

SIDCLEY BERNARDINO DE ARAÚJO

**Desenvolvimento e teste da formalina-gel
para fixação de pequenas biópsias: uma
alternativa biossegura**

Recife
2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação Patologia

Sidcley Bernardino de Araújo

Desenvolvimento e teste da formalina-gel para fixação de pequenas biópsias: uma alternativa biossegura

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Neves de Melo

Recife
2009

Araújo, Sidcley Bernardino de.

Desenvolvimento e teste da formalina-gel para fixação de pequenas biópsias: uma alternativa biossegura / Sidcley Bernardino de Araújo. – Recife : O Autor, 2009.

72 folhas, il, tab. quadro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco – CCS. Ciências da Saúde, 2009.

Inclui bibliografia anexo e apêndice

1. Patologia. 2. Fixação de Tecidos . 3. Autólise. I. Título.

**616
571.933**

**CDU (2. ed.)
CDD (20.ed.)**

**UFPE
CCS154/09**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

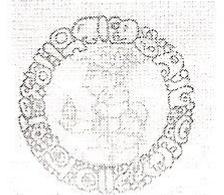
Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia



Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>

Autor: **SIDCLEY BERNARDINO DE ARAÚJO**

Área de Concentração: **PATOLOGIA**

Nome da Dissertação: **“DESENVOLVIMENTO E TESTE DA FORMALINA-GEL PARA
FIXAÇÃO DE PEQUENAS BIÓPSIAS: UMA ALTERNATIVA BIOSSEGURA”**.

Orientadora: **PROFA. DRA. MARIA DO CARMO CARVALHO DE ABREU E LIMA**

Co – orientadora: **PROFA. DRA. ELIZABETH NEVES DE MELO**

Dissertação defendida para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Data: 04 de setembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

Profa. Dra. Elizabeth Neves de Melo

Dedico este trabalho às três grandes mulheres da minha vida: Maria Deolinda (mãe), Adalgisa Oliveira (tia) e Keilla Araújo (esposa).

AGRADECIMENTOS

Glorifico a Deus por tudo conquistado até aqui e pelo que Ele tem reservado para minha vida. Toda honra, glória e louvor sejam somente para Ele!

Em especial, à Prof^a Dr^a Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima, minha orientadora neste trabalho, principalmente pela amizade, constante incentivo e colaboração imprescindível na realização de mais este feito.

À Prof^a Dr^a Elizabeth Neves de Melo, co-orientadora, pela valorosa participação.

Ao Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho, Coordenador do Programa em Patologia, pela paciência, confiança e pronta disposição em ajudar-me.

Ao Prof. Dr. Hilton Justino da Silva, Vice-Coordenador do Programa em Patologia, pela grande contribuição na pré-banca.

A Sonia Carvalho Lopes, Secretária do Programa pela compreensão, carinho e ajuda nos momentos difíceis.

À Prof^a Mestre Denise da Cruz Camboin, pela denotada colaboração.

Aos Prof^s Dr^s Roberto José Vieira de Mello e Luciano Montenegro Tavares, pelos incentivos.

Ao meu pai, Enéas Bernardino de Araújo, *in memoriam*, pelo incentivo aos estudos e aconselhamentos.

A minha mãe, Maria Deolinda Wanderley, principalmente pelo amor incondicional e pelo investimento em minha educação.

À Keilla, minha querida esposa, pelo companheirismo e compreensão.

À Ana Luiza, minha filha, pelos momentos subtraídos de sua companhia, para a dedicação a este trabalho.

À Sylvania Paz, colega de trabalho, pela compreensão quando estive ausente para me dedicar a este trabalho.

A todos os meus familiares, pelo estímulo e apoio.

Àqueles que me apresentaram a Deus em oração.

E por fim, mas não menos importante, a todas as pessoas, que contribuíram direta e indiretamente para realização dessa pesquisa.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

*Tão boa é a sabedoria como a herança,
e dela tiram proveito os que vêem o sol.
Porque a sabedoria serve de defesa,
como de defesa serve o dinheiro;
mas a excelência do conhecimento é que a sabedoria dá
vida ao seu possuidor.*

Eclesiastes 7.11-12

RESUMO

Introdução: O formaldeído é o fixador mais utilizado na análise de tecidos biológicos em laboratórios de Anatomia Patológica, Anatomia e Histotecnologia, mas são conhecidos os efeitos irritativos e tóxicos relacionados à exposição freqüente a essa solução, quer pelo contato direto, quer por inalação. **Objetivo:** Desenvolver uma solução de formaldeído, sob forma de gel, e testar sua aplicabilidade na fixação de fragmentos de tecidos de vários órgãos. **Métodos:** Foram descritos o desenvolvimento de formalina-gel, nas concentrações de 10% e 15%, e os testes de sua aplicabilidade por meio da comparação da qualidade técnica das preparações histológicas de biópsias de coração, rins, fígado, baço, músculo esquelético, cérebro, pulmão e estômago de ratos da linhagem Wistar, em relação àquelas resultantes da fixação em formalina líquida dos mesmos espécimes, em estudo duplo cego. **Resultados:** Ao exame das 40 lâminas histológicas por dois patologistas, não se verificaram diferenças qualitativas entre os dois grupos. **Conclusão:** Os achados parecem viabilizar a ampliação da formalina-gel na fixação de pequenas biópsias, reduzindo os efeitos tóxicos dos vapores da formalina líquida pelo “aprisionamento” da molécula de aldeído ao agente gelificante.

Palavras-chave: Patologia. Fixação de tecidos. Autólise.

ABSTRACT

Introduction: Formaldehyde is the most commonly utilized fixative in the analysis of biologic tissues in Anatomic Pathology, Anatomy and Histotechnology laboratories, but the irritative and toxic effects associated with the frequent exposure to this solution, either through direct contact or inhalation, are well known. **Objective:** To develop formaldehyde in a gel form, and to test its fixation ability in tissue fragments from many organs. **Methods:** One has described the development of a formaldehyde-gel solution, with a 10% and a 15% concentration, and the tests of its applicability by the comparison of the technical quality of histological preparations of heart, kidneys, liver, spleen, skeletal muscle, brain, lung and stomach biopsies, taken from Wistar mice, to those of same species, fixed with liquid formalin, within a double blinded design. **Results:** An evaluation of 40 histology slides by two pathologists did not find differences in quality between the two groups. **Conclusions:** These findings support the feasibility of using formalin-gel in the fixation of small biopsies, reducing the toxic effects of the steam of liquid formalin, by entrapping the aldehyde molecule within the gelifying agent.

Key-words: Pathology. Tissue fixation. Autolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cortes histológicos de alvéolos pulmonares	40
Figura 2: Cortes histológicos de alvéolos pulmonares	41
Figura 3: Cortes histológicos de fígado, observando-se veia centro-lobular e traves de hepatócitos	41
Figura 4: Cortes histológicos de folículo linfático em baço	42
Figura 5: Cortes histológicos de glomérulo renal	42
Figura 6: Cortes transversais de fibras de músculo esquelético	42
Figura 7: Cortes histológicos de músculo cardíaco	43
Figura 8: Cortes histológicos de córtex cerebral	43
Figura 9: Cortes histológicos de glândulas gástricas	43
Figura 10: Aspecto histológico de camada muscular própria de estômago	44
Figura 11: Cortes histológicos de glândulas de estômago	44
Figura 12: Aspecto do carbopol [®]	44
Figura 13: Tanque homogeinizador adaptado.....	45
Figura 14: Aspecto de fragmentos de tecido em formalina	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das avaliações de qualidade das preparações histopatológicas realizadas por duas anatomopatologistas e de sua significância segundo coeficiente de Kendall	39
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre as características do gel obtido com o Natrosol® e com o Carbopol 940®	37
Quadro 2 – Distribuição das concordâncias de avaliações de qualidade das preparações histopatológicas realizadas por duas anatomopatologistas, segundo fixador empregado.....	39

LISTA DE SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DQO - Demanda Química de Oxigênio

EPA - Agência de Proteção Ambiental

FG - Formalina-gel

FL - Formalina Líquida

HEC - Hidroxietilcelulose

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

OSHA – *Occupational Security and Health Association* (Associação de Saúde e Segurança Ocupacional)

RNA - Ácido ribonucleico

SBRT - Sociedade Brasileira de Respostas Técnicas

TH - Tanque homogeneizador

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

cm - centímetro

g/cm³ - grama por centímetro cúbico

g/k - grama por quilo

g/L - grama por litro

ppm - partes por milhão

rpm - rotação por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.2.1 Toxicidade do formaldeído	18
1.2.2 Aplicabilidade da formalina.....	21
1.2.3 Autólise celular.....	22
1.2.4 Mecanismo de ação da formalina.....	24
1.2.5 A importância da boa fixação de tecidos no laboratório de Morfologia	25
1.2.6 Agentes formadores de géis.....	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Geral.....	28
2.2. Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Tipo de estudo:.....	29
3.2. Etapas de desenvolvimento da formalina-gel a partir da solução de formaldeído de uso comercial.....	29
3.2.1 Teste para seleção do melhor agente formador de gel para formalina	29
3.2.2 Preparo da formalina-gel em dois diferentes agentes gelificantes e em duas concentrações diferentes.....	28
3.2.2.1 Formalina-gel a 10% utilizando o Natrosol® Hidroxietilcelulose (HEC). 28	
3.2.2.2 Formalina-gel a 15% utilizando o Natrosol® Hidroxietilcelulose (HEC). 28	
3.2.2.3 Formalina-gel a 10% utilizando o Carbopol 940®.....	29
3.2.2.4 Formalina-gel a 15% utilizando o Carbopol 940®.....	29
3.3. Obtenção dos espécimes para fixação e testagem da formalina-gel.....	32
3.4. Manipulação dos animais experimentais	32
3.5. Seleção dos tecidos para exame histológico	33
3.6. Processamento histológico	34
3.7. Exame das preparações histológicas	34
4. RESULTADOS	37
4.1 Desenvolvimento da formalina-gel.....	37
4.2 Teste da formalina-gel como fixador de fragmentos teciduais.....	38
5. DISCUSSÃO	46
5.1 Algumas vantagens observadas com o uso da formalina-gel.....	46
5.2 Expectativa da aplicação da formalina-gel em experimentos futuros	48
5.3 Detalhes técnicos observados durante a fase do desenvolvimento da formalina-gel, úteis para a reprodução da técnica por outros pesquisadores.....	49
5.4 Aplicabilidade da formalina-gel na fixação de pequenas biópsias: análise da qualidade das preparações histológicas	54
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. APÊNDICES.....	64
9. ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

A ampla utilização do formaldeído em diversos ambientes, inclusive nos laboratórios de anatomia, anatomia patológica e histotecnologia, oferece riscos à saúde humana como fator resultante da exposição a esta substância, quer pelo contato direto com pele e mucosas, quer por inalação (CARSON, 2009). O formaldeído possui propriedades teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas (GRAFSTOM et al., 1985), conforme atestam estudos de instituições internacionais como a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), Agência de Proteção Ambiental (EPA) e a *Occupational Security and Health Association* (OSHA).

Tem-se verificado, ainda, que os resíduos provenientes da utilização do formaldeído encontram-se presentes em níveis crescentes no ar dos centros urbanos e em afluentes de águas de esgoto (MCNARY, JACKSON, 2007).

Tendo em vista a problemática relacionada especialmente à biossegurança, este estudo propõe o desenvolvimento e teste de um novo produto à base de formaldeído que se mostre funcionalmente eficaz e seja menos nocivo ao ambiente e, por conseqüência, à saúde.

A solução de formol, também denominada formalina, uma vez gelificada, minimizaria a formação de vapores, pelo “aprisionamento” da molécula de aldeído ao agente gelificante. A consistência gel também possibilitaria a redução do extravasamento da solução do frasco contenedor, nos acidentes de manejo de biópsias, o que auxiliaria a preservação do meio ambiente. Partindo desses pressupostos, a aplicabilidade do formol em gel se mostraria mais vantajosa, por manter as propriedades de fixação e conservação, somando-se à comodidade no uso e à baixa toxicidade.

1.2. Revisão da Literatura

O aldeído fórmico (formol), conhecido também como formaldeído, metanol ou aldeído metílico, é um gás incolor, com cheiro sufocante, miscível em água, acetona, benzeno, clorofórmio, álcool e éter etílico (MICHALANY, 2005). É obtido mediante oxidação catalítica do álcool metílico e comercializado em solução aquosa (geralmente na proporção de 37% a 40% de formaldeído e 10% a 15% de metanol), convenientemente estabilizada para evitar sua tendência à polimerização (OLIVEIRA, 2001).

O formaldeído tem massa molecular igual a 30,03, ponto de ebulição de 96°C, ponto de fusão de - 15°C. Sua solução aquosa é 100% volátil, tem pH variável entre 2,8 e 4,0 e densidade igual a 1,081 g/cm³ (MSDS, 2000).

É utilizado como agente preservador e como um reagente em processos químicos em uma ampla variedade de produtos comerciais e de consumo (MCNARY; JACKSON, 2007). Industrialmente, é empregado como componente de algumas resinas e colas, na indústria química e petroquímica, processamento têxtil, indústria de papel, processamento de madeira, ou como ingrediente ativo de desinfetantes (OLIVEIRA, 2001).

É útil na confecção de seda artificial, celulose, tintas e corantes, soluções de uréia, tiouréia, resinas melanínicas, vidros, espelhos e explosivos. Pode ser utilizado para dar firmeza aos tecidos, borracha sintética, na coagulação da borracha natural, no endurecimento de gelatinas, albuminas e caseínas, como também na fabricação de drogas (BRASIL, INCA, 2009).

