

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Leonardo Jung

**Avaliação de uma Solução Química
Alternativa para a Conservação de
Material Biológico em Laboratório de
Anatomia.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2019**

Leonardo Jung

Avaliação de uma Solução Química Alternativa para a Conservação de Material Biológico em Laboratório de Anatomia.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Geraldo Pereira Jotz
Coorientadora: Dra. Taís Malysz
Coorientadora: Dra. Paula Rigon da Luz Soster

Porto Alegre

2019

Catálogo na Publicação

Jung, Leonardo

Avaliação de uma solução química alternativa para a conservação de material biológico em laboratório de anatomia / Leonardo Jung. -- 2019.

79 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Orientador(a): Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz ;
coorientador(a): Profa. Dra. Taís Malysz, Proa. Dra.
Paula Rigon da Luz Soster.

1. Solução alternativa. 2. Conservante. 3. Peças anatômicas. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, meu irmão, minha dinda, meus avós e minha esposa. Em especial à memória de meu pai, Leandro, que partiu cedo, mas deixou sua história e ensinamentos, que me dão força e iluminam meu caminho diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus (Grande Arquiteto do Universo), por estar presente em minha vida, mesmo quando não consigo senti-lo, e aos meus guias espirituais que conduzem e fortalecem minhas intuições a cada momento.

À minha família, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional. Em especial à minha amada esposa Indiara Lusa, por ter sido o pilar de sustentação fundamental para essa conquista.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz, Profa. Dra. Taís Malysz e Profa. Dra. Paula Rigon da Luz Soster, minha eterna gratidão por terem acreditado neste projeto, me ensinando com muita paciência e sabedoria os caminhos e etapas que deveria seguir. A dedicação e o amor deles pela ciência sempre me servirão de inspiração para a minha trajetória.

Ao Dr. Eduardo Cambuzzi e ao Dr. David Driemeier, por dedicarem seu tempo, conhecimento e energia para que este projeto se tornasse realidade.

Aos meus colegas do Laboratório de Anatomia Humana, Antônio Generoso Severino, Douglas Fabiano Lenz Nemos e Daniel Prato Schmidt, pela amizade, companheirismo e disposição em ajudar.

Ao meu colega do Laboratório de Histologia, Maikel Rosa Oliveira, pela amizade e por nunca medir esforços para auxiliar na etapa de processamento e confecção do material histológico deste trabalho.

As colegas Chris Krebs do Departamento de Farmacologia e Amanda de Lima do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e conselhos científicos valiosos.

À Bruna Rebechi, Tiago Rebechi, Alexandre Rebechi e ao Matadouro e Frigorífico Santo André pelo fornecimento do material biológico e informações repassadas.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA, pelos ensinamentos e orientação de alto nível formador.

A todas as pessoas que, de uma forma ou outra, estiveram envolvidas nesta conquista.

Muito Obrigado!

RESUMO

Introdução: As soluções de fixação e conservação a base de formaldeído permanecem até os dias de hoje como “padrão ouro” para a manutenção de materiais biológicos em laboratórios de anatomia. Contudo, seus efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente têm impulsionado a busca por soluções químicas alternativas com potencial suficiente para substituí-lo. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar, através da análise das características organolépticas (avaliação macroscópica) e do estado de conservação tecidual (avaliação microscópica), a eficácia de uma solução química alternativa, livre de formaldeído, para a conservação de peças anatômicas em laboratório de anatomia. **Material e Métodos:** Vinte hemiblocos de tecidos biológicos cervicais (laringes e músculos infra-hióideos) foram coletados de suínos machos (*Sus scrofa domestica*) e submetidos aos processos de fixação em solução padrão e posterior conservação em solução padrão (formol 10%) no grupo controle (GC) ou alternativa (álcool etílico, glicerina, água e desinfetante) no grupo experimental (GE). Avaliações das características organolépticas e do estado de conservação tecidual com base nos graus de autólise celular foram realizadas imediatamente após o abate dos animais (fase 1), após 1 mês de fixação em solução padrão (fase 2) e após 12 meses de conservação em solução padrão ou alternativa (fase 3). A avaliação organoléptica foi baseada nas características macroscópicas do material de acordo com a cor, textura, odor de decomposição, odor da solução e irritação de mucosas. Com base nos graus de autólise celular o estado de conservação foi classificado como excelente (A), boa (B), satisfatória (C), insatisfatória (D) e tecido em autólise (E). **Resultados:** Os dados foram apresentados na forma de frequência e percentual e analisados estatisticamente para comparação entre fases e entre grupos ($p < 0,05$). A avaliação organoléptica não evidenciou alteração dos tecidos na fase 1. Os mesmos apresentaram-se pálidos e rígidos nas fases 2 e 3 ($p < 0,05$ vs fase 1) sem diferença entre grupos ($p > 0,05$). Nenhum odor de decomposição foi perceptível nas 3 fases para ambos os grupos. No GC (fase 2 e 3) e no grupo GE (fase 2), o odor da solução e a irritação das mucosas foram classificados como não tolerável. Na fase 3 o GE apresentou odor de solução tolerável com ausência de irritação de mucosas ($p < 0,05$ vs fase 1; 2 e vs GC). Na fase 1, 85% das amostras de músculo, 100% das

amostras de cartilagem e 95-100% das amostras de tecido epitelial apresentaram excelente conservação tecidual (A). O percentual restante recebeu classificação de boa conservação (B). Na fase 2 e 3, o tecido muscular foi identificado 5 a 10% de amostras classificadas como conservação satisfatória (C) de modo que houve diferença significativa em relação aos resultados da fase 1 ($p < 0,05$). Nestas fases, o estado de conservação das amostras de cartilagem e tecido epitelial foram mantidas. Para estes parâmetros, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre grupos. **Conclusão:** A solução alternativa de conservação mostrou-se eficaz para manter as características macroscópicas e microscópicas das peças anatômicas da mesma forma que a solução padrão. Além disso, a solução apresentou odor tolerável com ausência de irritação de mucosas e manteve consistência tecidual adequada, favorecendo a manipulação e a dissecação das peças anatômicas.

Palabras chave: Solução alternativa; conservante; peças anatômicas; álcool etílico; glicerina; desinfetante.

ABSTRACT

Introduction: Formaldehyde fixing and preservation solutions remain to this day as a "gold standard" for the maintenance of biological materials in anatomy laboratories. However, its harmful effects on human health and the environment have driven the search for alternative chemical solutions with sufficient potential to replace it. .

Objective: The objective of this study was to evaluate the efficacy of an alternative chemical solution, free of formaldehyde, for the preservation of anatomical specimens in the anatomy laboratory by analyzing the organoleptic characteristics (macroscopic evaluation) and the tissue conservation status (microscopic evaluation). **Material and Methods:** Twenty hemiblocks of cervical biological tissues (larynx and infrahyoid muscles) were collected from male pigs (*Sus scrofa domestica*) and submitted to standard solution fixation and subsequent preservation

in standard solution (10% formaldehyde) in the group control (GC) or alternative (ethyl alcohol, glycerin, water and disinfectant) in the experimental group (GE). Evaluation of the organoleptic characteristics and the tissue conservation status based on the cellular autolysis were performed immediately after the slaughter of the animals (phase 1), after 1 month of fixation in the standard solution (phase 2) and after 12 months of storage in solution standard or alternative (phase 3). The organoleptic evaluation was based on the macroscopic characteristics of the material according to the color, texture, odor of decomposition, solution odor and mucosal irritation. Based on the degree of cellular autolysis, the condition was classified as excellent (A), good (B), satisfactory (C), unsatisfactory (D) and tissue in autolysis (E).

Results: The data were presented in frequency and percentage form and analyzed statistically for comparison between phases and between groups ($p < 0.05$). The organoleptic evaluation did not show alteration of the tissues in phase 1. They were pale and rigid in phases 2 and 3 ($p < 0.05$ vs stage 1) without difference between groups ($p > 0.05$). No decomposition odor was perceptible in the 3 phases for both groups. In GC (phase 2 and 3) and in the EG group (phase 2), solution pain and mucosal irritation were classified as not tolerable. In stage 3 the EG had a tolerable solution odor with no mucosal irritation ($p < 0.05$ vs phase 1, 2 and vs GC). In stage 1, 85% of muscle samples, 100% of cartilage samples and 95-100% of epithelial tissue samples presented excellent tissue conservation (A). The remaining percentage

received good conservation classification (B). In stage 2 and 3, muscle tissue was identified 5 to 10% of samples classified as satisfactory conservation (C) so that there was significant difference in relation to the results of phase 1 ($p < 0.05$). At these stages, the cartilage and epithelial tissue samples were preserved. For these parameters, no significant differences were found in the comparison between groups.

Conclusion: the alternative preservation solution proved to be effective in maintaining the macroscopic and microscopic characteristics of the anatomical parts in the same way as the standard solution. In addition, the solution presented a tolerable odor with no mucosal irritation and maintained adequate tissue consistency, favoring the manipulation and dissection of the anatomical pieces.

Key words: Alternative solution; preservative; anatomical parts; ethyl alcohol; glycerin; disinfectant.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 09 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 10 |
| 2.1 TERMOS E DEFINIÇÕES..... | 10 |
| 2.2 HISTÓRIA DO EMBALSAMAMENTO E CONSERVAÇÃO TECIDUAL..... | 11 |
| 2.2.1 Primeira época – Embalsamamento nas civilizações e culturas antigas..... | 12 |
| 2.2.2 Segunda época – Embalsamamento científico-anatômico..... | 13 |
| 2.2.3 Terceira época – Embalsamamento fúnebre..... | 14 |
| 2.3 SOLUÇÕES MODERNAS DE FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO ANATÔMICAS ... | 16 |
| 2.4 COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO | 23 |
| 2.4.1 Propriedades básicas | 23 |
| 2.5 COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE FIXAÇÃO E DE CONSERVAÇÃO EM ESTUDO | 25 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 29 |
| 4. OBJETIVOS..... | 38 |
| 4.1 Objetivo geral | 38 |
| 4.2 Objetivos específicos | 38 |
| 5 ARTIGO | 39 |
| 5.1 Manuscrito..... | 39 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 70 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 71 |
| ANEXOS | 72 |

1 INTRODUÇÃO

Registros arqueológicos têm demonstrado que os homens sempre se preocuparam com a conservação dos corpos após a morte, buscando métodos de evitar a putrefação causada pela decomposição natural dos tecidos corporais (SAEED et al., 2001; MAYER, 2011).

A técnica mais antiga de conservação de cadáveres que se tem conhecimento é a mumificação. Utilizada por diversos povos antigos, principalmente pelos egípcios, seus processos não foram bem descritos e ainda permanecem desconhecidos em sua totalidade (SAEED et al., 2001). Relatos completos e precisos sobre técnicas de preservação de corpos foram realizadas somente em 1544, por Ambrosiê Paré, em seu Tratado de Cirurgia e, por Petrus Florentinus, o qual descreveu detalhadamente os processos de embalsamamento dos pontífices de Roma (KLEISS e SIMONSBERGER, 1964).

O marco para a conservação de cadáveres foi a descoberta do aldeído fórmico, o qual passou a ser amplamente utilizado nos processos de conservação cadavérica em laboratórios de anatomia (OLIVEIRA e ZAIAT, 2004; BENKHADRA et al., 2011). As limitações e desvantagens das soluções a base de formaldeído impulsionaram o desenvolvimento de inúmeras formulações visando minimizar seus efeitos nocivos (BRENNER, 2014).

Apesar da vasta quantidade de substâncias desenvolvidas e da ampla tecnologia disponível, ainda nos deparamos com a dificuldade de preservar materiais biológicos em soluções conservadoras atóxicas (FOX et al., 1985; MOELANS et al., 2011). Desta forma, surge a necessidade de desenvolver novas formulações, livres de substâncias nocivas e com propriedades conservadoras suficientes para substituir as já disponíveis, principalmente o formaldeído (BUESA, 2008; ZANINI et al., 2012).

Desta forma, buscamos avaliar a eficácia de uma solução química alternativa contendo glicerina, álcool etílico, água e desinfetante com cloreto de benzalcônio como princípio ativo na conservação de peças anatômicas. A solução em estudo foi desenvolvida pelo Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz e do Biólogo Antônio Generoso Severino, e vem sendo utilizada desde 2010.

O objetivo de produzir e utilizar esta nova formulação foi minimizar a emissão de vapores tóxicos no ambiente, diminuindo a exposição ao formol pelos manipuladores (professores, alunos e técnicos) a fim de cumprir normas de segurança, manter a arquitetura tecidual por longos períodos, reduzir os riscos biológicos (disseminação de infecções), prevenir o crescimento de fungos e bactérias, manter flexibilidade e coloração dos tecidos o mais próximo do natural, além de ser uma alternativa de custos consideravelmente baixos, uma vez que muitas das técnicas utilizadas requerem uma grande infraestrutura, além de serem processos extremamente dispendiosos.

Neste sentido, torna-se importante testar novas preparações que possam ser empregadas para a fixação e conservação de material biológico em laboratórios de anatomia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TERMOS E DEFINIÇÕES

A utilização de determinados termos para definir a manutenção das características morfoestruturais de tecidos biológicos após a morte, muitas vezes, são empregadas de maneira inadequada e interpretadas de forma dúbia. Suas aplicações, tanto no campo educacional quanto no campo funerário, segundo Balta e colaboradores (2015), culminou no aparecimento de terminologias intercambiáveis, o que dificulta a categorização de diferentes métodos e soluções químicas utilizadas para este fim. No mesmo sentido, Brenner (2014) enfatiza que diferentes idiomas podem utilizar denominações distintas para definir processos de mesmo propósito.

Diante disso, torna-se necessário o esclarecimento de alguns conceitos e terminologias utilizadas para definir os processos de conservação de material biológico em laboratórios de anatomia, conforme seguem:

- **Embalsamamento:** é o tratamento, mediante emprego de soluções químicas especiais no corpo após a morte, que visa minimizar a presença e o desenvolvimento de microorganismos, proteger da decomposição orgânica e restaurar a aparência física. A distribuição uniforme e impregnação das soluções químicas em todas as partes do corpo, através do sistema vascular, caracterizam este processo (BATRA et al., 2010).

- **Tanatopraxia:** do grego *Thánatos* (morte ou Deus da morte) e *práxis* (prática). Consiste no processo de embalsamamento realizado para cerimônias fúnebres. O emprego deste termo reserva-se exclusivamente ao campo funerário (TROMPETTE e LEMONNIER, 2009; MAYER, 2011; GAHR et al., 2013).
- **Fixação:** processo que torna os tecidos firmes, insolúveis e protegidos contra a decomposição após a morte. Soluções químicas empregadas neste processo são ditas soluções de fixação ou fixadores (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).
- **Preservação:** ação que visa garantir a integridade e a perenidade de algo (FERREIRA, 2014).
- **Conservação:** ato de conservar, resguardar de dano, preservar (FERREIRA, 2014).

Os termos preservação e conservação, apesar de serem terminologias distintas, podem ser utilizados alternadamente, sem modificar o sentido, pois se designam ao mesmo propósito. Sendo assim, em nosso estudo utilizaremos conservação e preservação como termos que se referem ao mesmo processo, os tratando como sinônimos.

Neste sentido, os vocábulos **conservação/preservação** definem a manutenção, por tempo indeterminado, da condição alcançada pela fixação (HILDEBRAND, 1968).

Torna-se importante salientar que estes termos são utilizados para nomear uma técnica, referenciar soluções químicas e definir diferentes fases de processos desenvolvidas neste estudo, sendo fundamental para a compreensão da metodologia empregada no mesmo. As definições e conceitos apresentados são universalmente utilizados, entretanto, suas aplicações nos diferentes campos de atuação, países e culturas, permitem interpretações controversas. A forma de emprego destas terminologias em nosso estudo não inviabiliza a interpretação dada para as mesmas em outras pesquisas.

2.2 HISTÓRIA DO EMBALSAMAMENTO E CONSERVAÇÃO TECIDUAL

A prática do embalsamamento, considerado um dos primeiros procedimentos cirúrgicos empreendidos pela humanidade, tem uma longa história, e vem sendo

empregada por diferentes povos e culturas desde os tempos mais remotos (STRUB e FREDERICK, 1989; EZUGWORIE et al., 2009).

Vários foram os propósitos para a realização do embalsamamento de corpos após a morte. O principal está relacionado a crenças religiosas ou superstições profundamente enraizadas. Motivados pela fé, diversos povos antigos conservavam seus corpos por acreditarem que voltariam a habitá-los. A vida eterna estava relacionada a um corpo preservado, sendo que aquele com o corpo decomposto seria banido da vida após a morte (VON HAGENS e WHALLEY, 2009). A compreensão da sintopia das estruturas internas para tratar doenças e, até mesmo, para a caça, são outros motivos da realização do embalsamamento nas culturas antigas (MAYER, 2011).

Três grandes épocas marcam a trajetória do embalsamamento com o passar do tempo (AJAYI et al., 2011; Mayer, 2011).

2.2.1 Primeira época – Embalsamamento nas culturas e civilizações antigas

A primeira época, a qual remete ao princípio do embalsamamento, aborda sua prática entre diversos povos antigos.

Os chinchorros, um povo que viveu no deserto do Atacama, utilizavam técnicas de conservação impressionantes, produzindo as múmias artificiais mais antigas já encontradas até hoje (cerca de dois mil anos antes dos egípcios) (MARQUET et al., 2012).

