

## ORIGINAL ARTICLE

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DO PERICÁRDIO BOVINO CONSERVADO EM GLICERINA, AÇUCAR, MEL OU SAL**

*Antônio Fernando Bariani Júnior<sup>1\*</sup>, Gabriela Castro Lopes<sup>2</sup>, Ana Rosa Crisci<sup>1</sup>, Rubens Ferracini Júnior<sup>1</sup>, Camila Souza de Oliveira Guimarães<sup>3</sup>, Gregório Corrêa Guimarães<sup>2</sup>*

**RESUMO**

Foram realizadas análises histológicas e microbiológicas comparativas do pericárdio bovino conservado durante 30 e 60 dias em glicerina (98%), solução supersaturada de açúcar (300%), solução supersaturada de sal (150%) e mel não processado, com intuito de estabelecer meios alternativos de conservação de membranas biológicas. Foram utilizadas amostras de pericárdio, oriundas de cinco bovinos, coletadas em frigorífico, mantidas por até 60 dias em recipientes contendo as soluções de conservação supracitadas. Para análise morfológica dos constituintes do pericárdio bovino foram realizadas técnicas histológicas de rotina, associadas a duas técnicas de cultura microbiológica, a semeadura por esgotamento e o *pour-plate*. A solução supersaturada de açúcar (300%) foi o meio de conservação que mais se aproximou dos resultados obtidos com a glicerina (98%), entretanto não foi capaz de impedir o crescimento de microorganismos. O mel não processado e a solução supersaturada de sal (150%) apresentaram características antissépticas adequadas, porém não conseguiram conservar efetivamente o pericárdio, observando-se maior desorganização estrutural do tecido conjuntivo, indicando avançado processo de autólise aos 60 dias de conservação. Concluiu-se que a glicerina (98%) se apresentou como a solução mais eficiente quando comparada às demais avaliadas neste estudo.

**PALAVRAS-CHAVES:** Métodos de conservação. Pericárdio. Membrana biológica.

**INTRODUÇÃO**

A utilização de membranas biológicas como material de implante para a reparação de órgãos e tecidos vem sendo praticada no Brasil desde a década de 1960, cujo trabalho pioneiro foi realizado por Pigossi (1964) ao empregar a dura-máter canina conservada em glicerina em cirurgias reparadoras. Desde então vários trabalhos buscando entender as características e meios de conservação das membranas biológicas viáveis para implantes foram realizados (PIGOSSI, 1967;; LEITE et al., 1979;; DALECK et al., 1992; BATISTA et al., 1996;; MAZZANTI et al., 2001; BRUN et al., 2002a; BRUN et al., 2002b;; MOTA et al., 2003; BRUN et al., 2004; RABELO et al., 2004; BASTOS et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2007; AMENDOLA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2008; STELMANN et al., 2010; CAMARGO et al., 2012; VIDOR et al., 2013). O emprego de tais membranas deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade na estocagem, pouca ou nenhuma reação tecidual (ALVARENGA, 1992) e ainda pelo longo período de viabilidade como implante (BRUN et al., 2002b).

Dentre as membranas biológicas mais utilizadas encontra-se o pericárdio bovino, que possui como característica principal, constituição quase que exclusivamente de colágeno (ALVARENGA, 1992). Seu emprego como membrana biológica deve-se à sua facilidade de

\*Artigo recebido em: 19/08/2014

Aceito para publicação em: 09/01/2015

<sup>1</sup> Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, São Paulo.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras

<sup>3</sup> Universidade Federal do Triângulo Mineiro

\* Corresponding author: gabriela.clopes@yahoo.com.br Cx. Postal 3037, Lavras, MG, Brasil 37200-000

obtenção e pela quantidade de tecido aproveitável, que se mostra adaptável às diversas situações a que é submetida na prática cirúrgica (BASTOS et al., 2005; STELMANN et al., 2010; VIDOR et al., 2013).

Quando conservados em glicerina, os implantes devem permanecer por um período mínimo de 30 dias para perderem a capacidade de rejeição (PIGOSSI, 1964; PIGOSSI, 1967; PIGOSSI et al., 1971; DALECK et al., 1992; SARTORI FILHO et al., 1997; COSTA NETO et al., 1999), embora possam ser conservados neste mesmo meio, por período de até 6 meses ou mais, sem alterar suas características e propriedades (PIGOSSI, 1967; VIDOR et al.; 2013).