É também empregado como conservante, porque reage com DNA, RNA e proteínas, danificando as células, causando a morte de microorganismos, do que deriva sua ação fungicida, viruscida, bactericida e esporicida e seu uso para embalsamar cadáveres, na confecção de germicidas, fungicidas agrícolas e pesticidas (LU; HEGEMANN, 1988)

Por suas propriedades de fixação e de conservação de peças anatômicas e pelo baixo custo em relação a outras substâncias e métodos, o formaldeído é utilizado em larga escala nos laboratórios de estudos morfológicos, o que promove

a exposição continuada de docentes, técnicos e alunos, a despeito da sua toxicidade e dos efeitos prejudiciais ao meio ambiente (FRANCESCHINI; CARVALHO, 1993).

Segundo o ranking de impactos ambientais gerados por 45 produtos químicos proposto por Edwards et al. (1999), o formaldeído ocupa o 1º lugar (OLIVEIRA, 2001). No processo de lavagem das peças das aulas de anatomia, a solução diluída de formol é descartada no esgoto, mas pode ser desprezada também na forma concentrada, durante a manutenção e limpeza dos tanques e recipientes contendo peças anatômicas, para troca do líquido (OLIVEIRA, 2001). Além disso, na produção do formaldeído (10 g/L) a partir do metanol (20 g/L), a água residual gerada contém altas concentrações dessas substâncias (ZOUTBERG; DE BEEN, 1997).

1.2.1 Toxicidade do formaldeído

Instituições internacionais de pesquisa como a IARC, EPA e OSHA classificam o formaldeído como agente carcinogênico (CASQUIMICA, 2008; BRASIL, 2009).

O formol é tóxico quando ingerido, inalado, infundido por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea ou quando entra em contato com a pele (OLIVEIRA, 2001).

A inalação deste composto pode causar irritação nos olhos, nariz, mucosas e trato respiratório superior (BREThERICK, 1986; DREISBACH, 1983; GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984). Em altas concentrações, pode causar bronquite, pneumonia ou laringite (BREThERICK, 1986; GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984).

Os sintomas mais frequentes no caso de inalação são fortes dores de cabeça, tosse, falta de ar, vertigem, dificuldade para respirar e edema da laringe e pulmonar (CASQUIMICA, 2008; ROM, 1983). O contato com o vapor ou com a solução pode deixar a pele esbranquiçada, áspera e causar forte sensação de anestesia e erosão na pele superficial. Longos períodos de exposição podem

causar dermatite e hipersensibilidade, rachaduras na pele (ressecamento) e ulcerações principalmente entre os dedos; podendo ainda causar conjuntivite (BREATHERICK, 1986; GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984).

O vapor de formaldeído irrita todas as partes do sistema respiratório superior, pele e também afeta os olhos. Sua inalação pode causar irritação da garganta, tosse, falha na respiração. Concentrações de 25 a 30 ppm causam danos severos ao trato respiratório, levando ao edema pulmonar e doenças pulmonares (OLIVEIRA, 2001), podendo mesmo ser fatal em altas concentrações (MSDS, 2000).

A maioria dos indivíduos pode experimentar os efeitos do formol em concentrações tão baixas como 0,5 ppm e, conforme for aumentando a concentração até o limite de exposição máxima, a irritação se dá mais pronunciada. O metanol, presente na formalina, afeta o nervo ótico e pode causar cegueira (OLIVEIRA, 2001).

Há relatos de desordens e problemas menstruais em mulheres expostas a concentrações excessivas (CASQUÍMICA, 2008).

A exposição ao vapor de formaldeído pode causar ressecamento de mucosas e da conjuntiva, conjuntivite química e queimadura nos olhos. O contato do líquido com os olhos pode causar úlcera na córnea e até a cegueira. A severidade dos efeitos depende da concentração do produto e de quanto tempo após a exposição, os olhos foram lavados (CASQUÍMICA, 2008).

A ingestão causa dor imediata e intensa na boca e faringe (GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984) Provoca dores abdominais com náuseas, dor de cabeça, diarreia, vômito, possível perda de consciência e morte por falência respiratória (BREATHERICK, 1986; DREISBACH, 1983; GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984). Outros sintomas como proteinúria, acidose, hematêmese, hematúria, anúria, vertigem, também podem ser observados (WINDHOLZ, 1983).

Ocasionalmente pode ocorrer diarreia (com possibilidade de sangue nas fezes), pele pálida, fria e úmida, além de sinais de choque como dificuldade de micção, convulsões, e estupor. A ingestão também pode ocasionar inflamação e ulceração /coagulação com necrose na mucosa gastro-intestinal (GOSSELIN;

HODGE; SMITH, 1984).

Podem, ainda, ser observadas lesões como corrosão no estômago e estrias esofágicas e colapso circulatório e dos rins após a ingestão. A inalação ou aspiração do produto pode provocar severas alterações pulmonares ao entrar em contato com o meio ácido estomacal (GOSSELIN; HODGE; SMITH, 1984). Outras conseqüências são danos degenerativos no fígado, rins, coração e cérebro (DREISBACH, 1983; THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN, 1979).

Formaldeído é tóxico em contato com a pele, podendo causar irritação, odor, vermelhidão e até queimaduras. Estudos mostram que o formaldeído pode causar mutações em células humanas, além de carcinogênese (GRAFSTROM; CURREN; HARRIS, 1985).

Para que se possa avaliar o impacto ambiental e para a saúde de profissionais que necessitam entrar em contato com formaldeído puro ou em solução, três informações são necessárias. A primeira é que as concentrações de formaldeído no ar em laboratórios de anatomia atinge níveis entre 0,07 e 2,94 ppm. A segunda é que tais níveis expõem os profissionais a todo o espectro sintomatológico, desde uma irritação ocular e das vias respiratórias superiores, que ocorre numa concentração de 0,1 ppm a 0,3 ppm, até mesmo irritação dos olhos, nariz e garganta, os quais ocorrem nas concentrações entre 2 ppm a 3 ppm (BRASIL, 2009).

A terceira informação é que, segundo a OSHA, o limite máximo permitido de exposição contínua ao formaldeído é de 5 ppm, sendo que, nos casos de pico, a concentração máxima deve ser de 10 ppm. O *Criteria Document*, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional dos EUA (NIOSH), recomenda que o limite máximo presente no ar seja de 0.1 ppm/15 ppm (BRASIL, 2009).

O formol é um produto inflamável. É um agente redutor, especialmente na presença de álcalis. É incompatível com amônia, álcalis, taninos, bissulfitos, preparações ferrosas, cobre, sais de ferro, iodios, potássio e permanganato. Também é incompatível com fenóis. É violentamente reativo com óxidos nitrosos,

ácido perbóxico, nitrometano, carbonato de manganês e peróxido de hidrogênio, podendo gerar misturas extremamente perigosas e explosivas (CASQUIMICA, 2008).

Quando em solução aquosa, o formol precipita-se em concentrações superiores a 40%, do que deriva a denominação "formol puro" (MICHALANY, 2005).

1.2.2 Aplicabilidade da formalina

O formaldeído é de grande importância para a fixação de tecidos, na forma diluída (formalina), para trabalhos e aulas de Anatomia e Patologia, para estudos tanatológicos e, sobretudo, para o diagnóstico de doenças (OLIVEIRA, 2001), sendo utilizado para estudos histopatológicos sua solução aquosa a 10%, devido ao seu baixo custo e simplicidade de uso (MICHALANY, 2005).

O exame histopatológico (histo=tecido, pathos=doença e logus=estudo) é o estudo morfológico (macro e microscópico). Tem aplicação corrente na medicina para diagnóstico das doenças através de suas alterações histológicas. O produto final deste é o laudo anatomopatológico, que contém o resultado do exame, diagnóstico da doença e, dependendo do caso, a extensão e as complicações da mesma, bem como quadros associados (ANDRADE FILHO, 1987; BOGLIOLO, 1994; NUNES, 1998; ROBBINS, 1994; ROSAI, 1995; STEVENS; LOWE, 1996).

A fixação é um passo fundamental do processo do exame histopatológico e infelizmente muitas vezes negligenciado. A má fixação de biópsias e peças cirúrgicas pode impossibilitar o êxito do exame histopatológico. Baseia-se em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas. Há diversas formas de se fixar um tecido (físico e químico) sendo a fixação obtida através do uso de substâncias químicas (fixadores) (MICHALANY, 2005).

1.2.3 Autólise celular

A autólise *post mortem* é a destruição espontânea de células ou tecidos por enzimas hidrolíticas da própria célula (SHIMIZU et al., 1990), muitas dessas são lisossomais (GUIMARAES, 1982). A velocidade do processo autolítico varia consideravelmente com a temperatura, o tipo de tecido e o teor de enzimas hidrolíticas (GUIMARAES, 1982).

Em necropsias, o intervalo *post mortem* é o fator que mais influencia na autólise: quanto mais longo o tempo de óbito, maior a intensidade do fenômeno (KUMAR; ABBA; FAUSTO, 1999).

O modo do óbito também pode influenciar o processo de autólise, ou seja, na morte de causa aguda há autólise severa e, na morte crônica, a autólise é moderada. Além do modo de óbito e do intervalo *post mortem*, outros fatores como a temperatura do corpo na hora do óbito e a hora do óbito podem influenciar na autólise (SHIMIZU et al., 1990).

A refrigeração retarda a autólise por reduzir a atividade das enzimas hidrolíticas e o crescimento das bactérias (GUIMARAES, 1982). A catepsina, uma proteinase intracelular encontrada em muitos tecidos animais e abundante no fígado, rim e baço, é uma das enzimas mais importantes no processo autolítico.

Hibbs e Black (1963) realizaram um estudo com miocárdio de ratos em vários intervalos *post mortem*, procurando determinar a extensão e a natureza das alterações de autólise ocorridas durante as primeiras 10 horas. Os autores concluíram que espécimes obtidas de autópsias devem ser usados para estudar as alterações ocorridas no tecido com a autólise, para poder diferenciá-las das alterações produzidas por doenças.

Armige et al. (1976) estudaram as mudanças morfológicas e bioquímicas de autólise no músculo cardíaco de oito cachorros em diferentes períodos de *post mortem*. Determinaram a relação da mudança do Ph, conteúdo de ácido láctico e aparência morfológica durante a autólise. O resultado foi que houve uma diminuição do pH e um aumento de ácido láctico já com 10 minutos *post mortem*. Em microscopia óptica e eletrônica, foram observadas pequenas alterações de

autólise nos núcleos, incluindo *clumping* de cromatina e picnose. Concluíram que a diminuição do pH e um aumento de ácido láctico têm relação com alterações morfológicas ocorridas na autólise.

Pentillä e Ahonem (1976) avaliaram os efeitos da autólise no miocárdio de rato, por 20 dias, através da microscopia eletrônica e histoquímica de enzimas. As enzimas foram perdendo as atividades durante a autólise prolongada e mudanças ultra-estruturais foram vistas após um pequeno período de tempo de autólise. Os autores concluíram que as estruturas do miocárdio do rato são resistentes aos efeitos da autólise em temperatura ambiente e que os achados ultra-estruturais mostram uma rápida perda do glicogênio associado com um rápido desaparecimento histoquímico da atividade da fosforilase do miocárdio durante a autólise.

Nevalainen e Anttinen (1977) realizaram um estudo ultra-estrutural e funcional das alterações nas células acinares pancreáticas durante a autólise de ratos wistar e concluíram que ocorre a perda gradual da organização estrutural até chegar à desintegração celular.

Shimizu et al. (1990) também avaliaram a autólise de pâncreas em 92 necropsias e descreveram, como caracteres de necrose, ou a cariólise, picnose e cariorrexe. Nessa avaliação foi considerada a idade, sexo, raça, causa da morte, intervalo *post mortem*, temperatura do corpo no momento da morte e modo da morte. Concluíram que o intervalo após a morte é o fator que mais influencia na autólise, provocando o aumento desta com o passar do tempo.

Pallot, Seker e Abramovici (1992), examinaram os efeitos *post mortem* na estrutura do corpo carotídeo de ratos *wistar* em diferentes intervalos (0, 2, 4, 8, 16 e 24 horas). As peças foram fixadas em formalina neutra tamponada a 4%. Percebeu-se que as peças examinadas imediatamente após a morte, tinham a célula tipo I com morfologia similar ao normal e com a demora da fixação, a célula sofreu autólise, concluindo que a demora para fixar pode causar danos às células.

Outros estudos como os de Munoz et al. (1999) (miocárdio em cachorros adultos), Tomita et al. (2004) (rim, pâncreas, fígado, coração e músculo cardíaco

em ratos wistar) com diferentes tempos de fixação evidenciaram alterações autolíticas significantes embasando a correlação com o tempo após o óbito.

Tomita et al. (2004), concluíram que o processo de autólise depende de vários fatores como a temperatura, umidade do ar e tipo de ambiente e por isso, deve-se levar em consideração os efeitos da extirpação.

O material colhido deve ser colocado imediatamente em solução fixadora. A fixação é imprescindível porque impede a autólise do tecido, enrijece o material mantendo as células e o estroma em condições próximas de seus aspectos no vivo, permitindo assim o estudo morfológico.

1.2.4 Mecanismo de ação da formalina

O mecanismo de ação deste fixador se deve à aquilação de radicais amino, carboxil, oxidril e sulfidril de proteínas e ácidos nucléicos das células, formando pontes metilênicas ou etilênicas, o que impede que esses compostos realizem suas funções (OLIVEIRA, 2001).

