

UTILIZAÇÃO DA GLICERINA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, ASSOCIADAS OU NÃO AO CLORETO DE SÓDIO, NA CONSERVAÇÃO DE TECIDOS DE OVINOS

DIAS, I.C.G.^{1*}; SANT'ANA, A.P.F.¹; SADDI, L.G.C.¹; ZANI, F.L.¹;
OLIVEIRA, F.S.¹

RESUMO

A correta fixação e conservação de peças anatômicas nos laboratórios de anatomia é extremamente importante para se evitar a contaminação e possíveis problemas de saúde em pessoas que mantêm contato com as mesmas. Esse trabalho avaliou a utilização da glicerina, em diferentes concentrações, associadas ou não ao cloreto de sódio, na conservação de tecidos em ovinos. Foram utilizadas 10 amostras de concentrações diferentes de glicerina, com ou sem solução de cloreto de sódio a 30%, um grupo contendo apenas essa solução a 30% e um grupo controle contendo apenas água, todos em triplicata. Em cada frasco, foi utilizado um fragmento de 27cm³ de músculo pélvico e um fragmento de 3 cm de jejuno, ambos de ovinos. As peças foram previamente fixadas e conservadas em solução de formaldeído a 10% durante 2 anos, retiradas e recolocados em solução recém-preparada no formaldeído a 10%, para nova conservação por uma semana antes de iniciar os testes. Foram lavadas em água corrente por 48 horas e colocadas em frascos plásticos com as soluções a serem testadas. As amostras foram visualmente analisadas todos os dias, por durante 12 meses, objetivando-se detectar alterações na turbidez da solução e presença de contaminantes. Em caso de suspeita de contaminação, as soluções eram analisadas microbiologicamente. As amostras contendo apenas água desenvolveram contaminantes entre o 12^o e o 16^o dia; as de glicerina 3,125% no 6^o dia; as de glicerina 6,25% apresentaram contaminantes entre o 5^o e o 7^o dia; as de glicerina 12,5% entre 43^o e 44^o dia e as amostras de glicerina 25% apresentaram contaminantes no 47^o dia de experimento. Foram identificados como agentes contaminantes *Pseudomonas* sp e *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. fumigatus* além de *Penicillium* sp e *Neurospora crassa*. Concluiu-se que o cloreto de sódio a 30%, em associação ou não com a glicerina, foi eficaz na conservação de peças anatômicas, bem como as amostras com pelo menos 50% de glicerina. As amostras não-eficientes como conservantes apresentaram contaminação por microrganismos muito patogênicos ao homem.

PALAVRAS-CHAVE: glicerina, conservação, peças anatômicas, anatomia.

INTRODUÇÃO

Em laboratórios de anatomia, a contaminação por fungos nas peças anatômicas pode desencadear, em alunos e profissionais, quadros de alergia em decorrência da grande exposição de esporos fúngicos suspensos no ar (CORRÊA, 2003). Essa exposição prolongada e intensa a aerossóis de

¹ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Curso de Medicina Veterinária, Campus Umuarama, PR. Av. Colombo, 5790 – Maringá, PR. CEP 87020-900.

determinados fungos está associada a desordens dos sistemas nervoso central, respiratório e imune (JOHANNING et al., 1996).

Para serem conservadas, peças anatômicas devem ser fixadas antes. A fixação é a parte mais importante de todo trabalho, pois mantém os tecidos firmes, insolúveis e protegidos contra a deterioração (RODRIGUES, 1998).

Para a conservação de peças anatômicas são utilizadas substâncias que impedem a proliferação de microorganismos. As mais comuns são o formaldeído, a glicerina, o álcool etílico e o fenol. O formaldeído é o fixador e conservante mais utilizado, comumente em solução aquosa a 10%. Por ser barato e penetrar rapidamente nos tecidos (seis milímetros em doze horas) é amplamente utilizado nos laboratórios de anatomia. A glicerina não é tão bom fixador pois é fracamente anti-séptica, mas é indicada para evitar a desidratação dos tecidos e deixá-los mais moles e flexíveis (RODRIGUES, 1998).

