr. José Maria Vazquez Autón, Dr. Francisco Gil Cano, Dr. Gregorio Ramírez Zarzosa, Dr. Juan Seva Alcaraz e aos técnicos Mariano Orenes Hernández, José Albarracín López e Juan Sánchez Gil, da Faculdade de Veterinária da Universidade de Múrcia, Espanha.

Agradeço de maneira especial à professora Dra. Maria Dolores Ayala Florenciano e à técnica Lucía Sarrias, do Departamento de Anatomia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Múrcia, Espanha, pelo companheirismo, carinho e amizade.

Aos professores Dr. Athelson Stefanon Bittencourt (Universidade Federal do Espírito Santo), Dra. Telma Masuko (Universidade Federal da Bahia), Dr. Robert Henry (Universidade do Tennessee, EUA), Dr. Volker Schill (Biodur, Alemanha), pelos ensinamentos e disponibilidade de tempo dedicado a este trabalho.

Aos técnicos de laboratório Adão Carlos Cardoso, Cláudio Veridiano Cardoso, José Luciano Parzanini, Antônio Agripino Borges, e aos demais amigos do DVT da UFV.

Agradeço de maneira especial as minhas amigas, Mayra Fonseca Zerlotinni e Sanelly Lourenço da Costa, que marcaram importante presença durante meu trabalho de pós-graduação.

À secretária da pós-graduação do Departamento de Veterinária da UFV, Rosineia Aparecida da Cunha, por tão importante trabalho e dedicação.

Estendo meus agradecimentos aos queridos amigos e parceiros de laboratório Lina Carazo, Mayra Zerlotini, Fernanda de Paula, Leanes Silva, Milene Figueiras, Marcelo Santana, Letícia Bergo, Vinícius Herold, e aos estagiários Jorge, Rebecca, e Gabriela, que comigo conviveram e juntos compartilhamos momentos de alegria e também perdas.

Aos queridos Per Christian, Honey, Françoise e Elizabeth Braathen.

Aos meus grandes amigos Anísio Pereira Borges, Roberto Fábio Rodrigues e Silva, Adriana Santana, Elizabeth de Faria Tavares, Fernanda Freitas, Vânia Coutinho e Rafael Torres.

À minha irmã de coração Silvana da Costa Ferreira, pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos ao longo dessa caminhada.

Aos meus lindos Artur, Maria Clara e Maria Cecília.

À querida Soninha (*in memoriam*).

Meu reconhecimento a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradeço à vida e a Deus por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante e por colocá-las tão caprichosamente no meu caminho.

*“Deus não perguntará quantas coisas boas você fez na vida e sim quanto AMOR  
você colocou naquilo que fez”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Formaldeído.....	3
2.1.1 Efeitos nocivos do formaldeído.....	4
2.1.2 Legislação para o uso do formaldeído.....	6
2.2 Plastinação e desplastinação.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Aspectos éticos.....	11
3.2 Local de realização dos experimentos.....	11
3.3 Coleta e preparo das amostras.....	11
3.4 Delineamento experimental.....	12
3.4.1 Unidades experimentais de fixação.....	12
3.4.2 Grupos fixadores.....	12
3.4.3. Controles.....	13
3.4.4 Processamentos pós-fixação.....	13
3.4.4.1 Processamentos de plastinação.....	13
3.5 Plastinação.....	15
3.5.1 Fixação.....	15

3.5.2	Desidratação.....	16
3.5.3	Impregnação forçada.....	17
3.5.4	Cura.....	18
3.6	Desplastinação e maturação.....	18
3.7	Processamento histológico.....	19
3.8	Avaliação histológica.....	19
3.9	Análise estatística.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Avaliação dos fixadores sem o processamento de plastinação (controle) .....	25
4.2	Avaliação dos tecidos plastinados, curados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 1).....	31
4.3	Avaliação dos tecidos plastinados, curados, maturados e desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 2).....	37
4.4	Avaliação dos tecidos plastinados, não curados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 3).....	43
4.5	Avaliação dos tecidos plastinados, não curados, maturados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 4).....	48
5	CONCLUSÕES.....	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## RESUMO

RAMOS, Moema Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Avaliação de diferentes fixadores na qualidade histológica de tecidos previamente plastinados.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

A exposição ao formaldeído é reconhecidamente um dos mais importantes fatores de risco presentes nos laboratórios de anatomia e de patologia, por ser um produto tóxico, carcinogênico e teratogênico. O formaldeído é utilizado em solução comercial, normalmente diluída a 10%, designada comumente por formol. Trata-se de uma solução pouco onerosa e extremamente eficiente para preservação de peças anatômicas e de tecidos. Na busca de técnicas conservativas em substituição ao formaldeído, a plastinação é um método inovador de conservação de peças anatômicas, que substitui a água e a gordura dos tecidos por um polímero curável, para a etapa de conservação de peças cadavéricas. Porém, a plastinação prescreve o uso do formol na etapa de fixação. Um estudo comparativo, sobre a ação de três fixadores utilizados em tecidos previamente plastinados, foi realizado a fim de avaliar qualitativamente a preservação de características histológicas de nove órgãos, ao microscópio de luz (ML). Artéria, esôfago, fígado, intestino delgado, intestino grosso, músculo estriado esquelético, nervo periférico, pâncreas e traqueia de equino foram coletados, fixados em três diferentes soluções fixadoras (formaldeído 10%, formaldeído 2,5% e solução de Cambridge). Após fixação, foram preparados para procedimentos de plastinação com silicone S10 Biodur<sup>®</sup>, os quais foram submetidos ou não à etapa de cura. Após o término da plastinação, metade das amostras dos tecidos foi desplastinada em solução de metóxido de sódio 5% em metanol e processada para rotina histológica. A outra metade passou por um processo de maturação durante 04 meses, para depois ser desplastinada e processada para rotina histológica. Este estudo mostrou que a solução fixadora de formaldeído 10% apresentou melhores qualificações para análises histológicas dos tecidos plastinados, que foram submetidos ou não ao processo de cura, seguidos do processo de desplastinação. Mostrou também que a solução fixadora de Cambridge apresentou as melhores qualificações para análises histológicas dos tecidos plastinados, submetidos ou não ao processo de cura, maturados e desplastinados.

## ABSTRACT

RAMOS, Moema Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Assessment of different fixers on the histological quality of previously plastinated tissues.** Advisor: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

The exposition to formaldehyde is admittedly one of the most important risk factors present in the anatomy and pathology laboratories, since it is a toxic, carcinogenic and teratogenic product. Formaldehyde is used in commercial solution, normally diluted at 10%. This is a very cheap and extremely efficient solution used to preserve the anatomic pieces and tissues. Searching for conservative techniques to substitute the formaldehyde, plastination is an innovative method to conserve anatomic pieces that can substitute water and the tissue fat by a curable polymer, for the state of conservation of cadaveric pieces. However, plastination prescribes the usage of formaldehyde in the fixation stage. A comparative study regarding the action of three fixers used in tissues which were previously plastinated, was done in order to qualitatively evaluate the preservation of histological characteristics of nine organs using the light microscope (LM). Artery, esophagus, liver, small intestine, large intestine, skeletal striated muscle, peripheral nerve, pancreas and equine trachea were collected, fixed in three different fixing solutions (formaldehyde 10%, formaldehyde 2.5% and Cambridge solution). After fixation, they plastination procedures were prepared with silicon S10 Biodur<sup>®</sup>, which were submitted or not to the cure stage. After the end of plastination, half of the tissue samples was deplastinated in solution of sodium methoxide 5% in methanol and processed for histological routine. The other half went through a maturation process during 04 months, and only after that they were deplastinated and processed for histological routine. This study showed that the fixative solution of formaldehyde 10% presented better qualification for histological analyses of the plastinated tissues, which were submitted or not to the cure process, followed by the deplastination process. It has also showed that the Cambridge fixative solution presented better qualification for the histological analyses of the plastinated tissues, which were submitted or not to the cure process, then matured and deplastinated.

## 1 INTRODUÇÃO

O formaldeído é um composto utilizado mundialmente nas mais diversas áreas, desde a saúde até a produção de materiais. Em solução aquosa, o formaldeído é chamado de formol ou formalina, sendo um líquido incolor, de odor cáustico, miscível em água, etanol e acetona (COELHO, 2009). Ele é o principal fixador empregado na conservação de peças anatômicas e de cadáveres, pelo fato de agir nos tecidos biológicos prevenindo sua degradação (HAMBELI et al., 2010). Porém, o uso de formaldeído, para a conservação de cadáveres e peças para o estudo anatômico, vem sendo desestimulado. Avaliações feitas, em 2004, pela “International Agency for Research on Cancer – IARC” – da Organização Mundial de Saúde (OMS), sobre o formaldeído, o classificaram como carcinogênico (grupo 1), tumorogênico e teratogênico (INCA, 2005).

Dessa forma, tornou-se uma questão de grande importância encontrar uma alternativa no ensino da Anatomia Humana e Veterinária, que reduza o volume e a concentração do formaldeído na conservação das peças anatômicas e dos tecidos.

Coleman e Kogan (1998), com a finalidade de reduzir a percentagem de formaldeído na preservação de cadáveres, introduziram uma nova mistura de embalsamamento, com um teor relativamente baixo de formaldeído. A mistura testada consistiu em formaldeído 37-40% (0,5 L); fenol (0,2 L); glicerina (0,5 L); álcool isopropílico (4 L) e cloreto de sódio (20 kg) para um volume final de 35 L de água. Eles observaram que a solução de embalsamamento foi eficiente para preservação macroscópica e microscópica dos órgãos analisados.

Fixadores tradicionais livres de formaldeído, tais como ácido crômico, cloreto de mercúrio, ácido pícrico, Zenker e Bouin contêm metais pesados (que são tóxicos para o ambiente) ou são ácidos (o que pode degradar o DNA e o RNA) ou é uma substância cuja aquisição é controlada, como o ácido pícrico. Apesar de suas propriedades especiais, eles são alternativas não viáveis para fixação (ZANINI et al., 2012).

Um fixador alternativo natural que tem sido testado é o mel. Por séculos, o mel apresenta ser uma solução antibacteriana de sucesso, com o potencial de preservar os componentes teciduais sem qualquer efeito tóxico sobre manipuladores (PATIL et al., 2013). Alguns estudos mostraram que o mel também pode ser uma alternativa segura para métodos de fixação para coloração histoquímica e imunohistoquímica (ÖZKAN et al., 2012). No entanto, o mel não

está disponível universalmente e é impraticável usá-lo em grande escala devido ao seu alto custo (PATIL et al., 2013).

Apesar de toda tecnologia disponível, até os dias atuais vivemos a dificuldade de conservar peças cadavéricas e fragmentos de tecidos em substâncias fixadoras não tóxicas (FOX et al., 1985; MOELANS et al., 2011)

Para paliar essas limitações, foi desenvolvida uma técnica denominada plastinação (Von Hagens, 1987; Latorre et al., 2007), a qual se baseia na substituição do líquido corporal e parte de lipídeos por uma resina polimerizável de silicone, poliéster ou epóxi, o que permite a manutenção da peça em ambiente externo, sem nenhum uso de conservante.

As peças plastinadas apresentam vantagens inegáveis sobre o material formolizado como: baixa toxicidade, ausência de odor e umidade (podem ser manipuladas sem luvas), peças limpas, com maior durabilidade, e preservação das estruturas a nível histológico (Latorre et al., 2007).

Segundo Ravi e Bhat (2011), uma das qualidades mais interessantes, importantes e potencialmente úteis da plastinação do tecido por silicone, é a permanência da estrutura microscópica intacta. Isto implica que o espécime pode ser preservado e armazenado, quase indefinidamente, mantendo todo o potencial para exame histológico.

Para acessar a avaliação histológica, os autores descrevem o processo de desplastinação para a produção de lâminas e para tal são utilizados metóxido de sódio (Walker, Jackson, Powell, 1988), metilbenzeno, metileno, dicloroacetona (Ripani et al., 1996) como agentes desplastinantes.

Neste trabalho foi verificado se houve influência de três fixadores em tecidos plastinados com silicone Biodur® S10, e desplastinados antes e depois ao processo de cura. Todo material foi plastinado de acordo com protocolo padronizado Biodur® S10, onde amostras teciduais foram desplastinadas com 5% de metóxido de sódio em metanol por 48 horas, antes e depois do processo de cura, rotineiramente processadas para inclusão em parafina e seccionamento, e finalmente coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação qualitativa em microscopia de luz.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Formaldeído

O formaldeído é o fixador e o conservante amplamente mais utilizado em laboratório de anatomia, devido ao baixo custo e à alta eficiência (CARVALHO, et al. 2013). A ação fixadora do formaldeído é devida à capacidade do seu grupo aldeído reagir espontaneamente com grupos reativos de proteínas, formando pontes de metileno entre proteínas adjacentes (intermoleculares) ou dentro da mesma proteína (intramoleculares). Através do estabelecimento das pontes de metileno, as pontes intracelulares solúveis ligam-se às proteínas estruturais, tornando-se insolúveis (BANCROFT, 2008). Quando o formaldeído reage com os aminoácidos lisina, cisteína, arginina triptofano, histidina, e aminas N-terminais (aminoácido que existe no extremo de uma proteína ou polipeptídeo), ele para a degradação tecidual formando adutos de metilol (FOWLER et al., 2010). A fixação com formaldeído é fundamental para manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas (HAMBELI et al., 2010).

Existem outros métodos de conservação de tecidos biológicos em laboratórios de Anatomia Humana e Animal. Técnicas com o uso de congelamento ou agentes químicos como soluções mercuriais, glutaraldeído e glicerina podem ser utilizadas como alternativas ao uso do formaldeído. Mas, soluções mercuriais são inviáveis de serem utilizadas, pois também são tóxicas e seu comércio está cada vez mais restrito e outras soluções nem sempre têm um efeito desejado na conservação dos cadáveres. Atualmente existe uma política de redução dos níveis de formaldeído pela utilização de resinas que são utilizadas na conservação dos cadáveres e peças anatômicas (MACHADO, 2005).

Para o ensino de Anatomia, destaca-se que a dissecação é o método mais utilizado para a aprendizagem nas disciplinas relacionadas, sendo possível o contato real com os órgãos do corpo e com suas diversas texturas que apresentam os tecidos. Para realização deste método é necessário conservar cadáveres, sendo utilizadas diversas técnicas e várias substâncias para essa conservação, tornando possível a manipulação das peças. As técnicas de preparação e conservação, que permitem conservar os tecidos úmidos e ao mesmo tempo sem imersão em soluções conservadoras, tiveram suas origens com o descobrimento da glicerina em 1779, pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele (1742-1786). Em 1884 o italiano Carlo Giacomini propôs

sua utilização em preparados anatômicos. A publicação de Laskowski (1886) otimizou a combinação da glicerina com outros compostos, o que favoreceu a inclusão de cadáveres e de peças com grandes quantidades de tecido biológico (MOSCOL e CASTRO, 1989).

### **2.1.1 Efeitos nocivos do formaldeído**

As propriedades desejadas para preservação de cadáveres para o ensino de Anatomia incluem: boa preservação estrutural em longo prazo de órgãos e tecidos, com encolhimento mínimo ou distorção; manutenção da flexibilidade geral; prevenção da desidratação; prevenção de crescimento de fungos ou bactérias; redução de riscos biológicos (disseminação de infecção para profissionais e estudantes); redução da poluição ambiental e riscos químicos; e preservação da cor de tecidos e órgãos minimizando efeitos de oxidação, que resultam em escurecimentos dos mesmos (COLEMAN, 1995).

O formaldeído é muito utilizado por categorias profissionais como técnicos de laboratórios, anatomistas e patologistas, que geralmente trabalham em locais fechados, expostos ao mesmo. Ele é o principal fixador empregado na conservação de peças anatômicas e de cadáveres, pelo fato de agir nos tecidos biológicos prevenindo sua degradação (HAMBELI et al, 2010). Por ser tóxico, esse fixador provoca sintomas como irritação de mucosas, devido à emissão de vapores irritantes, e doenças do trato respiratório nas pessoas que têm contato prolongado com a solução. Os indivíduos com maior probabilidade de sofrerem danos, devido à utilização do formol, são aqueles que estão expostos no seu local de trabalho a concentrações mais elevadas de vapores do mesmo (LIMBERGER, 2011).

O uso de formaldeído para a conservação de cadáveres e peças para o estudo anatômico vem sendo, há muito, desestimulado. Algumas avaliações feitas pela “International Agency for Research on Cancer – IARC” - da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o formaldeído, que foram concluídas em 1987, classificaram o formaldeído no grupo 2A – provável cancerígeno em humanos – e mantiveram essa classificação também em 1995. Em 2003, foi montado um grupo de trabalho com cientistas da mesma agência, que reavaliaram os resultados de estudos existentes e optaram pela reclassificação do formaldeído quanto ao seu potencial cancerígeno. A partir de julho de 2004, a IARC classificou este composto como carcinogênico (grupo 1), tumorogênico e teratogênico, por produzir efeitos na reprodução em humanos e,

estudos experimentais demonstraram também efeitos do formaldeído na reprodução de algumas espécies de animais (INCA, 2005).