A fixação dos tecidos com formalina (ou formol a 10%) provoca a inativação enzimática, impedindo a autólise celular. Dessa forma, o objetivo de uma solução fixadora, no caso de tecidos vivos, é matar a célula conservando suas estruturas com as características que tinham em vida (GENOVESE, 1992; OLIVER; SLOAN; PEMBERTON, 2004).

O aldeído fórmico atua como fixador interagindo com os aminoácidos lisina e arginina. Tal fixador não provoca precipitação de proteínas, não preserva gorduras livres, porém fixa lipídeos complexos, provoca leve precipitação de outros constituintes celulares e não é o fixador de eleição para carboidratos (LAB & VET, 2007).

O ácido fórmico é um dos produtos de degradação do formol, sendo que tal ácido freqüentemente interage com a hemoglobina produzindo um pigmento acastanhado chamado de "pigmento de formol" ou hematina. O uso de solução tampão evita a acidificação do fixador, impedindo assim o aparecimento do pigmento de formol (LAB & VET, 2007). Ou seja, se a formalina (formol a 10%)

estiver com pH em torno de 7.0 (neutro) não haverá a formação desses pigmentos.

1.2.5 A importância da boa fixação de tecidos no laboratório de Morfologia

As células e seus constituintes quando não fixadas corretamente mostram distorção e retração que dificultam sua avaliação (FOX; JOHNSON; WHITINNG, 1985), podendo impossibilitar o êxito do exame histopatológico (MICHALANY, 2005).

A fixação apropriada mantém as características do tecido e minimiza o aparecimento de artefatos que podem dificultar o exame histopatológico e conduzir ao erro no diagnóstico final (OLIVER; SLOAN; PEMBERTON, 2004).

A busca por adequada solução fixadora é importante para o estudo histológico de diferentes tecidos biológicos (NEVES et al, 2006).

O tempo de fixação, o tamanho da amostra e a capacidade de penetração do fixador são pontos importantes para a obtenção de bom material para histomorfologia, histoquímica e avaliação imunológica (SALMITO-VANDERLEY; NEVES; SANTANA, 2002).

A fixação é o fator isolado de maior influência dentre as etapas que constituem o processamento de tecidos para exame histológico. Quase todas as etapas podem ser corrigidas por reprocessamento, caso haja algum problema técnico. Assim por exemplo, os corantes, na sua maioria, podem ser removidos para corrigir problema de intensidade ou especificidade. Em contraste, a má fixação produz danos permanentes (CARSON, 2009).

Para garantir uma boa fixação as biópsias e peças cirúrgicas devem ser imersas no fixador, logo após sua retirada, em quantidade de fixador cerca de no mínimo 10 vezes o volume do material. Como a solução é consumida pelos tecidos, o volume deve ser suficiente para garantir a fixação do centro da peça. As peças cirúrgicas grandes devem ser abertas para melhor penetração do fixador (ABULAFIA, 1973; CARVALHO, 1971; FLEURY, 1978; GREIN, 1981;

MICHALANY, 2005, NEVES; MARTINS; GENOVESE, 1992; OLIVER; SLOAN; PEMBERTON, 2004; TOMMASI, 2002).

Na seleção das amostras para exame histológico as secções encaminhadas nos cassetes correspondentes não devem ultrapassar 3 mm de espessura.

Do mesmo modo, tanto no processamento manual quanto no histotécnico (processador de tecidos) o ideal é não processar em conjunto pequenas biópsias e espécimes maiores no mesmo processador. Quando isso ocorre, leva ao super processamento e excesso de desidratação das biópsias e sub-processamento e desidratação incompleta dos espécimes maiores (CARSON, 2009).

1.2.6 Agentes formadores de géis

As substâncias formadoras de géis são polímeros, que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação. Pode-se definir o gel como uma preparação semi-sólida composta de partículas coloidais que não sedimentam (ficam dispersas) (SBRT, 2009a).

De acordo com as características dos polímeros, os géis podem apresentar natureza iônica ou não-iônica. Os géis de natureza não-iônica possuem estabilidade em ampla faixa de pH, tornando-se possível a veiculação de substâncias de caráter ácido, como os alfa-hidroxiácidos. Já os de caráter aniônico são pH dependentes, ou seja, apresentam-se estáveis em pH neutro ou próximo do neutro (MAIA CAMPOS; BOMTEMPO; LEONARDI, 1999).

Dentre as matérias primas usadas na preparação de géis, tem-se destacado os ácidos carboxivinílicos (Carbopóis[®]) e os ácidos poliacrílicos (Pemulen[®]). O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto. As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação respectiva, sendo conveniente conhecer as velocidades de

deformação das operações a que vão estar sujeitos (LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001).

Existem vários tipos de géis, os mais comuns como, por exemplo, o gel para ultrassonografia ou gel condutor, que é produzido a partir dos polímeros: Netrosol[®] ou Carbopol[®].

O Natrosol[®] ou Hidroxietilcelulose (HEC) é um sólido higroscópico na forma de pó classificado como não perigoso que quando em contato com a água, forma uma espécie de gel.

A resina Carbopol[®] constitui uma família de polímeros hidrosolúveis que são empregados para espessar e dar viscosidade em soluções e estabilizar emulsões. O seu nome comercial é: Carbopol 940[®], Carbopol[®] Ultrez[®], Pemulen e sua fórmula estrutural é: $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$ (SBRT, 2009a).

A resina Carbopol[®] apresenta-se na forma de um pó branco de odor ligeiramente ácido. Deriva-se dos polímeros do ácido acrílico, que devido aos grupamentos carbonila advém à maioria de suas propriedades e emprego. A resina Carbopol[®] é obtida pela síntese e polimerização do ácido acrílico e dependendo da cadeia carbônica e variação do grupo carboxila, consegue-se obter diversos tipos de resina Carbopol[®]. O Carbopol 940[®] é o que tem maior viscosidade e é o mais utilizado nos hidro-alcoólicos claros e transparentes. O Carbopol 940[®] tem a capacidade de produzir soluções e emulsões em qualquer viscosidade até gel. É usado para suspender ingredientes não solúveis e como estabilizante de emulsões (SBRT, 2009a).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver e testar a formalina sob a forma de gel para uso na fixação de pequenas biópsias.

2.2. Específicos

- Gelificar a formalina (10% e 15%) por meio de testes utilizando dois principais agentes formadores de géis um natural e o outro sintético;
- Analisar possíveis diferenças qualitativas entre os tecidos fixados pela formalina líquida a 10% (grupo controle) por 12 horas e tecidos fixados em formalina-gel em concentrações de 10% e 15% por 12 horas e por 24 horas de fixação (grupos experimentais).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo:

O estudo é do tipo qualitativo, descritivo com comparação de grupos.

3.2. Etapas de desenvolvimento da formalina-gel a partir da solução de formaldeído de uso comercial

Essa dissertação segue a linha de pesquisa do autor em desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos para aplicação em análise morfológica, em especial em Anatomia Patológica, parte destes objetivando maior biossegurança, com vários trabalhos apresentados em congressos (Apêndice C).

3.2.1 Teste para seleção do melhor agente formador de gel para formalina

Para a gelificação da formalina, foram realizados vários ensaios pilotos, testando-se duas principais substâncias formadoras de géis conhecidas no mercado (o Natrosol[®] Hidroxietilcelulose (HEC) e o Carbopol 940[®]), essas substâncias são usadas na preparação de géis comuns, como, por exemplo, os lubrificantes íntimos e os utilizados na realização de exame de ultrasson.

Para a seleção da substância ideal, foram verificadas propriedades reológicas, como viscosidade e estabilidade aparente da formalina-gel e algumas características importantes como: turbidez, precipitação, alteração da cor, alteração de odor, viscosidade, separação de fases, transparência e pH.

3.2.2 Preparo da formalina-gel em dois diferentes agentes gelificantes e em duas concentrações diferentes:

3.2.2.1 Formalina-gel a 10% utilizando o Natrosol® Hidroxietilcelulose (HEC)

Composição:

3 g de Natrosol®

900 mL de água destilada

100 mL de formaldeído (37%)

20 gotas hidróxido de sódio a 10%

Modo de preparo:

Em uma cuba de plástico redonda adicionou-se 900 mL de água destilada e 100 mL de formaldeído.

Na solução formada dissolveu-se 3 g de Natrosol®, com o auxílio de agitador (batedeira adaptada) em rotação lenta.

Após total diluição por uma hora, ainda sob agitação, adicionou-se 20 gotas de hidróxido de sódio a 10% (para a gelificação)

3.2.2.2 Formalina-gel a 15% utilizando o Natrosol® Hidroxietilcelulose (HEC)

Composição:

3g de Natrosol®

850 mL de água destilada

150 mL de formaldeído (37%)

15 gotas de hidróxido de sódio a 10%

Modo de preparo:

Em uma cuba de plástico redonda adicionou-se 850 mL de água destilada e 150 mL de formaldeído.

Na solução formada dissolveu-se 3 g de Natrosol[®], com o auxílio de agitador (batedeira adaptada) em rotação lenta

Após total diluição por uma hora, ainda sob agitação, adicionou-se 15 gotas de hidróxido de sódio a 10% (para a gelificação)

3.2.2.3 Formalina-gel a 10% utilizando o Carbopol 940[®] (Figura 12)

Composição:

1 g Carbopol[®]

900 mL de água destilada

100 mL de formaldeído 37%

28 gotas de hidróxido de sódio a 10%

Modo de preparo:

Em uma cuba de plástico redonda adicionou-se 900 mL de água destilada e 100 mL de formaldeído.

Na solução formada dissolveu-se 1 g de Carbopol[®], com o auxílio do agitador (batedeira adaptada) em rotação lenta.

Após total diluição, por 10 minutos, ainda sob agitação, adicionou-se 28 gotas de hidróxido de sódio a 10% (para a gelificação).

3.2.2.4 Formalina-gel a 15% utilizando o Carbopol 940[®]

Composição:

1 g Carbopol[®]

850 mL de água destilada

150 mL de formaldeído 37%

28 gotas de hidróxido de sódio a 10%

Modo de Preparo:

Em uma cuba de plástico redonda adicionou-se 850 mL de água destilada e 150 mL de formaldeído.

Na solução formada dissolveu-se 1 g de Carbopol[®], com o auxílio do agitador (batedeira adaptada) em rotação lenta.

Após total diluição, por 10 minutos, ainda sob agitação, adicionou-se 28 gotas de hidróxido de sódio a 10% (para a gelificação).

3.3. Obtenção dos espécimes para fixação e teste da formalina-gel

Para testar histologicamente as propriedades de fixação do formol-gel, foram utilizados fragmentos teciduais (medindo aproximadamente 0,5 X 0,6 X 0,5 cm) de dois animais eutanasiados, pertencentes ao grupo controle da pesquisa de Bruna da Rosa Maggi San't Helena, intitulada "Estudo de alguns parâmetros cardiovasculares em ratos desnutridos e normonutridos em diferentes estágios de desenvolvimento", desenvolvida em 2007 com protocolo nº 23076.008507/2007-16, aprovado pelo Conselho de Ética em Experimentação Envolvendo Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco através do ofício nº 84 2007 (Anexos 1 e 2).

3.4. Manipulação dos animais experimentais

Dois ratos machos albinos de linhagem *Wistar*, saudáveis, foram mantidos no Biotério do Departamento de Nutrição - CCB até atingir idade adulta (com 90 dias de vida e peso de \pm 350 g) hidratados e alimentados com água filtrada, ração industrial Labina, repecivamente, vivendo em ambientes climatizado (aproximadamente 22°C) e com ciclos de iluminação artificiais (dia e noite).

Os animais foram submetidos aos procedimentos de anestesia, eutanásia, coleta de órgãos e tecidos, seguido do congelamento da carcaça até o descarte no lixo biológico pelo Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

A droga utilizada para anestesia foi o Pentobarbital, na dosagem de 50 mg/Kg, via intraperitoneal, no volume de 0,5 mL de Nembutil (6,5 g / 100 mL).

3.5. Seleção dos tecidos para exame histológico

Os órgãos retirados dos animais foram: Coração, rim, fígado, baço, músculo esquelético, cérebro, pulmão, estômago.

Para de evitar autólise, a coleta do material após a eutanasia, foi feita em duas etapas: os órgãos compactos como o fígado, pulmão, rim, baço e músculo esquelético foram biopsiados em apenas um animal; e numa segunda etapa, utilizando outro animal, foram colhidas as amostras dos órgãos ocos como: coração e estômago. Assim, o tempo entre a colheita e a fixação foi minimizado, para que fenômenos autolíticos não interferissem no resultado da pesquisa.

As amostras dos tecidos estudados foram separadas em cinco grupos de acordo com o procedimento de fixação, o qual foi realizado em temperatura ambiente.

Grupo controle

- (FL10%12h): tecidos fixados em formalina líquida (FL) a 10%, por 12 horas, com pH tamponado em solução de fosfato de sódio monobásico e dibásico, em torno de 7,0.

Grupo teste (todos fixados sem necessidade de tamponamento)

- (FG10%12h): tecidos fixados em formolína-gel a 10%, por 12 horas;
- (FG10%24h): tecidos fixados em formol-gel a 10% por 24 horas;
- (FG15%12h): tecidos fixados em formol-gel a 15%, por 12 horas;
- (FG15%24h): tecidos fixados em formol-gel a 15% por 24 horas.