No antigo Egito (3200 anos A.C.), os mortos eram enterrados em valas rasas, escavadas nas areias do deserto, sem nenhuma prática de mumificação. O clima quente e seco da região favorecia a desidratação dos corpos, o que contribuía para a sua preservação (MAYER, 2011). A crença na imortalidade da alma certamente foi originada pela eclosão dos corpos preservados sobre a superfície da areia, o que levou este povo a providenciar uma provisão de alimentos, objetos pessoais e jóias para a utilização do morto em sua jornada em outra vida (FIUZA e MARCHIORO, 2010). Saques às cavernas funerárias passaram a ser comuns, em virtude do aumento da população. A construção de grandes tumbas em solos mais firmes criou um local mais seguro para enterrar os mortos, contudo, originou um ambiente menos favorável para a preservação, evitando o calor e a desumidificação. Este fato

provavelmente induziu a criação de uma nova técnica de preservação, iniciando a era da mumificação artificial pelos egípcios (VON HAGENS e WHALLEY, 2009).

Os papiros encontrados, até os dias atuais, trazem descrições incompletas dos processos de mumificação desenvolvidos pelos egípcios (KLEISS e SIMONSBERGER, 1964; RODRIGUES, 2010; FIUZA e MARCHIORO, 2010). A técnica original incluía a evisceração, com exceção do coração, pois acreditavam ser a sede da alma, residindo ali os sentimentos e a consciência. Por fim, as cavidades corporais eram preenchidas com terra, areia, tecido ou algodão e, o corpo envolto em tiras de linho embebidas em soluções especiais (ADAMS, 1998; SAEED; et al., 2001; RODRIGUES, 2010, FIUZA e MARCHIORO, 2010; MAYER, 2011).

Em meados do século IV da era cristã, a crença de que a mumificação seria a garantia de uma vida eterna já não era mais aceita por muitos egípcios, dada a influência do cristianismo (FIUZA e MARCHIORO, 2010). Com isso a arte e a ciência de criar múmias perderam força e, aos poucos, foram deixadas de lado e substituídas por outras crenças e métodos, dando fim a um ciclo de mais de 30 séculos (MAYER, 2011), registrando aproximadamente 730.000.000 corpos mumificados no Egito (EZUGWORIE et al., 2009).

2.2.2 Segunda época – Embalsamamento científico-anatômico

A segunda época inicia com a mais completa proibição da utilização dos métodos de conservação. Conhecida como a Idade das Trevas (Idade Média – século V a XV), este período de restrições reservava somente à nobreza, ao clero e a alguns membros da alta sociedade o direito de embalsamar seus falecidos. Rigorosas leis proibiam os cursos de medicina de utilizarem cadáveres para estudo ou dissecação (TROMPETTE e LEMONNIER, 2009).

Ulteriormente, o Renascimento (século XVI) pôs fim à Idade das Trevas, iniciando uma época marcada pelo desenvolvimento médico-científico, conhecida como Período dos Anatomistas (EZUGWORIE et al., 2009; AJAYI et al., 2011). A aprovação da dissecação de cadáveres para fins de investigação médica forneceu uma rica fonte de conhecimento e refinamento das metodologias de conservação cadavérica. Desde então as técnicas de embalsamamento anatômico passaram a ganhar popularidade (AJMANI, 2009).

O apogeu na investigação anatômica do embalsamamento se deu com o desenvolvimento das técnicas de injeção arterial (MCKONE, 1999; RODRIGUES, 2010; RIFKIN et al., 2011; MAYER, 2011). A descoberta da circulação sanguínea, em 1628, pelo fisiologista inglês William Harvey foi fundamental para a incorporação deste método (EZUGWOIRE et al., 2009; AIRD, 2011).

A técnica de injeção arterial foi aprimorada pelo cientista holandês Frederik Ruysch. Em 1717 seus exemplares anatômicos foram vendidos ao famoso czar russo Pedro, o Grande, para serem expostas no Museu de São Petersburgo, juntamente com a fórmula do líquido balsâmico utilizado na conservação das peças. As preparações chegaram ao destino em péssimas condições de conservação, pois os responsáveis pelo traslado beberam as soluções conservadoras, que continham álcool e pimenta negra, para suportarem o frio extremo (REVE, 2006; RODRIGUES, 2010). Ruysch teria desenvolvido, com o líquido balsâmico, a solução conservadora ideal, no entanto, a composição exata de sua fórmula permanece desconhecida até os dias de hoje (TROMPETTE e LEMONNIER, 2009; IJPMA e VAN GULIK, 2013).

O anatomista, fisiologista e médico escocês, Dr. William Hunter, em 1747 descreveu minuciosamente os planos de injeção arterial utilizados por ele. Por ter publicado seus achados, beneficiando o mundo científico, é considerado por muitos como o inventor original do sistema de injeção arterial (NUNNAMAKER e DHONAU, 2015).

Karl Scheelle descobriu, em 1779, a glicerina, um álcool derivado da saponificação do azeite de oliva com óxido de chumbo. Sua adequação para a preservação, idealizada por Giacomini em 1884 e Laskowski em 1886, representou um grande marco na preparação de peças anatômicas (KURZ, 1978; RODRIGUES, 2010).

2.2.3 Terceira época – embalsamamento fúnebre

A terceira época tem por marco histórico a Guerra Civil Americana (1861-1865), a qual levou os processos de conservação cadavérica a serem aplicados novamente com propósitos fúnebres, movido principalmente por questões afetivas. A preservação dos corpos dos soldados mortos em batalha era primordial para o transporte em longas distâncias, garantindo às famílias o retorno de seus entes

queridos para um enterro digno, com um corpo preservado, limpo e séptico (AJAYI et al., 2011; MAYER, 2011).

Com o novo enfoque dado ao procedimento de conservação cadavérica, o embalsamamento deixou de ser um método exclusivo das preparações anatômicas. O ramo funerário do embalsamamento, alavancado pelo barbeiro-cirurgião da Guerra Civil Americana, Thomas H. Holmes, trouxe à tona a preocupação e o cuidado com o corpo inanimado herdado das civilizações antigas (PINEDA e YUON, 2004; AJMANI, 2009; FIUZA e MARCHIORO, 2010).

Em seus ensaios, Holmes desenvolveu soluções de embalsamamento contendo arsênico como componente principal (RODRIGUES, 2010). Seu fluido de preservação foi o primeiro a ser aceito e amplamente utilizados durante os séculos XIX e XX (EZUGWOIRE et al., 2009).

Em 1906 o uso do arsênico em soluções embalsamadoras passou a ser proibido, e o formaldeído foi eleito como substância de escolha nas preparações fúnebres (FIUZA e MARCHIORO, 2010). A descoberta do formaldeído ocorreu em 1859 pelo russo Aleksandr Mikhaylovich Butlerov, no entanto, aplicações médicas desta substância ocorreram em 1893 com Ferdinand Blum, revelando suas propriedades antissépticas, antimicrobianas e fixadoras (BLUM, 1893; BINAWARA et al., 2010).

Nos Estados Unidos, desde 1861, o embalsamamento fúnebre está disponível para todos os cidadãos, tornando-se um serviço corriqueiro, aplicado em 90% dos corpos a cada ano (MITFORD, 2000; MAYER, 2011).

No Brasil, a primeira tanatopraxia e arte restauratória foi realizada por Gelcio Miguel Schilbelben em 1994, durante a 12ª Reunião da Associação Latino Americana de Cemitério e Serviços Funerários – ALPAR e 1º Encontro Internacional de Diretores de Cemitérios e Serviços Funerários do Brasil, ocorridos na cidade de Curitiba. Estabeleceu-se, a partir de então, o marco do embalsamamento funerário do país (FIUZA e MARCHIORO, 2010).

2.3 SOLUÇÕES MODERNAS DE FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO ANATÔMICAS

Modernas soluções químicas de fixação e conservação anatômicas são o resultado do acúmulo de vários séculos de conhecimento empírico e investigação científica, culminando em uma diversidade de formulações amplamente relatadas na literatura especializada (LOMBARDEIRO et al., 2017).

Métodos de preservação seca (PAPAGEORGOPOULOU et al., 2015), em baixas temperaturas (BRADBURY e HOSHINO, 1978; O'SULLIVAN e MITCHELL, 1993; ANDERSON, 2006; BARTON et al., 2009; MESSMER et al., 2010; MISHRA et al., 2016), por inclusão e impregnação de substâncias endurecedoras (VON HAGENS, 1979), com soluções pulverizadas (MACDONALD e MACGREGOR, 1997; MILLS, 2010) e preservação úmida (VAN DAM et al., 2015; TURAN et al., 2017; LUO et al., 2018; TAMAYO-ARANGO e GARZÓN-ALZETE, 2018) são exemplos da diversidade de técnicas e métodos de conservação atualmente empregados.

O formaldeído tornou-se a base das primeiras soluções de embalsamamento modernas, mostrando um excelente potencial conservador (EZUGWOIRE et al., 2009). Batizadas com o nome de seus idealizadores desde seus primórdios, convenientemente esta tradição manteve-se nas soluções contemporâneas, apesar de alguns autores favorecerem o componente principal ou o princípio ativo para nomeá-las.

Por adotarmos uma forma de preservação que utilize conservação úmida, daremos mais atenção a estas soluções. A tabela 1 faz um resumo das principais soluções de fixação e conservação consideradas modernas.

Tabela 1 – Soluções modernas de fixação e conservação.

| Autor (ano) | Solução de Fixação | Solução de Conservação |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | Formol 40% (400 ml) | Glicerina (500 ml) |
| Pulvertaft (1950) | Nitrito de Potássio (30 g) | Ácido Arsênico 1% (200 ml) |
| (Solução de Kaiserling) | Acetato de Potássio (60 g) | Acetato de Potássio (250 g) |
| | Água da torneira (2 l) | Timol (2,5 g) |

Continua.

Continuação.

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Richins et al. (1963) | Dowicide G TM (0,75) | Dowicide G TM (3,75) |
| | Metanol (4,00) | Metanol (20,00) |
| | Formcel (5,40) | Formcel (27,00) |
| | Sorbitol 70% (1,50) | Sorbitol 70% (7,50) |
| | Pirofosfato tetrapotássio (0,30) | Pirofosfato tetrapotássio (1,50) |
| | Agente molhante (0,05%) | Agente molhante (0,25) |
| | Água (87,9905) | Água (40,00) |
| | Medidas em % por peso corporal. | Medidas em % por peso corporal. |
| Langner e Jackson (1966) | Formol 4% tamponado | Formol 4% tamponado |
| | 2-para-dioxanona | 2-para-dioxanona |
| | (60 a 80% do peso corporal) | (60 a 80% do peso corporal) |
| Frolich et al. (1984) | Formaldeído (2,2%) | Fenoxietanol 1% diluído em água da torneira (600 l) |
| | Lisoformina (4,5%) | |
| | Glicerol (20%) | |
| | Hidrato de cloral (5%) | |
| | Cloreto de sódio (4%) | |
| | Cloreto de cálcio (anidro) (1%) | |
| | <u>Fixação complementar (imersão):</u> | |
| Formol 4% | | |
| Água da torneira (600 l) | | |
| Kessler (1989) (Solução de Jores) | Formol (50 ml) | Água destilada (1000 ml) |
| | Água destilada (1000 ml) | Glicerol (600 ml) |
| | Sulfato de sódio (50 g) | Acetato de potássio (300 g) |
| | Hidrato de cloral (50 g) | |
| Wineski e English (1989) | Formaldeído (1,5 a 2%) | Fenoxietanol 1% diluído em água da torneira (200 l) |
| | Fenol (7,5%) | |
| | Metanol (1,0 a 1,5%) | |
| | Pentaclorofenato de sódio (1%) | |
| | Total de solução (24 l) | |
| Thiel (1992) | <u>Solução de Perfusão:</u> | Água da torneira aquecida (100) |
| | Solução de estoque (14300 ml) | Ácido Bórico (3) |
| | Solução de Clorocresol (500 ml) | (Mono) etilenoglicol (10) |
| | Sulfito de sódio (700 g) | Nitrato de amônia (10) |
| | Formol (300 ml) | Nitrato de potássio (5) |
| | | Solução de clorocresol (2) |
| | | Sulfito de Sódio (7) |
| | Formol (2) | |

Continuação.

| | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <u>Solução de Estoque:</u> Água da torneira quente (100) Ácido Bórico (3) Monoetilenoglicol (30) Nitrato de Amônia (20) Nitrato de Potássio (5) | Os componentes sem unidade específica de medida indicam valores volumétricos para líquidos e partes em peso corporal partes sólidos. Um mililitro é igual a um grama. |
| | <u>Solução de Clorocresol:</u> Monoetilenoglicol (10) 4-cloro-3-metilfenol (1) | |
| Thiel (1992) | <u>Solução Cavitária:</u> Solução de estoque (1000 ml) Solução de clorocresol (500 ml) Formol (850 ml) Sulfito de Sódio (500 g) Morfina (300 ml) Álcool isopropílico (3000 ml) | |
| | <u>Solução Cerebral:</u> Água de torneira (40) Mono-etileno-glicol (10) Álcool isopropílico (40) Formol (10) | |
| Pretorius (1996) | Formol (1,2 l) Etanol 96% (28 l) Glicerina (0,8 l) Água (8 l) Fenol (1,2 l) | Glicerina (250 ml) Fenol líquido 80% (250 ml) Água (500 ml) |
| Coleman & Kogan (1998) | Formol 37% (0,5 l) Fenol (0,2 l) Glicerina (0,5 l), Álcool isopropílico (4 l) Cloreto de sódio (20 kg) Água da torneira (29,8 l) | Armazenados na mesma solução de fixação, mantidos a 18 °C. |
| Majewski et al. (2003) | Líquidos iônicos | Líquidos iônicos |

Continuação.

| | | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Formol 40% | Formol 40% |
| Da Silva et al. (2004) (Solução de Klotz) | Cloreto de sódio Bicarbonato de sódio Hidrato de cloral Água | Cloreto de sódio Bicarbonato de sódio Hidrato de cloral Água |
| Rodrigues (2010) (Solução de Pick) | Formol 40% (50 ml) Água destilada (1000 ml) Sulfato de sódio (50 g) <u>Solução intermediária:</u> Álcool etílico 80% | Água destilada (1000 ml) Glicerol (600 ml) Acetato de potássio (300 g) |
| Al-Hayani et al. (2011) | Goma-laca seca (80 kg) Álcool 58%, (200 l) | Armazenados na mesma solução de fixação. |
| Janczyk et al. (2011a,) | Nitrito de sódio (23%) Etanol (30%) Água (23,9%) Pluriol® E 400 (20%) Óleo de orégano (0,1%) Ácido ascórbico (3%) | Armazenados na mesma solução de fixação, mantidos entre 4 a 6 °C |
| Hammer et al. (2012) | Glicerina (0,7 l/Kg) Etanol (5% em volume) | Timol (300,44 g) Etanol (1 l) Água (10 l) |
| Shi et al. (2012) | Formaldeído a 6% | Sal de tetraquil hidroximetil fosfônio – THP (15%) Solução tampão ácida (hidróxido de sódio, ácido cítrico e ácido clorídrico, com pH 4,3-6,5) (85%) Água deionizada |
| Benet et al. (2014) | Etanol (62,4%) Glicerol (17%) Fenol (10,2%) Formaldeído (2,3%) Água (8,1%) | Solução Fixadora (1 parte) Água (10 partes) Armazenado a 5 °C |
| Holewijn et al. (2017) | Fluido de fixação F4L® (4 l) Água (18 l) Formaldeído a 37% (0,3 l) | Líquido de preservação F4L® |

Conclusão.

| | | |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| | <u>Solução pré-fixação</u> Cloreto de benzalcônio 1% (300 ml) | Armazenados na mesma solução de fixação, mantidos a 4 °C. |
| Turan et al. (2017) | <u>Solução de Fixação:</u> Etanol 96%, (35 L) Sabão Líquido (55 L) Ácido cítrico (10 Kg) | |
| Luo et al. (2018) | Formaldeído (3,5%) Álcool (15%) Glicerina (1%) Cloreto de sódio (0,9%) Água bidestilada | Armazenados na mesma solução de fixação, mantidos a 4 °C. |
| Tamayo-Arango e Garzón-Alzete (2018) | Etanol industrial (85%) Glicerina (10%) Cloreto de benzalcônio (5% a partir de solução a 50%). | Mantidos em Etanol a 96% ou embrulhados em um saco plástico sobre a mesa de dissecação. |

Um aspecto importante para a conservação anatômica moderna é a manutenção das propriedades organolépticas reais, em especial a preservação da cor, textura e odor tecidual. Todas as técnicas e soluções de conservação listadas acima foram desenvolvidas em busca de procedimentos ótimos e preservação ideal. Avaliações da qualidade macroscópica dos tecidos foram realizadas por estes autores, uma vez que a técnica de conservação ou substâncias utilizadas podem ser capazes de promover modificações das características teciduais.

A tabela 2 apresenta uma comparação das diferentes técnicas de fixação e conservação em termos de origem do tecido conservado, da qualidade do tecido e do tempo de conservação que proporcionam.