Na busca por meios de conservação alternativos que apresentassem características desidratantes, antissépticas e anti-imunogênicas semelhantes ou superiores à glicerina, é que se desenvolveram trabalhos testando o mel (GAIGA e SCHOSSLER, 2003), a solução supersaturada de açúcar (MAZZANTI et al., 2001), além da solução supersaturada de sal (BRUN et al., 2002a; BRUN et al., 2004).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação histológica e microbiológica do pericárdio bovino, a fresco e conservado em glicerina (98%), solução supersaturada de açúcar (300%), solução supersaturada de sal (150%) e mel não processado, por período de 30 e 60 dias, com intuito de caracterizar meios alternativos de conservação de membranas biológicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de pericárdio provenientes de cinco bovinos mestiços, machos e fêmeas, após abate no Frigorífico Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados Ltda., Sertãozinho - SP. Inicialmente realizou-se o esfregaço das amostras de pericárdio com *swab* estéril para realização da análise microbiológica. Em seguida as amostras de cada bovino foram divididas em nove fragmentos com pelo menos 1 cm<sup>2</sup> de área. Um fragmento foi fixado em solução de Bouin para processamento e análise a fresco (grupo controle).

Os demais fragmentos (oito) foram lavados com solução salina a 0,9% e acondicionados separadamente em (oito) recipientes de vidro previamente lavados e esterilizados em autoclave por período de 20 minutos. Dois recipientes continham glicerina (98%), dois solução supersaturada de açúcar (300%), dois solução supersaturada de sal (150%) e dois mel não processado. Cada frasco foi identificado e aberto somente aos 30 ou 60 dias pós-coleta, para análise histológica do pericárdio e microbiológica das soluções. Os recipientes foram mantidos em temperatura ambiente. O estudo foi realizado nos laboratórios de morfologia e microbiologia do Centro Universitário "Barão de Mauá" em Ribeirão Preto - SP.

Após o período de conservação os frascos foram abertos junto a bicos de Bunsen para realização dos esfregaços nos fragmentos de pericárdio. A seguir, foram reidratados em água bidestilada por pelo menos 20 minutos não ultrapassando os 40. Em seguida à hidratação, os fragmentos foram fixados em solução de Bouin e submetidos a processos histológicos de rotina para inclusão em parafina. Os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE), Verhoeff (VH) e Reticulina. As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio trinocular (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP) e câmera de captura de imagem digital (SC30, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP).

As amostras de pericárdio bovino do grupo controle foram comparadas com aquelas conservadas nas diferentes soluções, para tanto foram utilizados critérios quali-quantitativos, considerando-se como integridade leve (+), moderada (++) , intensa (+++) e acentuada (++++). Assim, quanto mais cruces, melhor o estado de conservação do tecido e da solução de preservação. Para minimizar erros na interpretação, todas as amostras foram estudadas por observador único.

No estudo microbiológico foram empregadas a técnica de semeadura por esgotamento para determinar a presença de micro-organismos nas amostras após a coleta e a técnica de contagem de células viáveis em placas de Petri (plaqueamento *pour plate*) expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama

de amostra preservada em diferentes condições para se comparar a eficiência microbiana dos meios de preservação.

Para realizar a técnica de semeadura por esgotamento, realizou-se a coleta das amostras por *swab* estéril. Esfregou-se a ponta do *swab* umedecido em caldo Infusão de Cérebro e Coração (caldo BHI) lentamente em toda a extensão da superfície de cada uma das amostras, a seguir os *swabs* foram mergulhados em tubo contendo caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração), e mantidos em incubação por 24 horas entre 30 e 37°C. Após esse período de incubação, os *swabs* foram descartados, e o caldo BHI após homogeneização, foi dividido em duas porções de 1 mL cada, uma semeada por estrias em superfície, e outra semeada por *pour plate*, sendo ambas as semeaduras realizadas em Ágar Sangue. Assim semeadas, cada placa de Ágar Sangue foi mantida em incubação entre 30 e 37°C, por até 07 dias. Ao final deste período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), que forneceria o número de micro-organismos presentes na amostra no momento da coleta. O período e as temperaturas de incubação utilizados permitem a determinação tanto de contaminação bacteriana quanto fúngica.