3.6 Processamento histológico

Para inclusão em parafina, os tecidos coletados foram submetidos às etapas de rotina abaixo (MICHALANY, 2005):

1. Lavagens sucessivas em água destilada;
2. Desidratação em sucessivos álcoois de concentrações crescentes: (70, 80, 90 e 100%) por 40 minutos cada, em temperatura ambiente;
3. Diafanização e clarificação: álcool-xilol, xilol 1 e xilol 2 por 40 minutos cada, em temperatura ambiente;
4. Impregnação em parafina 1 e parafina 2, por 30 minutos cada, na estufa a 60°C;
5. Inclusão em blocos de parafina;
6. Execução da microtomia e pescagem dos cortes histológicos em duas lâminas por grupo;
7. Secagem e adesão dos cortes nas lâminas, por 20 minutos na estufa a 60°C;
8. Desparafinização das preparações histológicas pelo xilol 1 e xilol 2 por dez minutos;
9. Hidratação em sucessivos banhos de proporções decrescentes de álcoois: 100%, 90%, 80%, 70% e água potável;
10. Coloração das lâminas pela Hematoxilina e Eosina (HE);
11. Desidratação, clarificação e montagem das preparações com resina e lamínula.

3.7. Exame das preparações histológicas

Foram analisadas 40 lâminas, considerando os oito grupos segundo o órgão de procedência do material de biópsia e os cinco grupos experimentais, considerando os meios de fixação.

Cada grupo esteve constituído por cinco lâminas diferenciadas segundo o agente de fixação, das quais quatro foram fixadas com a preparação de formalina-

gel em concentrações de 10% ou 15%, com tempos de fixação de 12 h ou 24 h, e uma lâmina, com formalina líquida a 10%, submetida à fixação por 12 horas, que se constituiu o padrão.

Para análise da qualidade da preparação histológica, foi considerada a concordância de avaliação das 40 lâminas segundo órgão biopsiado, feita por dois anatomopatologistas (aqui denominadas X e Y), as quais desconheciam o agente de fixação de cada lâmina.

As preparações foram codificadas, como segue: (1) = fixação com formalina-gel a 15%, durante 24 h; (2) = fixação com formalina-gel a 15%, durante 12 h; (3) = fixação com formalina-gel a 10%, durante 24 h; (4) = fixação com formalina-gel a 10% durante 12 h; (5) = fixação com formalina líquida a 10%, durante 12 h.

Realizou-se análise subjetiva baseada nas indagações especificadas no Apêndice A. Cada examinadora respondeu se havia diferenças na qualidade técnica das lâminas quanto a permitir ou não o exame histológico / diagnóstico acurado. A seguir classificaram as lâminas em graus decrescentes de qualidade especificando o provável problema responsável pelo resultado final da preparação histológica considerada de pior qualidade.

O grau de associação ou correlação entre os dois conjuntos de postos, ou seja, o grau e a semelhança entre as duas ordenações das lâminas com material de biópsia de cada órgão foram determinados pelo coeficiente de correlação por postos de Kendall ($Tau a = \tau$), já que as variáveis X e Y tinham nível de mensuração ordinal, permitindo atribuir a cada avaliação um posto, tanto para X quanto para Y, e não havia empates para um mesmo avaliador.

O coeficiente τ representa uma probabilidade, ou seja, é a diferença de probabilidade de as duas variáveis estarem na mesma ordem e a probabilidade de estarem em ordem diferente (ABDI, 2007).

Para o cálculo de τ , admitiu-se que as avaliações do anatomopatologista X estavam em ordem natural, de tal forma que a hipótese nula representou a ausência de diferença entre as duas classificações e a hipótese alternativa

significou que a classificação dos dois avaliadores diferia significativamente, em nível de significância de 0,05.

Em uma segunda etapa, o examinador Y revisou todas as lâminas histológicas com conhecimento prévio do tipo de fixador, concentração e tempo de fixação. Nessa etapa, foram analisadas diferenças qualitativas e elaboradas hipóteses quanto às possíveis causas responsáveis pelas diferenças encontradas, as quais foram anotadas em uma ficha padrão (Apêndice B).

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento da formalina-gel

Para determinação da substância formadora de gel, obteveiram-se resultados satisfatórios com a utilização do carbopol940[®], tais como: consistência de gel, boa estabilidade, viscosidade, transparência, refringência e pH ideal (pH=7,0). Por outro lado, com o natrosol[®], produziu-se uma consistência semi-líquida inadequada, observando-se ainda turbidez, baixas refringência e transparência, presença de instabilidade, maior odor e pH ácido (pH=5,0).

O Quadro 1 mostra as diferenças de características aparente na obtenção do gel com a utilização do Natrosol[®] em comparação com o Carbopol 940[®].

PARÂMETROS	AGENTES FORMADORES DE GÉIS	
	Natrosol [®]	Carbopol [®]
Turbidez	Torna-se turvo com o uso do formaldeído a 10% e 15%	Não se torna turvo com o uso do formaldeído a 10% e 15%
Estabilidade	Instável	Estável
Precipitação	Ausente	Ausente
Alteração da cor	Ausente	Ausente
Alteração de odor	Ausente	Presente com minimização olorosa
Viscosidade	Semi-líquida	Semi-sólida
Separação de fases	Não forma	Não forma
Transparência	Ruim	Boa
Refringência	Baixa	Excelente
pH	5.0	7.0

Quadro 1 - Comparação entre as características aparente do gel obtido com o Natrosol[®] e com o Carbopol 940[®]

Ao final dos experimentos, obteve-se, para um quilo de formalina-gel, a seguintes fórmulas:

1) Composição formalina-gel a 10%

carbopol940 [®]	1 g
água destilada	900 mL
formaldeído a 37%.....	100 mL
hidróxido de sódio a 10%.....	28 gotas

2) Composição formalina-gel a 15%

carbopol940 [®]	1 g
água destilada	850 mL
formaldeído a 37%.....	150 mL
hidróxido de sódio a 10%.....	28 gotas

4.2 Testes da formalina-gel como fixador de fragmentos teciduais

No que toca a qualidade técnica do tecido processado por ambos os métodos (FL ou FG), independentemente da concentração utilizada (10% ou 15%) e tempo de fixação (12 ou 24 horas), houve concordância completa entre os patologistas quanto à ausência de defeitos técnicos que inviabilizassem o exame histológico ou diagnóstico acurado, tampouco se observaram sinais de má fixação como autólise, retração tecidual ou formação de pigmento heme-formalina (Figuras 1 a 11).

Os examinadores relataram dificuldades no estudo cego, para estabelecer diferenças entre as cinco preparações histológicas de cada órgão e estabelecer por ordem decrescente quais as melhores e as piores. Ambos referiram que possivelmente haveria diferença intra-observador, se o material fosse reavaliado.

Na Tabela 1, estão expressas as classificações atribuídas pelos anatomopatologistas a cada lâmina, segundo o órgão analisado, assim como os respectivos valores de τ e os níveis de significância.

Constatou-se não haver diferença significativa entre as avaliações, exceção feita para a ordenação das preparações de pulmão, para a qual houve diferença significativa entre os avaliadores. Nas lâminas de pulmão, as avaliações dos anatomopatologistas dependeram do fixador empregado.

Tabela 1 – Distribuição das avaliações de qualidade das preparações histopatológicas realizadas por dois anatomopatologistas e de sua significância segundo coeficiente de Kendall

Órgão analisado	Ordenação de postos por qualidade										Valor de τ	Valor de p
	Avaliadora X					Avaliadora Y						
	1°	2°	3°	4°	5°	1°	2°	3°	4°	5°		
Baço	3	4	1	5	2	5	3	4	1	2	0,400	0,242
Rim	2	4	3	5	1	5	2	4	1	3	0,200	0,408
Coração	3	2	5	1	4	5	3	2	1	4	0,600	0,117
Músculo esquelético	4	1	5	2	3	4	3	5	2	1	0,000	0,592
Fígado	1	3	2	5	4	5	3	1	2	4	0,200	0,408
Cérebro	1	3	5	4	2	1	3	4	2	5	0,600	0,117
Pulmão	1	4	3	2	5	5	2	3	1	4	-0,800	0,042*
Estômago	5	1	4	3	2	5	3	2	1	4	0,200	0,408

Legenda: Soluções: 1 – FFG 15% 24 h, 2 – FG 15% 12 h, 3 – FG 10% 24 h, 4 – FG 10% 12 h, 5 – FL 10% 12 h, * p < 0,05

Quanto à concordância entre as avaliações dos anatomopatologistas, identificou-se que mais frequentemente houve concordância em preparações fixadas com formalina-gel a 10%, quando comparada às preparações a 15% (Quadro 2).

Constatou-se também que as concordâncias em lâminas fixadas com formalina-gel a 15% se acompanharam de concordância para aquelas fixadas com formalina-gel a 10%, mas o inverso não foi verdadeiro (Quadro 2).

Órgão analisado	Ordenação por qualidade				
	Formalina gel 15% (24 h)	Formalina gel 15% (12h)	Formalina gel 10% (24h)	Formalina gel 10% (12h)	Formalina líquida 10% (12h)
Baço		X			
Coração	X			X	
Músculo esquelético		X		X	X
Fígado			X	X	
Cérebro	X		X		
Pulmão			X		
Estômago					X

Quadro 2 – Distribuição das concordâncias de avaliações de qualidade das preparações histopatológicas realizadas por duas anatomopatologistas, segundo fixador empregado

Em apenas três órgãos (baço, coração e fígado) houve concordância quanto a lâmina de menor qualidade técnica que correspondeu, respectivamente, a solução 2 (formalina-gel 15%, 12 horas) no baço, solução 4 (formalina-gel 10%, 12 horas) no fígado e coração. Houve concordância quanto a melhor preparação histológica no exame do músculo esquelético que correspondeu à solução 4 (formalina-gel 10%, 12 horas), no cérebro, à solução 1 (formalina-gel 15%, 24 horas) e no estômago, à solução 5 (formalina líquida a 10%, 12 horas).

Na avaliação onde houve concordância quanto à menor qualidade técnica, o examinador X relatou os seguintes problemas: menor detalhe nuclear, pior coloração e discreta falha na desidratação do tecido. O avaliador Y relatou maior acidofilia e aspecto algo comprimido do tecido.

Na segunda avaliação pelo patologista Y, conhecendo previamente o tipo de fixador, concentração e tempo de fixação, manteve-se a impressão de aumento da eosinofilia na maior parte das lâminas fixadas pela formalina-gel (Figuras 5, 7 e 8). Notou, ainda, no pulmão, discreta redução no diâmetro das cavidades alveolares no grupo fixado pela formalina-gel em relação ao grupo controle fixado com formalina líquida (Figuras 1 e 2).

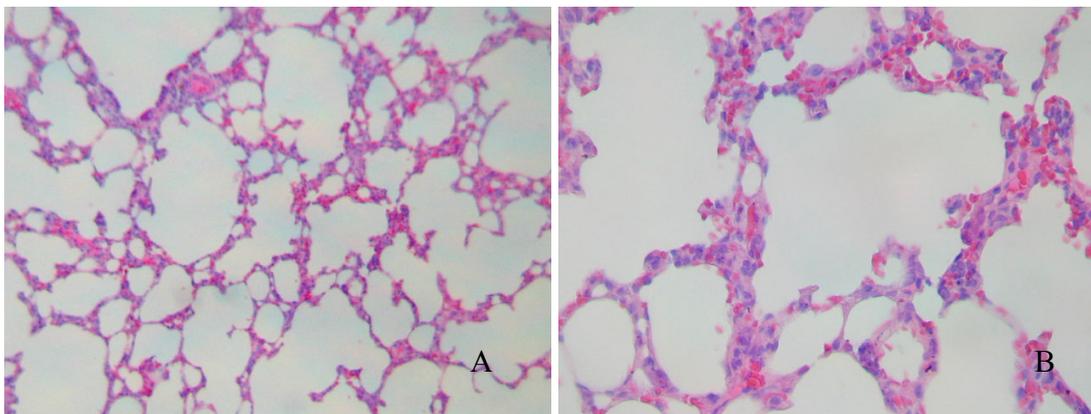


Figura 1: Cortes histológicos de alvéolos pulmonares

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 100X) B: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x)

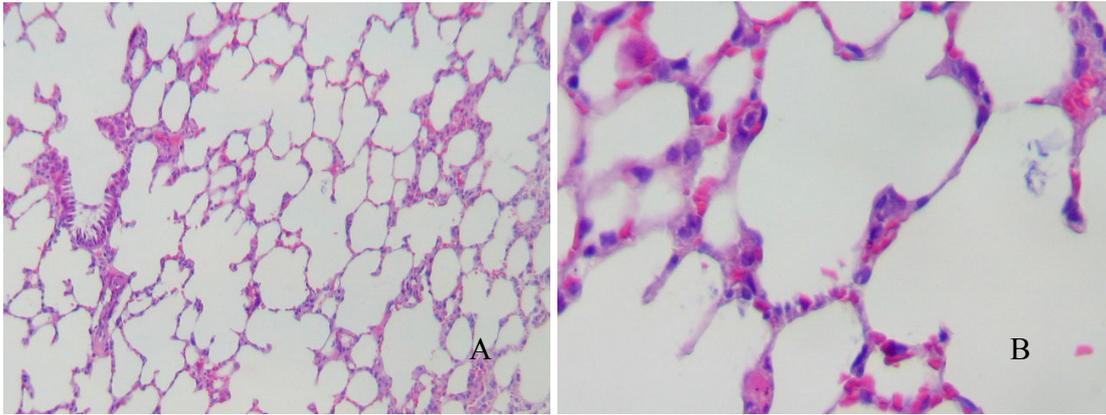


Figura 2: Cortes histológicos de alvéolos pulmonares

Legenda: **A:** Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 100x), **B:** Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