É consenso que a qualidade do ar, como pode ocorrer em laboratório de Anatomia, devido à presença de cubas de conversação das peças e cadáveres em formaldeído, pode afetar a saúde e a produtividade dos trabalhadores, que nele estejam lotados. A exposição repetida a baixas concentrações de substâncias presentes no ar interno, como o formaldeído, pode levar à “sensibilização múltipla” das pessoas que frequentam ambientes como salas de aulas e laboratórios, na qual o indivíduo afetado passa a reagir a concentrações cada vez mais baixas dessas substâncias (WHO, 2001).

Outro fator desfavorável ao uso de formol é a dificuldade na prevenção do crescimento de microrganismos na solução. Em relação à prevenção do crescimento de microrganismos, alguns fungos já apresentam resistência ao formol, por exemplo, o *Aspergillus flavus*. A pele humana é normalmente habitada por várias espécies de bactérias e fungos, incluindo alguns oportunistas. Esta microbiota cutânea rica mantém-se em equilíbrio metabólico, inibindo o super crescimento de qualquer espécie resistente ou de patógeno virulento. Apesar de todo esse equilíbrio natural, o nível de contaminação por agentes fúngicos vem crescendo de forma acelerada. O encontro de fungos patogênicos é suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não são contaminantes naturais de laboratório. Os principais patógenos microbiológicos encontrados ar dos laboratórios de Anatomia são do gênero *Monilla* e *Aspergillus*; em tecido cadavérico, fragmentos ósseos e lesões dermatológicas encontram-se patógenos do gênero *Tricophyton*; micobactérias e leveduras em tecido cadavérico e lesões das mãos e unhas (LIMBERGER, 2011).

A nocividade ambiental dos efluentes de laboratórios de Anatomia é uma das mais acentuadas dentre os diversos setores de uma universidade. O descarte de formol resultante de laboratórios de Anatomia pode causar sérios distúrbios para o tratamento biológico de águas residuais e causar sério dano à vida aquática. Se depositado em solo, o formol pode ser lixiviado para águas subterrâneas. O formaldeído apresenta uma semivida de 24-168 horas em águas de superfície e 48-336 horas em águas subterrâneas. Portanto, águas residuais contendo formaldeído devem ser lançadas no meio ambiente após o tratamento prévio ou após grande diluição para que atinjam concentrações não prejudiciais (LIMBERGER, 2011).

O descarte indevido do formaldeído no ambiente pode produzir efeitos adversos na saúde devido à contaminação da água pelo mesmo. Os rejeitos gerados pelas atividades de ensino com o uso de animais conservados em formol, apesar do pouco volume comparado com

os rejeitos de grandes indústrias, causam impactos ambientais relevantes (PEREIRA e ZAITA, 2008).

Nos últimos anos, pesquisas têm sido desenvolvidas relacionadas aos aspectos toxicológicos e ao acometimento biológico conferido às águas residuais onde o formol está presente, mesmo em concentrações baixas (menor do que 0,1 mg/L), evidenciando uma maior atenção para o risco-benefício das suas aplicações para o meio ambiente e para a saúde (LIMBERGER, 2011).

A despeito disto, a fragilidade das peças com uso contínuo por grande número de alunos, o transporte delicado e o grande potencial para a contaminação ambiental, são fatores motivadores para o uso de metodologias alternativas para conservação anatômica que reduzam a dependência do formaldeído (SILVA et al., 2007).

Apesar de suas características tóxicas, o formaldeído permanece como o principal fixador para corpos, para peças anatômicas e para fragmentos de tecidos para histologia, sendo utilizado para conservação de cadáveres através de técnicas de formalização e embalsamamento, como meio de prevenir e retardar a putrefação (MOELANS et al., 2011).

### **2.1.2 Legislação para o uso de formaldeído**

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem aos poucos propondo leis cada vez mais restritivas ao uso de formaldeído no Brasil e sugerindo a substituição desse produto por outros alternativos (ANVISA, 2009).

A legislação específica para ambientes de trabalho atualmente tem dois enfoques: um ocupacional e outro ambiental. Se o enfoque é a saúde ocupacional, as Normas Regulamentadoras do Ministério do Trabalho são aplicadas (BRASIL, 1978). Quando o enfoque é ambiental, o Ministério da Saúde determina medidas específicas referentes à definição de parâmetros físicos e composição química do ar de interiores; à identificação dos poluentes, suas tolerâncias e métodos de controle; pré-requisitos de instalações e de execução de sistemas de climatização. Mais recentemente o uso indevido do formol em salões de beleza e de cabelereiros recebeu legislação própria, com proibição total do uso em alguns estados. Assim, a comercialização do produto vem sendo dificultada, mesmo para o uso industrial e em ensino (ANVISA 2009).

Diversas autoridades de saúde ocupacional em todo o mundo estabeleceram limites de exposição permissíveis ao formaldeído (OCHS et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde recomenda  $0,1\text{mg} / \text{m}^3$  como valores máximos. A Conferência Americana de Indústria Governamental Higiene (OCHS et al., 2012), e a Conferência Europeia propuseram  $0,24\text{ mg} / \text{m}^3$  limite. O Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos definiu um limite de exposição de curto prazo de  $0,08\text{ mg} / \text{m}^3$  e limite de exposição ocupacional de  $0,013\text{ mg} / \text{m}^3$  (OCHS et al., 2012). O limite de exposição adotado pela legislação brasileira (ANVISA 2009) é de  $2,3\text{ mg} / \text{m}^3$ , para um máximo de 48 horas de trabalho por semana. Este valor é significativamente maior do que aqueles adotados em outras partes do mundo.

## **2.2 Plastinação e Desplastinação**

A técnica da plastinação foi desenvolvida por Gunther von Hagens (1978), que se baseia na substituição do líquido corporal e parte de lipídeos por uma resina polimerizável de silicone, poliéster ou epóxi, sob vácuo, o que permite a manutenção da peça em ambiente externo, sem nenhum uso de conservante (LATORRE et al., 2007).

Já foram descritas várias aplicações educacionais para peças plastinadas, como por exemplo, o uso de secções para compor softwares didáticos de anatomia. Um dos grandes atrativos da técnica é a possibilidade do aproveitamento didático de praticamente todos os órgãos, aparelhos e sistemas orgânicos de forma durável o que necessariamente reduzirá o uso de animais sacrificados e o incremento de técnicas alternativas ao uso de animais vivos. Outro atrativo é o grau de preservação. Ela mantém os espécimes livres de deterioração podendo ser expostas, manipuladas, transportadas sem o risco de estragarem com o tempo, além de eliminar o contato dos estudantes, técnicos e professores com o formol utilizado na conservação dos tecidos (LATORRE et al., 2007).

A técnica consiste nas etapas de fixação, desidratação, impregnação forçada e endurecimento (cura) da peça/cadáver. A fixação pode ser feita por quase todos os fixadores convencionais. A desidratação é conseguida principalmente com o uso da acetona, porque ela também serve como solvente intermediário durante a impregnação. A impregnação forçada é o passo central na plastinação: o vácuo força a acetona sair da peça em substituição ao polímero que penetra na peça. Durante a etapa de endurecimento (cura), a peça impregnada é endurecida,

expondo-a a um endurecedor gasoso (para a técnica de silicone) ou por UVA - luz e calor (poliéster, epóxi) (De JONG e HENRY, 2007).

De acordo com Sora (2015), durante a etapa de cura, a mistura de reação de impregnação dentro do espécime é reticulada e a amostra é seca. Este é um processo de duas etapas que consiste em extensão de cadeia e ligação cruzada de polímero. A extensão das cadeias das moléculas de silicone é um alinhamento “de ponta a ponta”, formando assim cadeias mais longas através da porção extensora de cadeia da mistura de impregnação Biodur S3 (dentro dos espécimes). Teoricamente, a extensão da cadeia começa quando o Biodur S3 (catalisador e extensor de cadeia) e o polímero Biodur S10 são misturados. No entanto, a velocidade desta reação é lenta em baixas temperaturas (abaixo de  $-15^{\circ}\text{C}$ ). A ligação cruzada das moléculas do polímero de silicone ocorre lado a lado, formando uma rede firme do polímero de silicone, e é causada pelo Biodur S6 (reticulante). O papel do catalisador (S3) é aumentar a taxa de reação entre as moléculas S10 e do agente reticulante S6.

A plastinação é realizada em muitas instituições em todo o mundo e tem-se obtido grande aceitação principalmente por causa da durabilidade das peças, da possibilidade de comparação direta com imagens de tomografias computadorizadas, além de as amostras terem um alto valor no ensino de anatomia. As peças plastinadas apresentam vantagens inegáveis sobre o material formolizado como: baixa toxicidade, ausência de odor e umidade (podem ser manipuladas sem luvas), peças limpas, maior durabilidade, estruturas preservadas a nível histológico, não necessitam de cuidados especiais para manutenção, possibilidade de exposição em ambientes diversos e fácil transporte. O método ainda permite a produção de peças/corpos didáticos seccionados, dissecados, contrastados com incorporação de reagentes coloridos para evidenciar sistemas orgânicos, bem como o estudo aprofundado de variações e situações anatômicas tais como anomalias, com a possibilidade do uso expandido em aulas de morfofisiologia, técnicas clínicas, cirúrgicas e patológicas (LATORRE et al., 2007).

Estudo realizado comparando o rendimento dos alunos de Anatomia Humana que manipularam peças plastinadas e peças úmidas fixadas com formol, em laboratório de Anatomia, demonstrou melhor desempenho dos estudantes que aprenderam com peças plastinadas, confirmando a eficácia da sua utilização para o aumento da qualidade da educação. A técnica de plastinação tem ganhado muita aceitação pelo mundo desde a sua introdução (LATORRE et al., 2007).

Várias aplicações educacionais para peças plastinadas têm sido descritas. Podem ser utilizadas em corpos dissecados ou em órgãos e partes avulsas. Também podem ser usadas

através da plastinação de secções de órgãos e/ou partes do corpo para desenvolver melhor entendimento de ultrassons, tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas. Essas secções podem ser usadas para compor animações realistas e baratas através de secções plastinadas de órgãos. Alguns espécimes também podem ser concebidos com o objetivo, por exemplo, de se treinar de forma individualizada as técnicas e/ou habilidades em cirurgia (LATORRE et al., 2007).

Segundo Ravi e Bhat (2011), uma das qualidades mais interessantes, importantes e potencialmente úteis da plastinação do tecido por silicone é a permanência da estrutura microscópica intacta. Isto implica que o espécime pode ser preservado, quase indefinidamente, em uma forma que é facilmente armazenada enquanto ainda mantém todo o potencial para exame histológico. Para acessar a avaliação histológica, os autores descrevem o processo de desplastinação para a produção de lâminas e para tal são utilizados metóxido de sódio (WALKER, JACKSON, POWELL, 1988), metilbenzeno, metileno, dicloroacetona (RIPANI et al., 1996).

De acordo com Grondin et al. (1988), a plastinação permite a preservação de espécimes anatômicos em estado físico aproximando-se da condição de vida. Eles estudaram a possibilidade de usar fragmentos de baço e pâncreas plastinados com silicone S10/S3 Biodur® para microscopia de luz e eletrônica, e constataram que espécimes plastinados podem ser usados para estudos de microscopia de luz e ultraestrutural. Para realização de tais estudos, os autores desplastinaram os tecidos com metóxido de sódio e observaram a produção de secções limpas, sem artefatos de silicone. Nesse estudo foram obtidos resultados satisfatórios para microscopia eletrônica e de luz e os autores vislumbraram que utilizando o processo de desplastinação é possível realizar estudos epidemiológicos retrospectivos de espécimes através da microscopia.

Manjunatha et al. (2014) compararam cortes histológicos de órgãos de suínos (fígado, baço e rins) embebidos em parafina com cortes histológicos de tecidos plastinados, dos quais foram retirados fragmentos depois do processo de impregnação, sem o processo de cura. Ambos foram corados com hematoxilina e eosina. Suas observações em microscopia de luz, das secções previamente infiltradas com silicone, porém sem o processo de cura, revelaram manutenção da arquitetura dos tecidos, sem áreas de retração nos mesmos.

A desplastinação usando metóxido de sódio e metanol é uma boa técnica para recuperar dados histopatológicos de tecidos plastinados e é essencial para obter lâminas, com qualidade comparável às secções tradicionalmente preparadas em parafina (FRANCIS e RABI, 2018).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), processo no 86/2015. O mesmo seguiu as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária (DVT) da UFV.

### **3.2 Local de realização dos experimentos**

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Anatomia Veterinária, de Plastinação e de Histologia Veterinária, do Departamento de Anatomia e Anatomia Patológica Comparadas, da Faculdade de Veterinária, da Universidade de Murcia, Espanha.

### **3.3 Coleta e preparo das amostras**

Todas as amostras foram coletadas de um equino adulto, da raça Frisón, proveniente da casuística de óbitos do Hospital Clínico Veterinário da Universidade de Murcia.

Imediatamente após o óbito do animal, foi iniciada a necropsia, onde foram feitas secções com bisturi cirúrgico para coleta das seguintes amostras:

- artéria (fragmento artéria femoral);
- esôfago (fragmento do terço caudal);
- fígado (fragmento do lobo hepático direito);
- intestino delgado (fragmento do duodeno);
- intestino grosso (fragmento do colón descendente);

- músculo estriado esquelético (fragmento músculo trapézio);
- nervo periférico (fragmento nervo femoral);
- pâncreas (fragmento do corpo pancreático);
- traqueia (fragmento de anéis traqueais).

Todas as amostras possuíam tamanho médio de 5 cm de comprimento.

O material coletado foi lavado em água corrente para retirada de resíduos e sujidades. Após, os mesmos foram imersos em soluções fixadoras, conforme descrição abaixo, por um período de 05 dias, na proporção 1:10 (volume/volume).

### **3.4 Delineamento experimental**

#### **3.4.1 Unidades experimentais de fixação**

Como delineamento experimental, foram definidas, para cada estrutura, três grupos de fixadores (Formaldeído 10%, formaldeído 2,5% e solução de Cambridge). Cada um deles, com um fragmento de aproximadamente 5 cm de comprimento de: artéria, esôfago, fígado, intestino delgado (ID), intestino grosso (IG), músculo estriado esquelético (MEE), nervo periférico, pâncreas e traqueia.

#### **3.4.2 Grupos fixadores**

Para a fixação das unidades experimentais, foram definidos três grupos de soluções fixadoras (figura 1):

Grupo I - solução de formaldeído a 10% em H<sub>2</sub>O;

Grupo II - solução de formaldeído a 2,5 % em H<sub>2</sub>O e

Grupo III - solução de Cambridge - solução contendo metanol (69,5%), glicerina (16,7%), formaldeído (8,3%) e fenol (5,5%).

### **3.4.3 Controles**

Fragmentos foram coletados para a utilização como controle do processo de fixação. Nesse sentido, amostras de cada órgão foram processadas histologicamente imediatamente após a fixação para avaliação em microscopia de luz, sem sofrer o processo de plastinação.

Controle 1 – solução fixadora: formaldeído 10% + processamento histológico de rotina.

Controle 2 - solução fixadora: formaldeído 2,5% + processamento histológico de rotina.

Controle 3 - solução fixadora: Cambridge + processamento histológico de rotina.

### **3.4.4 Processamentos pós fixação**

De cada órgão, em cada grupo fixador, foram procedidos quatro tratamentos de plastinação.

#### **3.4.4.1 Processamentos de plastinação**

- Processamento 1 - consistiu na desidratação, impregnação forçada em polímero de silicone, cura, desplastinação e avaliação.
- Processamento 2 - consistiu na desidratação, impregnação forçada em polímero de silicone, cura, maturação, desplastinação e avaliação
- Processamento 3 - consistiu da desidratação e impregnação forçada em polímero de silicone, desplastinação e avaliação.
- Processamento 4 - consistiu da desidratação e impregnação forçada em polímero de silicone, maturação, desplastinação e avaliação.

Foram avaliadas as seguintes combinações de processamento x fixação:

Tratamento 1 – solução fixadora: formol 10% + desidratação + impregnação forçada + cura + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 2 - solução fixadora: formol 2,5% + desidratação + impregnação forçada + cura + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 3 - solução fixadora: Cambridge + desidratação + impregnação forçada + cura + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 4 – solução fixadora: formol 10% + desidratação + impregnação forçada + cura + maturação + desplastinação + processamento histológico + avaliação

Tratamento 5 - solução fixadora: formol 2,5% + desidratação + impregnação forçada + cura + maturação +desplastinação + processamento histológico + avaliação

Tratamento 6 - solução fixadora: Cambridge + desidratação + impregnação forçada + cura + maturação +desplastinação + processamento histológico + avaliação

Tratamento 7 – solução fixadora: formol 10% + desidratação + impregnação forçada + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 8 - solução fixadora: formol 2,5% + desidratação + impregnação forçada + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 9 - solução fixadora: Cambridge + desidratação + impregnação forçada + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 10 – solução fixadora: formol 10% + desidratação + impregnação forçada + maturação + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 11 - solução fixadora: formol 2,5% + desidratação + impregnação forçada + maturação + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

Tratamento 12 - solução fixadora: Cambridge + desidratação + impregnação forçada + maturação + desplastinação + processamento histológico + avaliação.