Para realizar a técnica de contagem de células viáveis, alíquotas de 1,0 g de cada meio de preservação utilizado foram transferidas para tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (diluyente) e homogeneizadas, obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$ . Na sequência foram realizadas as diluições decimais seriadas das amostras, onde 1,0 mL de cada diluição foi adicionado a 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (diluyente), em sequência. Em seguida, a partir de cada diluição transferiu-se com auxílio de pipeta automática 1,0 mL como inóculo, em duplicata, e distribuiu-se nas placas previamente esterilizadas. Em seguida, distribuiu-se o meio de cultura Plate Count Ágar (PCA) fundido e

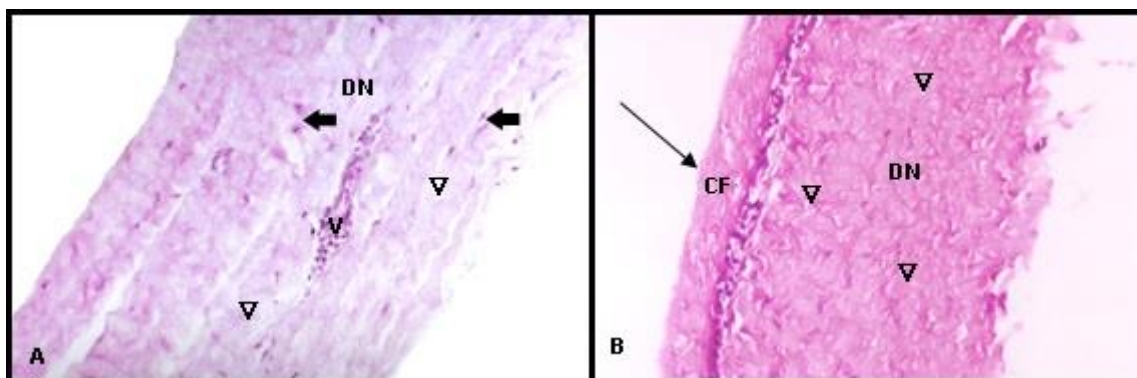
resfriado a 45°C (em Banho-Maria) sobre a placa de Petri contendo a suspensão diluída da amostra. O material foi homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares no sentido horário e anti-horário. Após a solidificação do meio, as placas de Petri tampadas foram invertidas e incubadas em estufas entre 30 e 37°C por 7 dias. O resultado foi multiplicado pelo fator da diluição e expresso em unidades formadoras de colônias (UFC  $g^{-1}$  de amostra), que forneceria o número de micro-organismos presentes nos meios de preservação das membranas. O período e as temperaturas de incubação utilizados permitem a determinação tanto de contaminação bacteriana quanto fúngica.

## RESULTADOS

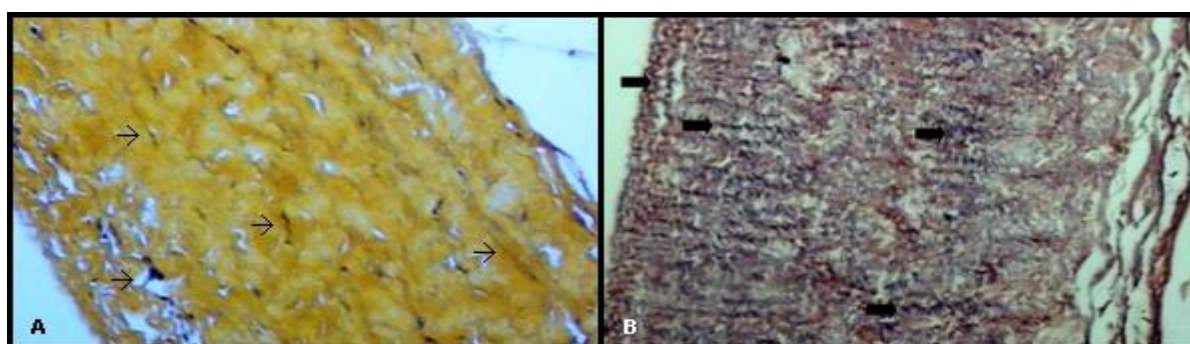
Estudos relativos à morfologia microscópica do pericárdio bovino revestem-se de importância pelo fato deste tecido apresentar ampla aplicação como material de implante (PIGOSSI, 1964; ALVARENGA, 1992; DALECK et al., 1992), tanto em experimentos com animais de laboratório (BASTOS et al., 2005) quanto na clínica cirúrgica veterinária (DALECK et al., 1992; COSTA NETO et al., 1999; RODASKI et al., 2002).

Na análise histopatológica do pericárdio bovino a fresco (grupo controle) constatou-se a presença de fina camada de células epiteliais (mesotélio) com seus núcleos basófilos repousando sobre uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, com fibras pouco acidófilas dispostas irregularmente, condensadas, com núcleos acentuadamente basófilos, seguido por tecido conjuntivo denso não modelado com núcleos dispostos ao acaso (Figura 1).