SPICHER e PETERS (1976) verificaram a resistência de diferentes microorganismos ao formaldeído e seu efeito antimicrobiano em diversas concentrações. *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. e *Salmonella* sp. mostraram-se mais susceptíveis ao formaldeído que *Staphylococcus* sp. Os fungos mostraram-se mais resistentes que as bactérias, sendo o *Aspergillus niger* mais resistente que *Candida albicans*.

O cloreto de sódio, mais comumente conhecido como sal de cozinha, é um importante conservante alimentar, que visa preservar alimentos ao longo do tempo na tentativa de evitar a deterioração para uso futuro. Qualquer bactéria que entre em contato com soluções de altas concentrações salinas (até 30%) morrem rapidamente por desidratação, pois a água do citoplasma passa muito rapidamente para o exterior da parede celular por osmose (CIÊNCIA, 2006).

BRUN et al. (2002) mantiveram pericárdio canino em solução com 1,5g de sal por ml de água tridestilada, por um período mínimo de 90 dias, visando a utilização do mesmo na reparação do músculo reto abdominal de ratos wistar. O meio de conservação não apresentou qualquer contaminação por bactérias e fungos, além de manter as características estruturais do pericárdio. A mesma solução foi utilizada por BRUN et al. (2004), além da solução de glicerina a 98%, como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar, não apresentando qualquer tipo de contaminação.

Com o objetivo de se testar a viabilidade de diferentes conservantes de tecidos biológicos (glicerina e cloreto de sódio, associados ou não) em diferentes concentrações, desenvolveu-se esse trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 grupos com diferentes concentrações de glicerina, com ou sem solução de cloreto de sódio a 30%. Além destes, foram utilizados um grupo contendo apenas essa solução a 30% e um grupo-controle contendo apenas água, totalizando 12 grupos (Tabela 1). Todo o processo foi realizado em triplicata. Assim, 36 frascos plásticos de capacidade total de 500ml, transparentes e com tampa não-hermética foram utilizados, simulando o ambiente ocorrido nos recipientes onde são mantidas as peças nos Laboratórios de Anatomia em todo o país.

Em cada um dos frascos foi colocado um fragmento de 27cm³ (três centímetros no comprimento, largura e altura) de músculo pélvico de ovino adulto (músculos bíceps femoral), além de fragmento de três centímetros do jejuno do mesmo animal. Estas peças anatômicas foram mantidas no Laboratório de Anatomia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá – Campus de Umuarama, PR, e foram previamente fixadas e conservadas, ambas com solução de formaldeído a 10%, há aproximadamente dois anos. Foram descartados os fragmentos com suspeita de quaisquer sinais de contaminação.

Os fragmentos de músculo e jejuno foram obtidos mediante utilização de paquímetro digital (Tesla®) e colocados em solução recém-preparada de formaldeído a 10% para nova conservação durante uma semana e conseqüentemente melhor infiltração tissular. Após esse período, foram lavados em água corrente por 72 horas para retirada do excesso do conservante e colocados nos frascos plásticos devidamente identificados, em triplicata, com a solução a ser analisada.

Tabela 1. Distribuição dos grupos (G) de diferentes concentrações de Glicerina (GL), associado ou não ao cloreto de sódio (C), como conservantes de tecidos de ovino.

G1	G2	G3	G4	G5	G6
Água	GL 50%	GL 50%	GL 25%	GL 25%	GL 12,5%
		C30%		C30%	
G7	G8	G9	G10	G11	G12
GL 12,5%	GL 6,25%	GL 6,25%	GL3,125%	GL3,125%	C30%
C30%		C30%		C30%	