### **3.5 Plastinação**

A técnica S10 de plastinação foi realizada conforme descrita originalmente por Gunther von Hagens (1985). O procedimento consistiu em quatro etapas principais da plastinação:

1. fixação;
2. desidratação;
3. impregnação forçada;
4. cura.

Os materiais utilizados nas etapas de desidratação, impregnação forçada e cura foram acetona (Quality Chemicals); freezer de laboratório -25° C (Biodur® Alemanha); bomba de vácuo Busch; polímero e endurecedores S10, S3 e S6 (Biodur® Alemanha), acetonômetro 90% a 100%, câmara de vácuo 100L (Biodur® Alemanha); câmara de cura (Biodur® Alemanha); manômetro de Bennert.

#### **3.5.1 Fixação**

Nesta etapa, os fragmentos foram fixados, por imersão, nas soluções fixadoras listadas abaixo:

- (1) solução de formaldeído a 10% em H<sub>2</sub>O;
- (2) solução de formaldeído a 2,5 % em H<sub>2</sub>O;

(3) solução embalsamadora de Cambridge - solução contendo metanol (69,5%), glicerina (16,7%), formaldeído (8,3%) e fenol (5,5%).

Foram utilizados 10 volumes de solução fixadora para um volume de fragmento, durante um período de 05 dias, em frascos opacos, cobertos, para evitar a evaporação do fixador e a penetração de luz. A fixação se deu à temperatura ambiente (15-20°C).

Após o término da fixação, todos os fragmentos foram lavados em água corrente durante um período de 6h.

Para garantir as mesmas condições de plastinação e processamento histológico, após a fixação, foram feitas secções de aproximadamente 2x2x1 mm de dimensões de todas as amostras controles e dos tratamentos. As mesmas foram acondicionadas em cassetes de processamento (Leica Jet II), previamente identificados.

### **3.5.2 Desidratação**

Nesta etapa, os cassetes foram submetidos à desidratação a frio em acetona ( $C_3H_6O$ ), no interior de um freezer a -22°C, com a finalidade de minimizar a retração dos tecidos e a volatilização da acetona.

A proporção utilizada da acetona para desidratação foi de 10 volumes de fluido desidratante para um volume de tecido.

Foram realizados três banhos em acetona, com duração de quatro dias cada um:

1. Primeiro banho – utilizou-se acetona reciclada a 98% à temperatura ambiente;
2. Segundo banho – utilizou-se acetona 100%, resfriada a -22°C;
3. Terceiro banho – utilizou-se acetona 100% resfriada a -22°C.

O grau de hidratação da acetona foi diariamente monitorado com o uso de um acetônômetro Biodur®, com graduação de 90% a 100%, calibrado a +20°C.

O teor de água ao final da etapa de desidratação foi de 0,5%.

### 3.5.3 Impregnação forçada

O processo de impregnação forçada foi feito em câmara de vácuo Biodur<sup>®</sup>, com 100L de capacidade, acoplada a uma bomba de vácuo Busch<sup>®</sup>, sob refrigeração (-22°C), dentro de freezer adaptado da BIODUR<sup>®</sup>.

Nessa etapa, a acetona foi substituída por um polímero de silicone BIODUR<sup>®</sup> S10, misturado com um agente de cura BIODUR<sup>®</sup> S3, na proporção de 100 partes de S-10 e 01 parte S3 (100:1).

Os cassetes com as amostras desidratadas foram removidos do banho de acetona e imersos na mistura de silicone da BIODUR<sup>®</sup> (S10 + S3), pré-resfriada a -22°C.

Durante um período de 24 horas, os cassetes ficaram imersos na mistura do silicone S10/S3, à temperatura de -22°C, com a bomba de vácuo desligada. Após esse período, a bomba foi acionada, com pressão inicial de 110 mmHg (com uma velocidade de bombeamento de 1,5 m<sup>3</sup>/min para 15 L de mistura de polímero). A pressão foi gradualmente reduzida ao longo de um período de 15 dias, de acordo com o monitoramento das bolhas de evaporação da acetona, até pressão final de 4 mmHg.

A impregnação foi monitorada pela observação da formação de bolhas na superfície da mistura do polímero e pela mudança de pressão dentro da câmara de vácuo. A pressão da câmara de vácuo foi monitorada através de manômetro de pressão analógico – manômetro de Bernnet - instalado junto à câmara de vácuo, associado a um manômetro digital.

A pressão era regulada pelo ajuste do desligamento de válvulas de desvio para permitir a estabilização da pressão em certos níveis. A pressão não era reduzida se as bolhas não subiam à superfície da mistura do polímero.

A formação de bolhas foi utilizada como um indicador direto da taxa de impregnação, na qual o vapor de acetona deixava o tecido enquanto o mesmo era impregnado. O espaço gerado pela saída de acetona nos tecidos foi ocupado pela mistura de impregnação (S10 + S3). A mistura de impregnação a -20°C é caracteristicamente denso-viscosa e, portanto, demora a penetrar nos tecidos durante a impregnação. Por esta razão, foi feito o monitoramento de saída da acetona (bolhas), o qual foi preconizado para que fosse lento, para favorecer a entrada da mistura do silicone nos tecidos durante o processo de impregnação forçada.

No decorrer de toda a etapa de impregnação, o nível de silicone foi mantido de 3-5 cm superior em relação ao nível dos cassetes, a fim de facilitar vaporização de acetona.

Após o término da impregnação, os cassetes foram deixados imersos, para equilibrar, na mistura de S10/ S3, na câmara de vácuo por um período de 24 horas.

Os cassetes impregnados foram então retirados da câmara de vácuo e o excesso de silicone foi drenado em papel toalha antes da etapa da cura.

Ao término da impregnação, metade dos cassetes, de todos os tratamentos, foi submetida ao processo de cura e a outra metade permaneceu em um gradil para que o excesso de silicone fosse drenado.

### **3.5.4 Cura**

Para etapa da cura, foi utilizado o endurecedor gasoso BIODUR<sup>®</sup> S6. O mesmo apresenta-se comercialmente como líquido, o qual foi vaporizado à temperatura ambiente.

Os cassetes, com os fragmentos dos tecidos, foram curados em uma câmara de cura fechada, os quais foram mantidos neste ambiente durante o período de uma semana. A cada intervalo de 8 horas, o ar era borbuhlado dentro de um frasco contendo 50 mL de S6, durante 10 min, com o auxílio de uma bomba de aquário, acoplada a um timer.

Para manter o ambiente da câmara desumidificado, foi utilizado um recipiente com dessecante (sílica gel).

Diariamente, o excesso da mistura do polímero era retirada dos fragmentos dos tecidos com auxílio de papel absorvente.

### **3.6 Desplastinação e Maturação**

Para realizar a desplastinação em todos os tratamentos, os fragmentos foram imersos em solução de desplastinação, contendo metóxido de sódio (5%) em metanol, por 48 horas. A proporção utilizada da solução de desplastinação foi de 10 volumes de solução desplastinante para um volume de tecido. Eles foram subsequentemente lavados por 24h, em metanol fresco, conforme descrito por Walker, Jackson, Powell (1988).

Metade dos cassetes (tratamentos 1, 2, 3, 7, 8 e 9) foi desplastinada imediatamente após o término da plastinação.

A outra metade dos cassetes (tratamentos 4, 5, 6, 10, 11 e 12) foi acondicionada em sacos plásticos fechados, do tipo zip lock, por um período de maturação de 04 meses, em temperatura ambiente, para serem desplastinadas.

### **3.7 Processamento histológico**

Os fragmentos foram processados em rotina histológica para microscopia de luz (ML), em um processador de tecidos automatizado (Leica<sup>®</sup> TP 1050), submetidos à desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70 a 100%; diafanização em xilol; impregnação por parafina a 58°C e inclusão.

Após processamento histológico e inclusão em parafina, as amostras foram encaminhadas para microtomia.

Durante a microtomia, foram obtidos cortes não sequenciais com 4 µm de espessura, em micrótomo rotativo com navalha de aço (Leica<sup>®</sup> RM 2125 RT), estirados em banho maria e colocados em lâminas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à reidratação em etanol (100 % → 100% → 96% → 70%), durante 5 minutos cada, coradas com hematoxilina e eosina (HE), novamente desidratadas (96 % → 100% → 100%), clarificadas em xilol, e montadas em meio de montagem Neo-Mount<sup>®</sup>.

### **3.8 Avaliação histológica**

A observação dos cortes histológicos foi realizada em microscópio de luz convencional, utilizando microscópio Zeiss<sup>®</sup> Axioskop 40, observando-se possíveis alterações na estrutura morfológica dos tratamentos e controles. As imagens histológicas representativas de cada tratamento e controle foram fotografadas com câmera AxioCam 105 Color da Zeiss<sup>®</sup> e capturadas para obtenção de imagens digitais, por meio do programa Zeiss<sup>®</sup> Zen 2012.

A avaliação microscópica foi realizada aleatoriamente, sem conhecimento prévio do processamento dos tecidos, por dois observadores independentes (dupla observação cega), tendo sido usada na avaliação uma escala de qualificação, de 1 a 3, sendo:

1. boa morfologia;
2. morfologia regular/satisfatória;
3. morfologia ruim.

A tabela 1 descreve os critérios utilizados para avaliação qualitativa dos diferentes tecidos analisados, os quais foram pré-estabelecidos por professores de histologia e de histopatologia do Departamento de Anatomia e Anatomia Patológica, da Universidade de Murcia, Espanha.

Tabela 1 - Critérios histológicos utilizados para avaliar as amostras.

<b>Órgão</b>	<b>Critérios avaliados</b>
Artéria	Perfis arteriais onde se observam túnicas íntima, média e adventícia definidas. Endotélio com ausência de vacúolos citoplasmáticos e nucleares. Fibras elásticas bem definidas na túnica média.
Esôfago	Ausência de vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais. Ausência de vacúolos nucleares nas células epiteliais. Vasos sanguíneos com ausência de vacúolos nas túnicas.
Fígado	Padrões de sinusóides bem delineados. Hepatócitos com contorno bem definido. Hepatócitos com boa definição nuclear. Regiões tríades com ductos biliares distinguíveis e epitélio preservado; perfis de veias e artérias com endotélios preservados.
Intestino delgado	Ausência de descamação do epitélio. Borda estriada bem definida. Ausência de vacúolos citoplasmáticos e nucleares nos enterócitos. Vilosidades íntegras. Vasos sanguíneos presentes na mucosa com ausência de vacúolos nas túnicas.
Intestino grosso	Ausência de descamação do epitélio. Criptas intestinais íntegras.

	<p>Ausência de vacúolos citoplasmáticos e nucleares nas células epiteliais.</p> <p>Vasos sanguíneos presentes na mucosa com ausência de vacúolos.</p>
Músculo esquelético	<p>Delineamento preciso de fibras individuais.</p> <p>Núcleos bem delineados.</p> <p>Ausência de acidofilia.</p> <p>Secção transversal - núcleos periféricos, ausência de fragmentação das fibras.</p> <p>Secção longitudinal – visualização de estriação transversal, ausência de fragmentação das fibras.</p> <p>Ausência de vacúolos nos vasos sanguíneos.</p>
Nervo	<p>Feixes nervosos bem definidos.</p> <p>Ausência de retração entre perineuro e feixes.</p> <p>Células do perineuro preservadas.</p> <p>Ausência de vacúolos nos vasos sanguíneos.</p>
Pâncreas	<p>Endócrino – ilhotas de Langerhans bem definidas, com células íntegras, contorno bem definido e ausência de vacúolos citoplasmáticos.</p> <p>Ausência de cromatose nuclear e de acidofilia.</p> <p>Exócrino - células íntegras, contorno bem definido e ausência de vacúolos citoplasmáticos.</p> <p>Ausência de cromatose nuclear.</p>
Traqueia	<p>Ausência de perda de células epiteliais.</p> <p>Cílios preservados no epitélio pseudoestratificado.</p> <p>Ausência de vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais.</p> <p>Ausência de cromatose nuclear nas células epiteliais.</p> <p>Ausência de vacúolos citoplasmáticos nos condrócitos.</p> <p>Ausência de acidofilia.</p>

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliação geral do efeito individual de cada fixador, as médias qualitativas dos diferentes tecidos foram somadas e apresentadas em escala percentual.

### **3.9 Análise Estatística**

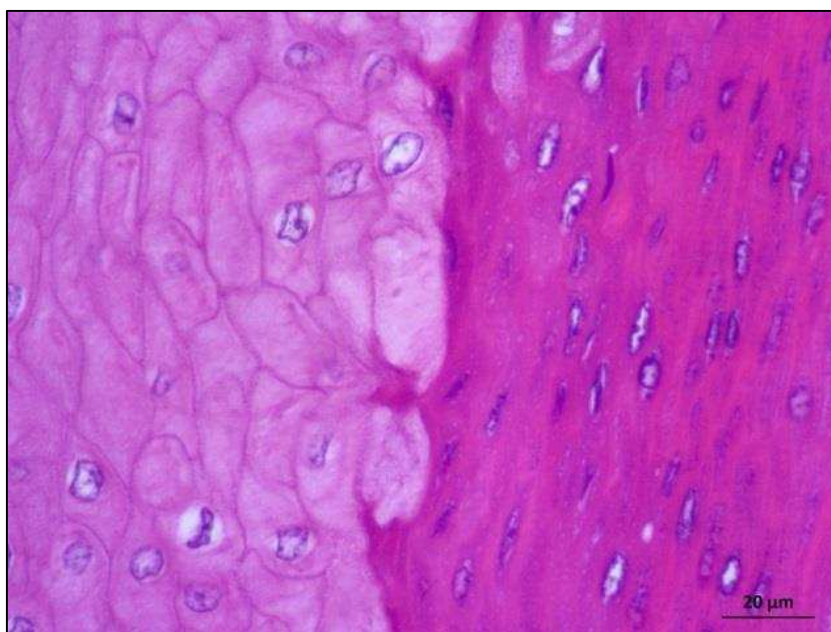
Para a análise dos dados, as frequências das lâminas classificadas como boas médias e ruins foram arranjadas em tabelas de contingência e a associação entre os fixadores e as classificações foi avaliada pelo teste de Freeman-Halton. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nível macroscópico, após o término da fixação e também após o término do processo de plastinação, não foram observadas diferenças de coloração entre os fragmentos dos mesmos órgãos fixados com formaldeído 10%, formaldeído 2,5% e solução de Cambridge.

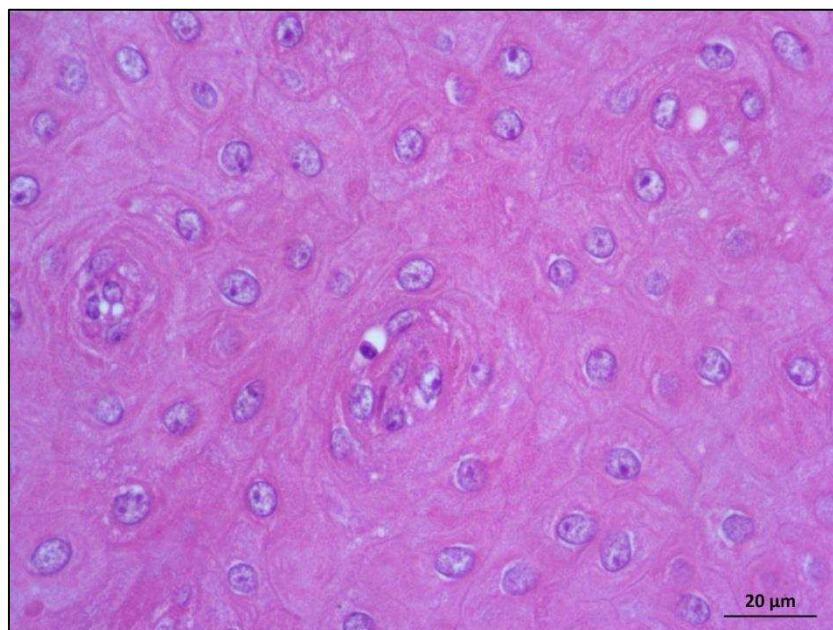
A nível microscópico, foram avaliados um total de 970 cortes histológicos. A coloração pela hematoxilina-eosina (HE) permitiu a observação microscópica dos tecidos e das células, sendo possível detectar alterações em nível da arquitetura tecidual e da morfologia celular. Os cortes nos controles e em todos os tratamentos apresentaram intensidade de coloração (nuclear e citoplasmática) semelhante nos tecidos fixados com solução de formaldeído 10% (Figura 1) e com solução de formaldeído 2,5% (Figura 2). Para a solução fixadora de Cambridge (Figura 3), observou-se coloração mais intensa do que nas soluções fixadoras de formaldeído 10% e 2,5%.

Figura 1: Fotomicrografia do epitélio esofágico, incluído em parafina, fixado em solução formaldeído 10%. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2: Fotomicrografia do epitélio esofágico, incluído em parafina, fixado em solução formaldeído 2,5%. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3: Fotomicrografia do epitélio esofágico, incluído em parafina, fixado em solução de Cambridge. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Hopwood et al. (1989) observaram que tecidos fixados em solução fixadora tamponada, contendo fenol 2% e formaldeído 4% (pH 7,0) tiveram um menor tempo para obtenção da coloração das lâminas em hematoxilina-eosina (HE) quando comparados com os tecidos fixados com formaldeído 4% tamponado neutro. Apesar de os tecidos fixados em solução de Cambridge, a qual contém fenol e formaldeído %, apresentarem intensidade de coloração em HE distinta em relação aos tecidos fixados com solução de formaldeído 10% e 2,5%, neste estudo optou-se pela padronização dos tempos de coloração em hematoxilina e eosina, independente do fixador.