Nas lâminas coradas com Verhoeff observou-se que o pericárdio apresenta poucas fibras elásticas associadas ao tecido conjuntivo (Figura 2A) corroborando com os relatos de Alvarenga (1992). Já naquelas coradas pela Reticulina, pode-se notar quantidade considerável de fibras reticulares compondo o tecido conjuntivo do pericárdio (Figura 2B).



**Figura 1.** Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino a fresco (A) e (B). Nota-se o mesotélio (seta fina), tecido conjuntivo frouxo (CF), conjuntivo denso não modelado (DN), com fibras conjuntivas dispostas irregularmente (∇), vasos sanguíneos (V), núcleos de fibroblastos acentuadamente basófilos (seta larga), 200X. HE.



**Figura 2.** Fotomicrografia de pericárdio bovino a fresco corado pelo Verhoeff (A) e pela Reticulina (B). Evidencia-se em (A) a disposição e a pequena quantidade de fibras elásticas (→) coradas em negro junto ao tecido conjuntivo e em (B) as fibras reticulares (seta larga) coradas em negro em disposição longitudinal, 100X.

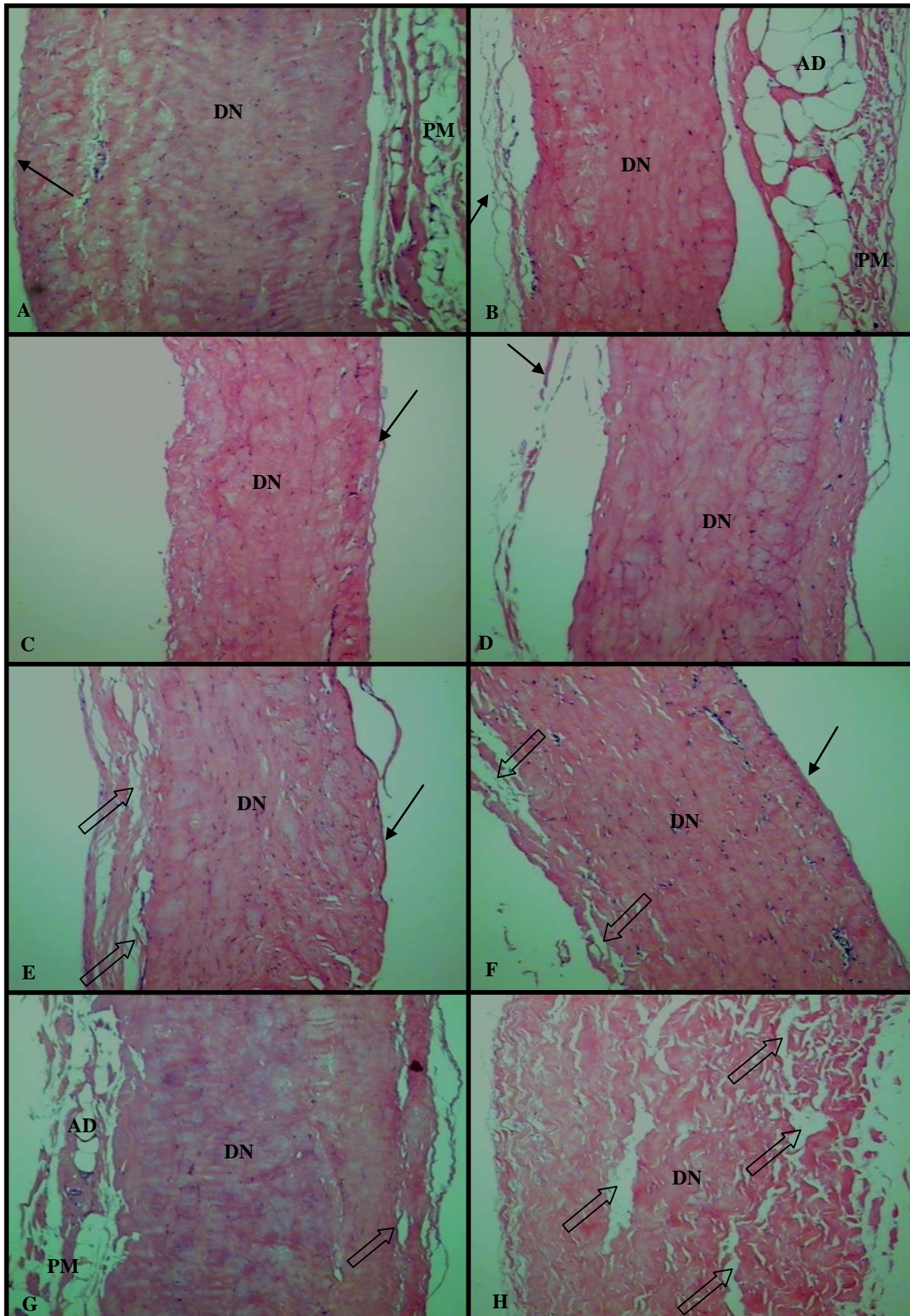
As amostras de pericárdio bovino avaliadas aos 30 dias de conservação em glicerina (98%) apresentaram uma camada serosa mais fragmentada do que a do grupo controle, porém o tecido conjuntivo periférico permaneceu íntegro em relação à parte interna, que exibiu disposição irregular dos núcleos, sugerindo retração das fibras colágenas pela ação da glicerina. Já as amostras conservadas em solução supersaturada de açúcar (300%) exibiram mesotélio em mal estado de preservação, assim como o tecido conjuntivo denso não modelado que demonstrou uma desorganização geral na disposição das fibras colágenas. Os fragmentos conservados em mel não processado apresentaram desorganização geral muito severa quanto à disposição das fibras colágenas e do mesotélio e os conservados em solução supersaturada de sal (150%) exibiram ausência da camada serosa associada à integridade