Os frascos plásticos foram mantidos no Laboratório de Anatomia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá – Campus de Umuarama, PR. Para cada frasco foram preparados 300ml de solução, o que foi suficiente para que todos os fragmentos ficassem totalmente cobertos. As amostras foram analisadas visualmente todos os dias, durante 12 meses, objetivando-se detectar alterações na turbidez da solução e a presença de contaminantes. Em caso de suspeita de contaminação, cinco ml da solução foram colocados em frascos plásticos estéreis do tipo coletor universal, identificados com etiquetas e enviados ao Laboratório de Microbiologia da UNESP, Campus Jaboticabal, SP, para realização de cultura e identificação de possíveis fungos. Mediante uso de swabs estéreis, as amostras foram semeadas em ágar Sabouraud e em ágar tripton-soja (TSA) por 48 horas a uma temperatura de 36°C, para identificação de fungos. As bactérias também foram identificadas através da cultura, cultivadas em placas de Petri em meio nutritivo comum.

RESULTADOS

Os resultados da cultura das amostras microbiológicas das soluções com glicerina (GL) e do grupo controle (água) estão demonstrados conforme as tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Dias de experimento e contaminação das amostras do grupo controle (água) e dos grupos com diferentes concentrações de glicerina (GL).

Dias de Experimento	Contaminação das Amostras
5	GL 6,25% (2 e 3)
6	GL 3,125% (1, 2 e 3)
7	GL 6,25% (1)
12	Água (1 e 2)
16	Água (3)
43	GL 12,5% (3)
44	GL 12,5% (1 e 2)
47	GL 25% (2 e 3)

Tabela 3. Identificação dos microrganismos nas amostras contaminadas

Amostras Contaminadas	Microorganismos
Água (1)	<i>Pseudomonas</i> sp e <i>Aspergillus flavus</i>
Água (2)	<i>E. coli</i> e <i>Penicillium</i> sp.
Água (3)	<i>E. coli</i>
GL 3,125% (1)	<i>Aspergillus niger</i>
GL 3,125% (2)	<i>Aspergillus flavus</i>
GL 3,125% (3)	<i>Aspergillus niger</i>
GL 6,25% (1)	<i>Neurospora crassa</i>
GL 6,25% (2)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
GL 6,25% (3)	<i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus flavus</i>
GL 12,5% (1)	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>E. Coli</i>
GL 12,5% (2)	<i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>E. Coli</i>
GL 12,5% (3)	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>E. Coli</i>
GL 25% (1)	<i>E.coli</i>
GL 25% (2)	<i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>E. Coli</i>
GL 25% (3)	<i>Penicillium</i> sp e <i>E. Coli</i>

Não houve contaminação em nenhuma amostra contendo cloreto de sódio a 30%, isoladamente ou associado à diferentes concentrações de glicerina.

Na amostra número 1 de água, foi encontrada *Pseudomonas* sp. Na amostra 1 de água e nas amostras 2 de GL 3,125%, 3 de GL 6,25% e amostras 1 e 3 de GL 12,5% foi observado presença de *Aspergillus flavus*. *Aspergillus fumigatus* foi encontrado em amostras 2 de GL 2 6,25%, 2 de GL 12,5% e 2 de GL 25%. Foi encontrado *Aspergillus niger* na amostra 1 e 3 de GL 3,125%.

Nas amostras 2 e 3 de água, amostras 1,2 e 3 de GL 12,5% e amostras 1, 2 e 3 de GL 25% foi encontrada *Escherichia coli* (Figura 1). Na amostra 2 de água foi encontrado *Penicillium* sp.

Na amostra 3 de GL 6,25% e 1 de GL 6,25% encontrou-se *Neurospora crassa*.