Tabela 2 – Comparação das diferentes soluções de fixação e conservação em termos de tecido conservado, qualidade do tecido e tempo de conservação.

| Autor (ano) | Tecido | Qualidade do Tecido | Tempo de Conservação |
|--------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Pulvertaft (1950) | | Coloração semelhante a fresco. Textura semelhante a fresco. Odores não avaliados. | Não consta |
| Richins et al. (1963) | Humano | Coloração marrom avermelhada. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | 2 anos |
| Langner e Jackson (1966) | Animal | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores não avaliados. | 10 meses |
| Frolich et al. (1984) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | 5 anos |
| Kessler (1989) | Não consta | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura rígida. Odores não avaliados. | 1 mês |
| Wineski e English (1989) | Humano | Coloração não avaliada. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores não avaliados. | 3 anos |
| Thiel (1992) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | Mais de 1 ano |
| Pretorius (1996) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | Não consta |
| Coleman & Kogan (1998) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | 1 ano |
| Majewski et al. (2003) | Humano e Animal | Coloração não avaliada. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | 2 anos |
| Da Silva et al. (2004) | Animal | Coloração não avaliada. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | Não consta |

Continua.

Conclusão.

| | | | |
|--------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Rodrigues (2010) | Não consta | Coloração não avaliada. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | Não consta |
| Al-Hayani et al. (2011) | Humano | Coloração da pele pálida e das estruturas subcutâneas semelhantes ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores não avaliados. | 2 semanas |
| Janczyk et al. (2011a) | Animal | Coloração dos músculos escura e dos órgãos semelhante ao tecido fresco. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | 1 ano |
| Hammer et al. (2012) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos leves. | 1 ano |
| Shi et al. (2012) | Animal | Coloração não avaliada. Textura não avaliada. Odores irritantes e tóxicos ausente. | 2 anos |
| Benet et al (2014) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos intensos. | 1 ano |
| Holewijn et al. (2017) | Humano | Coloração semelhante ao tecido fresco. Textura rígida. Odores não avaliados. | 4 semanas |
| Turan et al (2017) | Animal | Coloração dos músculos e do fígado pálida. Textura semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | 1 ano |
| Luo et al. (2018) | Humano | Coloração não avaliada. Textura não avaliada. Odores não avaliados. | 1 ano |
| Tamayo-Arango e Garzón-Alzete (2018) | Animal | Coloração semelhante ao tecido fresco. Flexibilidade semelhante ao tecido fresco. Odores irritantes e tóxicos ausente. | Não consta |

Alguns destes autores também avaliaram a qualidade dos tecidos em nível histológico, apresentando resultados satisfatórios na maioria dos estudos (FROLICH et al., 1984; COLEMAN e KOGAN, 1998; MAJEWSKI et al., 2003; JANCZYK et al.,

2011; HAMMER et al, 2012; SHI et al., 2012; TURAN et al., 2017; LUO et al., 2018). Suas soluções de conservação revelaram boas propriedades de preservação, capazes de manter as características morfológicas celulares e teciduais dentro da normalidade, revelando resultados compatíveis com os observados nos tecidos conservados em soluções tradicionais. Alterações morfológicas microscópicas foram relatadas somente nos trabalhos publicados por Turan et al. (2017) e por Luo et al. (2018), contudo, estes achados não comprometem a qualidade de preservação de suas soluções.

A diversidade de soluções de fixação e conservação, utilizada pelos laboratórios de anatomia em todo o mundo, já foi constatada por Van der Eerden e Van Nie (1981). Em um levantamento internacional, mediante questionário, comprovaram que não há um método uniforme de preservação de materiais biológicos. A busca pelo “método de preservação ideal” continua sendo retratada na literatura especializada até os dias atuais, o que corrobora com os seus achados. Além disso, poucos são os trabalhos que avaliam a qualidade das soluções a nível macroscópico e microscópico simultaneamente (FROLICH et al., 1984; COLEMAN e KOGAN, 1998; MAJEWSKI et al., 2003; JANCZYK et al., 2011; HAMMER et al., 2012; SHI et al., 2012; TURAN et al., 2017), o que nos fez avaliar os dois parâmetros em nosso estudo.

2.4 COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO

2.4.1 Propriedades básicas

Os produtos químicos, constituintes das soluções fixadoras e conservadoras, visam à preservação morfoestrutural dos tecidos orgânicos, de modo a impedir o desenvolvimento de microorganismos patogênicos (BALTA et al., 2015). Os fluidos utilizados nos laboratórios de anatomia devem garantir uma conservação dos materiais biológicos em longo prazo (superior a 8-12 meses), juntamente com a manutenção da textura e da coloração o mais próximo possível do cadáver fresco (COLEMAN e KOGAM, 1998; BALTA et al., 2015). Conhecer os diferentes componentes químicos de uma solução e a forma como são categorizados permite analisar com maior propriedade seus efeitos sobre os tecidos, tanto em nível macroscópico quanto microscópico (MAYER, 2011). Por conseguinte, os

componentes de um fluido de embalsamamento podem pertencer às seguintes categorias:

- **Fixadores e Conservantes:** são substâncias químicas que impedem o desenvolvimento de fungos e bactérias saprófitas, modificando enzimas e lisinas corporais, garantindo a integridade dos tecidos após a morte (TOLOSA et al., 2003; MAYER, 2011). Uma boa fixação é alcançada com o menor tempo possível entre a morte do indivíduo e a fixação, garantindo contato da solução com todas as superfícies da peças (volume da mistura no mínimo 10 vezes maior que o volume do espécime) (CARDIFF et al., 2014). A escolha adequada da solução fixadora é outro requisito fundamental para se ter uma fixação efetiva, a qual pode ser realizada por perfusão ou por imersão (ALVES, 2002). Segundo Rodrigues (2010), os principais fixadores e conservantes utilizados no Brasil são os aldeídos (formaldeído) e os alcoóis (etanol).
- **Desinfetantes e Germicidas:** são produtos químicos que servem para eliminar microorganismos patogênicos (desinfetantes) e não patogênicos (germicidas) (PELCZAR et al., 1996). Pertencem a esta categoria os compostos de amônio quaternário (cloreto de benzalcônio) e o glutaraldeído (MAYER, 2011).
- **Agentes Modificantes:** intervêm nas reações químicas produzidas pelas soluções de fixação e de conservação. Também agem em fluidos de embalsamamento, monitorando a ação dos principais agentes destas soluções. Estão inclusos nesta categoria os umectantes, tampões e sais inorgânicos (MAYER, 2011).
- **Umectantes (agentes molhantes):** são substâncias utilizadas para hidratar os tecidos. Constituem esta classe o glicerol (glicerina), sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol e lanolina (MAYER, 2011).
- **Tampões:** são soluções que resistem a mudanças do potencial hidrogeniônico (pH) quando ácidos ou bases são adicionados (HARRIS, 2015). Nas soluções de embalsamamento o ácido bórico, fosfato de sódio e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) dissódico são utilizados para este fim (MAYER, 2011).
- **Sais Inorgânicos:** desempenham um papel importante na determinação das qualidades osmóticas da solução de embalsamamento (MAYER, 2011).

- **Anticoagulantes:** são adicionados ao fluido de embalsamamento para auxiliar na dissolução de coágulos sanguíneos e tornar o sangue menos viscoso. São exemplos o citrato de sódio, oxalato de sódio e EDTA dissódico (MAYER, 2011).
- **Tensioativos:** são substâncias que diminuem a coesão molecular dos líquidos presentes no fluido de embalsamamento, permitindo sua difusão por vasos sanguíneos de pequeno calibre. O cloreto de benzalcônio, o lauril sulfato de sódio e o sulfonato de alquilbenzeno linear são exemplos de tensioativos (MAYER, 2011).
- **Corantes:** são agentes que atribuem uma coloração definida ao fluido de embalsamamento. Podem ser a eosina, o vermelho ponceau, a eritrosina e o amaranto (MAYER, 2011).
- **Agentes desodorizantes:** diminuem ou mascaram o odor bruto da solução, conferindo ao fluido de embalsamamento um aroma característico agradável. Como exemplos destes agentes temos o benzaldeído, o óleo de craco, o óleo de sassafrás e o salicilato de metila (MAYER, 2011).
- **Veículos (diluentes):** são adicionados às soluções de embalsamamento desempenhando a função de solvente para diversos produtos químicos componentes da solução. Podem ser a água, o álcool metílico e o glicerol (MAYER, 2011).

2.5 COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE FIXAÇÃO E DE CONSERVAÇÃO EM ESTUDO

Os produtos químicos que compõem as soluções de fixação e de conservação em estudo distribuem-se nas diferentes categorias (fixadores, desinfetantes, germicidas, tensoativos, umectante e veículos), com mecanismos de ação específicos nos tecidos. Destacamos na tabela 3 os componentes destas soluções, sua ação nos tecidos, vantagens e desvantagens de suas utilizações.

Tabela 3 – Mecanismo de ação, vantagens e desvantagens dos componentes químicos das soluções de fixação e conservação em estudo.

| Químico | Ação nos tecidos | Vantagens | Desvantagens |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Formaldeído (H ₂ CO) | Fixação mediante ligações cruzadas de pontes de metileno com cadeias peptídicas (FOX et al., 1985). | Baixo custo (RODRIGUES, 2010; TANG et al., 2009). Preservação estrutural em longo prazo (RODRIGUES, 2010; TANG et al., 2009). Rápida penetração no tecido (6 mm em 12 h) (RODRIGUES, 2010; TANG et al., 2009). Antisséptico (TANG et al., 2009; BALTA et al., 2015). Bactericida (TANG et al., 2009; BALTA et al., 2015). Fungicida (TANG et al., 2009; BALTA et al., 2015). Inseticida (TANG et al., 2009; BALTA et al., 2015). | Rigidez tecidual (HUBBELL et al., 2002; KERCKAERT, 2008) Aumento do peso (HUBBELL et al., 2002; KERCKAERT, 2008) Escurecimento tecidual (HUBBELL et al., 2002; KERCKAERT, 2008) Vapores irritantes e tóxicos (HUBBELL et al., 2002; KERCKAERT, 2008; VIEGAS et al., 2010) Efeitos carcinogênicos (IARC, 2008; NTP, 2010) Efeitos genotóxicos (NIELSEN e WOLKOFF, 2010) |
| Alcool etílico (CH ₃ CH ₂ OH) | Desnatura as proteínas reversamente, afetando o revestimento hidratado das estruturas terciárias, desfazendo as pontes de hidrogênio (HAMMER et al., 2011). | Alta capacidade de penetração (TOLOSA, 2003; HOLDA, 2017). Preserva as propriedades ultraestruturais (VAN ESSEN, 2010; MOELANS et al., 2011; ZANINI, 2012) Livre de vapores tóxicos (VAN ESSEN, 2010). Agente anti-infeccioso (RODRIGUES, 2010; BRENNER, 2014) | Rigidez excessiva (MOELANS et al., 2011; SOMPURAM, 2004) Ressecamento (MOELANS et al., 2011; SOMPURAM, 2004) Alterações cromáticas (MOELANS et al., 2011; SOMPURAM, 2004) Vapores irritantes (MOELANS et al., 2011; SOMPURAM, 2004) Volátil e inflamável (MOELANS et al., 2011; SOMPURAM, 2004) |

Continua.

Conclusão.

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Glicerol (C₃H₈O₃)</p> | <p>Desidrata os tecidos e removendo grande parte da água intracelular, sem alterar as concentrações iônicas das células, fixando assim as estruturas e mantendo sua integridade (RODRIGUES, 2010; PIGOSSI, 1964).</p> | <p>Hidratação tecidual (DA SILVA, 2007; BLOCK, 2001). Maciez tecidual (DA SILVA, 2007; BLOCK, 2001). Flexibilidade tecidual (DA SILVA, 2007). Sem efeitos nocivos (SILVA, 2011).</p> | <p>Fraco antisséptico (RODRIGUES, 2010; PIGOSSI, 1964). Alterações cromáticas (CARVALHO et al., 2013) Custo elevado (CARVALHO et al., 2013)</p> |
| <p>Cloreto de Benzalcônio (C₉H₁₃NRCI)</p> | <p>Altera a permeabilidade da membrana, inativando enzimas e causando o vazamento de material citoplasmático através da destruição da parede celular de fungos, e bactérias, além de combater alguns tipos de virus (FAZLARA et al., 2012; GARDNER et al., 2000).</p> | <p>Ação rápida e de longa duração (GARCIA e CABO, 2018). Soluções comerciais de concentrações baixas e atóxicas (BLOCK, 2001). Inodoro (FAZLARA et al., 2012) Não corrosivo (FAZLARA et al., 2012) Armazenamento estável (FAZLARA et al., 2012)</p> | <p>Tóxico em soluções concentradas (BLOCK, 2001).</p> |

Com base no exposto, este estudo busca avaliar uma solução alternativa de conservação contendo glicerina, álcool, desinfetante com cloreto de benzalcônio como princípio ativo e água que possibilite uma preservação estrutural dos tecidos em longo prazo, mantendo as características organolépticas e microscópicas o mais semelhante possível ao tecido fresco. Este fluido também tem por objetivo impedir a disseminação e o crescimento de fungos, bactérias e vírus, além de ser uma alternativa que minimize a emissão de vapores tóxicos e facilite o armazenamento e a manipulação dos materiais biológicos utilizados nos laboratórios de anatomia.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, BARBARA. **Egyptian mummies**. 2. ed. Buckinghamshire: Shire publications, 1998.

AIRD, WILLIAM C. Discovery of the cardiovascular system: From Galen to William Harvey. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 1, p. 118-129, Jul. 2011.

AJAYI, ITOPA E.; SHAWULU; GHAJI, ABDURRAHMAN; OMEIZA, GABRIEL K.; ODE, OKWOCHÉ J. Use of formalin and modified gravity-feed embalming technique in veterinary anatomy dissection and practicals. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 3, n. 6, p. 79-81, Out. 2011.

AJMANI, M. L. **Embalming: Principles and Legal Aspects**. 2 ed. Nova Delhi: Jaype Medical Publichers, 2009.

AL-HAYANI, A. A.; HAMDY, R. M.; EI-AZIZ, G. S. A.; BADAWOUD, M. H.; ALDAQAL, S.; BEDIR, Y. Shellac: A non-toxic preservative for human embalming techniques. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 12, p. 1561–1567, Dez. 2011.

ALLISON, MARVIN J.; FOCACCI, GUILLERMO; ARRIAZA, BERNARDO; STANDEN, VIVIEN; RIVERA, MARIO; LOWENSTEIN, JEROLD M. Chinchorro, momias de preparación complicada: Métodos de momificación. **Chungará**, n. 13, p. 55–173, Nov. 1984.

ALVES, A. Análises histopatológicas: porque demoram os resultados. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Oeiras. **Livro do Congresso de Ciências Veterinárias – Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**. Oeiras, 2002. p. 239-247.

ANDERSON, STEPHEN D. Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory. **Clinical Anatomy**, v. 19, n. 1, p. 8-11, Jan. 2006.

BALTA, JOY Y.; CRONIN, MICHAEL; CRYAN, JOHN F.; O'MAHONY, SIOBHAIN M. Human preservation techniques in anatomy: a 21st century medical education perspective. **Clinical Anatomy**, New York, v. 28, n. 6, p. 725–734, Jun. 2015.

BARTON, DESMOND P. J.; DAVIES, CERI D.; MAHADEVAN, VISHY; DENNIS, LEE; ADIB, TANIA; MUDAN, SATVINDER; SOHAIB, ASLAM; ELLIS, HAROLD. Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop. **Gynecologic Oncology**, v. 113, n. 3, p. 352-356, Abr. 2009.

BATRA, ARVINDER P. S.; KHURANA, BALJIT S.; MAHAJAN, ANUPAMA; SEEMA; KAUR, NAVPREET. Embalming abd other nethods of dead body

preservation. **International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine**, New York, v. 12, n. 3, p. 15-19, Abr. 2010.

BENET, ARNAU; RINCON-TORROELLA, JORDINA; LAWTON, MICHAEL T.; SÁNCHEZ, JOSÉ JUAN GONZÁLEZ. Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. **Journal of Neurosurgery**, v. 120, n.5, p. 1229-1237, Mai. 2014.

BENKHADRA, MEHDI; GÉRARD, JULIEN; GENELOT, DENIS; TROUILLOU, PIERRE; GIRARD, CLAUDE; ANDERHUBER, FRIEDRICH; FEIGL, GEORG. Is Thiel's embalming method widely known? A world survey about its use. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 33, n. 4, p. 359-363, Mai. 2011.

BINAWARA, B.; RAJNEE, C.S.; MATHUR, K.; SHARMA, H.; GOYAL, K. Acute effect of formalin on pulmonary function tests in medical students. **Pakistan Journal of Physiology**, n. 6, v. 2, p. 8-10, 2010.

BLOCK, SEYMOUR STANTON. **Disinfection sterilization, and preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkind; 2001.

BLUM, J. Formol als Konservierungsflüssigkeit. **Zoologischer Anzeiger**, Frankfurt, v. 16, n. 1, p. 450-452, Out. 1893.

BRADBURY, S. A.; HOSHINO, K. An improved embalming procedure for long-lasting preservation of the cadaver for anatomical study. **Acta Anatomica**, v. 101, n. 2, p. 97-103, Fev. 1978.