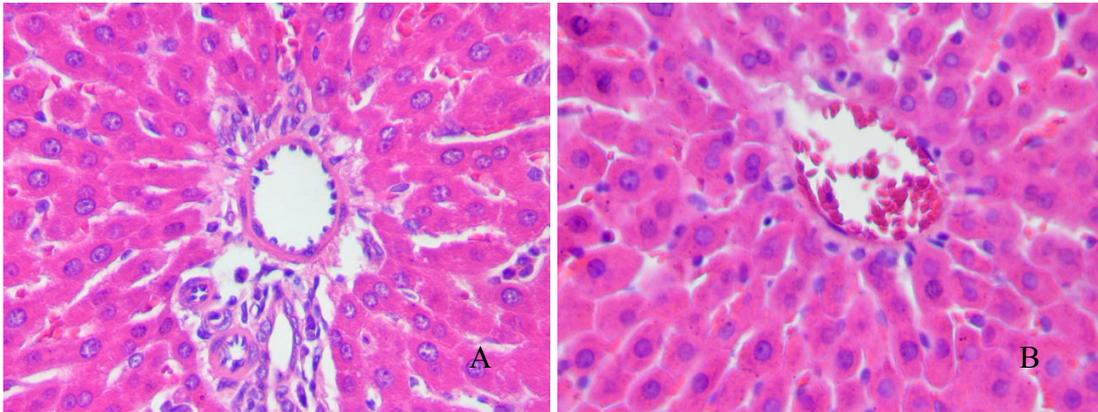


Figura 3: Cortes histológicos de fígado, observando-se veia centro-lobular e travess de hepatócitos

Legenda: **A:** Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x); **B:** Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

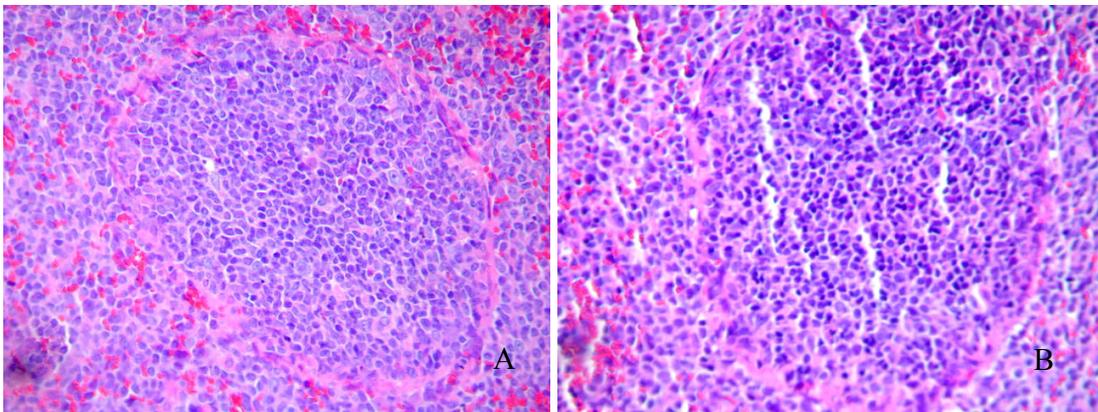


Figura 4: Cortes histológicos de folículo linfático em baço

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

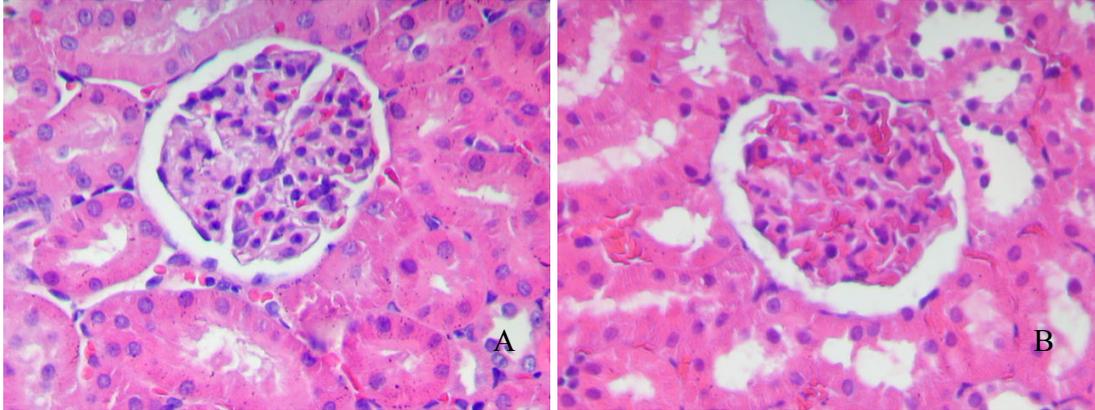


Figura 5: Cortes histológicos de glomérulo renal

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
B: Grupo teste em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

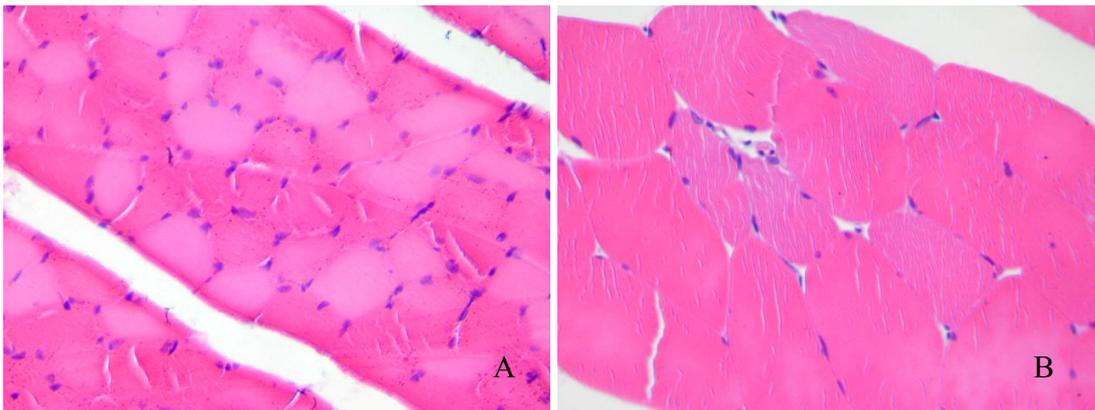


Figura 6: Cortes transversais de fibras de músculo esquelético

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

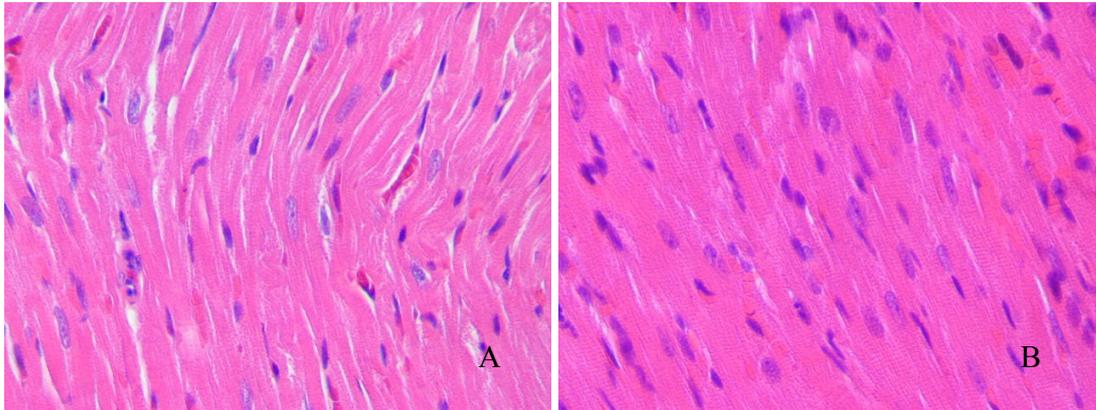


Figura 7: Cortes histológicos de músculo cardíaco

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
 B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

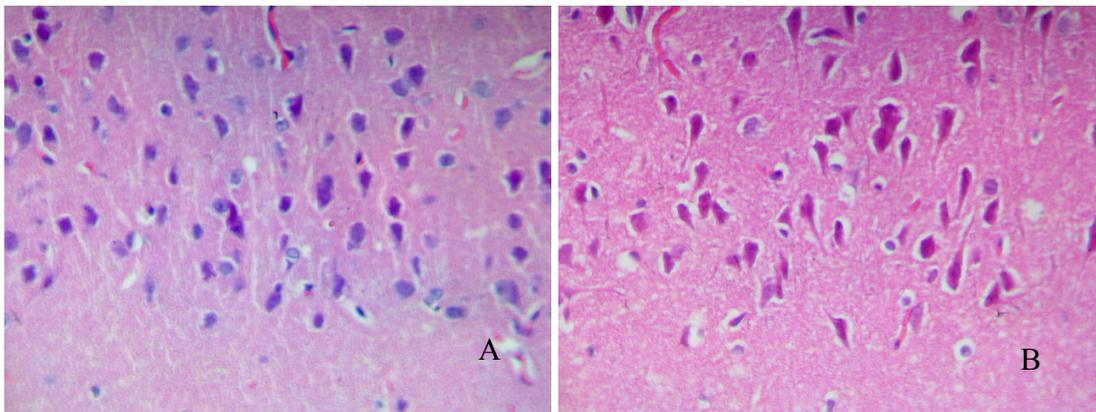


Figura 8: Cortes histológicos de córtex cerebral

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
 B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

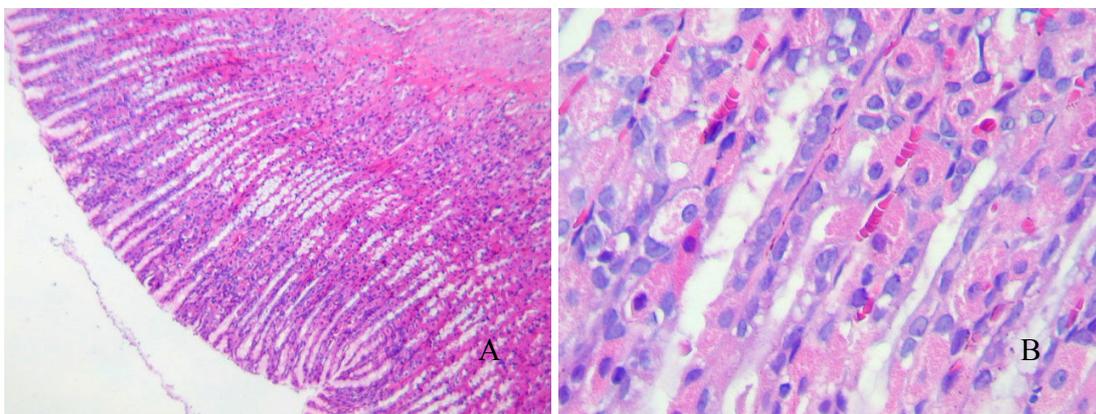


Figura 9: Cortes histológicos de glândulas gástricas

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 25x);
 B: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x)

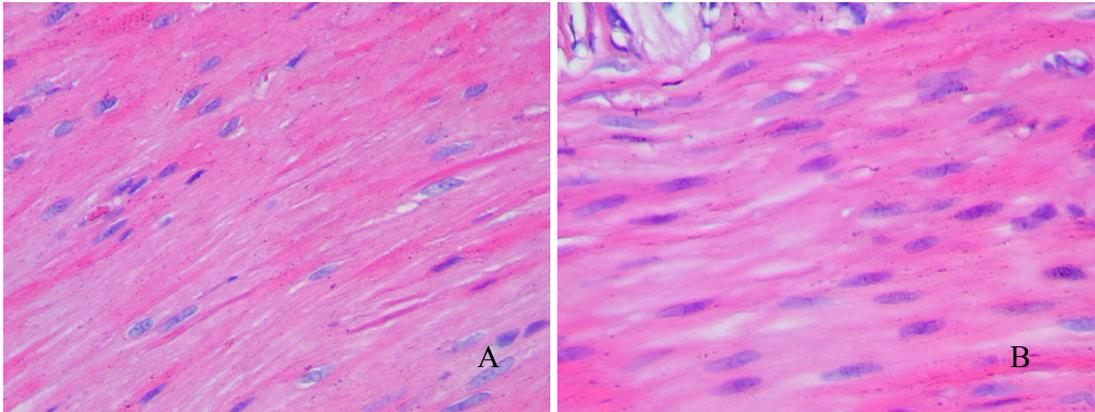


Figura 10: Aspecto histológico de camada muscular própria de estômago

Legenda: A: Grupo controle fixado em formalina líquida a 10% por 12 horas (HE, 400x);
B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)