Os cortes de todos os órgãos, analisados nos grupos controles e nos grupos tratados, foram satisfatórios para avaliação histológica dos tratamentos propostos neste estudo, em microscopia de luz.

#### 4.1 Avaliação dos fixadores sem o processamento de plastinação (controle)

Lâminas histológicas, preparadas a partir dos diferentes fixadores e observadas sem o processamento de plastinação, foram qualificadas conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação qualitativa de cortes dos diferentes tecidos fixados com o uso de formaldeído 10%, formaldeído 2,5% e solução de Cambridge e processados histologicamente sem o uso do processamento de plastinação.

Órgãos	Formaldeído 10%			Formaldeído 2,5%			Solução de Cambridge			P-Valor*
	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	
Artéria	66,67	33,33	0	100	0	0	0	100	0	0,0021
Esôfago	0	100	0	100	0	0	16,67	83,33	0	0,0055
Fígado	100	0	0	33,33	66,67	0	100	0	0	0,0147
ID	100	0	0	0	66,67	33,33	66,67	33,33	0	0,0032
IG	0	33,33	66,67	0	66,67	33,33	100	0	0	0,0004253
MEE	100	0	0	100	0	0	100	0	0	NS
Nervo	0	100	0	0	50	50	16,67	83,33	0	0,0735
Pâncreas	66,67	33,33	0	66,67	33,33	0	66,67	33,33	0	1,0000

Traqueia	33,33	66,67	0	0	66,67	33,33	0	100	0	0,0882
%	51,85	40,74	7,41	44,45	38,89	16,66	51,85	48,15	0	

Fonte: Fonte: Elaborada pela autora.

Notas:

\**P* Valor para valores indicados na mesma linha pelo teste de Freeman-Halton.

NS – não significativo

ID – intestino delgado

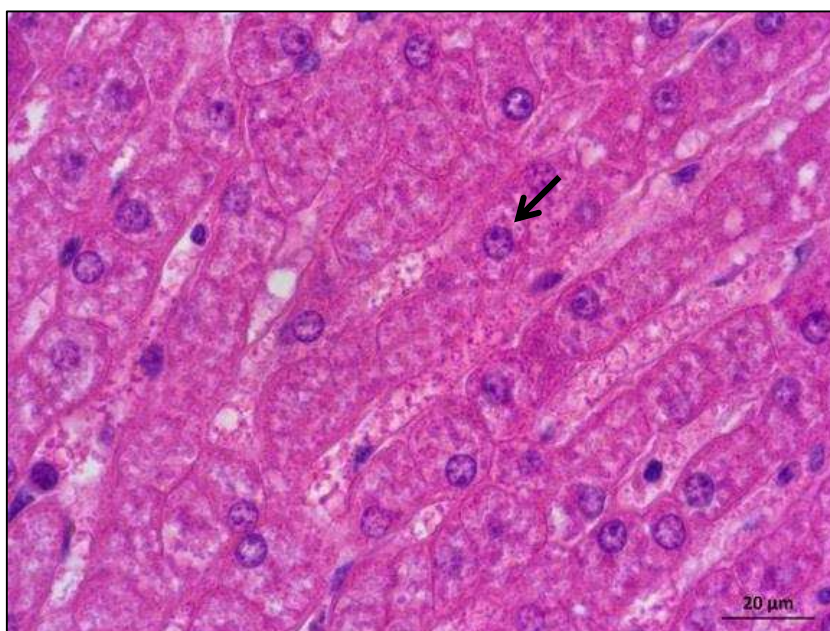
IG – intestino grosso

MEE – músculo estriado esquelético

% - percentual total da avaliação qualitativa dos cortes histológicos.

Conforme os dados mostrados na tabela 2, pode-se verificar que os resultados para os grupos controles foram em geral melhores para os tecidos fixados com solução de Cambridge como por exemplo, tecido hepático (Figura 4) e mucosa do intestino grosso (Figura 5).

Figura 4: Fotomicrografia de corte histológicos do tecido hepático fixado em solução de Cambridge, sem o processamento de plastinação (controle). Seta indicando núcleo do hepatócito. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5: Fotomicrografia de corte histológico da mucosa do intestino grosso fixada em solução de Cambridge, sem o processamento de plastinação (controle). Asterisco indicando células absortivas. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

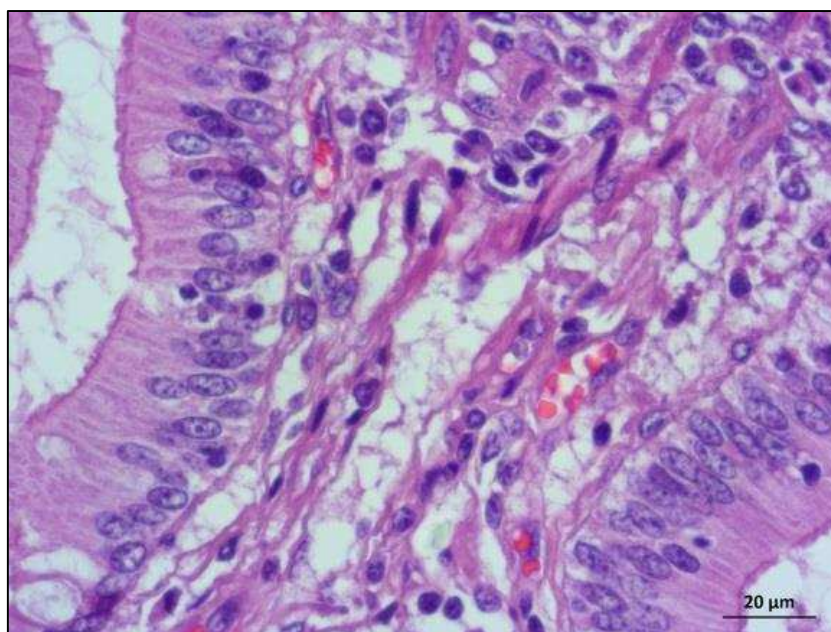
Tanto para a solução de Cambridge como para a solução de formaldeído 10%, os percentuais das avaliações histológicas qualificadas como boas apresentaram resultados similares. Mas, diferentemente da solução de Cambridge, a solução de formaldeído 10% apresentou um percentual de lâminas com qualidade histológica ruim. Porém, para solução de Cambridge, não foram observadas lâminas de qualidade histológica ruim.

Para o fixador o formaldeído 10%, o intestino delgado apresentou as melhores qualificações de avaliação histológica boa, apresentando uma boa preservação do tecido (Figura 6).

Nicholson et al. (2005) compararam a qualidade histológica de amostras obtidas em diversos órgãos fixados em diferentes soluções de embalsamamento. Verificaram que amostras obtidas de cadáveres embalsamados com a solução de Dunedin (mistura de álcool contendo 15,2% de glicerina, 1,9% de formaldeído, 7,5% de fenol, 15,2% de água e 60,6% de etanol) não foram satisfatórias para obtenção de cortes histológicos de qualidade. Já para amostras de cadáveres fixados com formaldeído 10%, solução de Michigan (solução aquosa contendo um mix da solução de Dodge) e solução de fenoxietanol (solução aquosa a base de 7% de

fenoxietanol, 61% de etanol, 15% de água, 15% de glicerina e 1,9% de formaldeído) apresentaram qualidade histológica satisfatória para os tecidos analisados, fato esse que corrobora com os resultados observados para os tecidos fixados com a solução embalsamadora de Cambridge, a qual contém uma mistura de metanol (69,5%), glicerina (16,7%), formaldeído (8,3%) e fenol (5,5%).

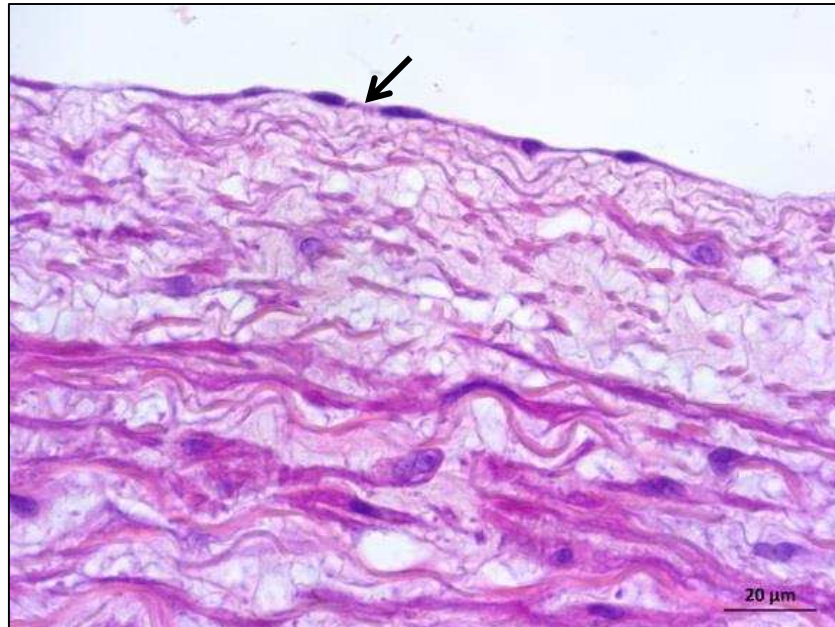
Figura 6: Figura 4. Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa do intestino delgado fixado em solução de formaldeído 10%, sem o processamento de plastinação (controle). HE.



Fonte: Elaborada pela autora

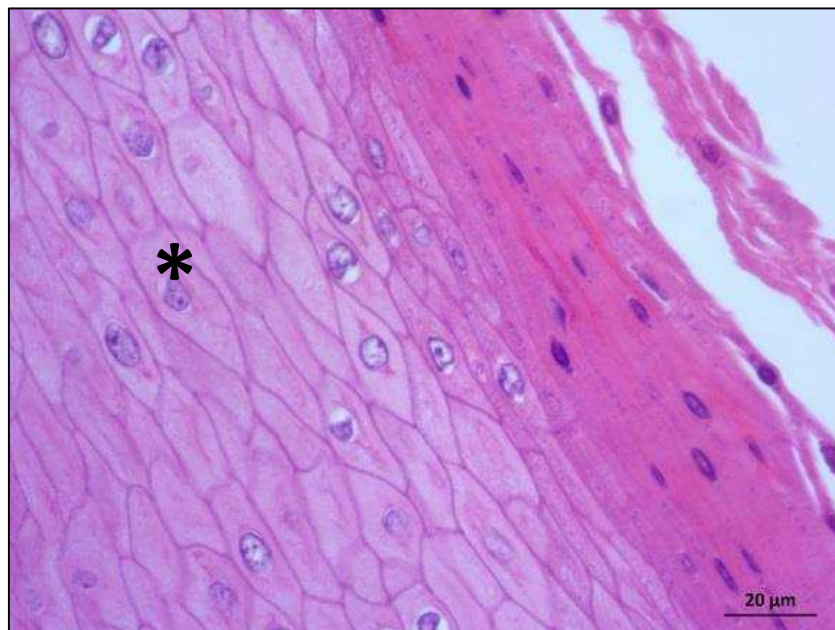
No presente trabalho, a redução da concentração do formaldeído na solução fixadora para 2,5 % apresentou histologicamente resultados variados nos diferentes tecidos. Amostras controles de artéria (Figura 7) e esôfago (Figura 8), fixadas em formaldeído 2,5%, apresentaram as melhores qualificações histológicas para este fixador.

Figura 7: Fotomicrografia de corte transversal de artéria elástica, fixado em solução de formaldeído 2,5%, com célula endotelial em evidência pela seta, sem o processamento de plastinação (controle). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

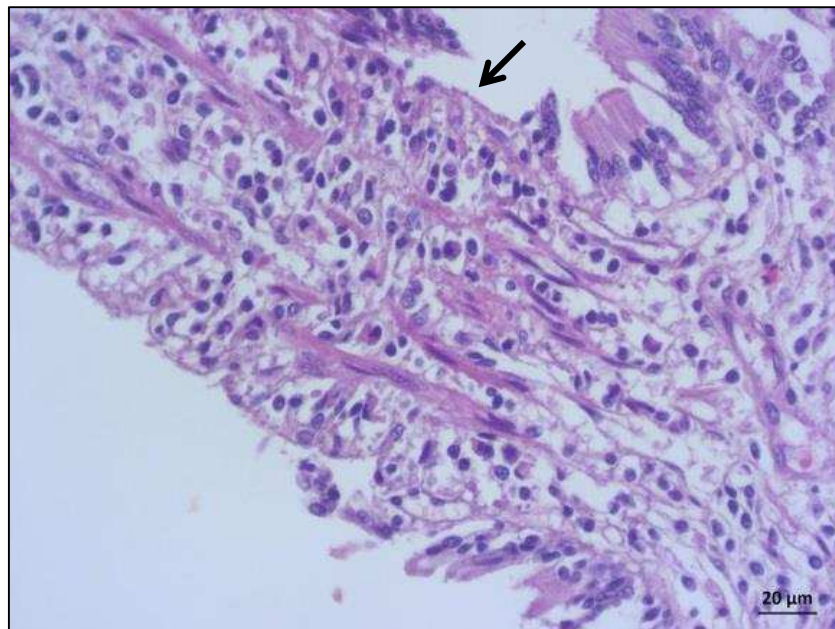
Figura 8: Fotomicrografia de corte de epitélio esofágico, fixado em solução de formaldeído 2,5%, com asterisco indicando núcleo da célula epitelial, sem o processamento de plastinação (controle). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Já cortes de intestino delgado, fixados com a solução de formaldeído 2,5%, mostraram as piores qualificações histológicas para esse fixador (Figura 9). Foram observadas perdas de vilosidades, descamação da epitelial e presença de vacúolos nucleares em células epiteliais, porém esse último achado foi escasso.

Figura 9: Fotomicrografia de corte longitudinal de mucosa de intestino delgado com área de descamação epitelial (seta), fixado em solução de formaldeído 2,5%, sem o processamento de plastinação (controles). HE.



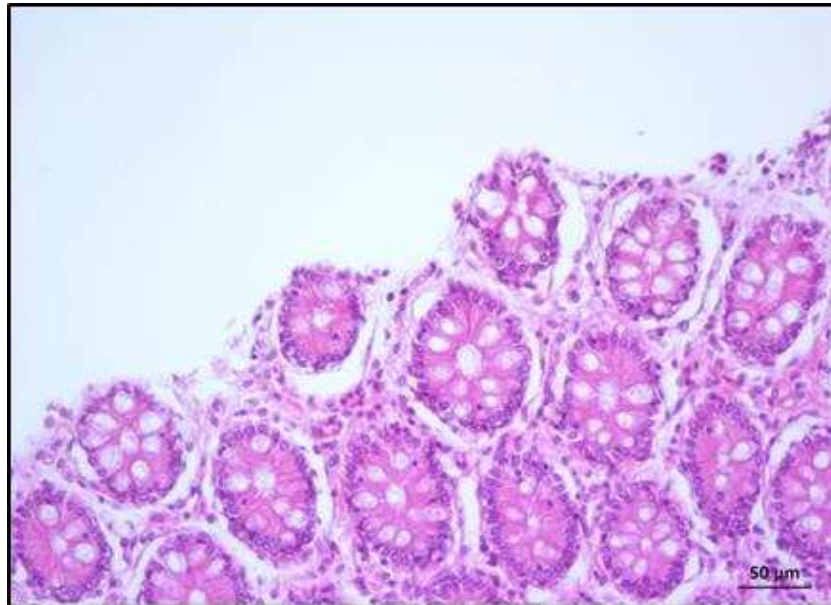
Fonte: Elaborada pela autora.

Já os cortes de intestino grosso, fixados com formaldeído 10%, mostraram as piores qualificações histológicas para este fixador. Apresentaram má preservação das células epiteliais, presentes na mucosa (Figura 10).

Para o músculo estriado esquelético não foram observadas diferenças significativas entre o fixador e o tecido incluído, ou seja, em todos os fixadores foi observado um percentual de 100% de lâminas com qualidade histológica boa.

Nas amostras de nervo, pâncreas e traqueia, estatisticamente não foram observadas influencias entre o fixador e o tecido incluído em parafina ( $P > 0.05$ ).

Figura 10: Fotomicrografia do corte transversal da região mucosa do intestino grosso, fixado em solução de formaldeído 10%, demonstrando ausência das células epiteliais absortivas, sem processamento de plastinação. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os fixadores de material biológico utilizados são decisivos para a qualidade final da histologia (BUESA, 2008). Os fixadores utilizados no presente estudo, quando usados para os mesmos órgãos, sem o processamento de plastinação (controles) apresentaram resultados distintos para a qualificação total do percentual de avaliação das lâminas histológicas. Estes achados estão em desacordo com Buesa e Peshkov (2012), que observaram que a formalina 10%, na proporção de 2 volumes de fixador para 1 volume do tecido, 2:1, durante 48 horas a 20-22° C foi suficiente para assegurar fixação adequada e infiltração dos tecidos testados e sugerindo que outros tecidos se comportem de maneira semelhante.