BRENNER, ERICH. Human body preservation – old and new techniques. **Journal of Anatomy**, United Kingdom, v. 224, n. 3, p. 316-344, Mar. 2014.

BUESA, RENÉ J. Histology without formalin? **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 12, n. 6, p. 387-396, Dez. 2008.

CARDIFF, ROBERTO D.; MILLER, CLARAMAE H.; MUNN, ROBERT J. Mouse Tissue Fixation. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, n.5, p. 521-524, Mai. 2014.

CARVALHO, YURI K.; ZAVARIZE, KELEN C.; NEDEIROS, LUCIANA dos S.; BOMBANATO, PEDRO 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, Jan. 2013.

COLEMAN, RAYMOND; KOGAN, IGOR. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. **Journal of Anatomy**, United Kingdom, v. 192, n. 3, p. 443-446, 1998.

DA SILVA, ROSANE MARIA GUIMARÃES; MATERA, JULIA MARIA; RIBEIRO, ANTÔNIO AUGUSTO COPPI MACIEL. Preservation of cadavers for surgical technique training. **Veterinary Surgery**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 606-608, Nov. 2004.

DA SILVA, ROSANE MARIA GUIMARÃES; MATERA, JULIA MARIA; RIBEIRO, ANTÔNIO AUGUSTO COPPI MACIEL. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of living animals. Is that an academic paradox? **Anatomy Histology Embryol**, v. 36, n. 3, p. 220-224, Jul. 2007.

EZUGWORIE JOSEPH; ANIBEZE, CHIKE; OZOEMENA, FRANCIS. Trends in the Development of Embalming Methods. **Internet Journal Alternative Medicine**, v. 7, n. 2, p. 01-06, Jul. 2009.

FAZLARA, ALI; EKHTELAT, MARYAM. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. **American-Eurasian Journal of Agricultural Environmental Sciences**, v. 12, n. 1, p. 23-29, Jan. 2012.

FERREIRA, AURÉLIO BUARQUE DE HOLANDA. **Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa**. 5ª ed. Paraná: Positivo; 2014. Conservação; p. 42.

FERREIRA, AURÉLIO BUARQUE DE HOLANDA. **Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa**. 5ª ed. Paraná: Positivo; 2014. Preservação; p. 157.

FIUZA, SÉRGIO LUIZ DA ROCHA; MARCHIORO, CLAYTON MAURO. *Tanatopraxia Teoria, Prática e Legislação*. 1. ed. Belo Horizonte, 2010.

FOX, CECIL H.; JOHNSON, FRANK B.; WHITING, JOHN; ROLLER, PETER P. Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845-853, Ago. 1985.

FROLICH, KARIN W.; ANDERSON, LING MERETE; KNUTSEN, ARNE; FLOOD, PER R. Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. **Anatomical Record**, v. 208, n. 2, p. 271-278, Fev. 1984.

GAHR, BRITTA; DREWITZ, MAREN; VÖTH, ROCHELLE; RITZ-TIMME, STEFANIE. Quality improvement of fingerprints of decayed corpses by local thanatopractical processing (Thanatoprint). **GMS Interdisciplinary Plastic and Reconstructive Surgery DGPW**, v. 2, n. ?, p. 1-5, Nov. 2013.

GAJVORONSKIJ, IVAN VASILEVICH; GAJVORONSKIJ, ALEKSEJ IVANOVICH; REZNIK, OLEG NIKOLAEVICH; BAGNENKO, SEREJ FEDOROVICH; MAKEEV, BORIS LAVROVICH. **Method of embalming corpses for training in doctors skills of extraction of donor organs for transplantation**. RU2479998-C2, 20 Jul. 2012, 27 Abr. 2013.

GARCIA, MARIAM R.; CABO, MARTA L. Optimization of *E. coli* Inactivation by Benzalkonium Chloride Reveals the Importance of Quantifying the Inoculum Effect on Chemical Disinfection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 26, Jun. 2018.

GARDNER, WILLIAM P.; GIRARD, JAMES E. Analysis of Common Household Cleaner-Disinfectants by Capillary Electrophoresis. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 10, p. 1335-1338, Out. 2000.

HAMMER, NIELS; LÖFFLER, SABRINE; FEJA, CHRISTINE; BECHMANN, INGO; STEINKE, HANNO. "Substitution of Formaldehyde in Cross Anatomy Is Possible." **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 7, p. 610-611, Abr. 2011.

HAMMER, NIELS; LÖFFLER, SABRINE; FEJA, CHRISTINE; SANDROCK, MARA; SCHMIDT, WOLFGANG; BECHMANN, INGO; STEINKE, HANNO. Ethanol-Glycerin Fixation with Thymol Conservation: A Potential Alternative to Formaldehyde and Phenol Embalming. **Anatomical Sciences Education**, Malden, v. 5, n. 4, p. 225-233, Ago. 2012.

HARRIS, DANIEL C. **Quantitative Chemical Analysis**. 9. ed. New York: Macmillan Learning, 2015.

HILDEBRAND, Milton **Anatomical Preparations**. 1. ed. Los Angeles: University of California Press, 1968.

HOLDA, MATEUSZ KRYSZTIAN; KLIMEK-PITROWSKA, WIESTAWA; KOZIEJ, MATEUSZ; TYRAK, KAMIL; HOLDA, JAKUB Penetration of formaldehyde based fixatives into heart. **Folha Medica Cracoviensia**, v. 57, n. 4, p. 63–70, Jan. 2017.

HOLEWIJN, RODERICK M.; FARAJ, SAYF S. A.; KINGMA, IDSART; VAN ROYEN, BAREND J.; KLEUVER, MARINUS DE; VAN DER VEEN, ALBERT JAN. Spinal biomechanical properties are significantly altered with a novel embalming method. **Journal of Biomechanics**, v. 55, n. 2, p. 144-146, Fev. 2017.

HUBBELL, D. S.; DWORNIK, J. J.; ALWAY, S. E.; ELIASON, R.; NORENBURG, R. E. Teaching Gross Anatomy Using Living Tissue **Clinical Anatomy**, v. 15, n. 2, p. 157-159, Fev. 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. IARC Monographs on the Evolution of Carcinogenic Risk to Humans**. Lion: IARC, v. 88, p. 478, 2006. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/mono88.pdf>>. Acesso em: 07 mar.. 2017.

IJPMA, FRANK F. A.; VAN GULIK, THOMAS M. "Anatomy Lesson of Frederik Ruysch" of 1670: A Tribute to Ruysch's Contributions to Lymphatic Anatomy. **World Journal of Surgery**, v. 37, n. 8, p. 1996-2001, Ago. 2013.

JANCZYK, PPAWEL; WEIGNER, JANET; LUEBKE-BECKER, ANTINA; KAESSMEYER, SABINE; PLENDL, JOHANNA. Nitrite pickling salt as an

alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy – a study based on histo- and microbiological analyses. **Annals of Anatomy**, v. 193, n. 1, p. 71-75, Fev. 2011a.

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS; CARNEIRO, JOSÉ. **Histologia Básica Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KESSLER, R. "Farberhaltende Fixations- und Konservierungstechnik für Feuchtpräparate." **Der Präparator**, v. 35, n. 4, p. 161-170, 1989.

KERCKAERT, INGRID; HOOF, TOM VAN; PATTYN, PIET; D'HERDE, KSTHARINA. Endogent: Centre for Anatomy and Invasive Techniques **Anatomy Teaching**, v. 2, p. 28-33, Out. 2008.

KLEISS, EKKEHARD Y.; SIMONSBERGER, PETER. **La parafinización como método morfológico**. Mérida: Tallares Gráficos Universitários, 1964.

KURZ, H. "Die Entwicklung moderner Konservierungsmethoden." **Der Präparator**, v. 24, n. 1, p. 180-187, 1978.

LANGNER, RALPH R.; JACKSON, LAKE. **Preservation of animal specimens**. 310,87216, 23 Set. 1963, 02 Ago. 1966.

LLAGOSTERA, AGÚSTIN M. Patrones de momificación Chinchorro en las colecciones Uhle y Nielsen. **Chungará**, v. 35, n. 1, p. 5–22, Mai. 2003.

LOMBARDEIRO, M.; YLLERA, MARÍA DEL MAR; COSTA-E-SILVA, ANTÓNIO; OLIVEIRA, MARIA JOÃO R.; FERREIRA, P. G. Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde-free embalming method for veterinary gross anatomy. **Journal of Anatomy**, v. 231, n. 2, p. 309-317, Ago. 2017.

LUO, JIA; ZHOU, HONGKANG; RAO, LIBING; LIU, TIANXIONG; LIU, LIAN JING; CHEN, YANLIANG; WANG, JIANLONG; HU TU; LIU, SHIQI; CHEN, DAN; WANG, HUI; ZENG, LEPING; HUANG, JU-GANG. A New Method of Biostorage and Biopreservation for Human Amputated Extremities. **Biopreservation and biobanking**, v. 16, n. 4, p. 251-257, Ago. 2018.

MACDONALD, GORDON J.; MACGREGOR, DOUGLAS B. Procedures for embalming cadavers for the dissecting laboratory. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 215, n. 4, p. 363-365, Set. 1997.

MAJEWSKI, P.; PERMAK, A.; GRZYMISLAWSKI, M.; IWANIK, K.; PERNAK, J. Ionic liquids in embalming and tissue preservation. Can traditional formalin-fixation be replaced safely?. **Acta Histochemica**, v. 105, n. 2, p. 135-142. Fev. 2003.

MARQUET, PABLO A.; SANTORO, CALOGERO M.; LATORRE, CLAUDIO; STANDEN, VIVIEN G.; ABADES, SEBASTIÁN, R.; RIVADENEIRA, MARCELO M.; ARRIAZA, BERNARDO; HOCHBERG, MICHAEL E. Emergence of social

complexity among coastal hunter-gatherers in the Atacama Desert of northern Chile. **PNAS**, v. 109, n. 37, 14754–14760. Set. 2012

MAYER ROBERT. G. **Embalming: History, Theory and Practice**. 5. ed. California: McGraw-Hill Education, 2011.

MCKONE, H. T. Embalming – chemistry for eternity. **ChemMatters**, v. 17, n. 4, p. 12-13, Dez. 1999.

MESSMER, CAROLINE; KELLOGG, RYAN T.; YIXIN, ZHANG; BAIAL, ANDRESSA; LEIWEKE, CLINTON; ,ARCUS, JEFFREY R.; LEVIN, L. SCOTT; ZENN, MICHAEL R.; ERDMANN, DETLEV. A Technique to Perfuse Cadavers That Extends the Useful Life of Fresh Tissues: The Duke Experience. **Anatomical Sciences Education**. v. 3, n. 4, p. 191-194. Ago, 2010.

MILLS, PETER R. **Preparation and Presentation of Anatomical Specimens at the University of Sydney**. Sydney: Anatomy Department, University of Sydney, 2010. Disponível em: <<http://fliphtml5.com/mlay/rbhb/basic>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

MISHRA, SUNITI RAJ; PASSEY, JIGYASA; SINGH, RAHUL; SINGH, RAVEENA; SUSHOBHANA; SINHA, PRIYAMKA. Embalming Fluid – modified Composition for hot and humid places. **International Journal of Anatomy and Research**, v. 4, n. 3, p. 2531-35. Jul. 2016

MITFORD, JESSICA. **The American way of death: revised**. Reprint. ed. New York: Vintage, 2000.

MOELANS, CATHY B.; OOSTENRIJK, DAPHNE; MOONS, MICHIEL J.; VAN DIEST, PAUL J. Formaldehyde substitute fixative: Effects of muscle acid preservation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 11, p. 960-967, Nov. 2011.

NIELSEN, G.; WOLKOFF, P. Cancer effects of formaldehyde: a proposal for an indoor air guideline value. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 6, p. 423-446, Jun. 2010.

NTP. National Toxicology Program. **Final Report on Carcinogens Background Document for Formaldehyde**. Research Triangle Park. p. 552, 2010. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/2009/november/formaldehyde_bd_final.pdf Acessado em: 08 mar. 2017.

NUNNAMAKER, ALBERT JOHN; DHONAU, CHARLES O. **Anatomy and embalming. A treatise on the science and art of embalming** 1.ed.: Createspace Pub, 2015.

OLIVEIRA, SONIA VALLE WALTER BORGES DE; ZAIAT, MARCELO. Gerenciamento de soluções de formol em laboratório de anatomia. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, São Paulo, n. 1, p. 18-25, Out. 2004.

O'SULLIVAN, E.; MITCHELL, B. S. An improved composition for embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching in the United Kingdom. **Journal of Anatomy**, v. 182, n. 2, p. 295–297, Abr. 1993.

PAPAGEORGOPOULOU, CHRISTINA; SHVED, NATALLIA; WANEK, JOHAN; RUHLI, FRANK J. Modeling Ancient Egyptian Mummification on Fresh Human Tissue: Macroscopic and Histological Aspects. **The Anatomical Record**, v. 298, n. 6, p. 974-987, Jun. 2015.

PELCZAR MICHAEL J.; CHAN, E. C. S; KING, NOEL R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed., v. 1. São Paulo: Makron Books, 1996.

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

PINEDA, FERNANDO ALCÓN; YUON, MARC SASTRE. **Manual Tanatopraxia Prática**. 1. ed. Puigcerdà: Albay Editores, 2004.

PRETORIUS, W. F. Formula for embalming of cadavers for student dissection and the modification thereof for plastination. **Journal International Society Plastination**, Brisbane, v. 10, n. 1, p. 35-36, Jul. 1996.

PRETORIUS, W. F. Formula for embalming of cadavers for student dissection and the modification thereof for plastination. **Journal International Society Plastination**, Brisbane, v. 10, n. 1, p. 35-36, Jul. 1996.

PULVERTAFT, R. J. V. Museum techniques; a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 3, n. 1, p. 1-23, Fev. 1950.

REVE, JOZIEN J. DRIESSEN-VAN HETD. **De Kunstkamera van Peter de Grote: De Hollandse inbreng, gereconstrueerd uit brieven van Albert Seba en Johann Daniel Schumacher uit de jaren 1711–1752**. Amsterdam: Hilversum Uitgeverij Verloren. 2006.

RICHINS, CALVIN A.; ROBERTS, EUGENE C.; ZEILMANN, JOSEPH A. Improved Fluids For Anatomical Embalming and Storage. **The Anatomical Record**, v. 146, n. 3, p. 241-243, Jul. 1963.

RIFKIN, BENJAMIN A.; ACKERMAN, MICHAEL J.; FOLKENBERG, JUDITH F. **Human Anatomy: A visual history from the renaissance to the digital age**. 1. ed. New york: Abrams, 2011.

RODRIGUES, HIKDEGARDO. **Técnicas anatômicas**. 4. ed. Vitória: GM. Gráfica e Editora, 2010.

SAEED, M.; RUFAL, A.; ELSAYED, S. Mummification to Plastination – Revisited. **Saudi Medical Journal**, v. 22, n. 11, p. 956-959, Nov. 2001.

SHI, KAIQI.; SHAO, SHUANGXI; YIN, WEIGANG. An improved non-formaldehyde tissue preservative. **Adv Mat Res**, v. 356, p. 360-363, Out. 2012.

SILVA, N. A.; GALVÃO, A. P. O.; FRAGA, K. B.; OLIVEIRA, R. G.; BARBOSA, R. F.; CAMPINA, R. C. F.; SANTOS, T. R.; MAGALHÃES, C. P. Comparative study between two techniques using a glycerin in the conservation of central nervous system. **Journal of Morphology Science**, v. 28, n. 4, p. 280-282, 2011.

SOMPURAM, S.; VANI, K.; MESSANA, E.; BOGEN, S. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, n. 2, p. 190-199, Fev. 2004.

STRUB, CLARENCE G.; FREDERICK, LAWRENCE. G. **The Principles and Practice of Embalming**. 5. ed. Dallas: Professional Training, 1989.

TANG, XIAOJIANG; BAI, YANG; DUONG, ANH; SMITH, MARTYN T.; LI, LAIYU; ZHANG, LUOPING. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. **Environmental International**, v. 35, n. 8, p. 1210-1224, Nov. 2009.

TAMAYO-ARANGO, LYNDA; GARZÓN-ALZETE. ANDERSON. Preservation of Animal Cadavers with a Formaldehyde-free Solution for Gross Anatomy; *Journal of Morphological Sciences*, v. 35, n. 2, p. 136-141, Jul. 2018.

THIEL, WALTER. Die Konservierung ganzer Leichen in natürlichen Farben. **Annals of Anatomy**, v. 174, n. 3, p. 185-195, Jun. 1992.

TOLOSA, E.; RODRIGUES, C.; NETO, A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003, 329 p.

TROMPETTE, PASCALE; LEMONNIER, MÉLANIE. Funeral embalming: the transformation of a medical innovation. **Science e Technology Studies**, v. 22, p. 9-30, Jan. 2009.

TURAN, ERKUT; GULES, OZAY; KILIMSI, FIGEN SEVIL; KERA, MEHMET ERKUT; DILEK, OMER GURKAN; SABANCI SEYYID SAID; TATAR, MUSA. The mixture of liquid foam soap, ethanol and citric acid as a new fixative-preservative solution in veterinary anatomy. **Annals of Anatomy**, v. 209, p. 11-17, 2017.