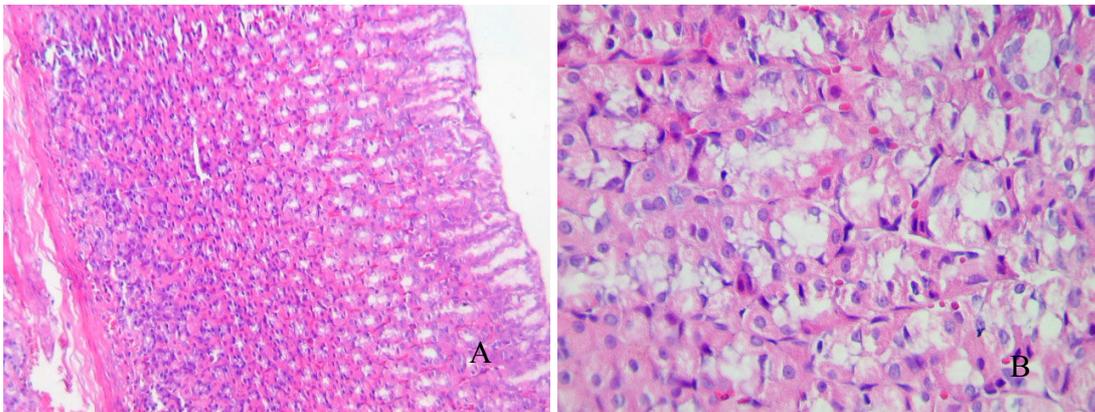


Figura 11: Cortes histológicos de glândulas de estômago

Legenda: A: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 25x);
B: Grupo teste fixado em formalina-gel a 10% por 12 horas (HE, 400x)



Figura 12: Aspecto do carbopol[®]

Legenda: A: Carbopol 940[®] em pó; B: Carbopol 940[®] em FG



Figura 13: Tanque homogenizador adaptado



Figura 14: Aspecto de fragmentos de tecido em formalina

Legenda: F: Formalina líquida; M: formalina-gel. Notar o contato completo do tecido com o fixador na FG

5. DISCUSSÃO

5.1 Algumas vantagens observadas com o uso da formalina-gel

Durante a manipulação da formalina líquida é comum a formação de vapores que, por sua vez, provocam irritação ocular e das vias aéreas. Estes sintomas foram pouco percebidos pelo autor durante a realização dos testes utilizando a formalina-gel, confirmando sua maior segurança para uso nos laboratórios, pelo aprisionamento dos vapores de aldeído no gel. Esse aspecto é particularmente importante pelas exigências atuais da Vigilância Sanitária (uso de exaustores, máscaras de gás, óculos de proteção e medição do nível de concentração de formaldeído ambiental, etc...) no controle de partículas de formaldeído nos ambientes em que essa substância é manipulada.

De acordo com Michalany (2005), um dos fatores que contribuem para uma boa fixação é o total contato da amostra com a solução fixadora. Esse contato, muitas vezes, só pode ser assegurado mediante o impedimento da flutuação da amostra com o uso de gases ou compressas, depositadas sobre a mesma para mantê-la submersa no líquido fixador, a exemplo do pulmão. Do mesmo modo, amostras mais pesadas se depositam no fundo do recipiente, de forma que parte do tecido fica em contato com o recipiente e não em contato direto com o fixador. Quando utilizada a formalina-gel, a amostra fica suspensa em meio ao gel e a solução fixadora fica em contato com toda a superfície da amostra em contraste com a formalina líquida (Figura 14).

Segundo pesquisa anterior do nosso grupo (ARAÚJO, 2007), 54% das falhas observadas envolvendo os cuidados com amostras teciduais na fase pré-analítica do exame anatomopatológico estão relacionadas com o vazamento da solução fixadora, durante o transporte e na recepção do laboratório, oferecendo riscos à saúde dos profissionais, bem como molhando fichas e borrando informações referentes à identificação e dados clínicos do paciente.

Em nossa pesquisa observamos que, pelo fato do gel ter consistência semi-sólida, o risco de extravasamento do fixador em gel é mínimo e mesmo com a quebra do recipiente a formalina-gel, é de fácil remoção antes mesmo que provoque danos à saúde.

O fixador em forma de gel, também é importante em cidades onde inexistem laboratórios de Anatomia Patológica, por facilitar o transporte seguro da amostras teciduais para outros centros.

Existe um inconveniente no uso de formalina, que é a formação de pigmentos de formol que ocorrem com o tempo no tecido fixado em formalina não tamponada. O tamponamento da formalina e o ajuste do pH desta solução representam a resolução para essa pigmentação tecidual. Para esse tamponamento é necessário o controle do pH em torno de 7,0 com adição de fosfato de sódio monobásico e dibásico (MICHALANY, 2005).

Segundo a SBRT (2009 a), o tamponamento não é necessário na confecção da formalina-gel, o que foi constatado na prática, no nosso estudo, durante a etapa de espessamento do gel. O pH ideal para o ponto máximo de gelificação é justamente em torno de 7.0, obtido por algumas gotas de hidróxido de sódio a 10% para cada litro, que tem um custo muito inferior aos fosfatos utilizados para neutralizar a mesma quantidade de formalina líquida.

Como desvantagem da formalina-gel, foi observada a facilidade de perda de água para o ambiente quando o recipiente é destampado por longo período, embora a formalina líquida também tenha que ser acondicionada em recipiente fechado para evitar evaporação para o meio ambiente.

Não há aumento de custos significativos para a confecção da formalina-gel, sendo necessária apenas a aquisição do tanque agitador (que pode ser uma batedeira adaptada) e da substância formadora de gel. Conforme já referido, como a formalina-gel não tem pH ácido não há necessidade de utilização dos sais para tamponamento.

5.2 Expectativa da aplicação da formalina-gel em experimentos futuros

1. Proteger materiais submetidos a transporte a longa distância e sem risco de vazamento;
2. Servir como conservante de peças anatômicas ou cirúrgicas (previamente fixadas) por longo período.

Esse é um tipo de aplicação que poderá ser muito útil na rotina dos Laboratórios de Anatomia Patológica na conservação de peças cirúrgicas, já fixadas, pois está regulamentado que devem ser guardadas por um período de pelo menos três meses, antes do descarte final. O objetivo é que possam ser re-examinadas em casos de dúvidas ou até em processos judiciais. A formalina em gel minimizaria os odores do armazenamento do grande volume de peças cirúrgicas por este período.

Outra aplicação prática é o uso em museus de Anatomia Patológica. Em especial, quando essas peças são acondicionadas em plástico, destinadas às aulas práticas da graduação (como ocorre no Departamento de Patologia, CCS, UFPE). O uso do gel, pela sua maior consistência, reduziria as rachaduras das peças produzidas pela manipulação constante dos alunos e professores e o risco de vazamento. A ausência de pigmento hemi-formalina com o uso da formalina-gel também facilitaria a preservação da cor da peça anatômica.

Já iniciamos os primeiros estudos de aplicabilidade da formalina-gel no museu de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da UFPE, com a colaboração da professora orientadora, os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentos Envolvendo Seres Humanos do CCS, UFPE.

5.3 Detalhes técnicos observados durante a fase do desenvolvimento da formalina-gel, úteis para a reprodução da técnica por outros pesquisadores

Segundo a SRBT (2009b), para o preparo do gel, deve-se primeiramente solubilizar os agentes conservantes na água e, em seguida, polvilhar lentamente o Carbopol® sobre a mesma, sob agitação vigorosa, deixando que o Carbopol® sofra um inchaço inicial para sua melhor dispersão. Para facilitar a dispersão e dependendo do tipo de Carbopol®, verifica-se se o mesmo se solubiliza melhor a quente, a frio ou se comporta melhor quando preparado sob choque térmico. Como existe uma tendência à formação de grumos durante o processo de preparo, verificamos que devem ser dispersos com agitação ou trituração (pressionando-os contra a parede do recipiente de preparo) (SBRT, 2009b).

No nosso estudo, não foi necessária a utilização de agentes conservantes para evitar crescimento microbiano, pois a formalina já possui ação antimicrobiana e esporicida, conforme referido por Oliveira et al (2001).

Durante o preparo, constatamos, ainda, que a agitação vigorosa acima de 100 rpm (rotação por minuto) favorece a formação de bolhas e espuma, resultando em um gel com bolhas. Usando rotação mais baixa (< 100 rpm) obtivemos a dissolução do pó na formalina líquida por completo, impedindo assim a formação de bolhas. Essa diluição foi realizada utilizando um equipamento de laboratório farmacêutico denominado de tanque agitador ou tanque homogeneizador (TH), semelhante a um liquidificador gigante, marca (ERLI®), do Departamento de Farmácia da UFPE. Para evitar a formação de grumos ou excesso de bolhas durante a diluição, regulou-se este aparelho para a rotação mínima.

Na medida em que os experimentos foram avançando e com a necessidade de se confeccionar mais formalina em gel, tornou-se difícil a utilização do TH do Departamento de Farmácia, por conta da demanda do laboratório de manipulação. Foi necessária a aquisição de um TH para o Laboratório de Histotecnologia onde foram realizados os experimentos posteriores. Como a pesquisa não contava com patrocínio, tentou-se, sem sucesso, trabalhar com um liquidificador (para substituir

o TH) e depois com uma batedeira (ARNO®) na baixa rotação obtendo um resultado algo semelhante, porém, inferior, pois a baixa rotação da batedeira, assim como a do liquidificador, ainda era superior ao do TH. Por conta desse fato, sabendo-se que a batedeira funcionava na corrente de 220 W, adaptou-se, então, um estabilizador com saída de 110 W no sentido de reduzir ainda mais a rotação do equipamento. Após isso, verificou-se que os resultados foram ainda melhores do que a do TH, pois durante o processo percebeu-se a redução da formação de vapores a qual atribuímos à lenta rotação do novo aparelho adaptado. Além da qualidade de viscosidade e refringência igual à obtida do gel confeccionado no TH, percebeu-se ainda a minimização da formação de bolhas durante o processo de espessamento (formação do gel).

A resina de Carbopol®, quando dispersa em água, umecta e forma uma dispersão aquosa (resina/água) com valor de pH na faixa de 2,8 a 3,2. Neste estado pré-dissolvido a molécula de Carbopol® está extremamente compactada e sua capacidade espessante é limitada. Para obter o espessamento do gel é necessária a sua neutralização, para isso podem ser utilizadas bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio ou aminas de baixo peso molecular, trietanolamina e aminometilpropanol (SBRT, 2009b).

Ao acrescentar as bases, a cadeia do polímero de Carbopol® se “abre”, devido à neutralização dos grupos carboxilas presentes no polímero. Dependendo de qual seja a base utilizada, as concentrações a serem adicionadas variam em proporções (%) em relação à quantidade de Carbopol®. Se for utilizada a Trietanolamina, a relação é a mesma, já no caso do hidróxido de sódio, se utiliza a terça parte e, para o caso do aminometilpropanol (AMP-95) acrescenta-se 70% da quantidade de Carbopol® (SBRT, 2009b). Após ensaios pilotos, para definir o melhor agente espessante, optamos pelo uso do hidróxido de sódio (na concentração de 10%) por seu baixo custo, pois se mostrou eficiente oferecendo bons resultados e proporcionando uma qualidade reológica semelhante à obtida com o uso do trietanolamina.

Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (ALMEIDA, BAHIA, 2003). Em

concordância com nossos experimentos, existem dados na literatura de que o Carbômero Carbopol® atinge o máximo de viscosidade e transparência no gel quando o seu pH atinge 7, porém para obter viscosidade e transparência aceitável o pH deve ocorrer na faixa de 4,5 a 11 (SBRT, 2009b).

Na pesquisa de Corrêa et al. (2005), objetivou-se determinar o comportamento reológico de géis hidrofílicos preparados com 3 diferentes polímeros: Carbopol 940®, Carbopol Ultrez® e Pemulen®. Avaliou-se, também, a influência da concentração do polímero no comportamento reológico em relação à temperatura e tempo de armazenamento. Os géis foram preparados com duas diferentes concentrações dos polímeros: 0,5 e 1%. Verificaram que o Carbopol Ultrez® se dispersa facilmente na água enquanto que o Carbopol 940® necessita de um contato maior com o veículo para se dispersar.

Esses mesmos autores observam que quando as formulações foram estocadas à temperatura ambiente, no tempo 24 horas, os géis preparados com o polímero Carbopol® (tanto o 940 quanto o Ultrez) apresentaram maior viscosidade aparente que as formulações preparadas com Permulen®.

Na nossa pesquisa, o Carbopol® 940 demonstrou ser bem mais eficiente como substância formadora de géis ao passo que o Carboxetilcelulose não estabilizou a formalina na forma de gel, nem após a adição da solução tampão, nem com a posterior adição do formaldeído. Obteve-se uma solução semi-líquida e opaca ao invés de uma solução semi-sólida e translúcida com boa refringência à luz, propriedades observadas utilizando-se o Carbopol 940®.

Em preparações de gel existe um grande número de incompatibilidades que podem ocorrer simultaneamente ou não, entre os constituintes da fórmula, os princípios ativos e algumas vezes até, com os diversos materiais componentes da embalagem. A instabilidade pode ser definida como uma situação de ocorrência imediata ou não, também existem alterações significativas em relação a forma de utilização, a durabilidade, a eficácia e a segurança do produto. É importante conhecer e identificar as incompatibilidades que aparecem inicialmente ou tardiamente, após semanas, utilizando-se para isto testes acelerados de

envelhecimento em estufa, exposição à luz solar ou submetendo-se a baixas temperaturas (SBRT, 2009b).

Os sinais demonstrativos de incompatibilidades são: turbidez, precipitação, cristalização, alteração da cor, alteração de odor, variação de viscosidade e separação de fases. Estes sinais podem ser identificados durante o preparo do gel (SBRT, 2009b).

A turbidez em géis hidrofílicos pode ocorrer quando: essências ou ativos lipofílicos são adicionados sem solubilização adequada em agentes solubilizantes etoxilados e propoxilados, a alteração do valor de pH em valores menores que cinco e também a contaminação microbiana. A precipitação é um estágio mais avançado da turbidez que pode ser corrigida pela adição de solubilizantes etoxilados e propoxilados ou pelo aquecimento (SBRT, 2009b).