moderada das fibras colágenas (Figura 3 e Tabela 1).

Aos 60 dias de conservação pode-se notar que as amostras mantidas em glicerina (98%) exibiam um estado de preservação maior em áreas internas e menor em áreas mais externas, entretanto, guardava as características observadas aos 30 dias. As amostras preservadas em solução supersaturada de açúcar (300%) mostraram-se menos íntegras em relação à disposição de suas fibras colágenas e núcleos em posição irregular, exibindo um padrão de preservação inferior às conservadas em glicerina. Em mel não processado a serosa do pericárdio não permaneceu íntegra e suas fibras colágenas apresentaram grau de integridade moderada. Situação semelhante foi notada quando avaliadas as amostras conservadas em solução supersaturada de sal (150%), cujas fibras colágenas não

apresentaram coesão indicando início de

autólise tecidual (Figura 3 e Tabela 1).



**Figura 3.** Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino conservadas em glicerina (A e B), açúcar (C e D), mel (E e F) e sal (G e H) aos 30 e 60 dias, respectivamente. Evidencia-se: epitélio (seta fina); tecido conjuntivo denso não modelado (DN); tecido adiposo (AD); espaçamentos entre fibras colágenas (seta vasada); pleura mediastínica (PM), 200X. HE.

Tabela 1. Integridade das amostras de pericárdio bovino, observadas aos 30 e 60 dias de conservação em diferentes meios de preservação, Ribeirão Preto - SP, 2014.

Meios de Conservação	Tempo de preservação (dias)	
	30	60
Glicerina a 98%	++++	++++
Solução supersaturada de açúcar a 300%	++++	+++
Mel não processado	++	++
Solução supersaturada de sal a 150%	++	+

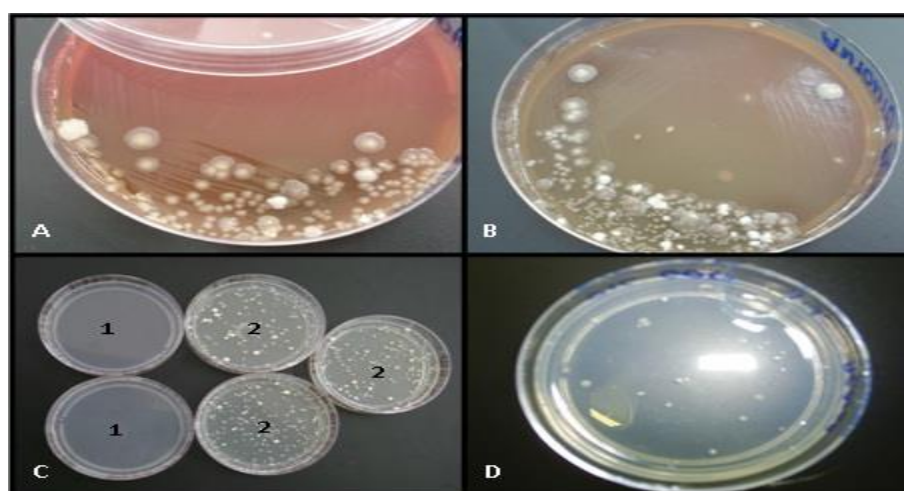
Legenda: integridade (+) leve; (++) moderada; (+++) intensa; (++++) acentuada.