VAN DAM, A. J.; VAN MUNSTEREN, J. C.; DERUITER, M. C.; 2014. Fix for life: the development of a new embalming and fixation method to preserve life-like morphology. **The FASEB Journal**, v.29, n.1, Abr. 2015.

VAN DER EERDEN, W. J.; VAN NIE, C. J. A method to eliminate free formalin from embalmed human bodies. **Acta Morphologica Neerland-Scandinavia**, v. 10, n. 4, p. 307-309. Dez. 1981.

VAN ESSEN, H. F.; VERDAASDONK, M. A. M.; ELSHOF, S. M.; DE WEGER, R. A.; VAN DIEST, P. J. Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: Influence on immunohistochemistry. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 12, p. 1090-1094, Dez. 2010.

VIEGAS, SUSANA; LADEIRA, CARINA; NUNES, CARLA; MALTA-VACAS, JOANA; GOMES, MÁRIO; BRITO MIGUEL; MEDONÇA, PAULA; PRISTA, JOÃO. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, Londres, v. 5, n. 25, p. 1-8, Ago. 2010.

VON HAGENS, GUNTHER. Impregnation of soft biological specimens with thermosetting resins and elastomers. **The Anatomical Record**, v. 194, n. 2, p. 247-256, Jun. 1979.

VON HAGENS, G.; WHALLEY, A. **The original exhibition of real human bodies**. Heidelberg: Arts & Sciences, 2009. 280 p.

WINESKI, L. E.; ENGLISH, A. W. Phenoxyethanol as a nontoxic preservative in the dissection laboratory. **Acta Anatómica**, v. 136, n. 2, p. 155-158, Fev. 1989.

ZANINI, CRISTINA; GERBAUDO, ELISA; ERCOLE, ELISABETTA; VENDRAMIN, ANNA; FORNI, MARCO. Evaluation of commercial and three home-made fixatives of substitution of formalin: A formaldehyde-free laboratory is possible. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 11, n. 1, p. 11-59, Set. 2012.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de uma solução química alternativa na conservação de peças anatômicas (blocos de tecidos biológicos cervicais - laringes e músculos infra-hióideos de suínos) em laboratório de anatomia.

4.2 Objetivos Específicos

- Comparar as características organolépticas (cor, textura, odor de decomposição, odor da solução e irritação das mucosas) entre hemiblocos de tecidos biológicos cervicais submetidos à técnica de fixação e conservação em solução padrão (GC), e fixados em solução padrão e conservados em solução alternativa (GE) em três fases distintas: antes da fixação (fase 1), após 1 mês de fixação em solução padrão (fase 2) e após 12 meses de conservação em solução padrão ou alternativa (fase 3);
- Avaliar comparativamente, em nível histológico, o estado de conservação tecidual, com base no grau de autólise celular de fragmentos do músculo esterno-hióideo submetidos à técnica de fixação e conservação em solução padrão (GC), e fixados em solução padrão e conservados em solução alternativa (GE) em três fases distintas: antes da fixação (fase 1), após 1 mês de fixação em solução padrão (fase 2) e após 12 meses de conservação em solução padrão ou alternativa (fase 3);
- Avaliar comparativamente, em nível histológico, o estado de conservação tecidual, com base no grau de autólise celular de fragmentos da cartilagem epiglote e do tecido epitelial associado submetidos à técnica de fixação e conservação em solução padrão (GC), e fixados em solução padrão e conservados em solução alternativa (GE) em três fases distintas: antes da fixação (fase 1), após 1 mês de fixação em solução padrão (fase 2) e após 12 meses de conservação em solução padrão ou alternativa (fase 3);
- Comparar o estado de conservação tecidual em nível microscópico e as características organolépticas entre os hemiblocos conservados em solução padrão (GC) e alternativa (GE), na fase 3 do estudo.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 Manuscrito

Efficacy of an alternative chemical solution for the preservation of anatomical pieces. Será submetido à revista, Annals of Anatomy, cujas normas para a publicação estão no link:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/701751?generatepdf=true

2017 Impact Factor: 1,852

**EFFICIENCY OF AN ALTERNATIVE CHEMICAL SOLUTION FOR
THE PRESERVATION OF ANATOMICAL PIECES**

Leonardo Jung^{a, b} (✉) Taís Malysz^b; Paula Rigon da Luz Soster^b; Eduardo
Cambuzzi^b; David Driemeier^c; Douglas Fabiano Lenz Nemos^b; Maikel Rosa
Oliveira^b; Geraldo Pereira Jotz^{a, b}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Faculdade de Veterinária (FAVET), Setor de Patologia Veterinária (SPV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

(✉) Leonardo Jung

Rua Sarmento Leite, 500

Zip code:90035-190

Porto Alegre - RS - Brazil

Phone: (55-51) 33083146

E-mail: leofj002@yahoo.com.br

Abstract

Chemical preservation solutions are fundamental for the maintenance of the morphostructural characteristics of tissues after death. The goal of this study was to evaluate the efficiency of an alternative chemical solution without the use of formalin for the preservation of anatomical pieces. Twenty hemiblocks of biological cervical tissues (larynxes and infra-hyoid muscles) were gathered of male swine (*Sus scrofa domestica*) and subjected to standard solution fixation procedures and subsequent preservation in standard solution (formalin 10%) in the control group (CG) or alternatively (ethyl alcohol, glycerin, water and disinfectant) in the experimental group (EG). Evaluations of organoleptic characteristics and tissue conservation status based on cellular autolysis degrees were made immediately after the slaughter of the animals (phase 1), after one month of fixation in a standard solution (phase 2) and after 12 months of preservation in standard or alternative solution (phase 3). The organoleptic evaluation was based on the macroscopic characteristics of the material according to the color, texture, decomposition odor, solution odor and mucosal irritation. Based on cellular autolysis degrees, the preservation status were classified as excellent (A), good (B), satisfying (C), unsatisfying (D) and tissue in autolysis (E). The data were presented in the form of frequency and percentage and statistically analyzed for comparisons among phases and groups ($p < 0,05$). The organoleptic evaluation did not show any alteration in tissues during phase 1. They presented themselves as pale and rigid in phases 2 and 3 ($p < 0,05$ vs phase 1) without showing difference between groups ($p > 0,05$). No decomposition odor was noticeable during all 3 phases for both groups. In groups CG (phase 2 and 3) and EG (phase 2), the solution odor and the mucosal irritation were classified as non-tolerable. In phase 3, EG presented a tolerable solution odor with no mucosal irritation ($p < 0,05$ vs phase 1;2 and vs CG). In phase 1, 85% of the muscle, 100% of the cartilage and 95-100% of the epithelial tissue samples presented excellent tissue preservation (A). The remaining percentage received a good preservation classification (B). In phase 2 and 3, the muscle tissue was identified with 5 to 10% of samples classified as satisfying (C) generating a significant difference relating with the results of phase 1 ($p < 0,05$). In these phases, the state of preservation of the cartilage and epithelial tissue samples were kept. Within these parameters, no significant differences were found comparing both groups. In conclusion, the alternative preservation solution showed itself efficient to maintain the macroscopic characteristics of the anatomical pieces, same as the standard solution. Moreover, the solution presented a tolerable odor with no mucosal irritation and kept an adequate tissue consistency, supporting the manipulation and dissection of the anatomical pieces.

Keywords: Alternative solution; preservative; anatomical pieces; ethyl alcohol; glycerin; disinfectant.

1. INTRODUCTION

The humid preservation is one of the most traditional and important techniques for the maintaining of biological material in anatomy laboratories. Preserved specimens in this method produce informative objects of demonstration, that many times approximate their tissue characteristics as the ones observed in fresh corpses (Albrecht, 1988).

Dry preservation methods (Papageorgopoulou et al., 2015), or by inclusion and impregnation of thermosetting substances (Von Hagens, 1979), are costly, expensive and modify the organoleptic properties of tissues (Schallenberg, 1972; Prasad et al., 2015). In this way, the practices of humid preservation became indispensable and wide utilized in anatomy labs until nowadays (Van Dam et al., 2015; Turan et al., 2017; Luo et al., 2018; Tamayo-Arango e Garzón-Alzete, 2018).

One of the first forms of humid preservation was the immersion of corpses in honey, recommended by the Babylonians (Meckl, 2004). The formalin discovery brought substantial benefits to this method becoming the landmark of modern anatomical conservation (Binawara et al., 2010). As a result of its action on the tissues, ranging from effects in the reactions of protein denaturation (Mason and O'Leary, 1991), to antioxidant activity (Turan et al., 2017) and microbial disinfection capacity (Tang et al., 2009; Balta et al., 2015), the formalin became an indispensable ingredient in the fixation and preservation solutions utilized in anatomy laboratories around the world (Oliveira and Zaiat, 2004; Benkhadra et al., 2011). However, corpses and pieces preserved in formalin presented excessive tissue rigidity, loss of texture, consistency and coloring (Barton et al., 2009), emitted toxic fumes of carcinogenic potential (Binetti et al., 2006; IARC, 2006; NTP, 2010) and promote irritating effects on the upper airway, ocular mucosa and skin (Viegas et al., 2010; Wolkoff and Nielsen, 2010).

Due to the harmful effects to human health and environment, as well as organoleptic modifications produced, several humid techniques and formulations are being developed in order to decrease formalin concentrations, minimizing damage and producing specimen with more realistic tissue characteristics (Brenner, 2014; Balta et al., 2015).

In 1992, Thiel presented a fixation and preservation solution capable of maintaining similar tissue characteristics observed in fresh corpses (Jaung et al.,

2011; Eisma and Wilkinson, 2014). Although, his technique is described as time-consuming, hard to implement and costly (Wolff et al., 2008; Hammer et al., 2012). Furthermore, Thiel's solution components are toxic, highly inflammable, explosive and dangerous to health and environment (Janczyk et al., 2011).

Another group of researchers has recently developed a proprietary conservation solution called Fix for Life (F4L) (Van Dam et al., 2015). Its effects were reviewed by Holewijn et al. (2017), presenting unsatisfactory results as tissue stiffness and alteration of the physiological biomechanical properties of the tissues.

In spite of the great quantity of chemical substances available and the wide developed technology, we still face difficulties in preserving biological materials in non-toxic solutions, capable of preserve the natural morphological characteristics of tissues (Fox et al., 1985; Moelans et al., 2011). In this way, the need to develop new formulations, free of harmful substances and with conservative properties, mainly formalin, arises (Buesa, 2008; Zanini et al., 2012).

Thus, the goal of the present study is to evaluate the efficiency of an alternative conservation solution, to preserve the anatomical pieces.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental design performed

This study was realized in the Laboratories of Human Anatomy and Histology of the Department of Morphological Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), with the approval of the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA), of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), under protocol number 204/17. For this study, 20 blocks of biological cervical tissues (larynxes and infra-hyoid muscles) from male swine (*Sus scrofa domestica*), at age of 07 to 08 months and weighting 120 to 150 Kg were used. The samples were obtained in a swine slaughterhouse located in the city of Taquara/RS, Brazil. The animals were slaughtered according to routine norms established by the Ministry of Agricultural Livestock and Supply (MAPA). It's worth to note that the parts of the body used in the present study would had been discarded in other ways, because not even the larynx or the extrinsic muscles are used in commercial ends.

The biological material was gathered on the same day, immediately after the slaughter of the animal. Swine's biological materials with traumatic lesions, inflammatory and/or infectious processes of the cervical region were not used. After the gathering, the blocks were stored in plastic organizer boxes, packed at room temperature and transported to the anatomy laboratory. As a result of dangerous chemical products transportation restrictions (MT- Decree 96.044 – Ordinance 204/97), safe handling in suitable location, the washing and fixation processes of the anatomic pieces were realized in the Anatomy Laboratory and not in the gathering location, thus creating a gap of 3 hours between gathering and fixation of the tissue block.

Shortly after, the blocks were washed in current water to remove residual blood (exsanguination) and were sectioned, through an incision in the median sagittal plane, dividing it in two hemiblocks (right and left). The hemiblocks were randomized in two groups (block randomization): CG- Control Group (n=20) and GE – Experimental Group (n=20). CG hemiblocks were submitted to the standard fixation technique for 1 month and the standard conservation technique for 12 months, while the hemiblocks in group EG were submitted to the standard fixation technique for 1 month and the alternative conservation technique for 12 months. In both groups, the samples were fixed and conserved by immersion. The standard fixation solution and the standard conservation solution were composed, each one, by 90% of water and 10% of formaldehyde 37% (Quimicamar). The alternative conservation solution was composed by diethylated glycerin, ethyl alcohol, water and disinfectant with Benzalkonium chloride as an active ingredient. The alternative conservation solution is with patent required by UFRGS, so it's not possible to reveal or disclose its concentrations, as well as the brands of chemical products utilized. The volume of fixation and conservation solutions of both groups corresponded to ten times the volume of the pieces (Rodrigues, 2010).

2.2. Evaluation of organoleptic characteristics

The blocks of biological cervical tissues have received a special numeration (without identification of sampling group and experimental phase), and were macroscopically analyzed by experienced anatomists, in a double-blind study. The organoleptic characteristics (coloration, texture, decomposition odor, solution odor

and irritating vapors emanation), were analyzed following the protocol adapted by Da Silva et al (2007), which says:

- Coloration:

The tissue coloration was classified as dark, normal or pale. The dark classification was utilized when pigmentation was more intense than the one found on fresh tissue, the normal classification when pigmentation was similar to the fresh tissue and pale classification when it was lighter than the fresh tissue.

- Texture:

The tissue texture was classified as rigid/steady, normal or friable/decomposed. The rigid/steady classification was used when tissues presented a harder consistency than the one observed on fresh tissues, normal classification in cases that consistency of tissues was similar to the one on fresh tissues, lastly, friable/decomposed classification when the tissue presented an autolysis degree or a decomposition state, complicating or making it impossible the utilization of the piece as a didactic and/or research material.

- Decomposition odor:

The decomposition odor was classified as absent, tolerable/noticeable or not tolerable/intense. The absent classification was used in cases that the odor was imperceptible, tolerable/noticeable in cases that the evaluator noticed a light decomposition odor, being tolerable to handle the pieces in pedagogical or research situations. Lastly, it was classified as not tolerable/intense when the evaluator noticed a strong decomposition odor process, being unbearable to handle the pieces for pedagogical and/or research situations.

- Fixation or preservation chemical solution odor:

The odor of the fixation or preservation chemical solution was classified as absent, tolerable/noticeable or not tolerable/intense. The absent classification was used in cases that the odor was imperceptible, tolerable/noticeable in cases that the evaluator noticed a light fixation or preservation chemical solution odor, being tolerable to handle the pieces in pedagogical or research situations. Lastly, it was classified as not tolerable/intense when the evaluator noticed a strong fixation or

preservation chemical solution odor, being unbearable to handle the pieces for pedagogical and/or research situations.

- Irritation of the mucous membranes (eyes, nose and mouth)

The irritation of the mucous membranes was classified as absent, tolerable/noticeable or not tolerable/intense. The absent classification was used in cases that any mucous membranes irritation was imperceptible, tolerable/noticeable in cases that the evaluator noticed a light membrane irritation caused by the emanation of chemical solution vapors, being tolerable to handle the pieces in pedagogical or research situations. Ultimately, it was classified as not tolerable/intense when the evaluator noticed a strong irritation of mucous membranes caused by the emanation of chemical solution vapors, making it impossible to handle the pieces for pedagogical and/or research situations.

The evaluation was performed in three distinct phases: Phase 1 (pre-fixation) at the beginning of the study, immediately after slaughter of the animals, Phase 2 (post-fixation), after 1 month of fixation in standard solution and Phase 3 after 12 months of storage in standard or alternative solution.

2.3. Histological evaluation

- Histological processing

To obtain histological sections, fragments of 1cm³ were gathered from the epiglottic cartilage and from the sternal-hyoid muscle of each hemiblock in the three distinct phases, and fixated in paraformaldehyde 4% (48 hours). The histotechnical processing was realized in a Micron STP 120 Automatic Tissue Processor (Thermo Scientific), starting with an ethanol dehydration (70%, 80%, 90% and 100%), followed by a diaphanization in xylol and embedded in fluid paraffin (60°C). Later, the tissue fragments were included in Paraplast® and sectioned in microtome Leica RM 2155® (Leica Instruments GmbH Nussloch Germany). 3 semiserved sections of 5 µm were obtained, cut in the sagittal plane and stained with hematoxylin (Newpow) and eosin (Vetec) for evaluation of cellular autolysis degrees.

- Evaluation of the cellular autolysis degrees

The histological slides were identified with a special numeration (without specification of the type of tissue, sample group and experimental phase) and

observed in a light microscope from Zeiss, model Axio Imager M2, attached to a digital camera. It was observed in the epiglottic cartilage slides the preservation state of the cartilaginous and epithelial tissue and in the infra-hyoid muscle slides the muscle tissue. The analysis was realized by two experienced histopathologists, in a blind evaluation and the captured tissue images, augmented by 10X and 40X, with the Zeiss ZenBlue edition software version 2.3. The histological evaluation of cellular autolysis degrees was based in criteria established by Goyri-O'Neal et al. (2013) and George et al. (2016), in an adapted evaluation form, objective and detailed. The defined characterization criteria of cellular autolysis comprise the analysis of vacuolization, cytoplasmic staining, nuclear condensation, nuclear fragmentation and phantom or absent nucleus, classified according to its presence in degrees that vary from 0 (absent), 1 (< 25% of cells), 2 (25% < 50% of cells) and 3 (> 50% of cells) (Table 1).