#### **4.2 Avaliação dos tecidos plastinados, curados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 1)**

Lâminas histológicas, preparadas a partir dos diferentes fixadores, provenientes de tecidos plastinados, curados e desplastinados, foram qualificadas conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: Avaliação qualitativa de cortes dos diferentes tecidos fixados com o uso de formaldeído 10%, formaldeído 2,5% e solução de Cambridge, com o uso dos processamentos de plastinação, cura e desplastinação.

Órgãos	Formaldeído 10%			Formaldeído 2,5%			Solução de Cambridge			P-Valor*
	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	
Artéria	66,67	33,33	0	0	100	0	0	33,33	66,67	0,0013
Esôfago	66,67	33,33	0	100	0	0	0	66,67	33,33	0,0002892
Fígado	0	66,67	33,33	16,67	83,33	0	33,33	66,67	0	0,2689
ID	66,67	33,33	0	0	0	100	0	100	0	0,0006660
IG	16,67	83,33	0	0	0	100	100	0	0	0,0002449
MEE	0	100	0	0	33,33	66,67	0	100	0	0,0147
Nervo	0	0	100	83,33	16,67	0	100	0	0	0,0001616
Pâncreas	0	100	0	0	33,33	66,67	0	100	0	0,0147
Traqueia	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0,0001616
%	35,19	50	14,81	22,22	29,63	48,15	25,93	51,85	22,22	

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas:

\*P Valor para valores indicados na mesma linha pelo teste de Freeman-Halton.

ID – intestino delgado

IG – intestino grosso

MEE – músculo estriado esquelético

% - percentual total da avaliação qualitativa dos cortes histológicos.

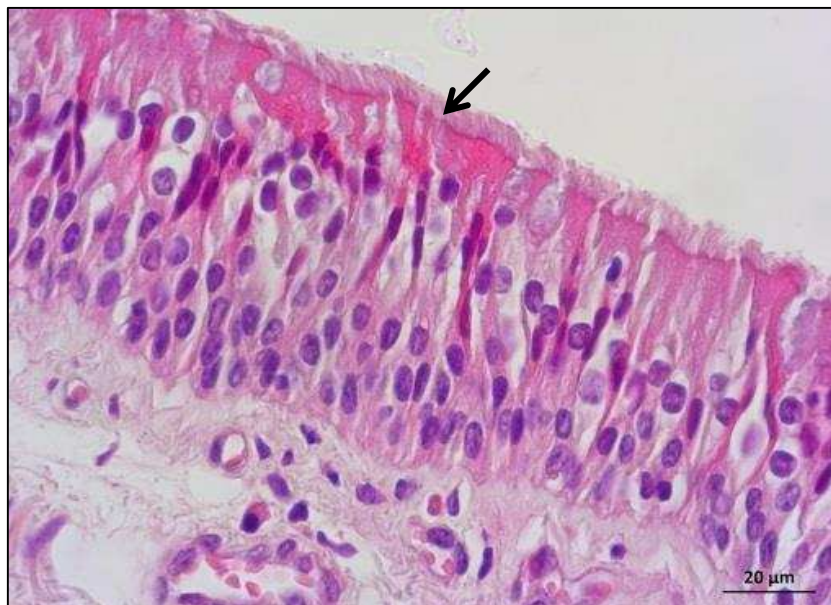
Na tabela 3, podem-se observar os resultados para as amostras do processamento 1, onde as amostras passaram pelos processos de desidratação, impregnação em polímero de silicone, cura, desplastinação e avaliação. Notou-se que o fixador formaldeído 10% foi o mais adequado para os tecidos plastinados, curados e desplastinados.

De acordo com López-Albors et al. (2012), a desplastinação de espécimes de plastinados com silicone foi proposta como uma técnica válida para estudos histológicos. Apesar de

algumas alterações estruturais, o tecido desplastinado e incluído em parafina mantém a maioria de suas características estruturais propiciando análises qualitativas das lâminas histológicas.

Nos cortes de traqueia fixados com formaldeído 10%, qualificados como bons, observou-se a conservação do epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (Figura 11).

Figura 11: Fotomicrografia do epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia com cílios nítidos (seta), fixado em solução de formaldeído 10%, plastinado, submetido ao processo de cura e desplastinado. HE.

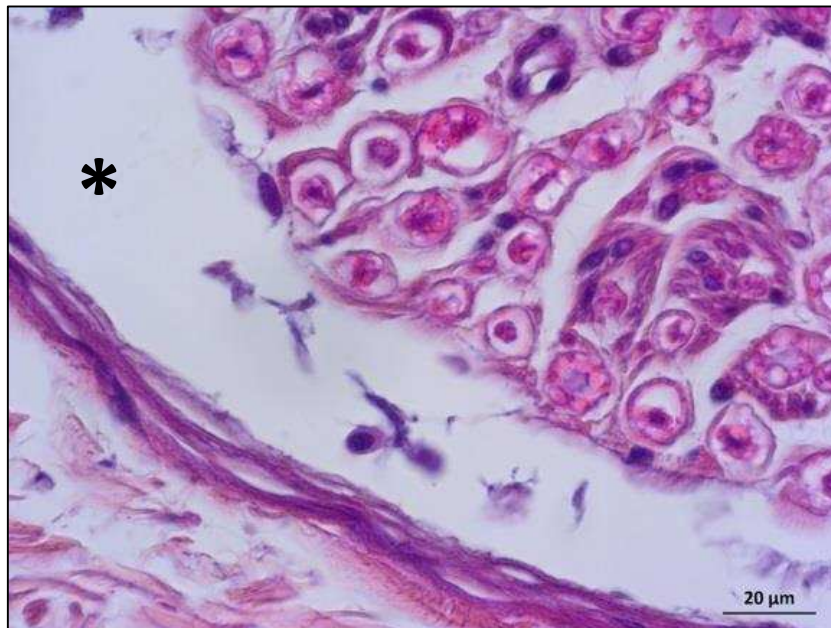


Fonte: Elaborada pela autora.

Mas, para este mesmo fixador, cortes do nervo periférico obtiveram as piores qualificações histológicas, onde foram verificadas áreas de retração dos fascículos (Figura 12).

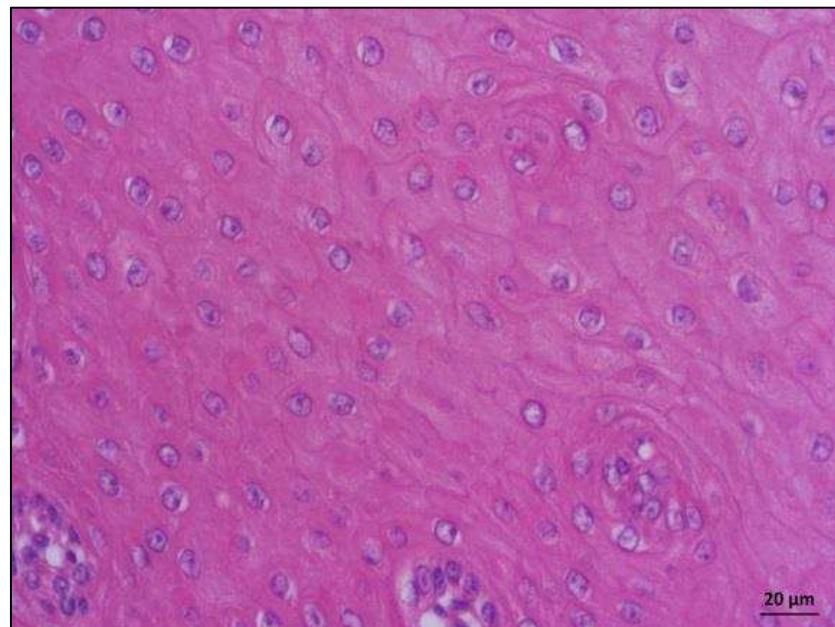
O fixador formaldeído 2,5% foi o melhor para a qualificação histológica do esôfago. Verificou-se preservação do epitélio, com ausência de vacúolos citoplasmáticos nas células cúbicas (Figura 13).

Figura 12: Fotomicrografia de corte transversal de nervo periférico. Asterisco no espaço entre perineuro e fascículo. Fixação em formaldeído 10%, curado e desplastinado. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13: Fotomicrografia do epitélio do esôfago fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, curado e desplastinado. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o fixador formaldeído 2,5%, as piores qualificações histológicas foram para intestino delgado, intestino grosso, músculo estriado esquelético, pâncreas e traqueia.

A traqueia apresentou epitélio com áreas desprendidas da lâmina basal, perda de cílios, vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais e fragmentação celular (Figura 14).

Figura 14: Epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia com área de desprendimento dos cílios e vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais (seta). Curado e desplastinado. HE.

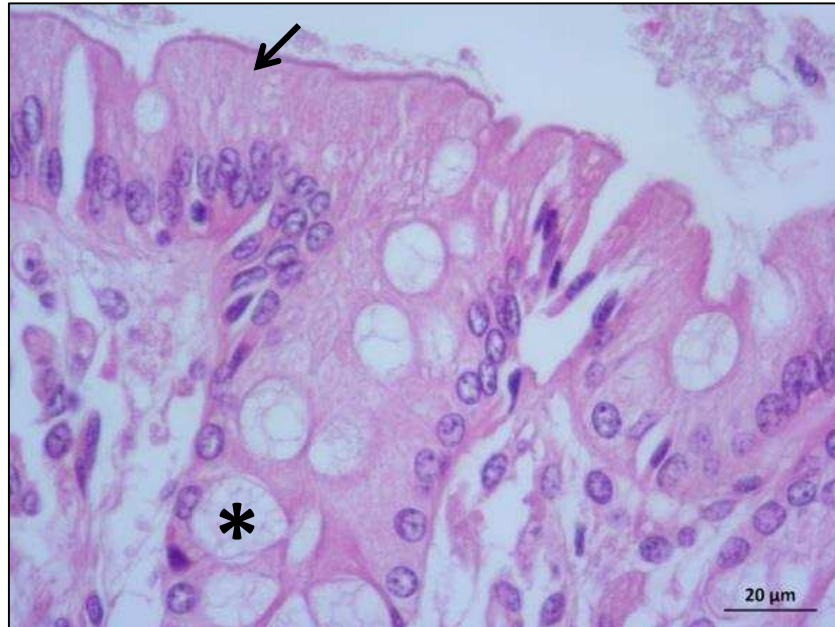


Fonte: Elaborada pela autora.

Os cortes de intestino delgado fixados com solução de formaldeído 2,5% apresentaram áreas de separação entre as células epiteliais e áreas descamação do epitélio. Nos cortes do intestino grosso, também fixados com solução de formaldeído 2,5%, observou-se descamação do epitélio, escassos vacúolos nucleares nas células epiteliais, vasos sanguíneos apresentando vacúolos citoplasmáticos. Nas lâminas de músculo estriado esquelético, observaram-se regiões com perda das estriações. Nos cortes de pâncreas fixados com solução de formaldeído 2,5%, nas porções endócrina e exócrina, foram observadas perdas do contorno celular. No pâncreas exócrino, notou-se cromatose nuclear.

A solução fixadora de Cambridge foi mais eficiente para fixar o nervo periférico e para a fixação do intestino grosso. No tecido nervoso observou-se ausência de espaço entre o perineuro e o fascículo. No intestino grosso, notou-se mucosa intestinal preservada (Figura 15).

Figura 15: Fotomicrografia do epitélio do intestino grosso, fixado em solução de Cambridge, submetido ao processo de cura e desplastinação. Células caliciformes (asterisco) e células absorptivas (seta) íntegras. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

As piores qualificações histológicas para a solução de Cambridge foram observadas em artéria, esôfago e traqueia.

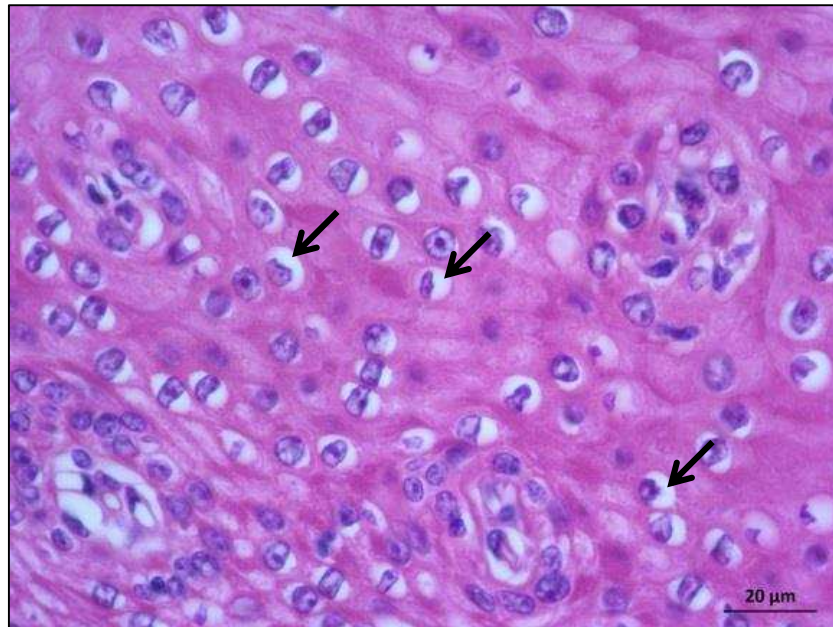
A artéria apresentou desprendimento parcial das células endoteliais formando alças na camada íntima. Camada média apresentando espaços intercelulares.

No esôfago, foram observados vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais em toda totalidade do epitélio (Figura 16).

A traqueia apresentou ausência de epitélio, condrócitos com vacúolos citoplasmáticos e matriz acidófila.

Para o fígado, estatisticamente não foram observadas influência entre o fixador e o processamento 1 ( $P > 0.05$ ).

Figura 16: Fotomicrografia do tecido esofágico, fixado em solução de Cambridge, submetido ao processo de cura e desplastinação. Epitélio estratificado pavimentoso, com células apresentando vacúolos citoplasmáticos (setas). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Seibold e colaboradores (1991), as técnicas de plastinação foram originalmente desenvolvidas para macroscopia, podendo ser modificadas para preparação de secções plastinadas para microscopia. Em seus estudos com histologia óssea, eles obtiveram secções histológicas satisfatórias quando empregaram técnicas descritas para desidratação a frio e impregnação forçada com silicone S10 Biodur®. Demonstraram que foi possível utilizar tecido ósseo plastinado em procedimentos de exame histológico, como microscopia de fluorescência, microangiografia e microrradiografia. Concluíram que a técnica de plastinação é útil para análises microscópicas. Estes estudos corroboram com as avaliações dos tecidos plastinados, curados e desplastinados, onde foi possível realizar avaliação qualitativa de lâminas histológicas utilizando microscopia de luz.

#### **4.3 Avaliação dos tecidos plastinados, curados, maturados e desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 2)**

Lâminas histológicas, preparadas a partir dos diferentes fixadores, provenientes de tecidos plastinados, curados, maturados e desplastinados, foram qualificadas conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Avaliação qualitativa de cortes dos diferentes tecidos fixados com o uso de Formol 10%, formol 2,5% e solução de Cambridge, com o uso dos processamentos de plastinação, cura, maturação e desplastinação

Órgãos	Formaldeído 10%			Formaldeído 2,5%			Solução de Cambridge			P-Valor*
	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	
Artéria	16,67	83,33	0	16,67	66,67	16,67	33,33	66,67	0	1,0000
Esôfago	66,67	33,33	0	33,33	33,33	33,33	0	100	0	0,0966
Fígado	0	0	100	0	33,33	66,67	0	83,33	16,67	0,0181
ID	0	100	0	0	0	100	0	33,33	66,67	0,0021
IG	0	50	50	0	83,33	16,67	66,67	33,33	0	0,0144
MEE	0	83,33	16,67	33,33	0	66,67	66,67	33,33	0	0,0034
Nervo	0	16,67	83,33	0	33,33	66,67	0	66,67	33,33	0,3495
Pâncreas	0	100	0	0	33,33	66,67	0	100	0	0,0147
Traqueia	0	100	0	0	0	100	83,33	16,67	0	0,0002449
%	9,26	62,96	27,78	9,26	31,48	59,26	27,78	59,26	12,96	

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas:

\*P Valor para valores indicados na mesma linha pelo teste de Freeman-Halton.