O aumento da viscosidade é uma das situações de maior ocorrência de envelhecimento das preparações semi-sólidas (gel). A concentração reduzida ou o tipo de umectante podem promover a perda de água da formulação para o ambiente, conduzindo ao ressecamento da preparação e conseqüente elevação da viscosidade. Gomas aniônicas na presença de concentrações reduzidas de sais de metais bivalentes podem inicialmente apresentar elevado aumento da viscosidade, evoluindo para a precipitação da goma e com a adição de grandes quantidade de eletrólitos pode ocorrer a coagulação ou precipitação de substâncias dispersadas no gel. As dispersões de gel com Carbopol® mantêm sua viscosidade durante longos períodos de tempo, à temperatura ambiente ou a elevadas temperaturas desde que estejam; protegidas da luz ou com adição de um antioxidante (SBRT, 2009b).

A utilização de sistemas gelificados para incorporação de princípios ativos em produtos farmacêuticos e cosméticos requer o conhecimento prévio da compatibilidade do ativo a ser incorporado com a estrutura polimérica, assim como a influência das condições de preparo (temperatura, velocidade e tempo de agitação) e dos demais componentes da formulação no comportamento estrutural do gel, resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo, pelo consumidor (SBRT, 2009b).

Como gelificante, os carbómeros formam géis neutros transparentes. Para formar o gel é necessário neutralizar o Carbopol® com uma base do tipo Trietanolamina ou solução de Hidróxido de Sódio a 10%. A transparência depende dos dissolventes dos princípios ativos empregados.

Existem vários tipos de Carbopol® no mercado: 5984 EP, 934, 940,954, 980, 990, 996, o AQUA CC, o AQUA SF-1 POLYMER, o ETD 2020, o ETD 2050, o ULTREZ 10, estes, variam em peso molecular, conferindo diferenças de viscosidade, pH e graus de transparência. Os mais indicados para cosméticos são o 940 e o 934 (SBRT, 2009b).

O Carbopol® 940 quando utilizado para a preparação de gel, confere transparência ao produto final apresentando transmitância medida em espectrômetro de 93% a 97%. Este produto além de proporcionar estabilidade aos géis tanto em altas quanto em baixas temperaturas, proporciona resistência impedindo o crescimento microbiano, resistência ao envelhecimento e apresenta também, alta estabilidade em soluções contendo alto teor de eletrólito, sal. Existe na literatura dados de incompatibilidade do Carbopol 940® com Fenol, polímeroscatiônicos, ácidos fortes e pH superiores a 11, quando em contato com a resorcina adquire coloração e quando exposto a luz, oxida diminuindo consequentemente a sua viscosidade; apresenta boa solubilidade em água porém, não se solubiliza de forma rápida; pode ser usado como agente emulsionante, em concentrações de 0,1% a 0,5% e também, como agente gelificante em concentrações de 0,5% a 2,0% (SBRT, 2009b).

Em nosso trabalho, o Carbopol 940® demonstrou ser compatível com o formaldeído gelificando a formalina na concentração de apenas 1%, ou seja, um grama para cada 1000 mL de formalina formando um quilograma de formalina-gel.

A resina Carbopol 940® substitui com grande eficiência e capacidade todos os polímeros naturais (celulose, gomas, amido, etc...) e não naturais que são usados para espessar soluções aquosas como o hidroxietil celulose (Celosize), o metil e propil celulose (Methocel), o polietilenoglicol (PEG), resinas de polivinilpirrolidonas (PVP), etc... Mas nenhum desses conseguem produzir géis

alcoólicos e hidro-alcoólicos com a clareza e transparência das resinas Carbopol® (SBRT, 2009a).

5.4 Aplicabilidade da formalina-gel na fixação de pequenas biópsias: análise da qualidade das preparações histológicas

Na avaliação das preparações histológicas, não houve diferenças qualitativas entre aquelas fixadas em FL e FG, quanto à possibilidade de garantir um exame histológico acurado. Do mesmo modo, não se revelaram diferenças significativas na classificação das lâminas por ordem decrescente de qualidade em sete dentre oito órgãos examinados.

Houve dificuldades em estabelecer parâmetros para análise, pois a literatura é escassa no que toca a descrição de critérios histológicos indicativos de boa e má fixação. Encontramos um texto um pouco mais detalhado no capítulo sobre fixação de Carson (2009) em livro editado pelo Colégio Americano de Patologistas, que serviu de base para a avaliação das lâminas na segunda fase do estudo com conhecimento prévio do tipo de fixador utilizado.

Segundo essa autora, em condições de boa fixação, o núcleo deve mostrar cromatina de padrão variado com membrana nuclear azul, bem demarcada; o citoplasma de aspecto preservado, eosinofílico. Por outro lado, são sinais de má fixação núcleos de aparência esmagada, com bolhas ou desbotados, retração celular, espaços artefatuais entre as células individualmente, rachaduras no tecido durante a flutuação dos cortes no banho-maria, e, em situações mais graves de retardo na fixação, franca autólise com disruptura completa da morfologia. A maior parte dos trabalhos que avaliam tecnologias aplicadas à histologia não deixam claros os critérios utilizados na análise. Neves, et al. (2006), por exemplo, analisando a fixação com formalina a 10% tamponada e Bouin no sistema genital em animal experimental, separaram para avaliação “estruturas acidófilas” e “basófilas”, mas não definiram os critérios empregados na análise dessas estruturas.

No presente trabalho, a maior concordância entre as anatomopatologistas

nas preparações histológicas fixadas pela FG a 10%, independentemente do tempo de fixação, nos parece importante desde que essa é a concentração comumente utilizada na rotina de patologia cirúrgica. Por outro lado, essa maior concordância pode refletir a maior familiaridade das avaliadoras com essa diluição do fixador.

O fato de não parecer ter havido melhora na qualidade técnica com o prolongamento de tempo de fixação (12h versus 24 h) é interessante porque na fixação de pequenas biópsias, para as quais a FG é proposta, a duração ideal de fixação é de 12 h, pois é sabido que o excesso de fixação produz inativação antigênica prejudicando o exame imunoistoquímico.

Assim, acreditamos que o fixador proposto (FG a 10% por 12h) é viável para aplicação no diagnóstico histopatológico de pequenas biópsias em fragmentos obtidos por agulha de tipo *tru-cut* (*core biopsy*), muito realizadas na atualidade, na maior parte das vezes por controle imagenológico.

São comumente utilizadas no diagnóstico de lesões mamárias impalpáveis, na avaliação da próstata em pacientes com altos níveis de PSA sérico, para biópsias de fígado, pulmões, rins, e, ainda, por endoscopia, tanto em trato gastrointestinal quanto urológico. Nesse tipo de material, muitas vezes exame imunoistoquímico é solicitado na avaliação de fatores prognósticos e preditivos no câncer da mama, definição ou exclusão de malignidade em lesões prostáticas suspeitas, para classificação de neoplasias malignas, e definição de sítio primário em tumores metastáticos.

Nesses casos, a boa fixação dada pela FG por 12 h evitaria os problemas de perda antigênica resultantes da superfixação. Todavia, são necessários testes mais abrangentes para afirmar a eficácia da formalina-gel na fixação de tecidos humanos com fins diagnósticos. Por outro lado, consideramos que a aplicação da FG limita-se a pequenas biópsias, pois, em peças cirúrgicas, a penetração e difusão da formalina no tecido é favorecida pela forma líquida.

A impressão de maior acidofilia nos tecidos fixados pela FG verificada no fígado, coração e músculo esquelético, embora possa ser real, pode apenas refletir uma maior espessura do corte histológico o qual é operador dependente e

impossível de ser completamente controlada, ao contrário do tempo de coloração.

Apenas no pulmão houve diferenças significativas na classificação das lâminas pelas examinadoras parecendo depender do tipo de fixador empregado. Na análise não cega, a examinadora notou aparente redução no diâmetro das cavidades alveolares no tecido fixado pela FG. Atribuiu o fato ao maior peso molecular dado pela adição do gel à formalina sobre o tecido esponjoso do pulmão, mais susceptível à compressão.

No entanto, não observou redução progressiva do diâmetro com prolongamento do tempo de fixação (12 horas em comparação a 24 horas).

Em contrapartida, é reconhecida a dificuldade de fixação do pulmão em necropsia, pois, a abertura do tórax para retirada do órgão leva a entrada de ar na cavidade pleural (pneumotórax), produzindo colapso e atelectasia do órgão o que pode ter ocorrido nos nossos casos.

Beçak e Paulete (1976) recomendam, sobretudo em animais de pequeno porte (camundongos, ratos, cobaias), abrir uma “janela” no tórax para permitir o colapso do órgão e, logo em seguida, ainda com o pulmão *in loco*, introduzir por meio de seringa o fixador pela traquéia após secção desse segmento.

Assim, obtém-se a distensão progressiva do pulmão à medida que vai sendo preenchido pelo fixador. No entanto, não se conhecem recomendações específicas para o emprego da FG.

A confirmação de redução do diâmetro alveolar requer estudos morfométricos, que serão realizados posteriormente com maior número de casos.

Apesar de acreditarmos nas potencialidades da FG na fixação das pequenas biópsias, considera-se seu uso de maior aplicabilidade na manutenção de tecidos previamente fixados em museus de anatomia e anatomia patológica, na guarda provisória de peças cirúrgicas em laboratórios de anatomia patológica ou no transporte de materiais a longa distância pelo menor risco de vazamento. Esses usos estão sendo averiguados em pesquisas em andamento pelo nosso grupo.

6. CONCLUSÃO

1. O carbopol940[®] foi melhor que o natrosol[®] para obtenção de formalina-gel com boa qualidade de consistência, estabilidade, viscosidade, transparência, refringência e pH ideal (7.0)
2. Propomos a seguinte fórmula para cada kilo de formalina-gel a 10%:
carbopol940[®]1 g
água destilada900 mL
formaldeído a 37%.....100 mL
hidróxido de sódio a 10%.....28 gotas
3. A formalina-gel, sobretudo na concentração de 10%, parece ser eficaz na fixação de pequenos fragmentos teciduais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI. The Kendall rank correlation coefficient. In: SALKIND, N. (ed.).

Encyclopedia of Measurement and Statistics. 2007.

ABULAFIA, J. Histologia e histopatologia da mucosa e semi-mucosa bucal.

Biópsia. In: GRINSPAN, D. **Enfermedades de la boca**. Buenos Aires: Mundi, p. 417-20, 1973.

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet Toiletries**, v. 15, n. 3, p. 96-100, 2003.

ANDRADE FILHO, J. S. Biópsias do ponto de vista do patologista. In: FONSECA F. P., SAVASSI, P. R. **Cirurgia ambulatorial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2. ed. 1987. p. 196-200.

ARAÚJO, S. **O papel do enfermeiro no exame anatomopatológico**: correlação da assistência com as falhas cometidas na fase pré-analítica, identificadas no Laboratório Municipal do Recife no ano de 2007. Monografia de conclusão de curso de enfermagem, FUNESO, Olinda, 2007.

ARMIGE, L. C.; SEELYE, R. N.; CARNEL, V. M.; SMITH, C. U.; GAVIN, J. B.; HERDSON, M. B. Morphologic and biochemical changes in autolysing dog heart muscle. **Lab Invest**, v. 34, n. 4, p. 357-62, 1976.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. vol. 1 e 2. Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A. 1976. 574 p.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Formol ou formaldeído**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Acesso em: 01/06/2009.

- BRETHERRICK, L. **Guide to safe practices in chemical laboratories**. London: The Royal Society of Chemistry. 4. ed. 1986. p. 344-345.
- CARSON, F. L. Fixation and processing. In: Brown R. W. **Histologic preparations**: common problems and their solutions. 1. ed. Cap Press. 2009. p. 1-5.
- CARVALHO, A. R. L. **Biopsia**. Campanha Nacional de Combate ao Câncer. Ed. Ministério da Saúde. 1971. p. 1-32.
- CASQUIMICA. **Formol Inido** 37%. 2008. Disponível em: www.casquimica.com.br. Acesso em: 01/07/2009.
- CORRÊA, N. M.; JÚNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F., LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev Bras Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.
- DREISBACH, R. H. **Handbook of poisoning**: prevention, diagnosis and treatment. Los Altos, CA: Lange Medical Publications. 11. ed. 1983. p. 200-202.
- EDWARDS, F. G.; EGEMEN, E.; BRENNAN, R.; NIRMALAKHANDAN, N. Ranking of toxics release inventory chemicals using a level III fugacity model and toxicity. **Water science and technology**, v. 35-9, n. 10-11, p. 83-90, 1999.
- FLEURY, R. N. **Biópsia**: resumos de aulas teóricas. Faculdade de Odontologia de Bauru. USP. 1978.
- FOX, C. H.; JOHNSON, F. B.; WHITINNG, J. Formaldehyde fixation. **J_Histochem Cytochem**, v.33, p. 845-853, 1985.
- FRANCESCHINI, L. J.; CARVALHO, V. C. Exposição ao formaldeído em anatomia: um risco à saúde ocupacional. **Rev Bras Cien Morfol**, v. 10, n. 2, 1993.
- GENOVESE, V. J. **Metodologia do exame clínico em odontologia**. 2. ed. São Paulo: Pancast. 1992. 391p.