Each tissue analyzed was classified in five categories, according to the preservation state of morphological structures by optical microscopy, as follow: A (excellent conservation), B (good conservation), C (satisfying conservation), D (unsatisfying conservation) and E (tissue in autolysis) (Table 2). This classification is based on the sum of points acquired by each tissue during histological evaluation.

2.4. Statistical analysis

This study statistical analysis was realized in a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 25.0. The results were presented through frequency and percentage. Cochran's Q test and Friedman's test (when there was more than two classification) were utilized to compare proportions along the three phases of evaluation within each sample group. The Qui-squared test was utilized for comparison between groups in the last phase of the study. Intra-evaluator comparison was through Kappa's agreement test. The statistical significance adopted was 5%.

3. RESULTS

It was observed intra-evaluator agreement on the organoleptic evaluations (macroscopic) and on cellular autolysis degree evaluations (microscopic) in 100% of samples, with coefficient $K = 1$, that corresponds to a perfect agreement.

The color and texture of the epiglottic cartilage and the sternal-hyoid muscle presented normal aspect, as well as the absence of decomposition odor in the pre-fixation phase (Phase 1 - immediately after the slaughter of the animals), in 100% of the samples. The properties observed on the fresh pieces served as a reference of real organoleptic characteristics for the comparisons among the different groups and phases of the study. Modifications of optical, haptic and olfactory properties of the hemiblocks of biological cervical tissues were observed in both groups (CG and EG), in the postfixation (phase 2) and postconservation (phase 3), in comparison with the fresh tissue (Table 3; Figure. 1)

The coloration of the evaluated tissues presented significant alteration in both groups, in phases 2 and 3, in comparison with phase 1 ($p < 0,05$). The sternal-hyoid muscle and the epiglottic cartilage showed themselves pale in the 20 hemiblocks (100%) after 1 month of fixation on the standard solution and 12 months of conservation in standard (CG) and alternative (EG) solution. Despite of the pale coloration in the tissues, a yellowish tone in the pieces preserved in the alternative solution was reported by the evaluators, when compared to pieces preserved in the standard solution. This chromatic alteration became evident when the tissues were exposed to air during the evaluations of hemiblocks on phase 3 of this study (Table 3; Figure 1).

In evaluating the texture, in both groups the tissues showed themselves rigid/steady after 1 month in standard fixation solution (phase 2). A light softness of structures was observed in EG, in comparison with CG, in the postconservation phase (phase 3). Despite of this subtle difference in the final phase of the study, the standard and alternative conservation solution provided a more rigid/steadier consistency to the pieces, regarding the fresh tissues ($p < 0,05$; Table 3).

No decomposition odor was noticeable in both groups, in phase 2 and 3 and between CG and GE at the end of the research. Intense and non-tolerable odor of the standard fixation solutions, accompanied by intense and non-tolerable irritation of the mucous membranes was noticeable in all pieces (100%) of GC in phases 2 and 3, showing a statistically significant difference regarding phase 1 ($p < 0,05$). Pieces of EG (100%) revealed intense and non-tolerable odor of the standard fixation solution and intense and non-tolerable irritation of mucous membranes in phase 2. The absence of mucosal irritant vapors and a light and tolerable odor of the alternative conservation solution was noticeable in phase 3, indicating a statistically significant

difference among all sample phases ($p < 0,05$). Noticeable difference in the odor and emanation of irritant vapors between tissues preserved in standard solution (CG) and alternative solution (EG) was identified by evaluators in phase 3 of the study ($p < 0,05$; Table 3).

The histological analysis of the sternal-hyoid muscle demonstrated that in both groups in phase 1 (pre-fixation), 85% ($n = 17$) of samples presented excellent tissue conservation (A) and 15% ($n = 3$) presented good conservation (B). Due to the presence of two samples (10%) in each group (CG and EG) with a satisfying conservation state (C), the distribution of conservation percentage status were different, for both groups, in comparison of phases 2 and 3 with phase 1 ($p < 0,05$; Tab 4). No statistically significant difference was found in the conservation state of tissues in standard solution (CG) and alternative solution (EG) at the end of the study ($p > 0,05$ Table 4; Figure 2a and 2d).

The cartilage sections showed themselves unaltered in all sample stages, with 100% ($n = 20$) classified as excellent conservation (A) in the two treatment groups. Also, no conservation differences were identified between cartilages preserved in standard (CG) or alternative (EG) solution in phase 3 of the study ($p > 0,05$; Table 4; Figure 2b and 2e).

The histological aspect if the epithelial tissue showed excellent conservation in 100% ($n = 20$) of samples in CG and 95% ($n = 19$) in EG, which revealed a sample (5%) in good conservation (B). This pattern was observed just in the beginning of the study (phase 1) and kept itself until the end of the research (phase 3), not having a statistically significant difference among the 3 sample phases ($p > 0,05$). Also, no differences were found between epithelia preserved in standard solution (CG) and alternative solution ($p = 1,000$; Table 4; Figure 2c and 2f).

4. DISCUSSION

The biological tissue transformations after death are caused by complex chemical and organic processes, through interaction of enzymes, bacteria, fungi and protozoa (Dimaio and Dimaio, 2001). Oxygen and nutrients deprivation in cells activate a succession of events that result in the beginning of autolysis and shortly after in putrefaction (both, decomposition processes) (Haglund and Sorg, 1996; Hostiuć et al., 2017). The autolysis represent a cellular degradation triggered by their

own enzymes (mainly lytic enzymes within lysosomes), which can occur in any moment of the life cycle or immediately after death. Putrefaction is characterized by tissue decay promoted by bacterial activity, initiating alongside with autolysis after death (Rutty, 2006; Gelderman et al., 2019; Escamez and Tuominen, 2014).

The use of fixation and preservation solution in anatomy laboratories, according to Brenner (2014), aims to prevent the appearance of decomposition phenomena, granting adequate morphostructural preservation of tissues for long periods. The preservation fluids also may secure the maintenance of organoleptic characteristics of organs and structures as close as possible to the *in vivo* aspect, as well as to prevent the growing of fungi and bacteria, and avoid the emanation of toxic vapors to the environment and manipulators (Coleman and Kogan, 1998). It should be noted that *post-mortem* alterations may not be completely interrupted during the fixation process in formaldehyde (Tomita et al. 1999).

Various chemical preservation solutions with non-toxic properties have been developed and tested for their capacity to store biological materials and keep tissue architecture for long periods, verifying its own applicability in anatomy teaching (Brenner, 2014; Balta et al., 2015). Different formulations based on ethyl alcohol and glycerin have been proposed (Woodbune and Lawrence, 1952; Turan et al., 2017; Tamayo-Arango and Garzón-Alzate, 2018). Until the present moment, no study reports that evaluate the efficiency of an alternative chemical preservation solution similar to the proposition of this study were found, which contains besides glycerin, ethyl alcohol and water, the disinfectant of benzalkonium chloride as an active ingredient. The only report about using a solution that contained disinfectant of benzalkonium chloride in anatomy laboratories was to moisten the corpses during dissections (MAcdonald and MAcgregor, 1997). In view of this, the incorporation of disinfectants with benzalkonium chloride in corpses preservation solutions is a field to be explored, making the alternative solution in study a potential substitute to the traditional preservation fluids based on formaldehyde and phenol.

The organoleptic characteristics of biological cervical tissue blocks fixated and preserved in standard solution, described in our results, are in agreement with the reports of Hubbel et al. (2002) and Kerckaert et al. (2008), demonstrating that tissues preserved in formalin become pale, rigid and emanate irritant and toxic vapors. These modifications, in phases 2 and 3, pointed to statistically significant differences regarding fresh tissues. Significant chromatic alterations were also

noticed in tissues maintained in the alternative solution, revealing a yellowish tone when exposed to air. Corroborating with our study, Tamayo-Arango and Garzon-Alzate (2018), reported a darkening of the musculature and viscera of corpses during the dissection procedure. The chromatic changes caused by our alternative preservation solution may be resulting of effects produced by glycerin, which is in agreement with reports of Carvalho et al. (2013). However, further studies are necessary to clarify the mechanisms involved. It is known in this study that the alterations were observed exclusively out of the preservation liquids, during exposition to air, indicating possible “darkening oxidation effects” Coleman and Kogan (1998). Adverse pigment variations were also verified by Turan et al. (2017), revealing an initially whitish and later greenish tone of the musculature and liver of the corpses. These modifications were attributed to citric acid and dye present in the formula of the liquid soap utilized in the preservation formula. In contrast with our findings, Pretorius (1996) reported that solutions containing glycerine and ethyl alcohol retains natural coloration of tissues.

The texture of biological cervical tissues preserved in alternative solution revealed a rigid aspect regarding fresh tissues, with a statistically significant difference between phases 3 and 1. This rigidity is consequence of characteristic effects caused by the standard fixation solution occurred in phase 2, since formalin bind the tissues by crosslink of methylene bridges with peptide chains. This intra and intermolecular reticulation mechanism drastically changes tissue characteristics, acquiring rigidity after a few days (Fox et al., 1985). A light softness of the structures was noticed in tissues preserved in the alternative solution compared to the ones preserved in standard solution. This haptic difference may be attributed to glycerin, which granted the tissues of the experimental group an aspect closer to natural. However, less flexible than fresh tissues and not so rigid as the ones preserved in standard solution. Corroborating with our work, Gajvoronskij et al. (2013) report that glycerin preserve the humidity and soft consistency of tissues. Other studies, also utilized ethyl alcohol and glycerin in their formulation, revealing closer results to the ones observed in fresh tissues with the same haptic conditions achieved in our research (Coleman and Kogan, 1998; Hammer et al., 2012; Benet et al., 2014; Turan et al., 2017; Tamayo-Arango and Grazón-Alzate, 2018).

Decomposition odors were absent in all CG and EG samples, in all three phases of the research. Formalin, present in standard fixation and preservation

solutions, has antiseptic properties, fighting bacteria, preventing the hydrolysis of cellular proteins and consequently the formation of characteristic fetid gases of decomposition (Tang et al., 2009; Kasper et al., 2012; Hauteo et al., 2013; Balta et al., 2015). Similar effect is performed by the benzalkonium chloride, component of the disinfectant present in the alternative preservation solution. Its antimicrobial actions alter the permeability of the plasma membrane, deactivate enzymes and destroy these agents cellular wall, granting the absence of decomposition odors. (Fazlara and Ekhtelat, 2012).

The odors emanated from the standard fixation and preservation solution are much more intrusive in comparison to the alternative preservation solution, showing statistically significant differences between them. In contrast, odors of the disinfectant related to the alternative preservation solution were pleasant. According to Janczyck et al. (2011), formalin evaporates easily, emanating toxic and irritant gases to the ocular mucosa and airways. Tissues preserved in the alternative preservation solution did not reveal these characteristics. Similar results were presented by Hammer et al. (2012) and Tamayo-Arango and Garzon-Alzate (2018), proving the absence of irritant vapors harmful to health in fluids based on glycerin and ethyl alcohol, which makes this solution suitable for use in anatomy laboratories.

The disinfectant with benzalkonium chloride was added to the formula as an antimicrobial agent of low toxicity (Miyagi et al., 2000). Its 2% concentration of active ingredient do not produce toxic or irritant effects, being sufficient to achieve its efficiency, which may be obtained with a content less than 1% (Gardner and Girard, 2000; Tamayo-Arango and Garzon-Alzate, 2018). The security form of the disinfectant utilized in our formulation does not bring information about toxic properties of the product. The information contained, according to manufacturers, describe individual risks of each ingredient, in their pure concentrations. Irritant effects on skin and mucosa and intoxication by inhaling are potential risks of the benzalkonium chloride to the health of its manipulators. According to Sütterlin et al. (2008), benzalkonium chloride is biodegradable, being the solution safe to dispose of, without contamination risks. However, some studies show ecotoxicity impacts and effects over different aquatic organisms (Zhu et al., 2010; Jing et al., 2012; Chen et al., 2014). Turan et al. (2017) did not add benzalkonium chloride directly to the solution, believing that its efficiency could be compromised when interacting with other components, mainly when mixed with liquid soap.

It's important to notice that the organoleptic tissue characteristics achieved by our alternative preservation solution aim the maintenance of biological materials for long periods, serving as a pedagogic-didactic model for teaching processes (practical classes, dissection courses and scientific researches). The specifications established for tissue preservation with this aim differ from those used to practice operation techniques. Preservation solutions that aim to facilitate dissection, provide a safer manipulation and extend the valid time of biological materials, a light rigidness is necessary. More real organoleptic characteristics are of mainly interest to surgeons that perform ability training. Various preservation solutions are described to this end (Thiel, 1992; Da Silva et al., 2004; Hayashi et al., 2005; Anderson, 2006; Da Silva et al., 2007; Barton et al., 2009; Messmer et al., 2010; Benet et al., 2014). However, the majority does not completely preserve the visual and haptic characteristics, natural to the tissues. though providing desirable tissue properties for clinical offices (Jansen et al., 2014). In many cases, cadaveric tissues are kept refrigerated, without being submitted to a process of fixation, aiming at achieving desirable tissue characteristics. This condition grants biological materials low durability and great infectious potential, which is of little interest for routines in anatomy laboratories (Hammer et al., 2015).

In this study, the results of histological evaluation for tissue preservation states have shown that the muscle tissue (sternal-hyoid muscle), presented greater variability of preservation states. In phase 1 (pre-fixation), 85% of muscle samples presented excellent preservation (A) and 15% presented good preservation (B). In phases 2 (postfixation) and 3 (postconservation) was possible to identify the presence of 5 to 10% of samples in a satisfying preservation state (C). These phases (2 and 3) had different distributions regarding phase 1, without difference between groups. All cartilaginous tissues (epiglottis) were classified as excellent preservation in both groups and in all phases of the study. In phase 1 of CG, all laryngeal epithelial tissues presented excellent preservation state (A) and in the same phase of EG, 95% have shown excellent preservation state (A) and 5% presented good preservation (B). This distribution showed itself unaltered in phases 2 and 3 of the study. Comparing both groups, no differences between preservation states of all three tissues analyzed were found. The results of the evaluation of the preservation states presented in our research have shown that our alternative preservation

solution (used in EG) was able to preserve the tissues and avoid degradation with the same efficiency as the ones using formalin 10% (used in CG).

The characterization criteria of cellular autolysis used in this study for the muscle, cartilaginous and epithelial tissue of the larynx included cytoplasmic color alteration, nuclear condensation, nuclear fragmentation and phantom or absent nucleus. They were used to classify the tissue in different preservation states. Autolytic enzymes disintegrate cellular organelles granting the cytoplasm a homogeneous appearance, which is strongly stained by eosin, resulting in a loss of cellular details (Zdravkovic et al., 2006). The nuclear condensation occurs in function of the loss of its content to the cytoplasm. If the nuclear material is soluble in the cytosol, it results in phantom or absent nucleus, if it's insoluble, results in nuclear fragmentation (Wells, 1906). These manifestations were present since the beginning of the study and may be attributed to the gap of 3 hours between the gathering of the biological material and the tissue fixation process by immersion, and not by infusion. According to Mahalakshmi et al., (2016) the tissues must be fixed as soon as possible after the gathering to avoid histomorphological alterations. According to Rodrigues (2010), the piece immersion in liquid fixator is not sufficient to obtain a uniform fixation. The fixator infusion by the vascular system ensure its distribution to all tissues.

In the present study, the development of characterization criteria of autolysis with a greater intensity in the muscle tissue, less evident in the epithelial tissue and absent in the cartilaginous tissue, are in agreement with the reports of Cocariu et al (2016), which approaches that the manifestation speed of these phenomena is different in each type of tissue. In the cartilage, the cellular density rate, chondrocytes resistance to the absence of oxygen and the protection of the extracellular matrix against microorganisms can delay the autolytic processes (Lasczkowski, 2002; Alibegovic, 2014). The difference in tissue preservation between the epithelial and muscle tissue, found in this study, may be associated to the use of the fixation method by immersion, the thickness of the surface area of the tissue in contact with the fixator and the penetration speed of the fixator. The fact of the epithelial tissue being less thick and present a greater contact surface with the fixator fluid, in comparison with muscle tissue fragment, may have facilitated the formalin diffusion to all cells, preventing the appearing of autolytic processes in a more severe form in this tissue. According to Holda et al., (2017) formaldehyde penetration rate in the cardiac

muscle tissue is slow, which may have contributed to the incomplete fixation of the muscle tissue and the developing of autolysis in a greater intensity in the epithelial tissue.

Studies using formaldehyde-based preservation and fixation solutions in different tissues and organs of corpses (Coleman and Kogan, 1998; Luo et al., 2018) have achieved, in histological level, compatible results to the samples preserved and fixed in formalin observed in this study. Results compatible with the solution in this study were also observed in different alternative preservation solutions that did not use formalin in their composition, revealing good preservation properties and maintenance of morphological tissue characteristics at microscopic level in corpses (Frolich et al., 1984; Hammer et al., 2012), in different animal species (Majewski et al., 2003; Janczyk et al., 2011; Shi et al., 2012; Turan et al., 2017).