ID – intestino delgado

IG – intestino grosso

MEE – músculo estriado esquelético

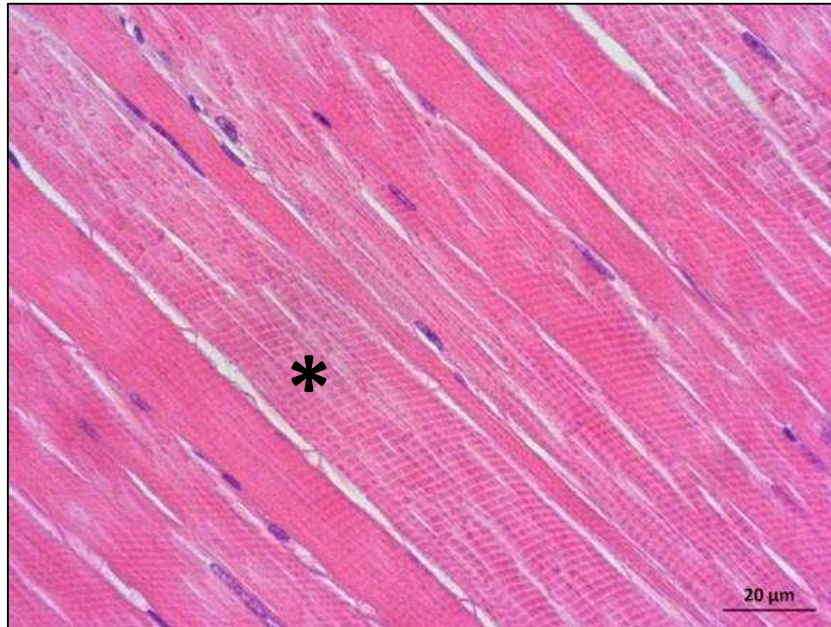
% - percentual total da avaliação qualitativa dos cortes histológicos.

De acordo com os dados da desta tabela, no geral, a solução de Cambridge foi o melhor fixador para os tecidos plastinados, curados, maturados e desplastinados.

A maioria dos cortes de intestino grosso, músculo estriado esquelético (Figura 17) e traqueia, fixados com a solução de Cambridge foram qualificados com uma boa arquitetura tecidual.

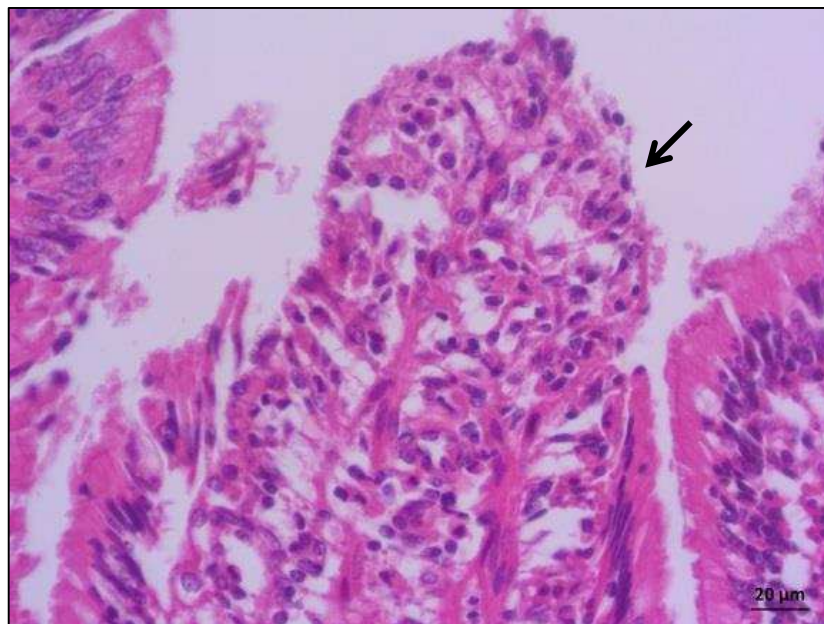
Cortes de intestino delgado, fixados com a solução de Cambridge, mostraram as piores qualificações histológicas para esse fixador para o processamento 2 (Figura 18). Foram observadas descamação de enterócitos e áreas da lâmina própria com presença de espaços intercelulares.

Figura 17: Fotomicrografia de corte de músculo estriado esquelético, fixado em solução de Cambridge, exibindo estriações transversais nítidas (asterisco). Submetido aos processos de cura, maturação e desplastinação. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18: Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa do intestino delgado, fixado em solução de Cambridge, exibindo perda de células epiteliais (seta). Submetido aos processos de cura, maturação e desplastinação. HE.



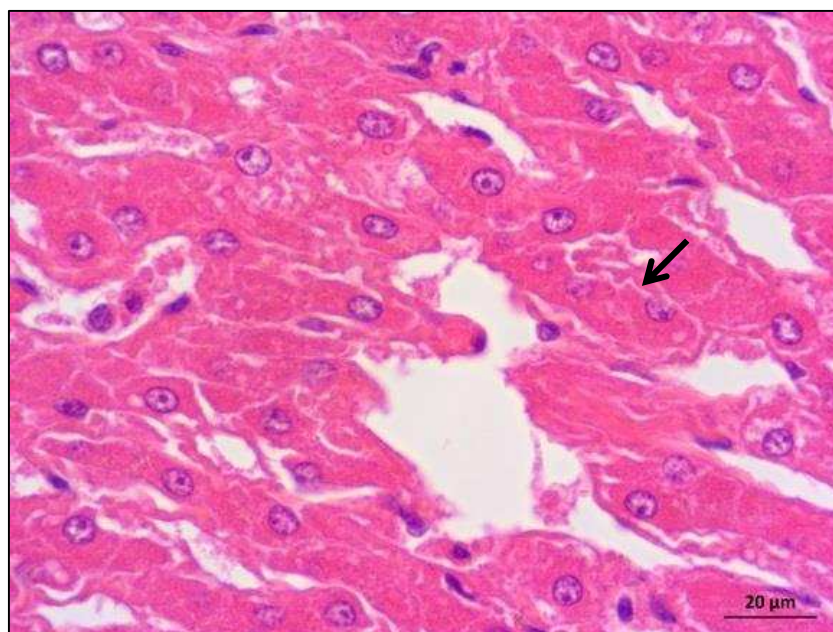
Fonte: Elaborada pela autora.

Sora (2016) relatou que a fixação adequada de um órgão ou amostra de tecido é muito importante para a qualidade final de um espécime plastinado. Ele recomendou para a etapa de

fixação, do processo de plastinação, o uso fixadores usuais, como solução de formaldeído 5-20% e solução de Kayserling. Ressaltou que soluções de embalsamamento, contendo álcoois de cadeia longa (por exemplo, glicerol), devem ser removidos antes da etapa de desidratação, porque podem alterar a qualidade final do espécime plastinado. Neste trabalho pode-se observar que tecidos fixados com a solução embalsamadora de Cambridge, plastinados, submetidos ao processo de cura, maturados e desplastinados, mantiveram um percentual qualitativo geral de boa avaliação para os tecidos analisados, mesmo sem o processo de remoção do metanol e da glicerina, como sugerido por Sora (2016).

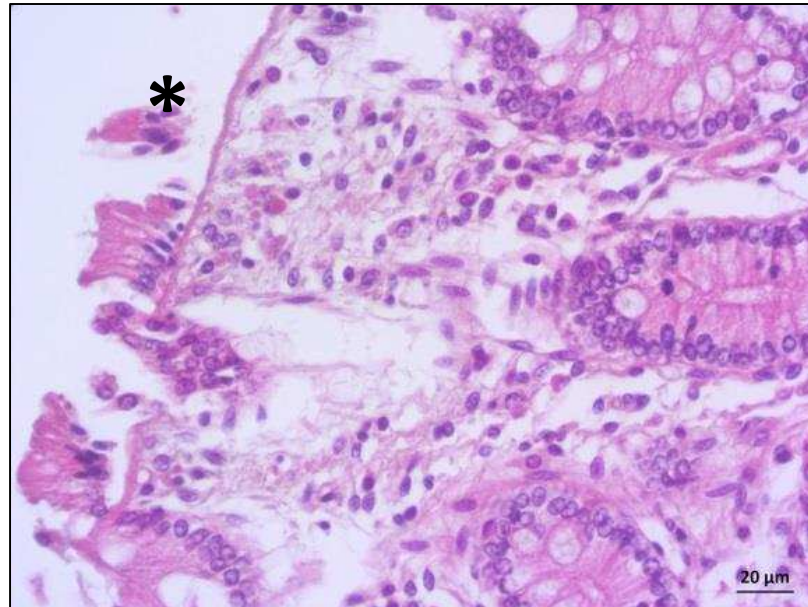
Para o fixador formaldeído 10%, o fígado e o intestino grosso apresentaram as piores qualificações histológicas. No tecido hepático, foram observados perda do contorno celular (Figura 19), aumento da distância entre as células e sinusóides com aumento de tamanho. No intestino grosso foram notadas criptas desprendidas da lâmina própria ao longo da mucosa intestinal e descamação de células absortivas intestinais (Figura 20).

Figura 19. Fotomicrografia de tecido hepático fixado em solução de formaldeído 10%, plastinado, curado, maturado e desplastinado, exibindo perda de contorno celular (seta). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20. Fotomicrografia de mucosa do intestino grosso fixada em solução de formaldeído 10%, plastinada, curada, maturada e desplastinada, exibindo descamação de células epiteliais (asterisco). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o fixador formaldeído 2,5%, as piores qualificações histológicas foram para intestino delgado, músculo estriado esquelético, pâncreas e traqueia. Os cortes de intestino delgado apresentaram áreas de separação entre as células epiteliais, descamação do epitélio e espaços intercelulares na lâmina própria. Nos cortes de músculo estriado esquelético observaram-se regiões com perda das estriações (Figura 21) e da morfologia celular. Nos cortes de pâncreas (Figura 22), na porção endócrina e exócrina, foram observadas perdas do contorno celular e no pâncreas exócrino notou-se cromatose nuclear. A traqueia apresentou epitélio com áreas desprendidas da lâmina basal, vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais e condrócitos com vacúolos citoplasmáticos.

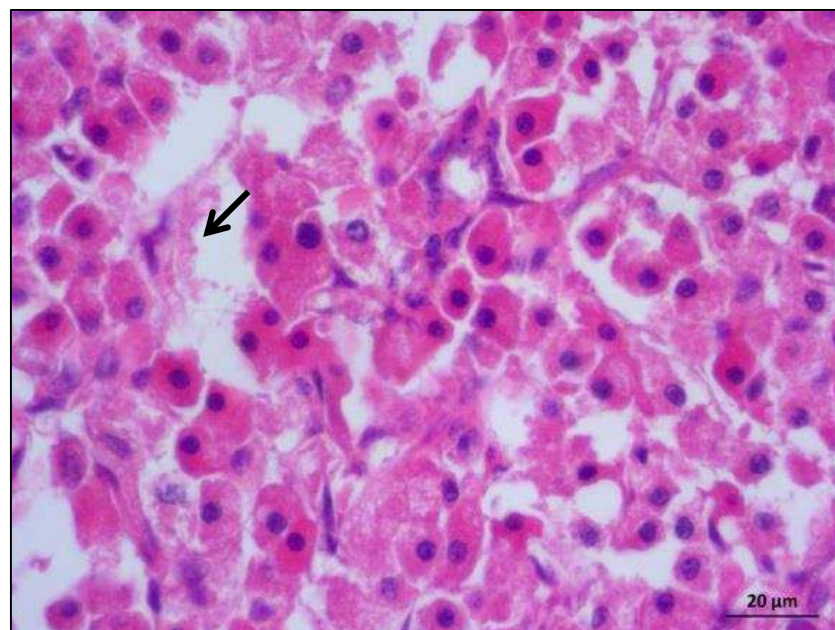
Para artéria, esôfago e nervo estatisticamente não foram observadas influência entre o fixador e o processamento 2 ( $P > 0.05$ ).

Figura 21: Fotomicrografia de tecido muscular esquelético fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, curado, maturado e desplastinado, exibindo região com perda de estriações (asterisco). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22: Fotomicrografia de tecido pancreático fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, curado, maturado e desplastinado, exibindo perda de contorno celular (seta). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 Avaliação dos tecidos plastinados, não curados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 3)

Lâminas histológicas, preparadas a partir dos diferentes fixadores, provenientes de tecidos plastinados, não curados e desplastinados, foram qualificadas conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5 Avaliação qualitativa de cortes dos diferentes tecidos fixados com o uso de Formol 10%, formol 2,5% e solução de Cambridge e processados histologicamente com o uso dos processamentos de plastinação, não curados e desplastinação.

Órgãos	Formaldeído 10%			Formaldeído 2,5%			Solução de Cambridge			P-Valor*
	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	
Artéria	83,33	16,67	0	0	33,33	66,67	0	33,33	66,67	0,0037
Esôfago	0	0	100	0	0	100	0	0	100	NS
Fígado	0	16,67	83,33	0	0	100	0	83,33	16,67	0,0118
ID	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0,0001616
IG	0	100	0	0	0	100	83,33	16,67	0	0,0002449
MEE	0	0	100	0	33,33	66,67	0	66,67	33,33	0,0845
Nervo	33,33	66,67	0	0	0	100	66,67	33,33	0	0,0004253
Pâncreas	0	100	0	0	0	100	0	33,33	66,67	0,0021
Traqueia	100	0	0	0	0	100	33,33	66,67	0	0,0009794
%	24,07	33,33	42,60	0	7,41	92,59	20,37	48,15	31,48	

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas

\*P Valor para valores indicados na mesma linha pelo teste de Freeman-Halton.

NS – não significativo

ID – intestino delgado

IG – intestino grosso

MEE – músculo estriado esquelético

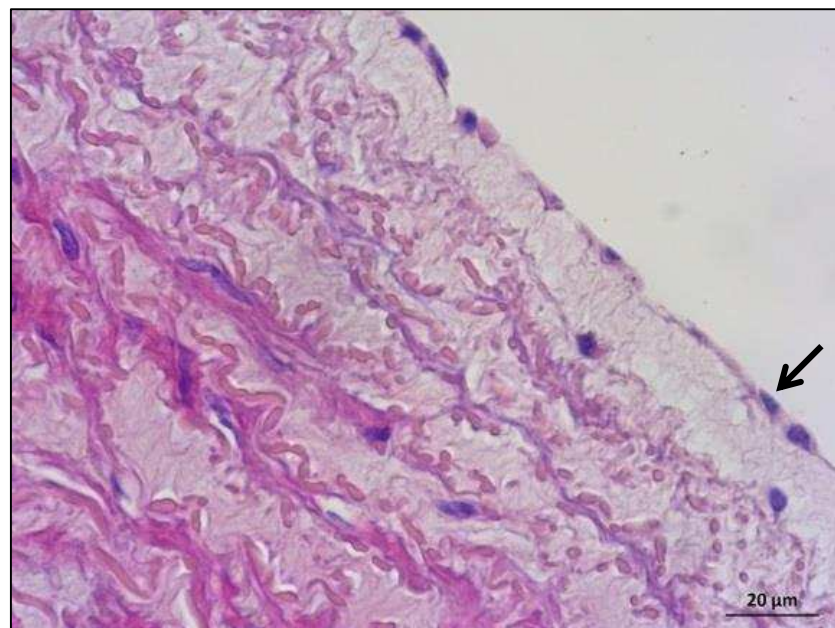
% - percentual total da avaliação qualitativa dos cortes histológicos.

Observa-se na tabela 5 que o fixador formaldeído 10%, foi em geral, o melhor fixador para os tecidos que foram desidratados, impregnados, não curados, desplastinados e avaliados histologicamente.

Manjunatha et al. (2014) compararam cortes histológicos de órgãos de suínos (fígado, baço e rins), fixados em formol-salina 5%, embebidos em parafina com cortes histológicos de tecidos plastinados sem os processos de cura e desplastinação. Ambos foram corados com hematoxilina e eosina. Suas observações em microscopia de luz, das secções histológicas dos tecidos previamente infiltrados com silicone próprio, não curados e não desplastinados, revelaram manutenção da arquitetura tecidual. Este estudo ratifica os resultados deste trabalho para o percentual total de avaliação dos tecidos fixados com a solução de formaldeído 10%, que não foram submetidos ao processo de cura.

Fragmentos de artéria (Figura 23) e traqueia fixados com a solução de formaldeído 10% para o processamento 3 apresentaram integridade tecidual avaliada como boa para microscopia de luz.

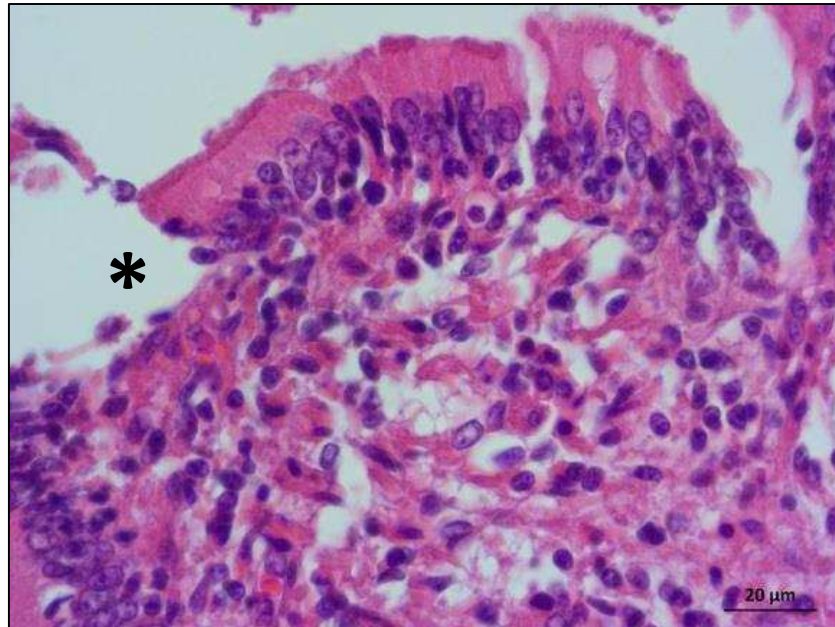
Figura 23. Fotomicrografia de corte longitudinal de artéria elástica fixada em solução de formaldeído 10%, plastinada, não curada e desplastinada, apresentando células endoteliais (seta) íntegras. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de a solução de formaldeído 10% ter sido qualificada como o melhor fixador para o processamento 3, os fragmentos de intestino delgado obtiveram uma má qualificação histológica para esse fixador, exibindo áreas de descamação de células epiteliais (Figura 24).