Quanto à técnica da semeadura pode-se observar crescimento de micro-organismos na maioria das placas cultivadas. Como esta técnica não foi seletiva, pode-se notar crescimento de fungos e bactérias (Figura 4A e 4B).

A avaliação microbiológica de material colhido por *swab* das membranas, obtido prévio ao contato com os meios de preservação, indicou apenas mínima contaminação bacteriana, detectável apenas em semeadura de superfície e não em *pour plate*, presumivelmente como artefato do processo de coleta.

A avaliação microbiológica dos meios de preservação não evidenciou crescimento microbiano a partir dos meios de preservação glicerina a 98%, mel não

processado e solução supersaturada de sal a 150%, em ambos os períodos avaliados (valores médios inferiores a  $1 \times 10^1$  UFC  $g^{-1}$ ). Entretanto, o meio de preservação solução supersaturada de açúcar a 300% observou-se crescimento de fungos tanto aos 30 dias quanto aos 60 dias de conservação. A análise dos meios de preservação foi realizada apenas em Plate-Count Agar (PCA), mais adequado à detecção de micro-organismos a partir de amostras líquidas. Os resultados da média da contagem de micro-organismos nas placas de Petri com meio de cultura PCA inoculadas com amostras de pericárdio bovino conservado em solução supersaturada de açúcar (300%) por 30 dias e 60 dias são de  $1,5 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  e  $1,0 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  (Figura 4C e 4D).



**Figura 4.** Placas de Petri demonstrando crescimento bacteriano em Ágar Sangue semeado pela técnica de esgotamento, A e B, em material obtido a partir da coleta de superfície das membranas utilizando-se *swab* estéril (antes do contato com os meios de preservação). Crescimento fúngico em placas de PCA contendo solução supersaturada de açúcar a 300% em ágar liquefeito em várias diluições após 30 dias de preservação, C. Placas de petri com diluição 1:100 (1) e 1:10 (2). Em D nota-se crescimento fúngico em placa de PCA contendo

## DISCUSSÃO

Mota et al. (2003) afirmam que nenhuma das soluções avaliadas em seus estudos são capazes de manter a integridade celular, porém, dos meios avaliados, a solução supersaturada de açúcar (300%) e a glicerina (98%) foram as que apresentaram resultados mais satisfatórios, coincidindo com as observações realizadas para o pericárdio bovino nesta oportunidade.

Guimarães et al. (2008) avaliaram a resistência à tração de membranas biológicas bovinas, tanto a fresco quanto conservadas em glicerina durante 30, 60 e 90 dias, constatando ser o pericárdio a que suporta as maiores tensões, independentemente do período avaliado. Tal informação torna-se pertinente uma vez que no presente estudo pode-se verificar quase que ausência de fibras elásticas e elevado número de fibras reticulares na constituição estrutural do pericárdio bovino, que se mantiveram bem preservados quando mantidos nesta solução por até 60 dias.

Quanto à matriz de colágeno, observou-se que ela se manteve preservada na maioria dos meios ora estudados, não encontrando fragmentação acentuada em nenhum dos tecidos conservados em glicerina (98%), solução supersaturada de açúcar (300%) e mel não processado. Já Camargo et al. (2012) relataram uma desorganização das fibras colágenas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*) conservadas em glicerina (98%) mediante o aumento do tempo de conservação. Observou-se na análise comparativa final das amostras de pericárdio bovino que não houveram alterações morfológicas entre os diferentes meios de conservação estudados.

As descrições de Mota et al. (2003) não constataram crescimento de micro-organismos por período de 45 dias, quando foram avaliadas a eficiência da solução supersaturada de açúcar (300%) na conservação da túnica muscular do intestino delgado de cães. No presente estudo, pode-se observar crescimento de fungos nesta mesma solução nos períodos de 30 e 60 dias de conservação do pericárdio bovino, resultado esse também relatado por Melo Filho et al. (2011) que utilizaram o mesmo meio para conservação de placas ósseas por 45

dias. Entretanto, os autores supracitados levantaram a suspeita de contaminação no momento da coleta e/ou do plaqueamento.