In studies involving human corpses, the solution used by Frolich et al. (1984) based on phenoxyethanol 1% kept morphological characteristics in tissue samples (liver and kidneys) after 5 years of preservation. Also, the preservation solution containing 10% thymol-ethanol used by Hammer et al. (2012) was, in a certain way, effective in preserving tissue of the skeletal muscle after the period of 1 year.

In animal studies Majewski et al. (2003) reported a good preservation of the skeletal muscle of chicken and pig after a period of 2 years in preservation solution containing ionic liquids. In a similar way Janczyk et al. (2011) reported that the saline solution composed by sodium nitrite, ethyl alcohol, water, Pluriol® E 400 (a mix of polyethylene glycols) and oregano oil, for the period of 1 year, was effective in the preservation of skeletal muscle tissue of dogs. Shi et al. (2012) histologically analyzed the different tissues of rabbits preserved for 2 years in a solution containing a reticulation agent (hydroxymethyl phosphonium salt of tetrakis) and have reported good preservation properties.

In the study of Turan et al. (2017) was evaluated the efficiency of a preservation solution in goats, composed by ethanol 96%, liquid soap and citric acid. Histological sample analysis of the skeletal muscle has revealed a bad preservation quality from the 4th month until the end of the one year study. They also report that bronchial cartilage presented perfect structural preservation. However, the gradual disappearance of the epithelial slide in the beginning of the study until its total absence at the end of the research was reported.

Signs of cellular autolysis characterization and tissue decomposition occurred in the beginning of the study and maintained themselves in similar degrees in the postfixation and postconservation phases, without difference between groups. This condition revealed that the fixation in standard solution granted the maintenance of morphological structures of anatomical pieces, (Tang et al., 2009; Kasper et al., 2012; Hauteo et al., 2013; Balta et al., 2015) and the preservation in alternative solution proposed in this study, was able to keep this condition. This preservation capacity may be explained by the actions of the solution components (glycerine, ethyl alcohol, water and disinfectant) on the tissues. In this sense, the alcohol-associated glycerin denaturates the proteins reversibly ensuring tissue preservation (Hammer et al., 2012) and the benzalkonium chloride disinfectant acts as an antimicrobial agent (Miyagi et al., 2000).

5. CONCLUSION

The alternative preservation solution proposed in the present study has shown itself able to maintain macroscopic and microscopic characteristics of the anatomical pieces, for the period of one year, in the same way as the standard solution. Moreover, the solution presented a tolerable odor with absence of mucosa irritation and kept adequate tissue consistency, favoring the manipulation and dissection of the anatomical pieces. In this way, the preservation of anatomical pieces in a solution containing glycerin, ethyl alcohol, water and disinfectant may be an alternative for the substitution of formalin 10% as a preservation solution in Anatomy Laboratories.

Further studies may include other forms of evaluation like microbiological analysis, toxic and irritant vapors quantification, organoleptic and histological alteration of tissues. Furthermore, it is suggested to evaluate the efficiency of the alternative preservation solution for longer periods and in human corpses. Besides that, its potential as a fixation solution can be tested.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank the technicians Maikel Rosa de Oliveira and Cris Krebs for their assistance in the preparation of the histological samples, Douglas Lenz Nemos and Antônio Generoso Severino for their assistance in the macroscopic analyzes and Andréia Vielmo and Welden Panziera for their assistance in histological analysis.

REFERENCES

- Alibegovic, A., 2014. Cartilage: A new parameter for the determination of the postmortem interval? *J Forensic Leg Med.* 27, 39–45.
- Albrech, F., 1988. Feuchtpräparate als platen präparate aus organischem glas. *Der präparator.* 34, 307–3012.
- Anderson, S.D., 2006. Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory. *Clin Anat.* 19, 8–11.
- Balta, J.Y., Cronin, M., Cryan, J. F., O'Mahony, S. M., 2015. Human preservation techniques in anatomy: a 21st century medical education perspective. *Clin Anat.* 28, 725–734.
- Barton, D. P. J., Davies, D.C., Mahadevan, V., Dennis, L., Adib, T., Mudan, S., Sohaib, A., Ellis, H., 2009. Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop. *Gynecol Oncol.* 113, 352–356.
- Benet, A., Rincon-Torroella, J., Lawton M. T., Sánchez, J. J., 2014. Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. *J Neurosurg.* 120, 1229–1237.
- Benkhadra, M., Gérard, J., Genelot, D., Trouilloud, P. G. C., Anderhuber, F., Feigl, G., 2011. Is Thiel's embalming method widely known? A world survey about its use. *Surg Radiol Anat.* 33, 359–363.
- Binawara, B., Rajnee, C. S., Mathur, K., Sharma, H., Goyal, K., 2010. Acute effect of formalin on pulmonary function tests in medical students. *Pak J Physiol.* 2, 8–10.
- Binetti, R., Costamagna, F. M., Marcello, I., 2006. Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde. *Ann Ist Super Sanita.* 42, 132–143.
- Brenner, E., 2014. Human body preservation – old and new techniques. *J Anat.* 224, 316-344.
- Buesa, R. J., 2008. Histology without formalin? *Annals Diag Pathol.* 12, 387–396
- Carvalho, Y. K., Zavarize, K. C., Nedeiros, L. D. S., Bombanato, P. P., 2013. Avaliação do uso da glicerina proveniente da produção de biodiesel na conservação de peças anatômicas. *Pesq Vet Bras.* 33, 115–118.
- Chen, Y., Geurts, M., Sjollema, S. B., Kramer, N. I., Hermens, J. L., Droge, S. T., 2014. Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: How test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environ Toxicol Chem.* 33, 606–615.
- Cocariu, E.A., Mageriu, V., Staniceanu, F., Bastian, A., Socoliuc, C., Zurac, S., 2016. Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Rom J Int Med.* 54, 105–112.

Coleman, R., Kogan, I., 1998. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat.* 192, 443–446.

Da Silva, R. M. G., Matera, J. M., Ribeiro, A. A. C. M., 2004. Preservation of cadavers for surgical technique training. *Vet Surg.* 33, 606–608.

Da Silva, R. N. G., Matera, J.M., Ribeiro, A. A. C. M., 2007. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of living animals. Is that an academic paradox? *Anat Histol Embryol.* 36, 220–224.

Dimaio, V. J., Dimaio, D., 2001. *Forensic pathology*, segunda edição. CRC Press, Boca Raton.

Eisma, R., Wilkinson, T., 2014. From “Silent Teachers” to Models. *Plos Biol.* 15, 1–5.

Escamez, S., Tuominen, H., 2014. Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *J Exp Bot.* 65, 1313–1321.

Fazlara, A., Ekhtelat, M., 2012. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Eurasian J Agric e Environ Sci.* 12, 23–29.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., Roller, P. P., 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Citochem.* 33, 845–853.

Frolich, K. W., Anderson, L. M., Knutsen, A., Flood, P. R., 1984. Phenoxylethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. *Anat Rec.* 208, 271–278.

Gajvoronskij, I. V., Gajvoronskij, A.I., Reznik, O. N., Bagnenko, S. F., Makeev, B. L., 2013. Method of embalming corpses for training in doctors skills of extraction of donor organs for transplantation. Patent number RU2479998-C2, 20 Jul. 2012, 27 Abr. 2013.

Gardner, W. P., Girard, J.E., 2000. Analysis of Common Household Cleaner-Disinfectants by Capillary Electrophoresis. *J Chem Edu.* 77, 1335–1338.

Gelderman, H. T., Kruiver, C. A., Oostra, R. J., Zeegers, M. P., Dujist, W. L. J. M., 2019. Estimation of the postmortem interval based on the human decomposition process. *J Forensic Leg Med.* 61, 122–127

George, J., Van Wettere, A.J., Michaels, B. B., Crain, D., Lewbart, G. A., 2016. Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *Peer J.* 16, 1–13.

Goyri O'Neill, J., Pais, D., Freire De Andrade. F., Ribeiro, P., Belo, A., O'Neill, A., Ramos, S., Neves, M. C., 2013. Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy. *Acta Med Port.* 26, 188–194.

Haglund, W. D., Sorg, M. H., 1996. *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*, primeira edição. CRC Press, Boca Raton.

Hammer. N., Löffler, S., Feja, C., Sandrock, M., Schmidt, W., Bechmann, I., Steinke, H., 2012. Ethanol-Glycerin Fixation with Thymol Conservation: A Potential Alternative to Formaldehyde and Phenol Embalming. *Anat Sci Educ.* 5, 225–233.

Hammer, N., Löffler, S., Bechmann, I., Steinke, H., Hädrich, C., Feja, C., 2015. Comparison of modified Thiel embalming and ethanol-glycerin fixation in an anatomy environment: Potentials and limitations of two complementary techniques. *Anat Sci Educ.* 8, 74–85

Hayashi. S., Naito, M., Kawata, S., Qu, N., Hatayama, N., Hirai, S., Itoh, M., 2016. History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anat Sci Int.* 91. 1–7.

Holda, M. K., Klimek-Pitrowska, W., Koziej, M., Tyrak, K., Holda, J., 2017. Penetration of formaldehyde based fixatives into heart. *Folia Med Cracov.* 57, 63–70.

Holewijn, R. M., Faraj, S. S. A., Kingma, I., Van Royen, B.J., Kleuver, M., Van Der Veen, A.J., 2017. Spinal biomechanical properties are significantly altered with a novel embalming method. *J Biomech.* 55, 144–146.

Hostiuc., S., Rusu, M. C., Mănoiu, V. S., Vrapsiu, A. D., Negoii, I., Popescu, M., 2017. Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review. *Rom J Morphol Embryol.* 58, 377–384.

Hubbell, D.S., Dwornik, J. J., Always, S. E., Eliason, R., Norenberg, R. E., 2012. Teaching Gross Anatomy Using Living Tissue. *Clin Anat.* 15, 157–159.

IARC, 2006. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol 2006. IARC Monogr. 88, 478. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/mono88.pdf>. (last accessed 07.03.2017).

Janczyk, P., Weigner, J., Luebke-Becker, A., Kaessmeyer. S., Plendl. J., 2011. Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy – a study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat.* 193, 71–75

Jaung, R., Cook, P., Blyth, P., 2011. A comparison of embalming fluids for use in surgical workshops. *Clin Anat.* 24, 155–161

Jansen, S., Cowie, M., Linehan, J., Hamdorf, J. M., 2014. Fresh frozen cadaver workshops for advanced vascular surgical training. *ANZ J Surg.* 84, 877–880.

- Jing, G., Zhou, Z., Zhuo, J., 2012. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) study of toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*. 86, 76–82.
- Kasper, J., Mumm, R., Ruther, J., 2012. The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions. *Forensic Sci Int*. 223, 64–71.
- Kerckaert, I., Hoof, T. V., PAttyn, P., D’Herde, K., 2008. Endogent: Centre for Anatomy and Invasive Techniques. *Anatomy Teaching*. 2, 28–33.
- Lasczkowski, G. E., Aiger, T., Gamerdinger, U., Weiler, G., Bratzke, H., 2002. Visualization of postmortem chondrocyte damage by vital staining and confocal laser scanning 3D microscopy. *J Forensic Sci*. 47, 663– 666.
- Luo, J., Zhou, H., Rao, L., Liu, T., Liu, L., Chen, Y., Wang, J., Hu T., Liu, S., Chen, D., Wang, H., Zeng, L., Huang, J., 2018. A New Method of Biostorage and Biopreservation for Human Amputated Extremities. *Biopreserv Biobank*. 16, 251–257.
- Macdonald, G. J., Macgregor, D.B., 1997. Procedures for embalming cadavers for the dissecting laboratory. *Proc Soc Exp Biol Med*. 215, 363–365.
- Mahalakshmi, V., Gururaj, N., Sathya, R., Sabarinath, T. R., 2016. Sivapathasundharam B, Kalaiselvan S. Assessment of histological changes in antemortem gingival tissues fixed at various time intervals: A method of estimation of postmortem interval. *J Forensic Dent Sci*. 8, 114–115.
- Majewski, P., Permak, A., Grzymislowski, M., Iwanik, K., Pernak, J., 2003. Ionic liquids in embalming and tissue preservation. Can traditional formalin-fixation be replaced safely?. *Acta Histochem*. 105, 135–142..
- Mason, J. T., O’Leary, T. J., 1991. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem and Citochem*. 39, 225–229.
- Meckl, M., 2004. Ursprünge der Präparationstechniken. *Der Präparator*. 50, 89– 93.
- Messmer, C., Kellogg, R.T., Zhang, Y., Baiak, A., Leiweke, C., Marcus, J. R., Levin, L. S., Zenn, M. R., Erdmann, D., 2010. A Technique to Perfuse Cadavers That Extends the Useful Life of Fresh Tissues: The Duke Experience. *Anat Sci Educ*. 3, 191–194.
- Miyagi, F., Timenetsky, J., Alterthum, F., 2000. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. *Rev Saúde Pública*. 34, 444–448.
- Moelans, C.B., Oostenrijk, D., Moons, M. J., Van Diest, P.J., 2011. Formaldehyde substitute fixative: Effects of muscle acid preservation. *J Clin Pathol*. 64, 960–967.
- NTP, 2010. Final Report on Carcinogens Background Document for Formaldehyde. Research Triangle Park 2010. 10, 522.

https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/2009/november/formaldehyde_bd_final.pdf
(last accessed 08.03. 2017).

Oliveira, S. V. W. B., Zaiat, M., 2004. Gerenciamento de soluções de formol em laboratório de anatomia. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*. 1, 15–25.

Papageorgopoulou, C., Shved, N., Wanek, J., Ruhli, F.J., 2015. Modeling ancient egyptian mummification on fresh human tissue: macroscopic and histological aspects. *Anat Rec*. 298, 974–987

Prasad, G., Karkera, B., Pandit, S., Desai, D., Tonse, R.G., 2015. Preservation of tissue by plastination: a review. *International journal of advanced health sciences*. 1, 27–31.

Pretorius, W. F., 1996. Formula for embalming of cadavers for student dissection and the modification thereof for plastination. *Journal International Society Plastination*. 10, 35–36.

Rodrigues, H., 2010. Técnicas anatômicas, quarta edição. GM. Gráfica e Editora, Vitória.

Rutty, G. N., 2006. *Essentials of autopsy practice: current methods and modern trends*, primeira edição. Springer Verlag, Leicester.

Schallenberg, E., 1972. Trockenpräparate von ganzen lungen. *Der präparator*. 3/4, 67–71.

Shi, K., Shao, S. X., Yin, W. G., 2012. An improved non-formaldehyde tissue preservative. *Adv Mat Res*. 356, 360–363.

Sütterlin, H., Alexy, R., Kümmerer, K., 2008. The toxicity of quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 71, 498–505.

Tamayo-Arango, L., Garzón-Alzate, A., 2018. Preservation of Animal Cadavers with a Formaldehyde-free Solution for Gross Anatomy. *Journal of Morphological Sciences*. 35, 136–141.

Tang, X., Bai, Y., Duong, ANH., Smith M. T., Li, L., Zhang, L., 2009. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int*. 35, 1210–1224.

Teo, C. H., Pawita, A. H., Khairul, O., Atiah Ayunni, A. G., 2013. Noor Hazfalinda H. Post mortem changes in relation to different types of clothing. *Malays J Pathol*. 35, 77–85.

Thiel, W., 1992. Die Konservierung ganzer Leichen in natürlichen Farben. *Annals of Anatomy*. 174, 185–195.

- Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y., Sato, S., 1999. Histological study of early postmortem changes in various organs: comparison of the paraffin embedding method and the epoxy resin embedding method. *Nihon Hoigaku Zasshi*. 53, 207–217.
- Turan, E., Gules, O., Kilimsi, F. S., Kara, M. E., Dilek, O. G., Sabanci, S. S., Tatar, M., 2017. The mixture of liquid foam soap, ethanol and citric acid as a new fixative-preserved solution in veterinary anatomy. *Ann Anat*. 209, 11–17.
- Van Dam, A. J., Van Munsteren, J. C., Deruiter, M. C., 2015. Fix for life: the development of a new embalming and fixation method to preserve life-like morphology. *The Faseb journal*. 29, 547–551.
- Viegas, S., Ladeira, C., Nunes, C., Malta-Vacas, J., Gomes, M., Brito, M., Mendonca, P., Prista, J., 2010. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J Occup Medicine Toxicol*. 5, 1–8.
- Von Hagens, G., 1979. Impregnation of soft biological specimens with thermosetting resins and elastomers. *Anat Rec*. 194, 247–256.
- Wells, H. G., 1906. The relation of autolysis to the histological changes occurring in necrotic areas. *J Med Res*. 15, 149–165.
- Wolff, K., Kesting, M., Müke, T., Raul, A., Hölzle, F., 2008. Thiel embalming technique: a valuable method for microvascular exercise and teaching of flap raising. *Microsurgery*. 28, 273–278.
- Wolkoff, P., Nielsen, G. D., 2010. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ Int*. 36, 788–799.
- Woodburne, R.T., 1952. Lawrence CA. An improved embalming fluid formula. *Anat Rec*. 114, 507–514.
- Zanini, C., Gerbaudo, E., Ercole, E., Vendramin, A., Forni, N., 2012. Evaluation of commercial and three home-made fixatives of substitution of formalin: A formaldehyde-free laboratory is possible. *Environ Health*. 11, 11–59.
- Zdravkovic, M., Kostov, M., Stojanovic, M., 2006. Identification of postmortem autolytic changes on the kidney tissue using PAS stained method. *Medicine and Biology*. 13, 181–184.
- Zhu, M. Ge, F., Zhu, R., Wang, X., Zheng, X., 2010. A DFT-based QSAR study of the toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*. 80, 46–52.