Figura 24. Fotomicrografia de corte longitudinal de mucosa do intestino delgado fixada em solução de formaldeído 10%, plastinada, não curada e desplastinada, apresentando área de perda de células epiteliais (asterisco). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o fixador formaldeído 2,5%, as piores qualificações histológicas foram para artéria, fígado, intestino delgado, intestino grosso, nervo, pâncreas e traqueia.

Nos cortes de artéria, fixados com solução de formaldeído 2,5%, observaram-se células endoteliais formando alças na túnica íntima. Para cortes do tecido hepático foram observados perda do contorno celular dos hepatócitos, aumento da distância entre os mesmos e raros vacúolos nucleares.

Os cortes de intestino delgado fixados com solução de formaldeído 2,5% apresentaram áreas de separação entre as células epiteliais e descamação do epitélio. Nos cortes do intestino grosso foram observadas descamações do epitélio, escassos vacúolos nucleares nas células epiteliais, vasos sanguíneos apresentando vacúolos citoplasmáticos.

Nos cortes de pâncreas fixados com a solução de formaldeído 2,5%, nas porções endócrina e exócrina, foram observadas perdas do contorno celular. No pâncreas exócrino notou-se cromatose nuclear.

Nas lâminas de nervo, observou-se retração dos fascículos e desprendimento de células do perineuro (Figura 25).

A traqueia fixada com a solução de formaldeído 2,5% apresentou epitélio (Figura 26)

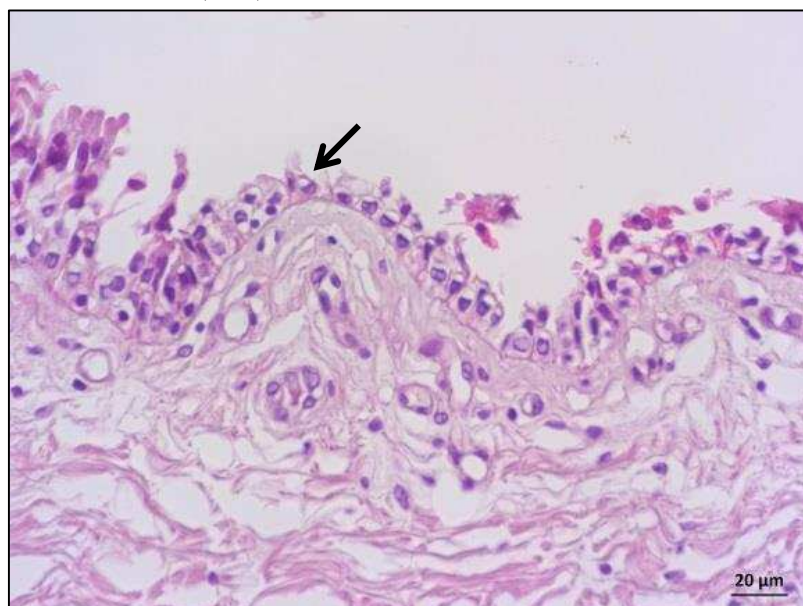
Figura 25: Fotomicrografia de corte transversal de nervo periférico fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, não curado e desplastinado com asterisco no espaço de retração. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

com áreas desprendidas da lâmina basal, perda de cílios, vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais, condrócitos com vacúolos citoplasmáticos e matriz acidófila.

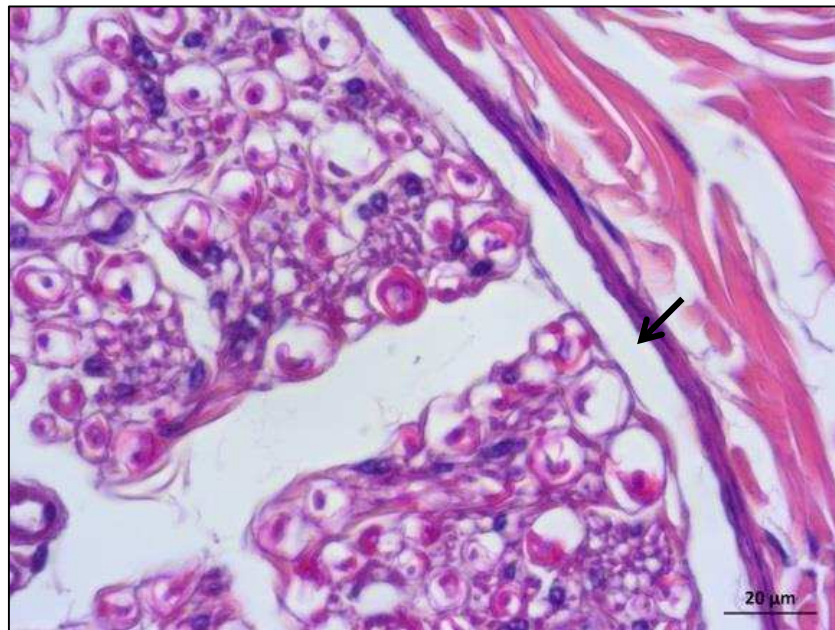
Figura 26: Fotomicrografia de corte traqueia fixada em solução de formaldeído 2,5%, plastinada, não curada e desplastinada com células epiteliais apresentando vacúolos citoplasmáticos e perda dos cílios (seta). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a solução de Cambridge, o intestino grosso e nervo periférico apresentaram as melhores avaliações histológicas. A mucosa intestinal mostrou-se preservada e no nervo periférico notaram-se fascículos com pequenas áreas de retração e perineuro íntegro (Figura 27).

Figura 27. Fotomicrografia de corte transversal de nervo periférico fixado em solução de Cambridge, plastinado, não curado e desplastinado apresentando perineuro íntegro (seta). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

As piores qualificações histológicas para a solução de Cambridge foram observadas quando artéria foi fixada com a mesma. A artéria apresentou espessamento do tecido conjuntivo frouxo presente na túnica íntima (Figura 28).

Para o músculo estriado esquelético estatisticamente não foram observadas influência entre o fixador e o processamento 3 ( $P > 0.05$ ).

Para o esôfago, o valor de  $P$  não foi significativo em relação aos fixadores, sendo que todas as lâminas para todos os fixadores apresentaram qualidade ruim quando submetidas ao processo de plastinação sem cura e desplastinação.

Figura 28. Fotomicrografia de corte transversal de artéria elástica fixada em solução de Cambridge, plastinada, não curada e desplastinada com asterisco indicando espessamento do tecido conjuntivo frouxo da túnica íntima. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.5 Avaliação dos tecidos plastinados, não curados, maturados, desplastinados, nos diferentes fixadores (processamento 4)

Lâminas histológicas, preparadas a partir dos diferentes fixadores, plastinadas, não curadas, maturadas e desplastinadas foram qualificadas conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação qualitativa de cortes dos diferentes tecidos fixados com o uso de Formol 10%, formol 2,5% e solução de Cambridge, com o uso dos processamentos de plastinação, sem cura, maturação e desplastinação.

Órgãos	Formaldeído 10%			Formaldeído 2,5%			Solução de Cambridge			P-Valor*
	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Bom	Regular	Ruim	
Artéria	0	100	0	0	66,67	33,33	0	100	0	0,2941
Esôfago	66,67	33,33	0	0	66,67	33,33	0	33,33	66,67	0,0189
Fígado	0	100	0	0	0	100	71,43	28,57	0	0,0001546
ID	0	33,33	66,67	0	33,33	66,67	100	0	0	0,0004260

IG	0	66,67	33,33	0	0	100	100	0	0	0,0009794
MEE	33,33	33,33	33,33	0	66,67	33,33	66,67	33,33	0	0,1196
Nervo	0	83,33	16,67	66,67	33,33	0	66,67	33,33	0	0,0438
Pâncreas	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0,0001616
Traqueia	16,67	83,33	0	0	33,33	66,67	0	100	0	0,0147
%	24,07	59,26	16,67	7,41	44,44	48,15	44,99	47,6	7,41	

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas:

\**P* Valor para valores indicados na mesma linha pelo teste de Freeman-Halton.

ID – intestino delgado

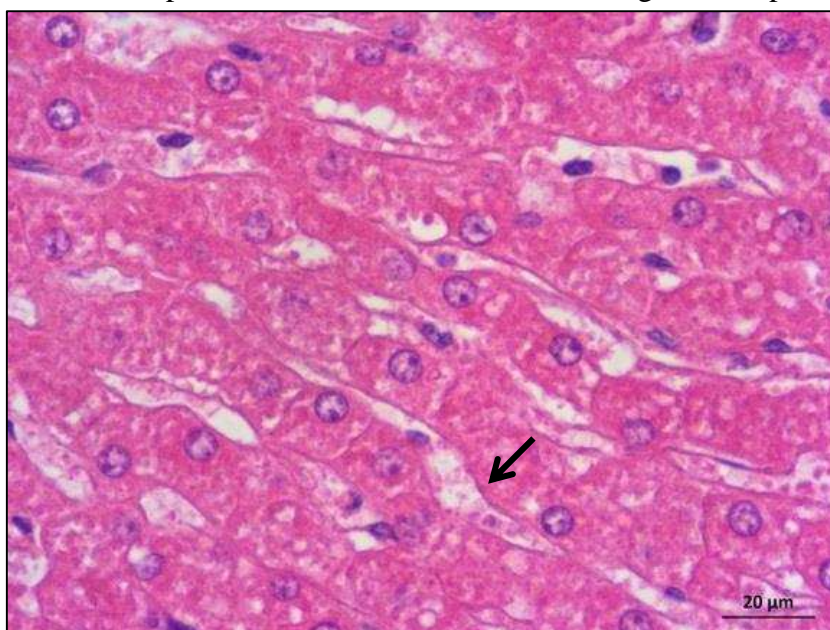
IG – intestino grosso

MEE – músculo estriado esquelético

% - percentual total da avaliação qualitativa dos cortes histológicos.

De acordo com os dados da tabela 6, em percentual qualitativo geral, o melhor fixador foi a solução de Cambridge, para os tecidos submetidos ao processo de plastinação, sem a etapa de cura, maturados e desplastinados. O tecido hepático (Figura 29), o intestino delgado e o intestino grosso apresentaram melhores avaliações para esse fixador com manutenção da arquitetura tecidual.

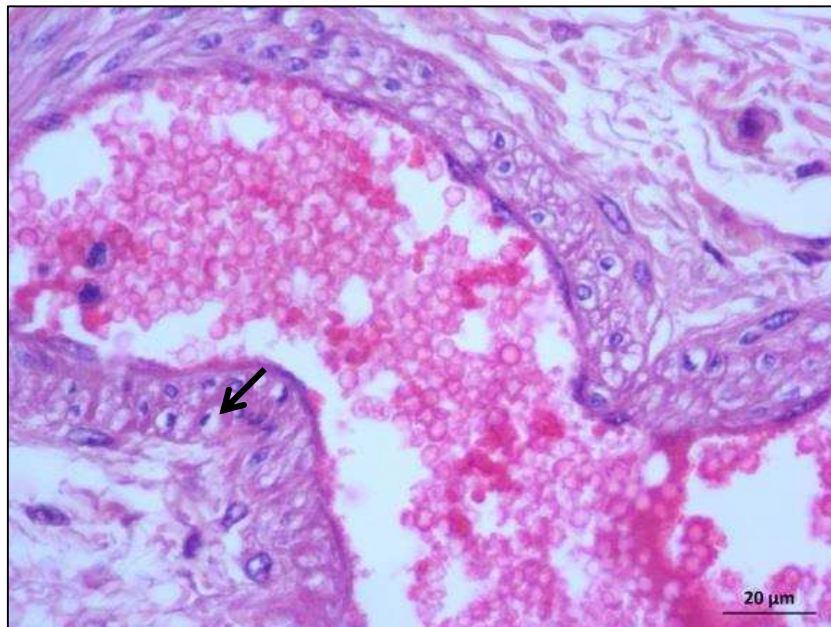
Figura 29: Fotomicrografia de tecido hepático, fixado em solução de Cambridge, plastinado, não curado, maturado e desplastinado, com contorno celular íntegro dos hepatócitos (seta). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de ter obtido a melhor avaliação geral, notou-se para os cortes do esôfago, quando fixados com essa solução, piores resultado para esse fixador. Vários vacúolos citoplasmáticos foram observados na extensão do epitélio esofágico e também se verificaram vacúolos presentes nas células da parede dos vasos sanguíneos da submucosa esofágica (Figura 30).

Figura 30: Fotomicrografia de vaso sanguíneo presente na submucosa do esôfago, fixado em solução de Cambridge, plastinado, não curado, maturado e desplastinado, com células da túnica média apresentando vacúolos citoplasmáticos (seta). HE.

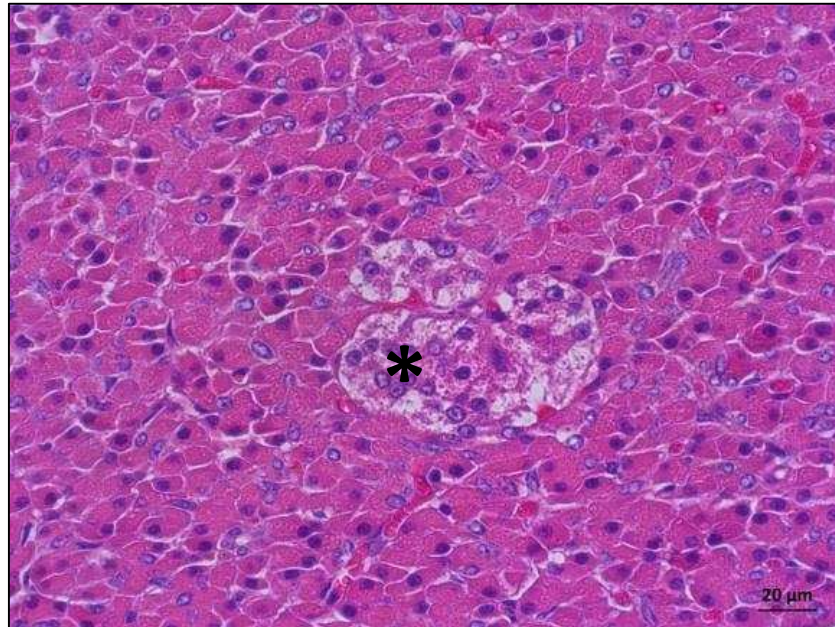


Fonte: Elaborada pela autora.

Para a solução fixadora de formaldeído 10%, as amostras de tecidos do esôfago, pâncreas (Figura 31) e traqueia apresentaram as melhores qualificações histológicas.

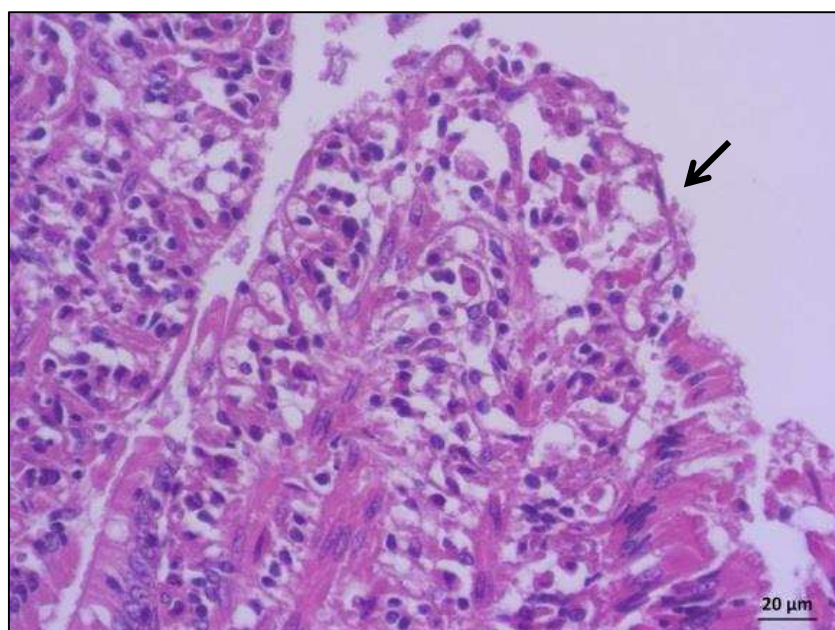
Para intestino delgado e nervo, fixados com solução de formaldeído 10%, foram observadas as piores qualificações histológicas em relação aos tecidos desplastinados, sem cura e maturados. Os cortes de intestino delgado apresentaram áreas de separação entre as células epiteliais, descamação do epitélio (Figura 32) e vacúolos na túnica média dos vasos sanguíneos. Nos cortes transversais do nervo periférico fixado com solução de formaldeído 10% foram observadas áreas de retração dos fascículos e com desprendimento de células do perineuro.