Observou-se elevado crescimento de micro-organismos em todas as amostras de pericárdio bovino a fresco e crescimento fúngico somente naquelas conservadas em solução supersaturada de açúcar (300%), tanto aos 30 quanto aos 60 dias de preservação. Tais relatos são concordantes com as descrições de Rabelo et al. (2004) que mesmo após imersão do centro tendíneo bovino em solução de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) por período de 24 horas sob refrigeração, observaram crescimento de micro-organismos, evidenciando que mesmo quando utilizado antissépticos, os micro-organismos não foram totalmente eliminados.

Amendola et al. (2008) demonstraram que o mel não foi eficiente para eliminação de todos os tipos de fungos encontrados no material a fresco, além de ocorrer o crescimento bacteriano em todas as amostras devido à contaminação do próprio mel. Melo Filho et al. (2011) usaram solução salina para conservação de placas ósseas e verificaram presença de *Staphylococcus sp.* Estes resultados diferem do presente trabalho, pois nesta oportunidade não se observou crescimento de micro-organismos tanto no mel não processado quanto na solução supersaturada de sal (150%). Entretanto, os resultados dos autores supracitados comprovaram a ação antisséptica da glicerina (98%) sobre as formas vegetativas bacterianas após conservação tecidual por 30 dias, coincidindo com os resultados obtidos neste estudo para o mesmo meio.

Brun et al. (2004) verificaram que tanto a solução supersaturada de sal quanto a glicerina foram eficientes para conservar o centro tendíneo canino por 90 dias, não se observando bactérias e fungos ao final do experimento, fato também evidenciado no presente estudo aos 60 dias. Entretanto, as amostras de pericárdio mantidas na solução supersaturada de sal (150%) exibiram intensa autólise aos 60 dias além de odor desagradável quando seus frascos foram abertos.

## CONCLUSÃO

Com relação as soluções conservadoras, tanto a glicerina (98%) quanto a solução supersaturada de açúcar (300%) foram eficientes na conservação das características morfológicas do pericárdio bovino, apresentando-se superiores ao mel não processado e à solução supersaturada de sal (150%), entretanto, a solução supersaturada de açúcar não foi capaz de impedir o crescimento de micro-organismos como as demais soluções. Constatou-se que a glicerina é o meio que melhor manteve a integridade da membrana estudada promovendo eficiente ação antisséptica, seguida pela solução supersaturada de açúcar (300%), mel não processado e solução supersaturada de sal (150%), esta considerada imprópria para conservação. Portanto considera-se que o presente estudo pode auxiliar na escolha dos meios de conservação do pericárdio bovino, mas o sucesso da implantação de qualquer tecido orgânico dependerá, em grande parte, da reação biológica no processo de reparação e regeneração tecidual, sugerindo a necessidade de investigações mais específicas e aprofundadas sobre esses eventos, principalmente, aquelas envolvendo experimentações "in vivo".

### MORPHOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF BOVINE PERICARDIUM CONSERVED IN SUGAR, GLYCERIN, HONEY AND SALT

#### ABSTRACT

Histological and microbiological comparative analysis of bovine pericardium preserved for 30 and 60 days in glycerin (98%), supersaturated sugar solution (300%), supersaturated solution of salt (150%) and unprocessed honey were performed aiming to establish alternative ways of preservation of biological membranes. Samples of pericardium from five cattle were collected in fridge and maintained for up to 60 days in containers with the above mentioned solutions of conservation. For morphological analysis of the constituents of bovine pericardium were performed routine histological techniques associated to two microbiological culture techniques:

streaking on the surface of the plate and *pour-plate*. The supersaturated solution of sugar (300%) was the medium of preservation with results closer to the obtained with glycerin (98%), but was unable to prevent microorganisms growth. The unprocessed honey and supersaturated solution of salt (150%) had suitable antiseptic characteristics, but failed to effectively conserve the pericardium, with a greater structural disorganization of the connective tissue, indicating advanced process of autolysis after 60 days of storage. It was concluded that glycerin (98%) appeared as the most efficient solution when compared to the others evaluated in this study.

**KEYWORDS:** Preservation methods; Pericardium; Biological membrane.

#### REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: Daleck, C. R.; Baptista, L. C.; Mukai, L. S. (Ed.). **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Funep-Unesp. Jaboticabal, 1992, p. 33-42.
- AMENDOLA, G. F.; RAISER, A. G.; SOARES, J. M. D.; BECKMANN, D. V. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1341-1345, 2008.
- BASTOS, E. L. S.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.; NOVO, N. F.; SILVADO, R. A. B. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v.32, n.5, p.256-260, 2005.
- BATISTA, L. C.; DALECK, C. R.; SHIMANO, A. C.; ALESSI, A. C.; ABRAHAO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, eqüino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.33, p.305-312, 1996.



- BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DRIEMEIER, 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, p.1019-1025, 2002a.
- BRUN, M. V.; PIGATTO, J. A. T.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, L. O.; BECK, C. A. C.; AGUIAR, E. V.; FREIRE, C. D.; GAIGA, L. H. Traqueoplastia em cães com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.133-142, 2002b.
- BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DRIEMEIER, 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 como conservante de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.147-153, 2004.
- CAMARGO, A. D.; LEAL, L. M.; GARCIA FILHO, S. P.; MARTINS, L. L.; REIS, A. C. G.; MACHADO, M. R. F. Propriedades morfológicas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*, L. 1766). **Biotemas**, Santa Catarina, v.25, n.4, p.185-192, 2012.
- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Heterotrophic plate count. In: \_\_\_\_\_. (Eds.). **Standard methods of the examination of water and wastewater**. 20. ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environmental Federation (WEF), Washington. Section 9215, p.9-34 a 9-40, 1998.
- COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p.697-703, 1999.
- DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; ALESSI, A. C.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.1, p.53-61, 1988.
- DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.179-183, 1992.
- GAIGA, L. H.; SCHOSSLER, J. E. W. Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em mel em pombos domésticos (*Columbia livia*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.709-715, 2003.
- GUIMARÃES, G. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; CRUZ, C.; CAPALBO, A. C.; SANTOS, A. L. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.120-127, 2007.
- GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M. R. F.; SHIMANO, A. C.; TERÇARIOL, C. A. S.; VOLPON, J. B.; DALECK, C. R. Propriedades tensiométricas comparadas entre fragmentos do centro tendíneo do diafragma, pericárdio fibroso e peritônio parietal de bovinos não conservados e conservados em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.45, p.127-135, 2008.
- LEITE, J. B. F.; MARQUES, A. F.; GOMES, O. M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação de tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v.93, n.3-4, p.81-84, 1979.
- MAZZANTI, A.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, A. F.; FARIA, R. X.; ALVES, A. S.; GONÇALVES, G. F.; STEDILE, R.; BRAGA, F. A. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para a reparação de grande defeito no diafragma de cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.277-283, 2001.
- MELO FILHO, E. V.; LÚCIA, R. M. D.; SALGADO, A. E. P.; MIRANDA, F. B.; DRAGO, M. A.; TAFFAREL, M. O.; VILELA, L. M.; MUSSI, J. M. S.; SANTOS, W. G.; ZANINI, M. S.; FREITAS, P. M. C. Mecânica e microbiologia de placas

produzidas a partir de osso bovino, conservadas em diferentes meios. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.4, p.660-666, 2011.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; FREITAS, P. M. C.; BELETTI, M. E.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; SILVA, L. A. F.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciencia Animal Brasileira**, Goiânia, v.4, n.2, p.117-123, 2003.

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

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental**. 1967. 83 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A.; GAMA, A. G.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.8, p.263-278, 1971.

RABELO, R. E.; TAVARES, G. A.; PAULO, N. M.; SILVA, L. A. F.; DAMASCENO, A. D.; ANDRADE, M. A.; MARTINS, F. G.; ROMANI, A. F.; SILVA, O. C.; TRINDADE, B. R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n.4, p.229-238, 2004.

RODASKI, S.; CUNHA, O.; DE NARDI, A. B.; RIOS, A.; COMAR, F. A.; CASTRO, J. H. T. Artroplastia acetábulo-femoral em cães com pericárdio bovino conservado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p.179-187, 2002.

SARTORI FILHO, F.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E. P. Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em

coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.9, p.69-77, 1997.

STELMANN, U. J. P.; SILVA, A. A.; SOUZA, B. G.; HESS, T. M.; AGUIAR, G. C. Utilização de pericárdio bovino como reforço da raffia do peritônio no tratamento cirúrgico de eventração em equino: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, ano VIII, n.14, 2010.

VIDOR S. B.; MARQUES, J. M. V.; MOURA, L. F. L.; GOMES, C.; PAZ, A. H.; GOMES, H. M.; MEURER, L.; BARROS, R. R.; GUIMARÃES, K. M.; CIRNE-LIMA, E. O.; CONTESINI, E. A. Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.41, n.1, p.01-10, 2013.

#### AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Claudia Eugênia Castro Bravo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Francisco Beltrão (UTFPR/FB), pela contribuição na análise microbiológica deste trabalho.