Table 1: Histological criteria for the characterization of cellular autolysis and respective degrees of classification.

| Classification Criteria for Cellular Autolysis | Degrees of Classification | | | | Degree Obtained |
|------------------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------|--------------|-----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| Vacuolization | 0 (absent) | 1 (< 25%) | 2 (25% < > 50%) | 3 (> 50%) | _____ |
| Cytoplasmic staining | 0 (absent) | 1 (< 25%) | 2 (25% < > 50%) | 3 (> 50%) | _____ |
| Nuclear condensation | 0 (absent) | 1 (< 25%) | 2 (25% < > 50%) | 3 (> 50%) | _____ |
| Nuclear fragmentation | 0 (absent) | 1 (< 25%) | 2 (25% < > 50%) | 3 (> 50%) | _____ |
| Phantom nucleo / absent | 0 (absent) | 1 (< 25%) | 2 (25% < > 50%) | 3 (> 50%) | _____ |
| Sum | | | | | _____ |

Source: Adapted from Goyri-O'Neal et al., (2013) and George et al., (2016).

Table 2: Classification of tissues according to their state of conservation.

| Categories and States of Conservation | Puntuaction |
|---------------------------------------|-------------|
| A = Excellent conservation | 0 a 2 |
| B = Good conservation | 3 e 4 |
| C = Satisfactory conservation | 5 e 6 |
| D = Unsatisfactory conservation | 7 e 8 |
| E = Tissue in autolysis | 9 or more |

Source: Adapted from Goyri-O'Neal et al. (2013) and George et al. (2016).

Table 3: Comparison of the results of the organoleptic evaluation of the sternohyoid muscle and the epiglottic cartilage between the control group (CG) and the experimental group (EG), in the three phases of the study

| Tissue | Group | PHASE 1 (pré-fixation) | | | | | PHASE 2 (post-fixation) | | | | | PHASE 3 (post-conservation) | | | | |
|-----------|-------|---------------------------|---------|-------------|-------------|------------------|----------------------------|---------|-------------|-------------|------------------|--------------------------------|---------|-------------|-------------|------------------|
| | | Color | Texture | Decom. odor | Solut. odor | Mucosa Irritaat. | Color | Texture | Decom. odor | Solut. odor | Mucosa Irritaat. | Color | Texture | Decom. odor | Solut. odor | Mucosa Irritaat. |
| Muscle | CG | Normal | Normal | Absent | Absent | Absent | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* |
| | EG | Normal | Normal | Absent | Absent | Absent | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* | Palid* | Firm* | Absent | Persepti.*# | Absent |
| Cartilage | CG | Normal | Normal | Absent | Absent | Absent | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* |
| | EG | Normal | Normal | Absent | Absent | Absent | Palid* | Firm* | Absent | Intense* | Intense* | Palid* | Firm* | Absent | Persepti.*# | Absent |

* p < 0,05 vs Phase 1; # p < 0,05 vs Phase 2.

Cochran's Q Test: Phase 1 vs Phase 2 vs Phase 3. Chi-Squared Test: CG vs EG in Phase 3.

Table 4: Comparison of the conservation status (A, B, C, D e E), of muscle, cartilaginous and epithelial tissue, obtained in the histological evaluation of cellular autolysis degrees, between the control group (CG) and experimental group (EG), during the study phases.

| Tissue | Group | PHASE 1 (pré-fixation) | PHASE 2 (post-fixation) | PHASE 3 (post-conservation) |
|------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Muscle | CG | A = 17 (85%) B = 3 (15%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 15 (75%) B = 4 (20%) C = 1 (5%) D = 0 (0%) E = 0* (0%) | A = 15 (75%) B = 3 (15%) C = 2 (10%) D = 0 (0%) E = 0* (0%) |
| | EG | A = 17 (85%) B = 3 (15%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 15 (75%) B = 3 (15%) C = 2 (10%) D = 0 (0%) E = 0* (0%) | A = 15 (75%) B = 3 (15%) C = 2 (10%) D = 0 (0%) E = 0* (0%) |
| Cartilage | CG | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) |
| | EG | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) |
| Epithelium | CG | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 20 (100%) B = 0 (0%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) |
| | EG | A = 19 (95%) B = 1 (5%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 19 (95%) B = 1 (5%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) | A = 19 (95%) B = 1 (5%) C = 0 (0%) D = 0 (0%) E = 0 (0%) |

A: excellent conservation, B: good conservation, C: satisfactory conservation, D: unsatisfactory conservation, E: autolytic tissue, * p < 0.05 for frequency distribution (A to E) vs Phase 1.

Friedman's Test: Phase 1 vs Phase 2 vs Phase 3 in muscle tissue. Cochran's Q Test: Phase 1 vs Phase 2 vs Phase 3 in cartilage and epithelium tissue. Chi-Squared Test: CG vs EG in Phase 3.

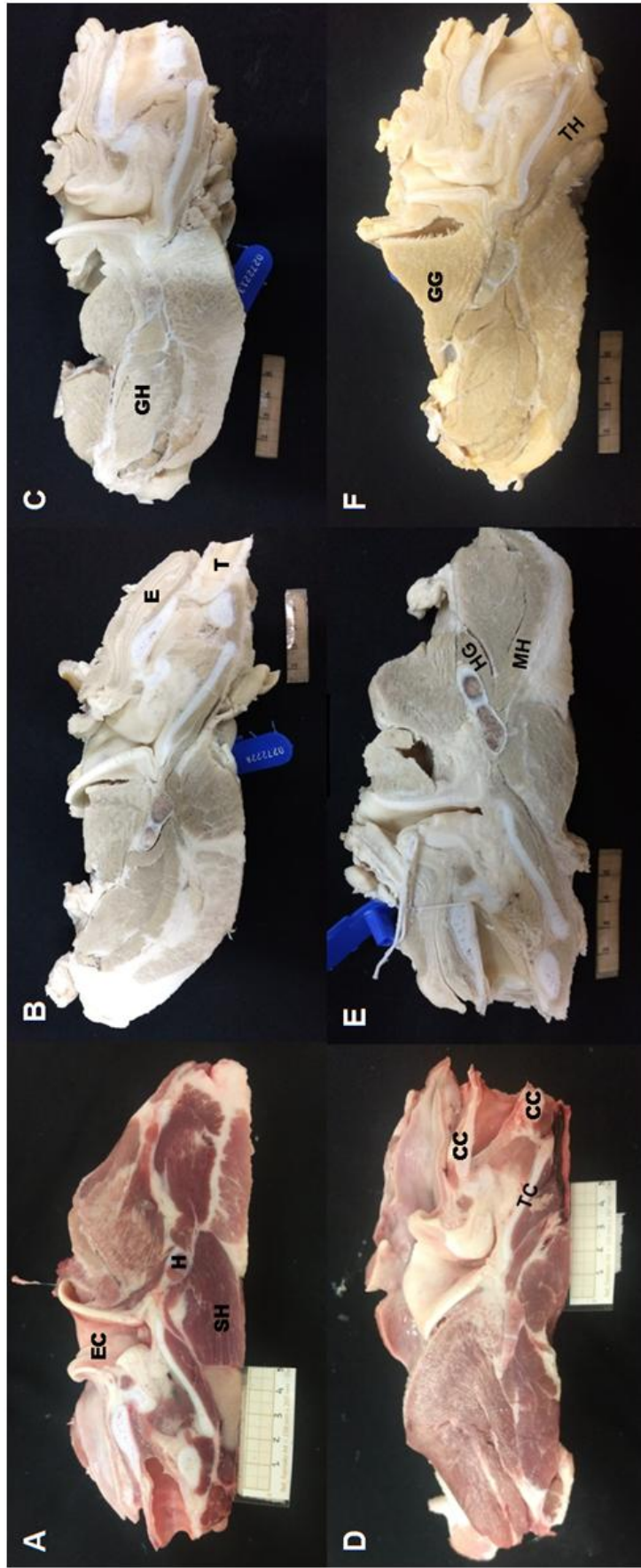


Figure 1: Comparison of the tissue coloring of the Control Group (CG) and Experimental Group (EG) between phases 1 (pre-fixation), phase 2 (post-fixation) and phase 3 (post-preservation) (B) GC phase 2. (C) GC phase 3. (D) GE phase 1. (E) GE phase 2. (F) GE phase 3. (SH) sternal-hyoid muscle. (GG) genioglossus muscle. (HG) muscle hyoglossus. (GH) genioglossus muscle. (MH) milkoid muscle. (H) hyoid bone. (EC) cartilage epiglottis. (TC) thyroid cartilage. (CC) crinoid cartilage. (E) esophagus.

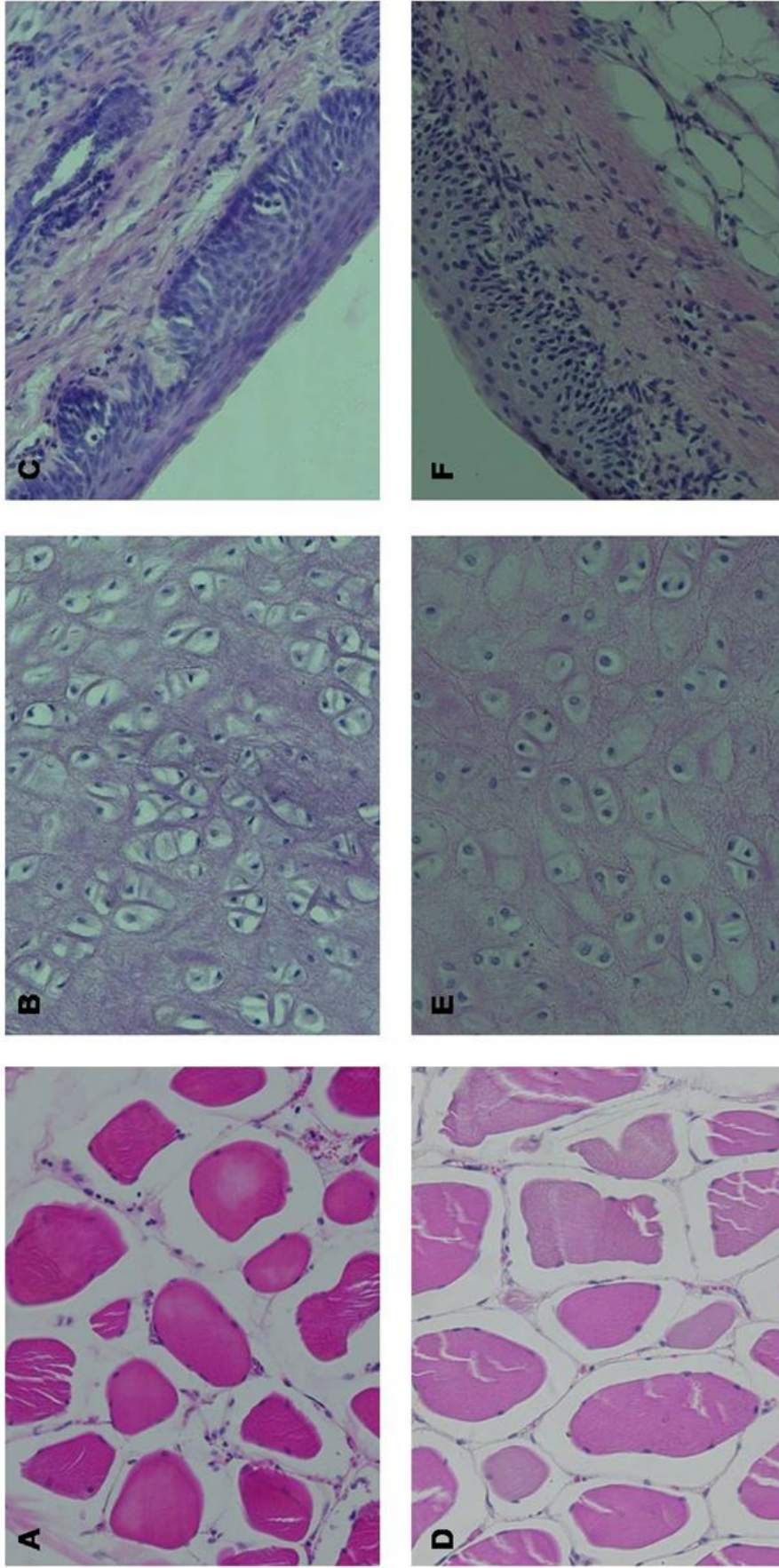


Figure 2: Optical microscopy in magnification of 400X showing the state of tissue conservation. Comparison between Control Group (CG) and Experimental Group (EG) at phase 3. (A) muscle tissue CG, (B) cartilaginous tissue CG, (C) epithelial tissue CG, (D) muscle tissue EG, (E) cartilage tissue EG, (F) epithelial tissue EG.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução alternativa de conservação proposta no presente estudo mostrou-se eficaz para manter as características macroscópicas e microscópicas das peças anatômicas, pelo período de um ano, da mesma forma que a solução padrão (formol 10%). Além disso, a solução apresentou odor tolerável com ausência de irritação de mucosas e manteve consistência tecidual adequada, favorecendo a manipulação e a dissecação das peças anatômicas. Dessa forma, a conservação de peças anatômicas em solução contendo glicerina, álcool etílico, água e desinfetante pode ser uma alternativa para a substituição do formol 10% como solução conservadora em Laboratórios de Anatomia.

7 PERSPECTIVAS

Estudos futuros podem ser realizados utilizando outros métodos de avaliação como análise microbiológica e mensuração de vapores irritantes e tóxicos. Avaliações histológicas de contagem de célula e mensuração da fração de área poderão ser utilizadas para definir a qualidade de preservação dos tecidos. Testes de compressão e tração com analisador de texturas e quantificação das alterações cromáticas por espectrofotometria poderão oferecer mais informações sobre as características organolépticas. Por fim, sugere-se avaliar a eficácia da solução alternativa de conservação por períodos mais longos e em cadáveres humanos, além de testar o seu potencial como solução fixadora.

ANEXO A – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA) da UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 204/17 Parecer 500/17

2) DATA DO PARECER: 10/05/2017

3) TÍTULO DO PROJETO:

Avaliação de uma solução química alternativa para a conservação de material biológico em laboratório de anatomia.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Geraldo Pereira Jotz

5) RESUMO DO PROJETO:

O presente projeto visa testar uma solução química alternativa ao uso de formaldeído, considerado uma substância carcinogênica para humanos, para conservação de peças anatômicas. A partir do conhecimento que o cloreto de benzalcônio tem ação antisséptica contra microorganismos, este será utilizado em um preparado como princípio ativo na conservação de peças anatômicas comparado ao formaldeído que é considerado uma solução padrão utilizada atualmente.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar a eficácia de uma solução química alternativa na conservação de peças anatômicas em laboratório de anatomia.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

- Relevância e Justificativa** Adequados Comentários
- Materiais e Métodos** Adequados Comentários
- Cronograma para execução da pesquisa** Adequado Comentários
- Orçamento e fonte financiadora** Adequados Comentários
- Referências Bibliográficas** Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Não se aplica

Espécie: *Sus scrofa domestica*

Número Amostral: 33

Redução Amostral:

Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Não se aplica

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Não se aplica

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Não se aplica

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Não se aplica

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Laboratório de Anatomia Humana e Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Outra instituição. Qual? UFRGS

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

| Data | Espécie | Sexo | Quantidade |
|------|---------|------|------------|
|------|---------|------|------------|

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Com Pendência

Não aprovado

Data de início 07/2017 Data de Término 10/ 2018

Comentários gerais sobre o projeto:

Sugerimos que o presente projeto seja submetido para avaliação e/ou ciência da CEUA da instituição (UFRGS) onde será realizado a parte experimental. O projeto não apresentou a fonte financiadora.

ANEXO B – Autorização do frigorífico para coleta dos materiais biológicos

AUTORIZAÇÃO

Por este instrumento, o Matadouro e Frigorífico Santo André Ltda. CNPJ nº 97.763.072/0001-22, instalado no município de Taquara/RS, disponibiliza 40 blocos de tecidos biológicos cervicais (laringes e músculos infra-hióideos) de descarte do processo comercial de suínos (*Sus scrofa domestica*) machos, com idade de 6 a 10 meses. Os blocos de tecidos cervicais serão utilizados na pesquisa intitulada **Avaliação de uma Solução Química Alternativa para Fixação e Conservação de Material Biológico em Laboratório de Anatomia**. O estudo é de responsabilidade de Leonardo Jung, aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (PPGCS-UFCSPA), sob orientação do Professor Dr. Geraldo Pereira Jotz (UFCSPA e UFRGS) e co-orientação da Professora Dra. Taís Malysz (UFRGS).

Os blocos de tecidos biológicos cervicais deverão ser utilizados exclusivamente para fins de pesquisa científica

O descarte adequado dos rejeitos biológicos advindos da pesquisa é de responsabilidade dos autores do estudo.

Taquara, 13 de abril de 2017



Tiago Rebechi

Matadouro Frigorífico Santo André Ltda

97.763.072/0001-22

Matadouro Frigorífico
Santo André Ltda.

Rua André Rebechi, 1700
95600-000 TAQUARA / RS