Figura 31: Fotomicrografia de tecido pancreático fixado em solução de formaldeído 10%, plastinado, não curado, maturado e desplastinado com asterisco indicando ilhota de Langerhans bem definida. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

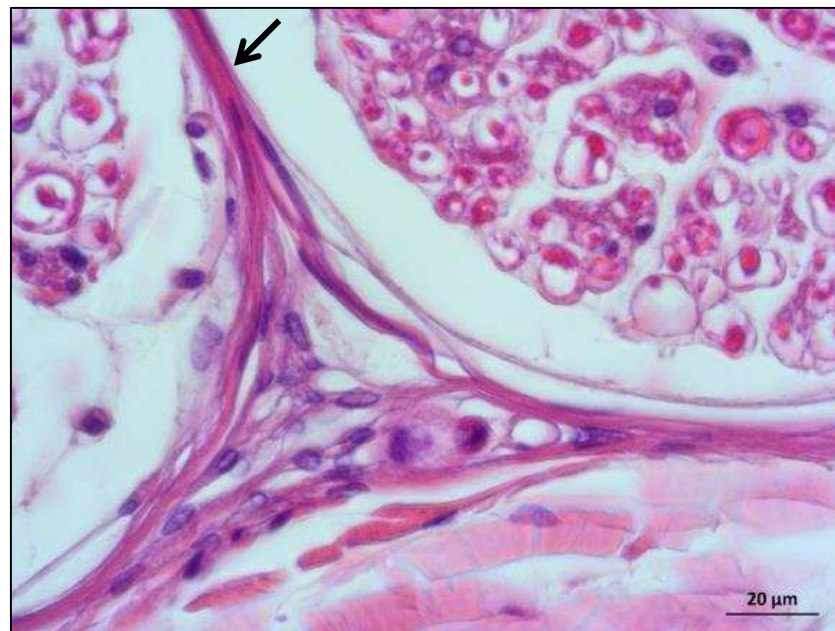
Figura 32: Fotomicrografia de mucosa de intestino delgado fixada em solução de formaldeído 10%, plastinada, não curada, maturada e desplastinada, com seta indicando área de descamação do epitélio. HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a solução fixadora de formaldeído 2,5%, as amostras do tecido nervoso apresentaram as melhores qualificações histológicas, com preservação das células do perineuro (Figura 33), áreas moderadas de retração dos fascículos.

Figura 33: Fotomicrografia de corte transversal de nervo periférico fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, não curado, maturado e desplastinado, com perineuro íntegro (seta). HE.

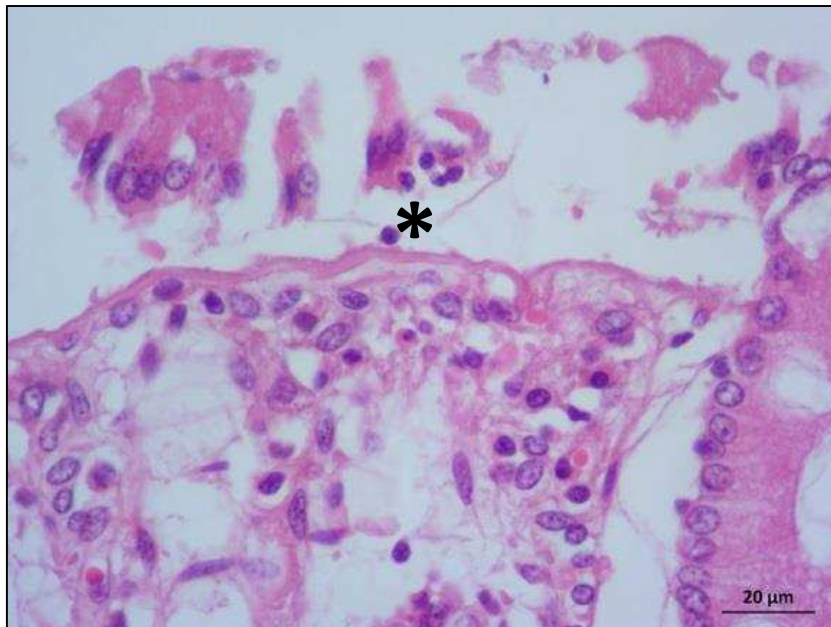


Fonte: Elaborada pela autora.

As piores qualificações histológicas para a solução fixadora de formaldeído 2,5% foram observadas no fígado, intestino delgado, intestino grosso e traqueia, que foram submetidos ao processo de plastinação sem a etapa da cura, maturados e desplastinados. Nos cortes do fígado, evidenciou-se perda do contorno celular dos hepatócitos.

Nos cortes do intestino delgado foram observadas alterações histomorfológicas semelhantes às observadas para a solução de formaldeído 10%. Nos cortes do intestino grosso observamos criptas desprendidas da lâmina própria, descamação das células absortivas (Figura 34), vasos sanguíneos apresentando vacúolos citoplasmáticos. A traqueia apresentou epitélio com poucas áreas preservadas, maioria das células epiteliais apresentando vacúolos citoplasmáticos, espaços entre as células epiteliais e perda de cílios e de células epiteliais.

Figura 34: Fotomicrografia de mucosa de intestino grosso fixado em solução de formaldeído 2,5%, plastinado, não curado, maturado e desplastinado, com áreas de descamação de células epiteliais absortivas (asterisco). HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para artéria e músculo estriado esquelético estatisticamente não foram observadas influência entre o fixador e o processamento 4.

Observou-se para o intestino grosso, que nenhum corte histológico foi qualificado como bom, quando amostras deste tecido foram fixadas com as soluções de formaldeído 10% e formaldeído 2,5%, para os controles, processamentos 2, 3 e 4.

Francis e Rabi (2018) verificaram que os tecidos desplastinados podem ser utilizados para estudos histopatológicos. Eles utilizaram amostras de tecido hepático, separadas em controle – processada e coradas com HE – e plastinadas com silicone S10 Biodur. Após 3 meses, as amostras plastinadas foram submetidas ao processo de desplastinação, utilizando metóxido de sódio como agente desplastinante. As lâminas do tecido desplastinado foram coradas em HE e avaliadas qualitativamente. Verificaram que foi possível a identificação do tecido nas lâminas desplastinadas, observando estruturas intracelulares como núcleos, nucléolos, gotículas de gordura. Concluíram que metóxido de sódio e metanol foram uma boa forma de desplastinar. Esse estudo corrobora com os resultados obtidos neste trabalho para todos os tecidos fixados com os três diferentes fixadores. Onde se pode avaliar qualitativamente

cortes histológicos de tecidos desplastinados com metóxido de sódio 5% em metanol, processados em rotina histológica e corados em HE.

López-Albors et al. (2012) avaliaram a influência da cura na estrutura tecidual dos seguintes órgãos plastinados: coração, pulmão, rim, fígado, útero, omaso e rúmen de vários mamíferos domésticos. As amostras destes órgãos foram plastinadas de acordo com três protocolos padronizados: Biodur S10, Corcoran PR 10 e Vis-Docta HS1, desplastinadas com metóxido de sódio 5% em metanol por 48h e processadas em rotina histológica para microscopia de luz e coradas com hematoxilina-eosina. Seus resultados mostraram que o processo de cura influencia a preservação tecidual, porém sem diferenças significativas entre as três técnicas de plastinação. Amostras não curadas tiveram raros danos teciduais, enquanto amostras curadas mostraram alterações histológicas. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se observar que a etapa da cura não interferiu na qualidade histológica das lâminas. A qualificação do percentual geral para as amostras dos tecidos fixados com a solução de formaldeído 10%, os quais foram (processamento 1) ou não (processamento 3) submetidos à etapa da cura, sem o processo de maturação, permaneceu boa em ambos os processamentos. Fato semelhante foi observado para os tecidos fixados com a solução de Cambridge, que sofreram processo de maturação, após término da etapa da cura (processamento 2) e para aqueles que sofreram o processo de maturação sem a etapa da cura (processamento 4), que também obtiveram qualificação do percentual geral das lâminas histológicas avaliadas como boas.

## 5 CONCLUSÕES

Estruturas plastinadas podem ser utilizadas como fonte de amostras para pesquisa histológica, mesmo após períodos de cura e maturação, onde o processo de desplastinação, usando metóxido de sódio em metanol, uma técnica viável para o seu processamento histológico.

O fixador formaldeído em concentrações de 10% apresentou melhores qualificações para análises histológicas de tecidos plastinados, submetidos ou não à etapa de cura e desplastinados. Já em concentrações de 2,5% este mesmo fixador apresentou qualificações inferiores.

A solução de Cambridge foi eficiente por apresentar as melhores qualificações para análises histológicas de tecidos plastinados, submetidos ou não à etapa de cura, maturados e desplastinados, mostrando-se como alternativa viável como solução de fixação nestas situações.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 36, de 17 de junho de 2009.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE M. **Fixation and Fixatives Theory and Practice of Histological Techniques**. 7. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 2013. 604p.

BRASIL, MINISTÉRIO DO TRABALHO. Portaria 3.214, de 08 de junho de 1978. Norma regulamentadora nº 15. Dispõe sobre atividade e operações insalubres. Diário Oficial da União, Brasília, 06 de julho de 1978. Disponível em [http://www.mte.gov.br/ligislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_15.pdf](http://www.mte.gov.br/ligislacao/normas_regulamentadoras/nr_15.pdf) Acesso: 27 de maio de 2018.

BUESA, R.J. Histology without formalin? **Annals of Diagnostic Pathology**, v.12, p.387-396, 2008.

BUESA, R.J.; PESHKOV, M. V. How much formalin is enough to fix tissues? **Annals of Diagnostic Pathology**, v.16, p.202-209, 2012.

CARVALHO Y. K.; ZAVARIZE, K. C.; MEDEIROS, L. S.; BOMBONATO, P. P. Avaliação do uso da glicerina proveniente da produção de biodiesel na conservação de peças anatômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n 1, p. 115-118. 2013.

COELHO, M. C. S. D. M. O. O formaldeído em ambiente laboral: determinação do ácido fórmico em urina de trabalhadores de uma fábrica produtora de formaldeído. 2009. 142 f. Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal.

COLEMAN, R. Reducing the levels of formaldehyde exposure in gross anatomy laboratories. **The Anatomical Record**, v.243. n. 4, p.531-33. 1995.

COLEMAN, R.; KOGAN, I. (1998) An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. **Journal of Anatomy**, v. 192, p 443-6. 1998.

FOWLER, C.B.; CHESNICK, I. E.; MOORE, C. D.; O'LEARY, T. J.; MASON, J. T. Elevated pressure improves the extraction and identification of proteins recovered from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue surrogates. **PLoS One**. v. 5, n. 12 e14253. Epub 2010 Dec 8.

---

FOX, C.; JOHNSON, F.; WHITING, J.; ROLLER, P. Formaldehyde Fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845-853, 1985.

FRANCIS D. V.; RABI, S. Deplastination: Making plastinates histo-pathologically relevant. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 67, p. 77-79. 2018.

GRONDIN, G., GRONDIN, G.G.; TALBOT, B.G. A study of criteria permitting the use of plastinated specimens for light and electron microscopy. **Biotechnique and Histochemistry**, v. 69, p. 219-34. 1994.

HAMBELI, A. T.; LOMBARDI, M.; PROCHOWNIK, M. Técnicas de conservación de piezas cadavéricas. **Tercera Epoca: Revista Científica de la Facultad de Ciencias Médicas**, v.2. n.1, p.1-2, 2010.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: secondary title: International Agency for Research on Cancer, 2013. URL: <[http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A36A27C140136A8089B344C39/NR15%20\(atualizada%202011\)%20II.pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A36A27C140136A8089B344C39/NR15%20(atualizada%202011)%20II.pdf)> Acesso abril 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – Formol ou Formaldeído 2005. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=795](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795)>. Acesso em: 10 de março 2018.

DeJONG, K.; HENRY, R. W. Silicone plastination of biological tissues: cold-temperature technique Biodur TM S10/S15 technique and products. **Journal of the Internacional Society for Plastination**, v.22. p.2-14, 2007.

LATORRE R.M.; GARCÍA-SANZ, M.P.; MORENO, M.; HERNÁNDEZ, F.; GIL, F.; LÓPEZ, O.; AYALA, M.D.; RAMÍREZ, G.; VÁZQUEZ, J.M.; ARENCIBIA, A.; HENRY, R.W. How useful is plastination in learning anatomy? **Journal of Veterinary Medical Education**. v.34 n.2, p.172-76, 2007.

LIMBERGER, D. C. H. **Processos de recuperação, reuso e destinação do formol em laboratório de anatomia**, 2011. 98 f. Dissertação – Centro de Tecnologia - Engenharia de Processo – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

LÓPEZ-ALBORS, O.; GIL F.; ORENES, M.; AYALA, M., D.; ABELLÁN, H.; HENRY, R.; LATORRE, R. Curing influences the tissue preservation of silicone plastinated organs. 12th Int Conf Plast, Murcia, Spain, 2004. Abstract in **Journal of the Internacional Society for Plastination**, n. 19, p. 49-50. 2004.

MACHADO, E. L.; KIST, L.T.; BACARIN, G. Gerenciamento de efluentes de laboratórios de Anatomia. In: 24° CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Belo Horizonte, 2007. Anais. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007. p. 1-5.

MANJUNATHA K, PRASAD RV, JAMUNA KV, PLACID ED, SUGUNA R, RAMKRISHNA V. Comparison of histological architecture of paraffin embedded and indigenously plastinated tissues. **Indian Journal of Veterinary Anatomy**, v. 26, p. 132-133. 2014

MOELANS, C. B.; OOSTENRIJK, D.; MOONS, M. J.; VAN DIEST, P. J. Formaldehyde substitute fixatives: Effects on nucleic acid preservation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 11, p. 960-967. 2011.

MOSCOL GONZALES, J. A; CASTRO CHARO, I. Las técnicas de conservacion em anatomia. Lima: serviços gráficos S.C.R.L, 1989.

NICHOLSON, H. D.; SAMALIA, L; GOULD, M.; HURST, P. R.; WOODROFFE, M. A comparison of different embalming fluids on the quality of histological preservation in human cadavers. **European Journal of Morphology**, v. 42(4/5), n. 178, p. 184. 2005

OCHS, M.; GROTZ, L.; FACTORINE, L. S.; RODRIGUES, M. R.; NETTO, A. D. P. Occupational exposure to formaldehyde in an institute of morphology in Brazil: A comparison of area and personal sampling. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2813-2819, 2012.

ÖZKAN, N.; SALVA, E.; CAKALAGAOGLU, F.; TUZUNER, B. Honey as a substitute for formalin? **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 2, p. 148-153, 2012.

PATIL, S.; PREMALATHA, B.; RAO, R.; GANAVI, B. Revelation in the field of tissue preservation – A preliminary study. **Journal of International Oral Health**, v. 5, p. 31-38, 2013.

PEREIRA, N. S.; ZAITA, M. Degradation of formaldehyde in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR). **Journal of Hazardous Materials**, v.163. p.777-82, 2008.

RAVI, S. B; BHAT, V. M. Plastination: a novel, innovative teaching adjunct in oral pathology. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, p. 133-137. 2011.

RIPANI, M.; BOCCIA, L.; CERVONE, P.; MACCIUCCA, D. V. Light microscopy of plastinated tissue. Can plastinated organs be considered viable for structural observation? **Journal of the Internacional Society for Plastination**, v. 11, p. 28-30. 1996.

SEIBOLD, R.; EITEL, F.; WALDNER, H.; BRUNNER, U.; Von HAGENS, G. A new application of plastination in bone histology. **Unfallchirurg**, v. 94, n. 12, p. 624-33, dez. 1991.

SILVA, R. G.M.; MATERA, J.M.; RIBEIRO, A.A.C.M. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of living animals. Is that an academic paradox? **Anatomia, histologia, embryologia: journal of the World Association of Veterinary Anatomists**. Berlin, v. 36, p.220-224, 2007.

SORA, M. C.; BOIA, M.; BANCUIU, C. Silicone (BIODUR) viscosity and impregnation in plastination. **Materiale Plastice**, v.52, p. 593 - 595. 2015.

SORA, M. C. The general protocol for the s10 technique. **Research and Clinical Medicine**, v. 1, n. 1, p. 14-18. 2016.

Von HAGENS, G. Impregnation of soft biological specimens with thermosetting resins and elastomers. **The Anatomic Record**, v 194. p 247-55, 1979.

Von HAGENS, G. **Heidelberg Plastination Folder**: Collection of all technical leaflets for plastination. Anatomisches Institut I, Universität Heidelberg 1985

Von HAGENS, G.; TIEDEMANN, K.; KRIZ, W. The current potential of plastination. **Anatomy and Embryology**, v. 175, p. 411-421. 1987.

WALKER, A. N.; JACKSON, R. L.; POWELL, S. Technical communication: routine microscopy of deplastinated tissue. **Journal of the Internacional Society for Plastination**, v. 2, p. 40-42. 1988.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION – Formaldehyde. Copenhagen: Regional Office for Europe. Copenhagen, Denmark, 2001. Disponível em: <<http://www.euro.who.int>>. Acesso em: 09 de fev. de 2018.

ZANINI, C.; GERBAUDO, E.; ERCOLE, E.; VENDRAMIN, A.; FORNI, M. Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: A formaldehyde-free laboratory is possible. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 11, n. 1, p. 11-59, 2012.