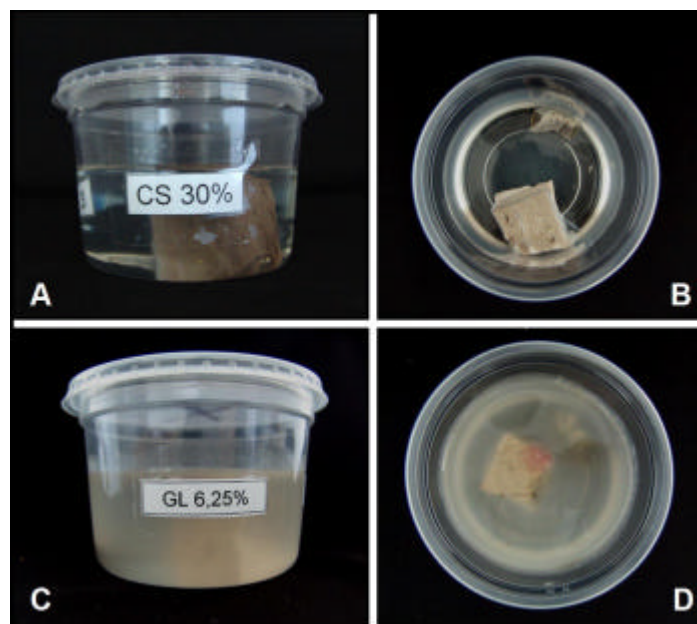


Figura 1 – “A”: vista lateral da amostra número 3 de cloreto de sódio 30%, 90 dias após o início do experimento; a mesma amostra visualizada por cima em “B”, na qual percebe-se a transparência da mesma, sugerindo ausência de contaminação microbiológica. Em “C” observa-se contaminação da amostra 2 de glicerina 6,25%, com 7 dias de experimento, e em “D”, vista por cima da mesma solução de “C”.

DISCUSSÃO

A contaminação por microrganismos ocorreu nos tecidos que foram mantidos em soluções consideradas como ineficientes para conservação, como sugerido por CORRÊA (2003). O fungo mais comumente observado nas soluções foi o *Aspergillus* sp, juntamente com *Pseudomonas* sp, similarmente ao descrito por SPICHER e PETERS (1976).

A solução aquosa de cloreto de sódio a 30% mostrou-se extremamente eficiente na conservação dos tecidos, não havendo se observado crescimento de microrganismos durante o período analisado, similarmente ao descrito por BRUN et al (2002), que mantiveram pericárdio canino por um período mínimo de 90 dias em solução hipersaturada de cloreto de sódio e BRUN et al. (2004) que conservaram centro frênico canino em glicerina, ambos para fins cirúrgicos, não ocorrendo contaminação em nenhum dos casos.

Além dos microrganismos contaminantes de soluções conservantes de peças anatômicas (*Pseudomonas* sp e *Aspergillus* sp) já reportados na

literatura, foram ainda observados *E.coli*, *Penicillium* sp e *Neurospora crassa* nas soluções que apresentaram-se ineficazes para conservação.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o cloreto de sódio a 30%, em associação ou não com a glicerina, foi eficaz na conservação de peças anatômicas. As amostras com solução de glicerina a 50% e a 100% também demonstraram eficácia como conservantes. As soluções com concentração inferior a 50% de glicerina e as amostras-controle apresentaram contaminação, evidenciando uma concentração mínima necessária de glicerina para conservação de peças anatômicas. As amostras não-eficientes como conservantes apresentaram contaminação por microrganismos muito patogênicos ao homem.

REFERÊNCIAS

- BRUN, M.V.; PIPPI, N.L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E.A.; BECK, C.A.C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S.T.L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 6, 2002.
- BRUN, M.V.; PIPPI, N.L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E.A.; BECK, C.A.C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S.T.L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R.; SILVA T.F. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 34, n. 1, 2004.
- CIENCIA viva. Conservantes. Disponível em <http://www.new.cienciaviva.pt/docs/itqbconservantes.pdf>. Acesso em 16 fev 2007.
- CORRÊA, W, R. *Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%*. São José dos Campos, 2003. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2003.
- JOHANNING, E.; BIAGINI, R.; HULL, D.; MOREY, P.; JARVIS, B.; LANDBERGIS, P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Internal Archives of Occupation and Environmental Health*. v.68, n.4, p.207-218, 1996.
- RODRIGUES, H. Técnicas anatômicas, Vitória - ES. 1998.
- SPICHER, G. PETERS, J. Microbial resistance to formaldehyde. I Comparative quantitative studies in some selected species of vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, bacteriophages and viruses. *Zentralbl Bakteriol*. v.163, n 5-6, p 486-508, 1976.