GOSSELIN, R. E.; HODGE, H. C.; SMITH, R. P. **Clinical toxicology of commercial products**. Baltimore: Ed. Williams and Wilkins, Co. 5. ed. 1984. p. 187,196-198.

GRAFSTROM, R. C.; CURREN, R. D.; HARRIS, C. C. Genotoxicity of formaldehyde in cultured human bronchial fibroblasts. **Science**, v. 228, p. 89-91,1985.

GUIMARAES, S. A. C. Reações celulares as agressões In: GUIMARÃES, S. A. C. **Patologia básica da cavidade oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p. 40-60.

HIBBS, R. G.; BLACK, W. C. Electron microscopy of post-mortem changes in the rat myocardium. **Anat Rec**, v. 147, p. 261-72, 1963.

KUMAR, V.; ABBA, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran patologia** – bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. p. 22.

LAB & VET. **Laboratório de Análises Clínicas e Anatomia Patológica Veterinária**. Disponível em: <http://www.labvet.com.br/html/home.htm>. Acesso em: 27/08/2007.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **Int J Pharm Compounding**, v. 3, n. 4, p. 154-156, 2001.

LU, Z.; HEGEMANN, W. Anaerobic toxicity and biodegradation of formaldehyde in batch cultures. **Water Res**, v. 32, n. 1, p. 209-15, 1988.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R. **Formulário dermocosmético**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade. 1999. v. 2. p.37-38.

M McNARY, J. E.; JACKSON, E. M. Inhalation exposure to formaldehyde and toluene in the same occupational and consumer setting. **Inhal Toxicol**, v. 19, n. 6-7, p. 573-576, 2007.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**: com instruções para cirurgião, enfermeiro e citotécnico. Ed. Michalany Ltda. 3. ed. 2005.

MSDS. Material Safety Data Sheet. **F5522 (Formaldehyde)**. Phillipsburg: Mallinckrodt / J.T. Baker. NJ. U.S.A. 2000.

MUNOZ, D. R.; ALMEIDA, M.; LOPES, E. A.; IWAMURA, E. S. M. Potential definition of the time of death from autolytic myocardial cells: a morphometric study. **For Sciinte**, v. 104, n. 2-3, p. 81-9, 1999.

NEVALAINEN, T. J.; ANTTINEN, J. Ultrastructural and functional changes in pancreatic acinar cells during autolysis. **Virchows Archiv B**, v. 24, p. 197-207, 1977.

NEVES, J. F. D.; MARTINS, N. H.; GREIN, R. L. Citologia esfoliativa e biópsia. **Odontólogo moderno**, v. 8, n. 6, p. 17-21, 1981.

NEVES, M. M.; MORAIS, D. B.; BARBOSA, L. P.; GOMES, M. G.; BALARINE M. K. Preservação do sistema genital de chinchila (*Chinchilla lanigera*) para avaliação em microscopia de luz. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 58, n. 6, p. 1247-1248, 2006.

NUNES, A. Exame anatomo-patológico das afecções do ânus e canal anal. In: CRUZ, G. M. G. **Coloproctologia**. Volume I – “Coloproctologia – Propedêutica Geral”. Rio de Janeiro: Editora Revinter. Parte III. Cap. 22. 1998. p. 255-257.

OLIVEIRA, S. V. W. B. **Avaliação da degradação e toxicidade de formaldeído em reator anaeróbio horizontal de leite fixo**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. USP – São Carlos.

OLIVER, R. J.; SLOAN, P.; PEMBERTON, M. N. Oral biopsies: methods and applications. **Br Dent J**, v. 196, n. 6, p. 329-33, 2004.

PALLOT, D. J.; SEKER, M.; ABRAMOVICI, A. Post-mortem changes in the normal rat carotid body: possible implications for human histopathology. **Virchows Arch A**

Pathol Anat Histopathol, v. 420, n. 1, p. 31-35, 1992.

PENTILLÃ, A.; AHONEM, A. Electron microscopical and enzyme histochemical changes in the rat myocardium during prolonged autolysis. **Beitr Pathol**, v. 157, p. 126-141, 1976.

ROBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 5. ed. W.B. Saunders. 1994. p. 783-824.

ROM, W. N. **Environmental and occupational medicine**. Boston: Little, Brown and Company. 1983. p. 525-526.

ROSAI, J. **Ackerman's surgical pathology**. 8. ed. Mosby. Cap. 11. 1995. p. 800-814.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; NEVES, M. M.; SANTANA, C.;V.; et al. Preservação do sistema genital de cabras para a avaliação em microscopia de luz. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 54, p. 100-102, 2002.

SBRT. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Resposta técnica**. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 10/06/2009a.

SBRT. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Resposta técnica**. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 10/06/2009b.

SHIMIZU, M.; HAYASHI, T.; SAIOTH, Y.; OHTA, K.; ITOH, H. Postmortem autolysis in the pancreas: multivariate statistical study. The influence clinicalpathological conditions. **Pancreas**, v. 5, n. 1, p. 91-94, 1990.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 1. ed. São Paulo: Manole. 1996. p. 513-519.

THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN. **The pharmaceutical codex**. The Pharmaceutical Press. 11. ed. London. 1979. p. 372-373.

TOMITA, Y.; NIHIRA, M.; OHNO, Y.; SATO, S. Ultra structural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. **Legal Med**, v. 6, p. 25-31, 2004.

TOMMASI, A. F. Exames complementares. In: TOMMASI, A. F. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3. ed. São Paulo: Pancast. 2002. p 43-47.

WINDHOLZ, M. **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. New Jersey: Merck & Co. 10. ed. 1983. p. 604-605.

ZOUTBERG, G. R.; DE BEEN, P. The biobed EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) system covers shortcomings of the up flow anaerobic sludge blanket reactor in the chemical industry. **Water Sci Technol**, v. 35, n. 10, p 183-88, 1997.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A: Protocolo para a análise das preparações histológicas pelos patologistas (estudo duplo cego).

Nas cinco lâminas, comparando separadamente cada órgão, avaliar os seguintes parâmetros:

1 - Há diferenças quanto a qualidade para permitir um diagnóstico histopatológico conclusivo? Sim (___) Não (___)

Em caso de sim, qual o número da lamina de má qualidade? _____

Qual o problema? _____

2 – Enumere as cinco melhores preparações histológicas em ordem decrescente da melhor para a pior

Ex : _____ > _____ > _____ > _____ > _____

3 – Quais os problemas verificados na lâmina de menor qualidade?

APÊNDICE B: Protocolo para a análise das preparações histológicas pela patologista com o conhecimento prévio do fixador, concentração e tempo De fixação:

ORGÃO: _____ **Nº:** _____

- Lâmina controle: FORMOL LÍQUIDO 10% POR 12 HORAS

- FORMOL-GEL 10% POR 12 HORAS:

- FORMOL-GEL 10% POR 24 HORAS:

- FORMOL-GEL 15% POR 12 HORAS:

- FORMOL-GEL 15% POR 24 HORAS:

APÊNDICE C: Trabalhos da linha de pesquisa do autor

- ARAÚJO, S. B., et al. **Novas posturas laboratoriais com relação ao uso do álcool e a toxicidade do xilol no setor de Histotecnologia do Mestrado em Anatomia Patológica-UFPE** In: II Congresso Regional de Histotecnologia, 2004, Botucatu-SP. Sociedade Brasileira de Histotecnologia. Rio de Janeiro: Rio Gráfica, 2004. v.16. p.55. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso
- ARAÚJO, S. B., et al. **Diferenciação dos tipos de hemoglobina (fetal e adulta) pelo método modificado da técnica do tricrômico de Masson** In: XIII Congresso Regional Brasileiro de Histotecnologia e IV Jornada do Mercosul de Histotecnologia, 2003, Florianópolis-SC. XIII Congresso Regional Brasileiro de Histotecnologia e IV Jornada do Mercosul de Histotecnologia. Rio de Janeiro: Rio Grafica, 2003. v.15. p.12 – 12. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso
- ARAÚJO, S. B., et al. **Mandamentos indispensáveis para impregnações argênticas processadas no óleo mineral** In: I CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA, 2002, São José do Rio Preto-SP. Sociedade Brasileira de Histotecnologia. Rio de Janeiro: Rio Gráfica, 2002. v.14. p.8 – 8. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
- ARAÚJO, S. B. **Preparações histológicas mediatras para fins didáticos, 2006. (Conferência ou palestra (Apresentação de Trabalho)**
Palavras-chave: Preparações histológicas, Histologia, Histotecnologia
Áreas do conhecimento : Histologia, Embriologia, Citologia e Biologia Celular
Setores de atividade : Educação, Produtos e processos biotecnológicos
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários
III Congresso Regional de Histotecnologia; Local: AUDITÓRIO DA VUNESP; Cidade: SÃO PAULO-SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA
- SILVA, SABRINA et al. **Método de limpeza total para lâminulas oxidadas, 2006.**(Congresso, Apresentação de Trabalho) Palavras-chave: Lâminulas, Preparações histológicas, Histotecnologia, Histologia Áreas do conhecimento : Histologia, Morfologia
- PAZ, SILVANIA, et al. **Nova opção para descalcificação de bulas timpânicas de ratos wistar realizada no laboratório do Mestrado em patologia-UFPE, 2006.**In: III CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: VULNSP; Cidade: SÃO PAULO-SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA

- ARAÚJO, S. B., GOMES, VALDINÉIA, BARATELLA, LIRIANE, SILVA, IGOR, et al **Opção de descalcificação de cabeça de ratos neonatos para estudos de brotos dentários, sem prejuízo do tecido**, realizada no Mestrado em Patologia - UFPE, 2006. In: III CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: VUNESP; Cidade: SÃO PAULO-SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA.
- ARAÚJO, S. B., et al. **Optimização de custo no uso do autotécnico, no processamento histológico de peças cirúrgicas para emblocagem na parafina no Laboratório de Histotecnologia**, 2006. In: III CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: VUNESP; Cidade: SÃO PAULO-SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA
- ARAÚJO, S. B., SILVA, et al. **Comparação entre o meio de montagem convencional (ENTELLAN/XILOL) e a nova opção (VERNIZ GERAL/XILOL) em laboratório de histotecnologia**, 2005 In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTOTECNOLOGIA E V JORNADA DO MERCOSUL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: PIRÂMIDE PALACE HOTEL; Cidade: NATAL-RN; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA
- FRANCA, T. J. B., ARAÚJO, S. B. et, al, **Efeito da manipulação do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento sobre a morfologia e morfometria da traquéia**, 2004. ÁGUAS DE LINDÓIA-SP; Inst.promotora/financiadora: FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL.
- ARAÚJO, S. B., et, al. **Novas posturas laboratoriais com relação ao uso do xilol no setor de Histecnologia do Mestrado em Anatomia Patológica-UFPE**, 2004. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Unesp; Cidade: Botucatu-SP; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Histotecnologia
- ARAÚJO, S. B., et, al. **Diferenciação dos tipos de hemoglobina (FETAL E ADULTA) pelo método modificado da técnica do tricrômico de masson**, 2003. in: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTOTECNOLOGIA E IV JORNADA DO MERCOSUL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: CENTRO DE CONVENÇÕES; Cidade: FLORIANÓPOLIS; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA.
- PAZ, SILVANIA, ARAÚJO, S. B. et al. **Otimização de custo para processamento do P.A.S.**, 2003. in: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTOTECNOLOGIA E IV JORNADA DO MERCOSUL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: CENTRO DE CONVENÇÕES DE FLORIANÓPOLIS; Cidade: FLORIANÓPOLIS-SC; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA

- PAZ, SILVANIA, MEDEIROS, ARAÚJO, S. B., et al. **Identificação de placas senis pelo método da prata de Jones com coloração de contraste para material amilóide**, 2002. in: I CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO - UNESP; Cidade: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA E INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO - IBILCE-UNESP.
- ARAÚJO, S. B., PAZ, et al. **Mandamentos indispensáveis para impregnações angênticas processadas no óleo mineral**, 2002. in: I CONGRESSO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA; Local: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO - UNESP; Cidade: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE HISTOTECNOLOGIA E INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS- UNESP.
- ARAÚJO, S. B., et al. **Otimização do laminário das aulas práticas de histologia e embriologia dos sistemas ministradas para o curso de licenciatura em Ciências Biológicas**, 2002. In: III CONGRESSO DE GRADUAÇÃO DA UFPE; Local: CAMPUS DA UFPE; Cidade: RECIFE-PE; Inst.promotora/financiadora: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE.

9. ANEXOS

Anexo 1: Carta de Anuência



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro que autorizo a utilização de material biológico por mim obtido durante o desenvolvimento da pesquisa para defesa da minha Dissertação de Mestrado em Fisiologia intitulada "ESTUDO DE ALGUNS PARÂMENTROS CARDIOVASCULARES EM RATOS DESNUTRIDOS E NORMONUTRIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO" – Recife 2003, Laboratório de Fisiologia Cardiopulmonar, Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE .

Outrossim, informo que o referido material pode ser utilizado em outros projetos de pesquisa, devendo ser inserido em futuros trabalhos científicos o nome do autor.

Recife, 27 de junho de 2008.

Bruna da R. Maggi Sant'Helena
Bruna da Rosa Maggi Sant'Helena
mestranda

Anexo 2: Carta de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8940 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 84/07

Recife, 22 de agosto de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Carlos Peres da Costa**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE
Processo nº 008507/2007-16

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "Estudos de Alguns Parâmetros Cardiovasculares em Ratos Normonutridos e Desnutridos durante o Processo de Envelhecimento".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver