



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS
FÍSICAS E MICROBIOLÓGICAS DE PEIXES DA ESPÉCIE
Oligosarcus pintoii E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADOS
EM GLICERINA E FORMOL**

Aline Lazzaretti Cassol

Dourados – MS

Fevereiro/ 2017





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MICROBIOLÓGICAS DE PEIXES DA ESPÉCIE *Oligosarcus pintoi* E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADOS EM GLICERINA E FORMOL

Acadêmica: Aline Lazzaretti Cassol

Orientador: Prof. Dr. Margarete Soares da Silva

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados – MS

Fevereiro/ 2017



“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Dedico este trabalho aos meus pais Sonia e Ermeto, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Muitíssimo obrigado.

Agradecimentos

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Muito especialmente, desejo agradecer a minha orientadora Professora Doutora Margarete Soares, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, pelo incentivo, dedicação e profissionalismo. A Senhora me fez enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, há vidas humanas... Você não foi somente orientadora, mas, em alguns momentos, conselheira, confidente, mãe e amiga. Você é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar a meu lado e acreditar tanto em mim.

Desejo agradecer o Professor Doutor Sidnei E. Lima Junior, pela disponibilidade, atenção, paciência, incentivo, dedicação, profissionalismo, e por acreditar que era possível, pelo apoio nas atividades de campo e em laboratório. Obrigada.

A meu querido esposo, Adriel, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me ajudando, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

A toda minha família pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim; pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. Obrigada.

À Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul e aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, pelo conhecimento e oportunidade que proporcionou meu aprendizado.

O Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que me concedeu uma bolsa, durante a realização deste mestrado, fato este que muito contribuiu para a viabilização desta tese. Portanto, deixo aqui expresso meu agradecimento.

A UNIGRAN, pelo apoio.

Sou muito grata aos amigos e colegas do laboratório de química Ellen Paula S., Talita C. P., pela amizade e pelo companheirismo em todos os momentos, que sem dúvida foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer aos amigos e colegas do laboratório de ecologia Fabiane S. F, Gabriela S. V, Walmir B. F. M. Junior Mundim, Mônica B. Jorge pelo apoio nas atividades de campo e em laboratório.

Obrigada!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 Antecedentes e justificativas	1
1.2 Formol- Formolização: Aspectos gerais.....	2
1.3 Glicerina - Glicerinação: Aspectos gerais.....	3
1.4 Álcool: Aspectos gerais.....	4
1.5 Referências bibliográficas	5
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DA ESPÉCIE <i>Oligosarcus pintoi</i> E <i>Cichlasoma paranaense</i> EM DIFERENTES CONSERVADAS - GLICERINA E FORMOL	8
2.1 Introdução	8
2.2 Objetivos	10
2.2.1 Objetivos Gerais	10
2.2.2 Objetivos Específicos	10
2.3. Materiais e Métodos.....	11
2.3.1 Local e desenvolvimento do trabalho	11
2.3.2 Coleta e tratamento das amostras	11
2.3.3 Análise física e observação das peças	12
2.3.4 Análise estatística	12
2.4 Resultados e discussão	13
2.4.1 Análise física e observação das peças.....	13
2.4.2 Análise estatística	15
2.5 Conclusões	17
2.6 Referências bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 3 –ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES <i>Oligosarcus pintoi</i> E <i>Cichlasoma paranaense</i> CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL.....	20
3.1 Introdução.....	20

3.2	Objetivos	22
3.2.1	Objetivos Gerais	22
3.2.2	Objetivos Específicos	22
3.3	Materiais e Métodos.....	23
3.3.1	Local e desenvolvimento do trabalho	23
3.3.2	Coleta e tratamento das amostras	23
3.3.3	Meios de cultura.....	23
3.3.4	Processamento da amostra	24
3.3.5	Inoculação	25
3.3.6	Isolamento	25
3.3.7	Análise macroscópica e microscópica	25
3.3.8	Análise bioquímica	26
3.4	Resultados e discussão.....	28
3.5	Conclusões.....	32
3.6	Referências bibliográficas.....	33
	CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL ÁPOS 12 MESES DE CONSERVAÇÃO	35
4.1	Introdução.....	35
4.2	Objetivos	36
4.2.1	Objetivos Gerais	36
4.2.2	Objetivos Específicos	36
4.3	Materiais e Métodos.....	37
4.3.1	Local e desenvolvimento do trabalho.....	37
4.3.2	Coleta e tratamento das amostras.....	37
4.3.3	O desenvolvimento do questionário para verificação externa das peças anatômicas	37
4.4	Resultados e discussão.....	39
4.5	Conclusões.....	42
4.6	Referências bibliográficas.....	43
	CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 –AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DA ESPÉCIE <i>Oligosarcus pintoii</i> E <i>Cichlasoma paranaense</i> EM DIFERENTES CONSERVADAS - GLICERINA E FORMOL.....	8
Figura 1: Coleta dos peixes na lagoa da UEMS/Dourados.....	11
Figura 2: Delineamento experimental com os três meios de conservação: Grupos GI, GII e GIII.....	12
Figura 3: Determinação do comprimento dos peixes após a coleta.....	12
Figura 4: Peças anatômicas referentes ao Tratamento GI: A) logo após a coleta. B) depois da conservação.....	13
Figura 5: Peças anatômicas referentes ao Tratamento GII. A) logo após a coleta. B) depois da conservação.....	14
Figura 6: Peças anatômicas referentes ao Tratamento GIII. A) logo após a coleta. B) depois da conservação.....	14
Figura 7 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, Tratamento GI.....	16
Figura 8 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, Tratamento GII.....	16
Figura 9 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, Tratamento GIII.	16
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES <i>Oligosarcus pintoii</i> E <i>Cichlasoma paranaense</i> CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL.....	20
Figura 1: Observações macroscópicas, microscópicas e identificação dos microorganismos através do equipamento Phoenix Automated Microbiology System....	29
Figura 2: Grupo A2, meios de cultura Ágar sangue e Ágar Sabouraud 2% Dextrose com Cloranfenicol.....	30
Figura 3: Grupo A3, meios de cultura Ágar sangue e Ágar Sabouraud 2% Dextrose com Cloranfenicol.....	31

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES *Oligosarcus pintoi* E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL ÁPOS 12 MESES DE CONSERVAÇÃO35

Figura 1: Exposição das peças anatômicas de peixes das espécies *Oligosarcus pintoi* e *Cichlasoma paranaense* e aplicação do questionário avaliativo, no laboratório de Biologia - CERNA - UEMS.38

Figura 2: Grupo Q1- Respostas referentes à pergunta 1 e 2 do questionário39

Figura 3: Grupo Q2- Respostas referentes à pergunta 1 e 2 do questionário.....40

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

CAPÍTULO 3 –ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES *Oligosarcus pintoii* E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL.....20

Tabela 1: Resultados das análises bioquímicas realizados manualmente, grupo A.....29

Tabela 2: Identificação as bactérias encontradas em cada meio de conservação, pelo equipamento Phoenix Automated Microbiology System.....30

RESUMO

O método mais utilizado para a conservação de peças anatômicas é a formalização. Entretanto, existem vários fatores negativos em sua utilização, devido à sua toxicidade. Uma das alternativas ao uso da formolização são os protocolos de glicerinação: associação de glicerina pura e álcool absoluto. A glicerina tem a capacidade de desidratação celular, atuando contra fungos e bactérias, proporcionando a conservação de peças anatômicas com morfologia muito próxima da original. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de se usar a glicerina como conservante de peças anatômicas de peixes. Para tanto, foram coletados peixes da espécie *Oligosarcus pintoii* e *Cichlasoma paranaense* e colocadas em três meios de conservação: Grupo GI - grupo controle (formol 10% em água); Grupo GII - conservação mista (formol 5% em glicerina) e Grupo GIII – (glicerina pura). Após 4 dias de conservação foi isolada e identificada a microbiota presente nos conservantes e nas peças anatômicas, sendo identificado os microorganismos: *Cupriavidus pauculus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus kloosii*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus capitis ssp. ureolyticus*. Logo após as peças foram colocadas em álcool etílico, sendo analisadas periodicamente, onde não se detectou mais a presença de microorganismos nem sinais de decomposição. Ao final do experimento pode-se observar que a glicerina pura foi tão eficiente quanto o formol na conservação das peças anatômicas. A glicerina manteve as peças bem conservadas e com aparência física e estática muito próxima do original. Sendo assim, mais estudos poderão ser realizados a fim de se verificar a eficiência desse protocolo em mais espécies de peixes, viabilizando o uso da glicerinação como prática rotineira nos laboratórios de anatomia.

ABSTRACT

The most used method for the conservation of anatomical pieces is formalization. However, there are several negative factors in its use due to its toxicity. One of the alternatives to the use of formaldehyde is the glycerin protocols that use a mixture of pure glycerin and absolute alcohol. Glycerin dehydrates cells acting against fungi and bacteria. Thus, it provides the conservation of anatomical pieces with morphology very close to the original. The main objective of this work was to evaluate the possibility of using glycerin as a conservative in anatomical fish specimens. For this, fish of the species *Oligosarcus pintoii* and *Cichlasoma paranaense* were collected. The fish were placed in three means for conservation: Group GI - control group (10% formaldehyde in water); Group GII - mixed conservative (5% formaldehyde in glycerin), and Group GIII - (pure glycerin). After 4 days, the microorganisms and the microbiota present in the conservatives and anatomical pieces were identified: *Cupriavidus pauculus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus kloosii*, *Lactococcus garvieae* and *Staphylococcus capitis* ssp. *Ureolyticus*. After these analyzes, the pieces were removed from the conservatives and placed in ethyl alcohol, being analyzed periodically, no microorganisms or signs of decomposition were detected until the end of the experiment. Pure glycerin was as efficient as formaldehyde in the preservation of anatomical pieces. The Glycerin kept the pieces well preserved and with physical and aesthetic appearance very close to the original. Therefore, more studies could be carried out in order to verify the efficiency of this protocol in more fish species and to enable the use of glycerin as a routine practice in anatomy laboratories.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Antecedentes e justificativas

Os laboratórios de anatomia animal possuem grande importância científica para a educação em geral, levando a uma evolução significativa na aprendizagem dos estudantes (YASSER & TOLBA, 2009).

O uso de peças anatômicas em aulas práticas, nas instituições de ensino, tem se mostrado muito eficaz no processo de aprendizagem dos alunos, visto que a associação da vivência prática e do conhecimento teórico proporciona noções mais claras sobre o funcionamento e as características das estruturas anatômicas estudadas. Para tornar viável a utilização deste material de estudo, faz-se necessária a aplicação de técnicas de conservação, cujo objetivo é retardar o processo de decomposição das peças anatômicas, mantendo as características morfológicas o mais semelhante às originais. A escolha do método de conservação mais apropriado geralmente se baseia em fatores como: custo e complexidade aplicada, toxicidade das substâncias utilizada, presença de odores, facilidade no manuseio das peças e semelhança entre a aparência adquirida e seu aspecto original (SILVA et al., 2008).

A preocupação quanto à conservação de peças anatômicas existe a mais de 5 mil anos, e o uso das peças anatômicas são indispensáveis para o ensino, sendo um método utilizado em todo o mundo, devido à contribuição no processo de aprendizagem prático, melhorando as habilidades aplicativas, assimilativas e compreensão da disciplina preparando os estudantes para uma situação próxima da realidade, além do caráter científico acadêmico. Nos dias de hoje podemos contar com uma ampla variedade de técnicas que ajudam na preservação das peças anatômicas para estudo (KIMURA & CARVALHO, 2010).

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se obter um meio ideal para conservação de tecidos biológicos, meio este que seja de fácil execução, transporte e sem custos elevados. O meio preservador deve possuir um alto poder estabilizador impedindo ao máximo a decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos, deve manter a integridade celular e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA et al., 1992).

JUNQUEIRA & CARNEIRO (2005) e RODRIGUES (2010) ressaltaram que os fixadores são substâncias químicas que conseguem manter a integridade dos tecidos

mesmo após a morte, sem ocasionar alterações na sua estrutura celular. Suas finalidades são as de evitar ao máximo as alterações na constituição química celular; insolubilizar as proteínas dos tecidos por meio de ligações cruzadas entre os aminoácidos, o que é de fundamental importância na fixação, pois são essas as proteínas responsáveis pela manutenção estrutural das células e tecidos e inativar enzimas proteolíticas o mais rapidamente possível, pois estas últimas são as responsáveis pela degradação espontânea que os tecidos sofrem após a morte, isto é, a autólise e por fim evitar a proliferação bacteriana e fúngica, permitindo assim o estudo da célula ou do tecido como se estivesse, naquele momento, vivos.

1.2 Formol – Formolização: Aspectos Gerais

O formaldeído pertence à família dos aldeídos, é gasoso à temperatura ambiente e possui características de toxicidade, reatividade e inflamabilidade, o que o torna um produto perigoso, segundo a norma NBR 10.004 (ABNT, 2004, LUND et al.,1991). Tem como sinônimos: formol, formalina, aldeído fórmico, entre outros.

Quando inalado ele é absorvido no trato respiratório superior, podendo penetrar na via dérmica e causar ardor nos olhos, lacrimejamento, irritação das mucosas nasais, queimação da garganta é sérios riscos à saúde, pois ele apresenta efeitos destrutivos nos tecidos do corpo humano e no DNA. (VIEGAS et al., 2010; CARVALHO, 2009).

Cheoker (2002) relatou que o formol pode degradar o DNA no seu todo ou parcialmente, dependendo da concentração e do tempo de exposição a que um determinado tecido é exposto. Seus relatos baseiam-se em reações bioquímicas, sem a realização de um estudo de campo ou experimental. Assegura, no entanto, a necessidade de mais pesquisas a respeito.

No ano de 1995 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer classificou o produto como um agente carcinogênico (IARC, 1995). Além de prejudicial à saúde ele traz vários danos ao meio ambiental, pois o manuseio e descarte inadequado de carcaças e efluentes pode contaminar e ocasionar riscos ambientais (WHO, 1989; WHO, 1991).

Apesar de seu efeito tóxico, ele é o produto mais usado no mundo como fixador, para conservação de peças anatômicas e cadáveres, mediante as técnicas de formolização e de embalsamamento. A fixação em formol baseia-se em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, por longo prazo evitando a degradação do material em decorrência de fenômenos (MIES 1994; SUGIYAMA et al., 1993; HAMAZAKI et al.,1993). Gusmman (2007) relatou que ele atua como fixador

interagindo com os aminoácidos lisina e arginina. Que este por sua vez 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.

O formol é utilizado normalmente em solução aquosa na concentração de 37% e contém metanol como preservativo contra a polimerização. Nessa forma ele é líquido e incolor, possui massa molar de 30.03 g/mol, ponto de ebulição de - 19,5°C e ponto de fusão de -92°C. É incompatível com oxidantes fortes, álcalis, ácidos, fenóis e uréia (Tokuda et al, 1990; Greer, 1991). Jackson et al (1991) elucidaram que ele pode sofrer degradação formando ácido fórmico, sendo que este frequentemente interage com a hemoglobina das peças produzindo um pigmento acastanhado chamado de "pigmento de formol" ou hematina. O uso de uma solução tampão evita a sua acidificação, impedindo o aparecimento do pigmento de formol.

O formol tem como principal vantagem o baixo custo, entretanto, existem vários fatores negativos em sua utilização como: peso excessivo, escurecimento e rigidez excessiva das peças após a conservação.

1.3 Glicerina – Glicerinação: Aspectos Gerais

O 1,2,3 propanotriol também conhecido por glicerina, ou glicerol é um líquido, incolor, inodoro, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (Arruda et al., 2007; Lopes et al., 1999). Sua temperatura de fusão é de 17,8°C, e decomposto aos 290°C (Pachauri & He, 2006).

Ela foi descoberta no ano de 1762 por Karl Wilhelm Sheele, sendo batizada de “o doce princípio das gorduras”, utilizada primeiramente para preservação de peças anatômicas pelo anatomista Carlo Giacomini, cuja técnica leva seu nome (Silva, 2008).

A glicerina possui três graus de pureza (baixa, média e alta), nos quais as variações ocorrem devido às concentrações de água, glicerol, fósforo e metanol, sendo classificadas pelo teor de glicerol como glicerina de baixa pureza (50 a 70% de glicerol), glicerina de média pureza (80 a 90% de glicerol) e glicerina de alta pureza (acima de 99% de glicerol) (Schröder & Südekum, 1999).

A glicerina possui uma variedade de utilização e é uma das alternativas de substituição ao método de formolização. Os protocolos de glicerinação se baseiam na associação de glicerina pura e álcool absoluto. Como a glicerina tem a capacidade de

desidratação celular, atuando contra fungos e bactérias, a técnica de glicerinação proporciona uma melhor preservação das peças anatômicas e possui diversas vantagens em relação ao formol, entre elas: maior leveza e maleabilidade das peças, a morfologia é preservada mais próxima da forma original, a coloração é mais clara e menos opaca facilitando a identificação de várias estruturas anatômicas de difícil visualização, sem odor desagradável, baixa toxicidade aos manipuladores, etc. (GIGEK et al., 2009; KRUG et al., 2011; CURY et al., 2013).

A glicerina também apresenta propriedades antissépticas, atuando como bactericida e fungicida (ALVARENGA, 1992; RANDI et al., 2002), além de reduzir a antigenicidade (PIGOSSI, 1967). Além disso, não é considerada agressiva ao meio ambiente, pois é de fácil diluição quando em contato com a água e é totalmente biodegradável (SILVA et al., 2008).

1.4 Álcool: Aspectos Gerais

O etanol, também conhecido como álcool, é um líquido claro com odor característico que tem utilização na fabricação de vários produtos como bebidas alcóolicas, desinfetantes, artigos de higiene pessoal, combustíveis, entre outros produtos. Também participa da síntese de outras substâncias químicas. Não é um produto tóxico, e sua inalação não causa maiores danos. Em contato com a pele pode produzir ressecamento (DALLAGNOL et al., 2016).

O álcool é o conservante mais utilizado na conservação de exemplares de peixes, quando diluídos abaixo de 85% comporta-se como ácido fraco e pode danificar as estruturas das peças (SANTOS et al., 2005).

1.5 Referências Bibliográficas

Alvarenga, J. Possibilidade e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C.R. Tópicos em cirurgia de cães e gatos. Jaboticabal: FU-NEP-UNESP, 1992.

Arruda, P. V., Rodrigues, R. C. L. B., Felipe, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. Rev Analytica, n. 26, p. 56-62, 2007.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 10004, Resíduos Sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

Carvalho, K.S. Influência do formol utilizado para conservação de cadáveres na obtenção de DNA nuclear em tecido muscular. Dissertação de Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Piracicaba, São Paulo. p. 66. 2009.

Cheoker, P. The effect of formalin-fixed tissue in DNA molecule. The Chemistry World. 2002; 33: 232-235.

Cury, F. S., Censoni, J. B., Ambrósio, C. E. Técnicas anatômicas no ensino da prática da anatomia animal. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro. 2013.

Dallagnol, E. F., Borghetti, I., Groff, A. L., Rampi, D. L., Faccin, Â., Mahl, D. L., Oliveira, F., Pierozan, M. K., Urio, E. A., Ritter, F. **Técnica anatômica de diafanização em exemplar de *Rhandia quelen***. Mostra de Iniciação Científica e Mostra de Criação e Inovação – ISSN: 2316-1566 – Getúlio Vargas –RS, 2016.

Gigek, T., Neto, A. C. A., Oliveira, J. E. M., Carvalho, W. L., PEREIRA, F. V. Estudo Analítico da técnica de Glicerinação Empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos. In: V Simpósio de Ciências da UNESP – DRACENA. Setembro de 2009.

Greer, C. E., Peterson, S.L, Kiviat, N. B., Manos, M.M., PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effect of fixative and fixation time. Am. J. Clin. Pathol.; 95: 117-124. 1991.

Greer, C. E., Lund, J.K., Manos, M.M., PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. PCR Methods Appl. 1991; 1: 46-50.

Gusmman, T. An disorder in DNA by action of formalin. Scrabber Review of Genetic; 2007; 232-233.

Hamazaki, S., Koshiba, M., Habuchi, T., Takahashi, R., Sugiyama, T. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. Path Res Pract. 1993; 189: 553-557.

IARC - international agency for research on cancer - summaries & evaluations, formaldehyde, 1995. Disponível on line em: <http://www.inchem.org>.

Jackson, D.P., Hayden, J. D., Quirke, P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In PCR-A practical approach. 1991; 29- 50.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. 8ª ed., Guanabara Koogan, 2005.

Kimura, A.K.E. & Carvalho, W.L. Estudo da relação custo x benefício no emprego da técnica de glicerinação em comparação com a utilização da conservação por formol. Trabalho de Conclusão de Curso de Extensão em Higiene Ocupacional, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. p. 30. 2010.

Krug, L., Pappen, F., Zimmermann, F., Dezen, D., Rauber, L., Semmelmann, C., Roman L.I., Barreta, M.H. Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira. Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, p.1-6. 2011.

Lópes, F.D, Revilla, J.L.G, Munilla, M.H. Manual dos Derivados da Cana de Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, Resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, pp. 393-397, 1999.

Mies, C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 555-560.

Pachauri, N., He, B. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual Meeting, Portland, OR, 2006.

Pigossi, N. Glicerina na conservação de dura-mater. Estudo experimental. Dissertação - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 1967.

Randi, F. E., Braccialli, C. S., Silveira, P. Aplicabilidade e métodos de conservação de próteses biológicas. *Unimar Ciências*, v.11, n.1/2, p.39-44, 2002.

Rodrigues H. *Técnicas Anatômicas*. 4a ed. GM Gráfica e Editora, Vitória, Espírito Santo. p. 269. 2010.

Santos, J. N., Silva, M.A., Vasconcellos, R. M., Araújo, F.G. Efeito do tempo de conservação dos espécimes sobre a qualidade dos microincrementos em otólitos *sagittae* e *Anchoa tricolor* (Agassiz) (Clupeiformes, Engraulidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (4):949-952. 2005.

Schröder, A., & Südekum K.H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In *New Horizons for an Old Crop*. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia, September 26–29, Paper No. 241. N. Wratten and P. A. Salisbury, ed. 1999

Silva, E.M., Dias, G., Tavares, M., Marques, T., Furtado, J.M. Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas: experiência da disciplina de Anatomia Humana do Departamento de Morfologia da UniFOA. *Cadernos UniFOA*, Volta Redonda, Rio de Janeiro, 2008.

Sugiyama, T., Koshiba, M., Ogama, K., Hamazaki, S., Ogawa, O., Kitajima, T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded Tissues. *Path Res Pract.* 1993; 189: 66-72.

Tokuda, T., Nakamura, T., Satonaka, K., Maeda, S., Dói, K., Baba, S., Sugiyama, T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol.*: 748-751. 1990.

Viegas, S., Ladeira, C., Nunes, C., Malta-Vacas J., Gomes M., Brito M., Mendonca P., Prista J. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: a study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J. Occup. Med. Toxicol.* 5(1):25. 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION - IPCS INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – Formaldehyde - Health and Safety Guide No. 57, 1991. Disponível on line em: <http://www.inchem.org>.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION - IPCS INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – Formaldehyde – Environmental Health Criteria No. 89, 1989. Disponível on line em: <http://www.inchem.org>.

Yasser, H. & Tolba, E.S. Educational objectives of different laboratory types: a comparative study. *Int. J. Computer Sci. Inform. Security* 6(2):89-96. 2009.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DA ESPÉCIE *Oligosarcus pintoi* E *Cichlasoma paranaense* EM DIFERENTES CONSERVADAS - GLICERINA E FORMOL

2.1 INTRODUÇÃO

O estudo da anatomia faz parte da matriz curricular de cursos relacionados às ciências biológicas e da saúde (BRAZ, 2009). Um dos aspectos importantes desse estudo é a anatomia comparada, a qual busca semelhanças estruturais e funcionais no processo evolutivo dos seres vivos (DANGELO & FATTINI, 2010; KARDONG, 2011).

Os laboratórios de anatomia animal têm como objetivo o estudo de peças anatômicas sintéticas e cadavéricas sendo indispensável o manuseio das mesmas. As peças passam por processos como dissecação e reparação para depois serem estudadas, sendo conservadas, na grande maioria, em solução de formol a 10% ou pela técnica de glicerinação (Freitas et al. 2009).

Há uma variedade de técnicas anatômicas, inúmeras maneiras de executar uma determinada técnica, alterando algumas etapas da metodologia, como algum detalhe diferente no procedimento, substituição, redução ou acrescentando alguns materiais utilizados podemos evidenciar algum sistema de maneira específica isso vale também para métodos de conservação. O uso dos protocolos de glicerinação foi uma das principais alternativas para a substituição do formol, diferentes protocolos foram e são utilizados na tentativa de chegar ao máximo de confiança quanto à sua eficiência, sendo utilizado na maioria das vezes a associação do álcool absoluto com glicerina (Cury et al., 2013).

O formol é o fixador e conservante amplamente utilizado em laboratório de anatomia, devido ao baixo custo e a alta eficiência. Entretanto as peças conservadas com formol se mostram mais pesadas e perdem a sua coloração tornando-se mais escuras com o passar do tempo (MIES, 1994).

A principal característica da glicerina é a capacidade de desidratação celular, essa desidratação não altera a concentração iônica das células, o que mantém a integridade celular, reduzindo assim, a antigenicidade dos tecidos conservados (PIGOSSI, 1964). A glicerinação é menos agressiva às estruturas tratadas, deixando as peças mais leves, facilitando assim o manuseio e conservando a aparência mais semelhante à original. (SILVA et al., 2008; KRUG et al, 2011).

Por ela ser inodora a preocupação quanto à irritação das mucosas não existe, além do fato de não ser cancerígena e ter níveis de contaminação muito inferior ao do formol (CURY et al.,2013).

O gênero *Oligosarcus* compreende cerca de 19 espécies, são peixes de pequeno a médio porte, são carnívoros , variando de insetívoro a piscívora para algumas espécies. As espécies são habitantes típicos de riachos e ribeirões, e ocasionalmente, rios de grande porte. Diversos grupos dentro da família Characidae, a filogenia e a taxonomia são importantes objetos de estudos. (MIRANDE, et al., 2011; HERMES-SILVA, et al.,2004).

O gênero *Cichlasoma* pertence à família Cichidae, está presente em todos os rios e riachos do Brasil (BUCKUP, 1999), habita em bacias das regiões semiárida sul-americanas, possui grande diversidade de espécie. Desta forma a diversidade e o processo de adaptação em ambientes extremófilos, são particularidade interessantes desta espécie. *Cichlasoma paranaense* ocorre naturalmente na bacia do alto rio Paraná. (TURNER, 1999).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a possibilidade de se usar a glicerina como conservante de peças anatômicas de peixes, em substituição do formol, tendo em vista um modelo de boa visualização, durabilidade, resistência e baixa toxicidade.

2.2.2 Objetivos específicos

Realizar um estudo comparativo da ação dos conservantes glicerina e formol sobre as características físicas das amostras de peixes, e avaliar as características físicas das peças anatômicas das amostras analisadas.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biologia e de Química Ambiental do Centro de Estudos em Recursos Naturais - CERNA/UEMS – Dourados.

2.3.2 Coleta e tratamento das amostras

Foram coletados exemplares de *Oligosarcus pintoii* e *Cichlasoma paranaense* na lagoa localizada em frente ao Centro de Estudos em Recursos Naturais – CERNA da UEMS, em Dourados. Para captura foi utilizada uma rede de nylon medindo 1,20 x 0,80 m (Figura 1), após a captura os peixes foram acondicionados em sacolas plásticas com água e encaminhados para o laboratório de Biologia do CERNA, onde foram eutanasiados.



Figura 1 – Coleta dos peixes na lagoa da UEMS/Dourados

Foram coletados no total 21 exemplares de peixes, sendo 11 exemplares *Oligosarcus pintoii* e 10 exemplares *Cichlasoma paranaense*, medindo entre 50 a 110 milímetros de comprimento. As amostras foram divididas, de acordo com os tratamentos de conservação, em três grupos experimentais (Figura 2): GI – tratamento controle utilizando método de conservação tradicional (formol 4% em água), GII – tratamento utilizando conservação mista (formol 2% em glicerina), e GIII – tratamento de conservação pura (glicerina pura). Os meios de conservação, glicerina e formol passaram pelo processo de autoclavação, visando à total ausência de formas viáveis capazes de reprodução.

Os peixes ficaram submersos em potes de vidro, conforme tratamentos acima citado, durante quatro dias, no laboratório, em temperatura ambiente e estes foram cobertos com papel filme para minimizar as possibilidades de contaminação. O

experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualidade, com três tratamentos e quatro repetições.



Figura 2 – Delineamento experimental com os três meios de conservação: Grupos GI, GII e GIII.

2.3.3 Análise física e observação das peças

Os exemplares coletados passaram por medidas físicas de comprimento padrão e total (Figura 3), e avaliação de características morfométricas (QUILANG et al., 2007). As medidas de comprimento foram realizadas utilizando-se um paquímetro digital. Posteriormente, foi realizado um exame macroscópico externo para a observação da coloração e de qualquer sinal clínico que pudesse indicar foco de infecção.

Após o período de conservação as características morfométricas foram analisadas novamente para comparação e confirmação se os mesmos foram conservados e para observar se houve alguma mudança no comprimento das peças.

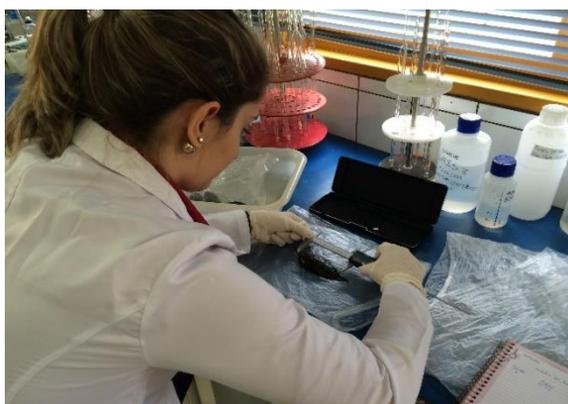


Figura 3 – Determinação do comprimento dos peixes após a coleta.

2.3.4 Análise estatística

A comparação do tamanho das peças anatômicas entre os diferentes tratamentos foi feita utilizando-se o programa estatístico com aplicação do teste t de *Student* com nível de significância de 5%.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Análise física e observação das peças

A análise física das peças anatômicas foi realizada logo após a coleta, durante o período de conservação e, imediatamente à retirada das peças dos respectivos conservantes, antes de serem transferidas para o conservante permanente: álcool etílico 70%.

Na figura 4 observamos as características das peças do tratamento GI.

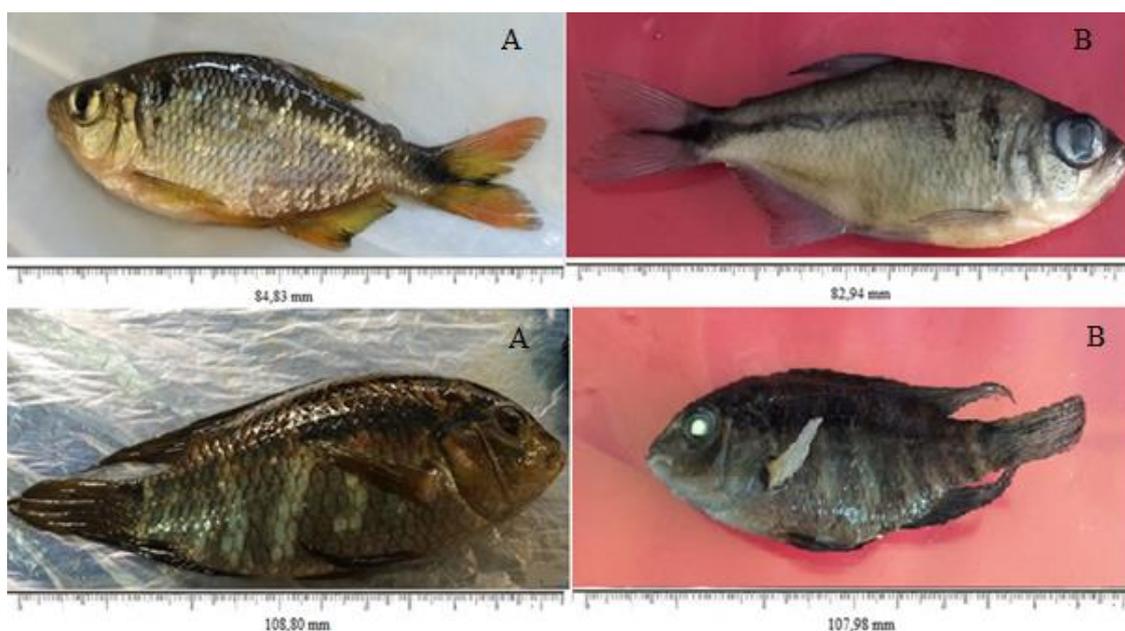


Figura 4 – Peças anatômicas referentes ao Tratamento GI: A) logo após a coleta. B) depois da conservação.

Após 24 horas de conservação as peças apresentaram leve mudança na coloração (levemente esbranquiçado), o meio de conservação ficou pouco turvo, não foi observado crescimento macroscópico de colônias de bactérias. Durante o período de 48 a 72 horas as peças não apresentam mudança significativa, porém observou-se uma leve rigidez das mesmas. As características permaneceram com aspecto próximo as originais, mostrando que o grupo controle manteve-se nas condições desejadas, como esperado.

Na figura 5 observamos as peças submetidas à conservação no tratamento GII, a imagem mostra as peças após a coleta e posteriormente após o período de conservação.



Figura 5 – Peças anatômicas referentes ao Tratamento GII. A) logo após a coleta. B) depois da conservação

No monitoramento observamos que após 24 horas de conservação as peças não apresentaram mudança de coloração, não houve crescimento macroscópico de colônias de bactérias, o conservante ficou levemente amarelado, porém sem turvação. De 48 a 72 horas o conservante testado apresentou somente uma leve turvação e rigidez nas peças, sem grandes alterações.

Na figura 6 observamos o tratamento GIII, antes e depois do período de conservação.



Figura 6 – Peças anatômicas referentes ao Tratamento GIII. A) logo após a coleta. B) depois da conservação

Após 24 horas de conservação as peças apresentaram leve escurecimento, porém, as características de coloração permaneceram bem evidentes, não houve crescimento macroscópico de colônias de bactérias, o conservante ficou levemente amarelado, mas sem turvação. De 48 a 72 horas o conservante testado apresentou uma leve turvação e a coloração levemente amarelada, as peças não apresentam mudança de coloração e a rigidez foi pouco observada.

As peças conservadas em glicerina pura se mostraram mais maleáveis e de tonalidade menos opaca comparadas a peças conservadas em formol, tornando-as mais próximas de peças frescas. Os materiais anatômicos não demonstraram odor forte, mantendo-se inodoros, diferente do evidenciado na utilização de formol.

Gigek et al. (2009) descreveram que o processo de glicerinação permite melhor identificação das estruturas anatômicas, resultando maior clareza das peças quando comparadas à conservação em formol, o que facilita o estudo destas.

A glicerina conservou as peças anatômicas de maneira adequada, com uma boa penetração, fato este também observado por Silva et al. (2008).

Carvalho et. al (2013) ao fazer a técnica de glicerinação com glicerina semipurificada tiveram resultados semelhantes aos apresentados nesse trabalho, pois as peças também tiveram diminuição de odor, flexibilidade, boa aparência estética e estruturas anatômicas intactas, apesar de usarem um protocolo diferente.

2.4.2 Análise estatística

Os dados referentes às medidas de comprimento das amostras foram comparados utilizando o Teste “t” de *Student* para amostras dependentes, o cálculo da diferença mínima significativa (CENTENO 1999), ao nível de significância de 5%.

Verificaram-se diferença significativa entre as amostras dos tratamentos GI e GII, pois as mesmas apresentam $p < 0.05$. Esses valores relatam que houve diminuição no tamanho das mesmas.

Após a análise estatística os valores médios dos tamanhos das peças nos tratamentos GI, GII e GIII apresentaram os respectivos valores, $t = 3,5617$ e $p = 0.0119$ (Figura 7), $t = 3,7239$ e $p = 0.0098$ (Figura 8) e $t = 2,2615$ e $p = 0.0643$ (Figura 9).

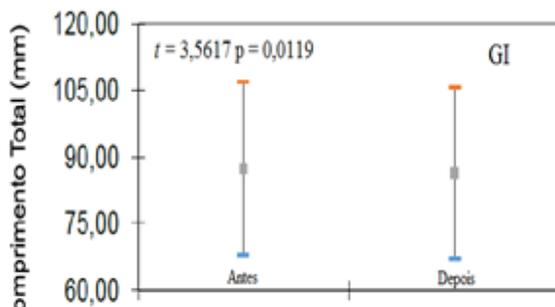


Figura 7 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, tratamento GI.

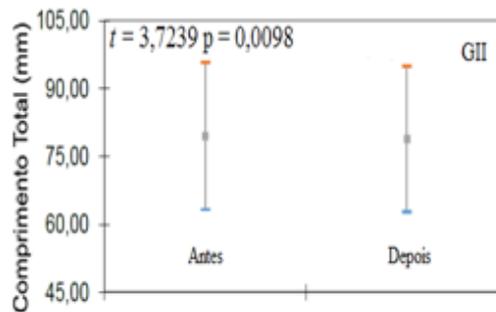


Figura 8 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, tratamento GII.

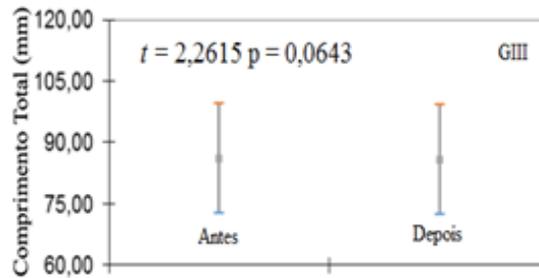


Figura 9 – Comprimento total das peças antes e após o período de conservação, tratamento GIII.

Para as amostras conservadas em glicerina pura (GIII), não se observou diferença significativa em relação ao tamanho das peças. Esses resultados indicam que a conservação em glicerina pura foi eficiente quanto à manutenção das características físicas das mesmas.

Os resultados obtidos se assemelham aos citados por Silva et al. (2008) Gigeck et al. (2009) e Cury et al (2013), os quais a glicerina conservou as peças anatômicas de maneira adequada, com uma boa penetração, mostrando maior eficiência da glicerina em relação ao formol devido à diminuição de peso, odor e também por apresentarem ótimo aspecto estético, semelhante à morfologia original das peças, podendo-se evidenciar com clareza as estruturas das peças em estudo.

2.5 CONCLUSÕES

Os três tratamentos foram eficientes na conservação das peças anatômicas.

Entretanto, ocorreram diferenças importantes entre os tratamentos: as peças anatômicas colocadas nos conservantes contendo formol apresentaram odor relativamente forte e coloração opaca, diferentemente das peças conservadas com glicerina, as quais não demonstraram odor forte, se mostraram mais maleáveis e menos opacas.

Outro parâmetro importante foi que a glicerina não alterou de forma significativa o comprimento total das peças anatômicas, mantendo a morfologia próxima ao seu aspecto original.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braz, P. R. P. Método didático aplicado ao ensino da anatomia humana. Anuário da Produção Acadêmica Docente, v. 3, n. 4, p. 303-310, 2009.
- Buckup, P.A. Sistemática e Biogeografia de Peixes de Riachos. In: Caramaschi, E.P., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R. Ecologia de peixes de riachos. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 91-138, 1999.
- Carvalho Y.K., Zavarize K.C., Medeiros L.S. & Bombonato P.P. Avaliação do uso da glicerina proveniente da produção de biodiesel na conservação de peças anatômicas. Pesq. Vet. Bras. 33(1):115-118. 2013.
- Centeno, A. J. Estatística Aplicada à Biologia. Goiânia: CEGRAF/UFG, 1999.
- Mies C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. Hum. Pathol. 25:555-560. 1994.
- Cury, F. S., Censoni, J. B., Ambrósio, C. E. Técnicas anatômicas no ensino da prática da anatomia animal. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro. 2013.
- Dangelo, J. G., Fattini, C. A. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 763p.
- Freitas I.B., Souza A.M. & Santos R.M.B. Técnica anatômica aplicada na conservação de cortes segmentares em *Canis familiaris* e *Decapterus macarellus*. 2009. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, UFRPE, Recife, p.1-3. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0721-2.pdf>
- Gigek, T., Neto, A. C. A., Oliveira, J. E. M., Carvalho, W. L., Pereira, F. V. Estudo Analítico da técnica de Glicerinação Empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos. In: V Simpósio de Ciências da UNESP – DRACENA. Setembro de 2009.
- Hermes-Silva, S., Meurer, S., Zaniboni-Filho, E. Biologia alimentar e reprodutiva do peixe-cachorro (*Oligosarcus jenynsii* Gunther, 1864) na região do alto rio Uruguai – Brasil. Acta Scientiarum, Biological Sciences, 6: 175-19, 2004.
- Kardong, K. V. Vertebrados – Anatomia comparada, Função e Evolução. 5ª ed. Rio de Janeiro: Roca, 2011, 928p.
- Krug, L., Pappen, F., Zimmermann, F., Dezen, D., Rauber, L., Semmelmann, C., Roman, L.I. & Barreta, M.H. Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira. Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, p.1-6. 2011.
- Miranda, M.J., Aguilera, G., Azpelicueta, M.L.M. A threatened new species of *Oligosarcus* and its phylogenetic relationships, with comments on *Astyanacinus*. Zootaxa, 2994: 1-20, 2011.

Pigossi, N. Implantação de dura-mater homogênea conservada em glicerina – estudo experimental em cães. Tese Doutorado - Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo. 1964.

Quilang, J. P., Basiao, Z. U., Pagulayan, R. C., Roderos, R. R., Barrios, E. B. Meristic and morphometric variation in the silver perch, *Leiopotherapon plumbeus*. from three lakes in the Philippines. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 561–567. 2007.

Silva, E.M., Souza Filho, G.D., Marques, T., Furtado, J. M. Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas; experiência da disciplina de anatomia humana do departamento de morfologia do UniFOA Cadernos UniFOA. Volta Redonda, ano 3, edição especial, Maio. 2008.

Turner, G.F. Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*, v 17, p. 827-831, 2007.

CAPÍTULO 3: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES *Oligosarcus pintoii* E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL

3.1 INTRODUÇÃO

A conservação de peças anatômicas de peixe apresenta diversos problemas, uma vez que a decomposição ocorre rapidamente em decorrência dos métodos de captura que provocam morte lenta, e dos danos mecânicos que podem ocorrer. Outro fato importante refere-se à quantidade de microorganismos presentes na água, bem como a sua microbiota natural, fatores que aceleram o início da deterioração (FARIAS; FREITAS, 2008; MACHADO et al., 2010; MOL; TOSUN, 2011).

A microbiota natural do peixe não varia muito, segue de acordo com o *habitat* da espécie, grau de contaminação e profundidade das águas e maior ou menor proximidade da costa e, principalmente, a temperatura. No entanto, essas variações não se mantêm uniformes e apresentam grandes diferenças em termos de predominância relativa do que em gêneros presentes no pescado (FELDHUSEN, 2000; MURATORI et al., 2004).

Silveira (2005) descreve que não há diferença entre os microbiota do peixe de água doce e de água salgada. Entretanto, as águas costeiras por serem mais rasas têm maior probabilidade de contaminação em relação às águas mais profundas. Nos peixes os microorganismos são encontrados apenas na superfície, guelras e trato gastrointestinal, porém após o abate suas defesas naturais deixam de existir e a microbiota superficial começa a invadir o interior dos tecidos, iniciando o processo de deterioração.

Prista et al., (1990) descreve que os conservantes são substâncias dotadas de ação germicida ou germiostática, as quais têm a função de evitar as alterações que possam ocorrer em qualquer conservado, proveniente de proliferação microbiana.

Spicher e Peters (1976) realizaram um experimento onde verificaram a resistência de diferentes microorganismos para o formol, foram analisados bactérias gram-negativas e gram-positivas. Os microorganismos foram expostos às mesmas condições ambientais, com temperatura constante a 20°C e pH 7.0, num período de duas horas de exposição. Dentre as bactérias avaliadas, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Salmonella* mostraram ser mais suscetíveis ao formol que o *Stafilococos*.

O método de glicerinação reduz a antigenicidade, preserva a textura das peças. A glicerina apresenta poder antisséptico com amplo espectro de ação, excetuando-se as formas bacterianas esporuladas. A glicerina a 98% tem sido utilizada na esterilização e

conservação das membranas biológicas, como demonstrado por PIGOSSI (1964), INATOMI et al. (1980), DALECK et al. (1992), COSTA NETO et al. (1999) e DALECK et al. (2000).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a possibilidade de se usar a glicerina como conservante de peças anatômicas de peixes, em lugar do formol, tendo em vista um modelo de boa visualização, durabilidade, resistência e baixa toxicidade, os quais poderão ser utilizados como material didático em aulas práticas.

3.2.2 Objetivos Específicos

Isolar, caracterizar macroscopicamente e identificar a microbiota presente nas peças anatômicas de exemplares de *Oligosarcus pinto* e *Cichlasoma paranaense*.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biologia e Química Ambiental do CERNA/ UEMS - Dourados, no laboratório de Microbiologia do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN e no Hospital Universitário Federal da Grande Dourados - HU.

3.3.2 Estudos microbiológicos

Este estudo é a continuidade do capítulo anterior. Conforme exposto anteriormente, os peixes ficaram submersos em potes de vidro cobertos com papel filme sob a tampa, para evitar qualquer tipo de contaminação, durante quatro dias, à temperatura ambiente. Todos os meios de conservação foram submetidos à análise microbiológica antes de serem utilizados. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualidade, com três tratamentos e quatro repetições. Posteriormente as peças foram transferidas para recipientes contendo álcool etílico. Essas peças ficaram em temperatura ambiente e, foram monitoradas visualmente e por testes microbiológicos.

Após o período de conservação, foram realizadas as análises microbiológicas dos meios bem como das peças anatômicas. As análises foram divididas em três grupos: A1 – análise microbiologia realizada após o período de fixação (4dias), A2 – monitoramento microbiológico realizado nas peças e no conservante final (álcool etílico) após 4 meses de conservação e A3 – monitoramento final realizado 10 meses após as peças estarem em processo de conservação.

A observação diária das peças foi realizada a fim de verificar, de forma macroscópica, indicativos de formação de colônias provenientes de crescimento microbiano.

3.3.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura escolhidos para se verificar uma possível presença de microorganismos nas peças e nos conservantes foram: Ágar Sangue, Ágar Sabouraud 2% Dextrose com cloranfenicol e caldo BHI (brain heart infusion).

O Ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol é um meio não seletivo que apresenta pH ácido de 5,6 e é pobre em nutrientes, condição essencial para inibir o crescimento de bactérias, mas permite o crescimento de fungos oportunistas e

patogênicos. O meio proporciona também um aumento de esporulação e uma morfologia colonial mais característica, facilitando o estudo (KERN; BLEVINS, 1999).

A preparação do meio:

- Dextrose.....40g
- Ágar15g
- Neopeptona.....10g
- Dissolveu-se 100 mg de cloranfenicol em 10 mL de álcool 95 °C.

Adicionou-se em um litro de Ágar Sabouraud Dextrose antes da esterilização. Todos os componentes foram adicionados em água destilada, em Erlenmeyer e o volume completado para 1000 mL; em seguida, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio ficou 24 horas na estufa a 37°C para controle, antes da distribuição nas placas de Petri.

O Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) é um meio enriquecido, derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas, já a dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. Sua constituição possibilita o metabolismo de microrganismos com diferentes exigências nutritivas (JUNIOR et al., 2008).

A preparação do meio:

- *Brain Heart agar*37 g
- Água destilada1000 mL

Todos os componentes foram adicionados em Erlenmeyer, a seguir, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio ficou 24 horas na estufa a 37°C para controle, antes de distribuir o BHI caldo estéril nos tubos. Os tubos de ensaio também passaram pelo processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

O Ágar Sangue é um meio enriquecido primário não seletivo, que permite o crescimento da maioria dos microrganismos gram-positivos e gram-negativos e atividade hemolítica (OPLUSTIL et al., 2004). O ágar sangue de carneiro 5% desfibrinado estéril foi adquirido comercialmente.

3.3.4 Processamento das amostras.

Para cultura e processamento das amostras foram utilizadas placas de Petri 90 x15 mm, descartáveis com 2 compartimentos, por terem a vantagem de economizar material e facilitar a visualização.

A distribuição do meio de cultura foi realizada em ambiente estéril no fluxo laminar. Toda superfície da área de trabalho do fluxo laminar foi limpa com álcool a 70%, a lâmpada germicida foi usada por 30 minutos antes da distribuição do meio de cultura nas placas. Esse procedimento é muito importante, pois proporciona um ambiente estéril, removendo as partículas do ar originadas na área de trabalho e proteger contra a contaminação do ambiente, evitando a contaminação com outros processos ou produtos.

As placas foram vedadas com parafilm para evitar a desidratação do meio e ficaram por 24 horas em estufa a 37°C para controle antes da inoculação das amostras.

3.3.5 Inoculação

Em fluxo laminar previamente esterilizado, foi semeado a microbiota presente em cada peça anatômica e nos conservantes, com auxílio do swab estéril as amostras foram semeadas, em triplicata e incubada a 37 °C durante 24 a 48 horas, em seguida, as placas que não apresentaram crescimento microbiológico foram mantidas em temperatura ambiente por 30 dias. Após o período de incubação, procedeu-se a caracterização das estirpes isoladas por meio da morfologia das colônias.

3.3.6 Isolamento

Após o crescimento das colônias foram realizados repiques e novas distribuições em caldo BHI, preparados conforme descrito anteriormente, visando o isolamento das colônias. Os repiques foram realizados em intervalos de sete dias, até que o isolamento total das colônias fosse confirmado, após isolamento as colônias foram replicadas em Ágar Sangue, para posterior identificação por meio de provas bioquímicas.

3.3.7 Análise macroscópica e microscópica

A análise macroscópica das colônias foi feita mediante a observação direta, sendo analisados: o crescimento no isolamento das colônias, o diâmetro da colônia, a cor, as elevações e a textura. Todos os detalhes foram registrados em fotos, servindo apenas como orientação e não como critério absoluto na identificação.

Para análise microscópica foi realizada a coloração de Gram, esta metodologia é utilizada para classificar as bactérias com base na morfologia e na reação à coloração, pois classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas (TORTORA et al., 2003). Este é um método de coloração diferencial, com largo espectro

de coloração, as bactérias Gram (+) apresentam uma coloração roxa enquanto as Gram (-) adquirem coloração vermelha. (MARTINEZ; TADEI, 2005).

3.3.8 Análise bioquímica

Após o isolamento das colônias elas foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação de gênero e espécie. Foram realizados os seguintes testes: teste da catalase, ágar bile esculina, coagulase, teste da oxidase, citrato, glicose, hemólise, indol, uréia.

O teste da catalase tem como objetivo verificar a presença da enzima catalase que decompõe peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, diferenciando assim o gênero *Staphylococcus* do *Streptococcus*. (OPLUSTIL, 2000)

O teste da glicose permite determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose. É considerado método simples e eficaz para identificação de bactérias que utilizam a glicose em presença ou na ausência de oxigênio, e baseia-se na produção de ácido quando a glicose é metabolizada (Oliveira, 2000).

O ágar bile esculina é recomendado para a diferenciação de *Enterococos* e do grupo *Streptococcus* de outros estreptococos. Os *Enterococos* e certos estreptococos hidrolisam a esculina produzindo esculetina e glicose. A esculetina reage com o citrato férrico da fórmula formando um complexo marrom escuro ou negro (KONEMAN et al., 2001)

O teste da coagulase tem a finalidade de verificar a habilidade do organismo em coagular o plasma pela ação da enzima coagulase. A enzima coagulase está presente em duas formas: na forma livre e na forma ligada à célula. Na coagulase ligada à célula, a célula é detectada pelo método da lâmina e a livre pelo método do tubo, no presente estudo realizamos o método do tubo (OPLUSTIL, 2004).

O teste da oxidase verifica se a bactéria é produtora da enzima oxidase. (KONEMAN et al., 2001)

O teste da uréia tem a finalidade de classificar as bactérias quanto à produção da enzima urease (OPLUSTIL, 2004).

Teste da produção de indol, resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. A prova é realizada inoculando-se o meio contendo excesso de triptofano (SANTOS FILHO, 2006).

O teste do citrato tem como finalidade verificar se o microorganismo tem a capacidade de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono (OPLUSTIL, 2004).

Pelo teste da hemólise observa as características hemolíticas, de acordo com o tipo de hemólise. Nesse sentido verificam-se três tipos de hemólise: alfa, beta e gama. A alfa hemólise apresenta zonas de hemólise parciais, com hemácias íntegras na parte mais interna (junto à colônia) e hemólise maior na parte mais externa. Na beta hemólise ocorreu uma zona de hemólise total, não se observando hemácias íntegras. E por fim, na gama hemólise não há produção de hemólise (OPLUSTIL, 2000).

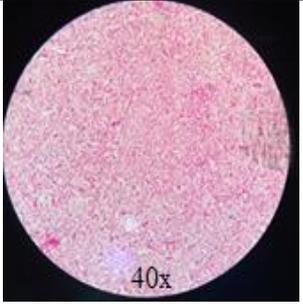
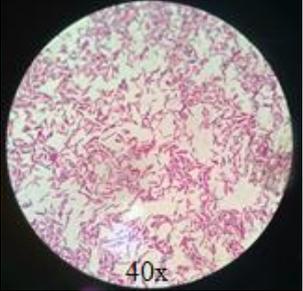
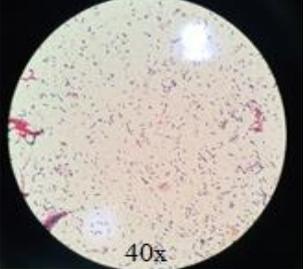
Concernente à microbiologia, através destas análises, foi possível identificar com precisão três gêneros de bactérias: *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Lactococcus* e algumas possíveis espécies desses gêneros. Observamos também todas as morfologias, colorações microscópicas e morfologia das colônias. As provas bioquímicas ajudaram a eliminar vários possíveis gêneros e espécies de bactérias, entretanto, não foram suficientes para identificar, com precisão, todos os possíveis microorganismos presentes nas amostras de peixes e conservantes.

Sendo assim, consideramos necessário a utilização de um aparelho automatizado de análises em microbiologia sendo utilizado o aparelho *BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostic Systems)*, o qual garantiu alta precisão na identificação das bactérias encontradas.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os quatro dias de fixação, foi observado crescimento microbiológico em todos os grupos de conservação, tanto nos meios quanto nas peças anatômicas, o Agar Sangue foi o meio que apresentou esse crescimento, já no Ágar Sabouraud 2% Dextrose com Cloranfenicol não foi verificado o crescimento de colônias de fungos, por fim, o caldo BHI foi utilizado para crescimento de colônias puro e as mesmas apresentaram crescimento como previsto.

Na figura 1 encontra-se os resultados do grupo A1, as características macroscópicas, microscópicas, identificação dos microorganismos realizados pelo equipamento Phoenix Automated Microbiology System e valor de confiança da identificação.

Característica Macroscópica	Característica Microscópica	Morfologia das colônias e coloração de Gram	Identificação <i>Phoenix</i>
		Colônias secas e aderentes à superfície do ágar. Bacilos Gram Positivo	<i>Bacillus licheniformis</i> Valor de confiança: 99%
		Colônias redondas, lisas, convexas, ligeiramente úmidas e viscosas, não pigmentado. Bacilos Gram Negativo	<i>Cupriavidus pauculus</i> Valor de confiança: 97%
		Colônias circulares, convexas, com margens lisas. Cocos de cadeias curtas Gram Positivo.	<i>Staphylococcus kloosii</i> Valor de confiança: 99%

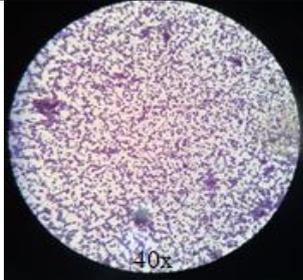
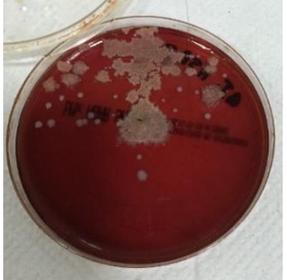
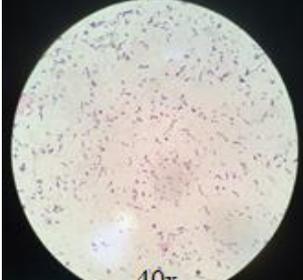
		Colônias circulares lisas, não pigmentáveis. Cocos cadeias curtas Gram Positivo	<i>Lactococcus graviae</i> Valor de confiança: 98%
		Colônias opacas, convexas, cremosa e brilhante. Cocos em cachos, cadeias curtas Gram Positivo.	<i>Staphylococcus capitis ssp. ureolyticus</i> Valor de confiança: 98%

Figura 1 – Observações macroscópicas, microscópicas e identificação dos microorganismos através do equipamento Phoenix Automated Microbiology System.

Os resultados das análises bioquímicas realizados manualmente do grupo A (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados das análises bioquímicas realizados manualmente, grupo A.

<i>Staphylococcus kloosii:</i>	Teste da catalase – positivo, ágar bile esculina – negativo, teste da oxidase – negativo, teste da coagulase – negativo, teste do citrato – negativo, teste da glicose – positivo, presença de hemólise – ausente, teste do indol – negativo e teste da ureia – positivo
<i>Cupriavidus pauculus</i>	Teste da catalase – positivo, ágar bile esculina – negativo, teste da coagulase – negativo, teste da oxidase – positivo, teste do citrato – negativo, teste da glicose – negativo, presença de hemólise – ausente, teste do indol – negativo e teste da ureia – positivo.
<i>Bacillus licheniformis</i>	Teste da catalase – positivo, ágar bile esculina – negativo, teste da coagulase – negativo, teste da oxidase – positivo, teste do citrato – negativo, teste da glicose – negativo, presença de hemólise – beta hemolítico, teste do indol – negativo e teste da ureia – negativo.
<i>Staphylococcus capitis ssp. ureolyticus</i>	Teste da catalase – negativo, ágar bile esculina – negativo, teste da coagulase – negativo, teste da oxidase – negativo, teste do citrato – negativo, teste da glicose – positivo, presença de hemólise – ausente, teste do indol – negativo e teste da ureia – positivo.

<i>Lactococcus garvieae</i>	Teste da catalase – negativo, ágar bile esculina – negativo, teste da coagulase – negativo, teste da oxidase – negativo, teste do citrato – negativo, teste da glicose – positivo, presença de hemólise – ausente, teste do indol – negativo e teste da ureia – positivo.
-----------------------------	---

Na tabela 2 observamos os resultados para os microorganismos identificados nos meios de conservação formol em água 4% (GI), formol 2% em glicerina (GII) e glicerina pura (GIII), para o grupo A1 (análise realizada após o período de fixação de 4 dias).

Tabela 2 – Identificação das bactérias encontradas em cada meio de conservação, pelo equipamento Phoenix Automated Microbiology System

Bactérias Identificadas	Tratamento
<i>Bacillus licheniformis</i>	GI, GII, GIII
<i>Cupriavidus pauculus</i>	GI, GII, GIII
<i>Lactococcus garvieae</i>	GI, GII, GIII
<i>Staphylococcus capitis ssp. ureolyticus</i>	GIII
<i>Staphylococcus kloosii</i>	GIII

Os resultados das análises microbiológicas dos grupos A2 e A3 (Figura 2 e 3) apresentaram resultados diferentes do grupo A1, pois não houve crescimento bacteriano nem fúngico em nenhum dos tratamentos testados. Mesmo após dez meses de conservação (grupo A3) não houve desenvolvimento de formas vegetativas bacterianas, comprovando assim a eficiência da ação antisséptica dos tratamentos avaliados.

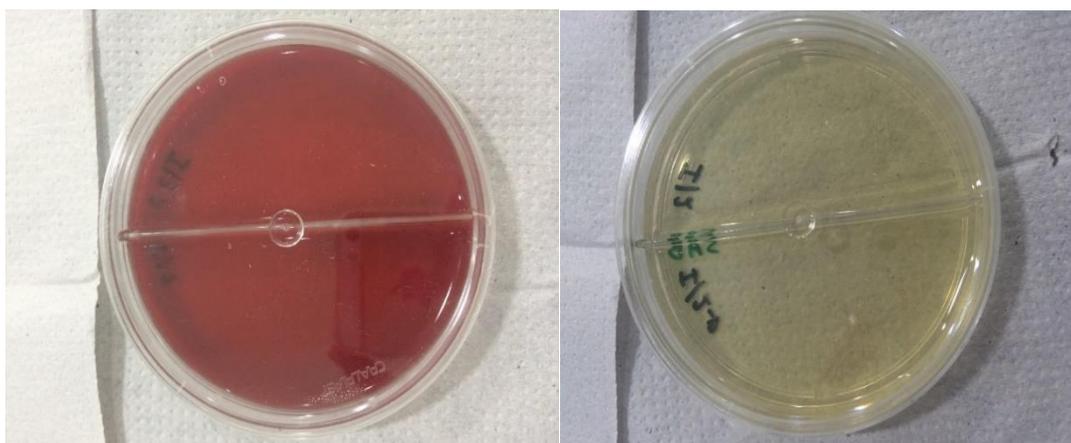


Figura 2 - Grupo A2, meios de cultura Ágar sangue e Ágar Sabouraud 2% Dextrose com Cloranfenicol.

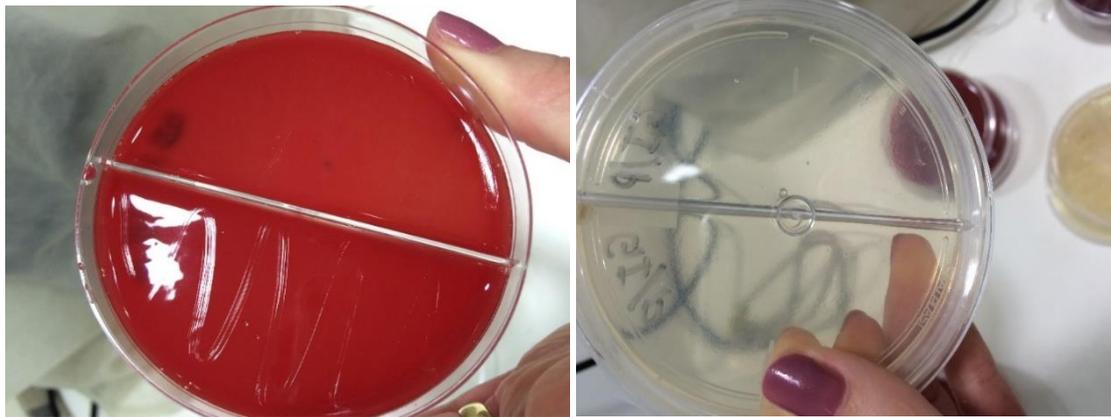


Figura 3 – Grupo A3, meios de cultura Ágar sangue e Ágar Sabouraud 2% Dextrose com Cloranfenicol.

Quando a patogenicidade e riscos à saúde das pessoas expostas, *Cupriavidus pauculus* (caráter não patogênico) são organismos ambientais ubíquos que são encontrados principalmente no solo, na água, e em plantas (YABUUCHI et al., 1995).

Bacillus licheniformis (caráter não patogênico), bactéria amplamente encontrada na natureza, sendo uma bactéria do solo, encontrada principalmente associada com plantas e materiais de plantas, facilmente disseminadas com a poeira (VEITH et al., 2004).

Staphylococcus kloosii (não patogênico) isolado a partir da pele de roedores, animais selvagens, cães e porcos (SCHLEIFER et al., 1985).

Lactococcus garvieae (não patogênico) é um dos principais patogênico para peixes. É considerado um problema sério no cultivo de peixes marinhos e de água doce (ELDAR et al., 1999), anteriormente denominado *Enterococcus seriolicida*. Sabe-se que esta espécie infecta viveiros de peixes principalmente durante o verão, quando a temperatura da água é superior a 20°C (TSAI et al., 2013).

Staphylococcus capitis ssp. ureolyticus (patogênico oportunista) o ser humano é a principal fonte e veículo de transmissão de *S. capitis* (HIRA et al., 2010) e sua emergência como patógeno oportunista foi relatado em neonatos internados em unidades de terapia intensiva (RASIGADE et al., 2012).

3.5 CONCLUSÕES

O uso da glicerina pura foi tão eficiente quanto o formol ou a mistura dos dois na conservação das peças anatômicas. Ambos impossibilitaram o crescimento de microorganismos, mas não eliminam completamente as bactérias durante o período inicial do processo de conservação.

Os testes com Ágar Sangue mostraram que nos 4 dias iniciais as bactérias estão presentes, havendo a necessidade de monitoramento microbiológico e cuidados com o manuseio e armazenamento das peças.

Pelas análises microbiológicas verificou-se que os microorganismos encontrados no início do experimento não permaneceram vivos nos meios de conservação, mostrando a eficiência da glicerina e do formol como antissépticos bactericidas e fungicidas.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Costa Neto, J. M., Daleck, C. L. M., Padilha Filho, J. G. 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., Neto, J. M. C., Alessi, A. C., Vicenti, F. A. M., Fantinatti, A. P., Francisco, M. M. S., Martins, M. R. Reparação cirúrgica da *pars musculares* do diafragma por ligamento nugal xenólogo conservado em glicerina a 98%: estudo experimental em cães (*canis familiaris*- Linnaeus-1758). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4. 2000, Goiânia. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia: CBCAV/EVUFG, v.1, suplemento, p.103, 2000.

Farias, M. C. A.; Freitas, J. A. Qualidades microbiológicas de pescado beneficiado em indústrias paraenses. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 67,113-117, 2008.

Feldhusen, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

Inotomi, L. S., Prantoni, G. A., Raiser, A. G. Implante de dura-máter heteróloga em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, 1980.

Kern, M.E., Blevins, K. S. **Micologia médica, texto e Atlas**. 2ª. Ed. São Paulo: Edit. Premier, 1999. p. 35-55.

Koneman, W.; Allen, D. S.; Janda, M.W; Schreckenberger, C. P; Winn, C. W. *Diagnóstico Microbiológico*, 5ª ed. MEDSI, 2001.

Machado, T.M., Furlan, E. F., Neiva, C.R.P, Casarini, L.M., Alexandrino de pérez, A.C., Lemos Neto, M.J., Tomito, R.Y. Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.36, n.3, p. 213-223, 2010.

Mol, S, Tosun, Y. The quality of fish from retail markets in Istanbul, Turkey. *Journal of Fisheries Science*, 5, 16-25, 2001.

Muratori, S. C. M., Viana, M. C., Rodrigues, C. P., Junior, P. D. L. R. Qualidade Sanitária do Pescado “In Natura”. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo. v. 18, n. 116/117, p.50 – 53. jan. /fev. 2004.

OLIVEIRA, S. J. *Microbiologia Veterinária, Guia Bacteriológico Prático*. Canoas: ULBRA, 2ª Edição, 2000.

Oplustil, C.P. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. Ed. Saraviva, São Paulo, 2000.

Pigossi, N.; Raia, A.; Lex, A. Estudo experimental sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. Revista Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 263- 278, 1971.

SANTOS FILHO, L. Manual de microbiologia. 4^a ed. Joao Pessoa. Edit: Universitária UFPB, 2006. p. 316.

Silveira, N.F.A. Contaminação microbiológica na cadeia produtiva de pescado. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO PESCADO: Qualidade e Sustentabilidade, 1, 2005, São Vicente, SP. Anais: Instituto de Pesca, 2005. p.24-28.

Spicher, G., Peters, J. Microbial resistance to formaldehyde. 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.

Washington Winn, Jr.; Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberge, P. Diagnóstico Microbiológico. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1565 2008.

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO FÍSICA DAS PEÇAS ANATÔMICAS DE PEIXES DAS ESPÉCIES *Oligosarcus pintoi* E *Cichlasoma paranaense* CONSERVADAS EM GLICERINA E FORMOL ÁPOS 12 MESES DE CONSERVAÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

O questionário é um instrumento característico para o método de pesquisa descritivo, que tem como objetivo observar, registrar, analisar, descrever e correlacionar fatos, fenômenos ou comportamentos sem manipulá-los (MATTOS et al., 2004; RABACOW et al., 2006).

Morrow et al., (2003) descrevem que a validade de um questionário é definida pelo grau de autenticidade e precisão, e dependente da reprodutibilidade e da relevância, ou seja, refere-se ao quanto o teste mede aquilo que se propõe ou foi designado a medir.

Questionários de boa qualidade são pré-requisitos para a validade das conclusões dos estudos. Perguntas a respeito de assuntos objetivos ou sobre conceitos abstratos, que podem ser operacionalizados por meio de gráficos, somente são recuperadas por meio do questionário. Dessa forma, é possível conhecer de percepção do participante sobre o assunto pesquisado (CHOR et al., 2013, BJORNER et al., 2010).

Nesta parte do trabalho, as amostras de peixes foram analisadas após um ano conservadas em álcool etílico. Além da análise por parte do pesquisador, foi aplicado também um questionário, muito simples, a observadores externos à pesquisa para se avaliar as características físicas das amostras como resistência à manipulação e durabilidade dos caracteres biológicos de cada espécie.

4.2 OBJETIVO

4.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o grau de conservação das peças anatômicas de peixes após o período de conservação de 12 meses.

4.2.2 Objetivos específicos

Utilizar a técnica de observadores treinados e não treinados para verificar o grau de conservação e aspectos visuais das peças conservadas em glicerina e formol durante 12 meses.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biologia e Química Ambiental do CERNA/ UEMS – Dourados.

4.3.2 Avaliação das peças anatômicas pelo pesquisador

Este estudo é a continuidade do capítulo anterior.

Após o período de fixação nos meios de conservação, as peças ficaram submersas em álcool etílico, em temperatura ambiente durante 12 meses sendo monitoradas visualmente. Todos os detalhes foram registrados em fotos, para comparação entre os tratamentos.

4.3.3 Avaliação das peças anatômicas por observadores externos.

Esta avaliação foi feita através da análise das respostas registradas num questionário.

Um questionário foi aplicado para 84 observadores, sendo o mesmo para todos os participantes. Entretanto, a análise das respostas foi dividida em dois grupos: Grupo Q1 (14 participantes): formado por pesquisadores que já trabalham com peças anatômicas de peixes e com o formol; Grupo Q2 (70 participantes): formado por alunos de cursos de graduação e leigos ao assunto. A idade dos participantes foi de 19 a 50 anos.

Durante a aplicação do questionário, as peças anatômicas ficaram expostas na bancada do laboratório de biologia (Figura 1) sem qualquer identificação sobre a metodologia de conservação, sabiam apenas que havia três tratamentos distintos e que eles deveriam observar a aparência física das peças, levando em consideração o estado de conservação das mesmas.

A primeira pergunta foi: “Em qual dos três tratamentos, as amostras estão com melhor aparência de conservação?”

Respostas a serem assinaladas:

- 1 – Não observei diferença entre os tratamentos.
- 2 – Tratamento I
- 3 – Tratamento II
- 4 – Tratamento III

A segunda pergunta: “De forma comparativa, qual dos três tratamentos você considera inferior?”.

Respostas a serem assinaladas:

1 – Não observei diferença entre os tratamentos.

2 – Tratamento I

3 – Tratamento II

4 – Tratamento III

Cabe ressaltar que os termos usados nas respostas: Tratamento I - corresponde ao “tratamento GI”; Tratamento II corresponde ao “tratamento GII” e o Tratamento III corresponde ao “tratamento GIII”.

Em complementação as duas perguntas foi solicitado aos participantes que manifestassem, por escrito, suas observações, justificativas e opiniões. A finalidade dessa parte escrita foi obter informações mais detalhadas sobre as observações e impressões dos mesmos. Estas informações foram importantes para fundamentar a discussão dessa etapa do trabalho e também para a obtenção de parâmetros para eventuais alterações e/ou adequações a serem adotadas em estudos futuras.



Figura 1 – Exposição das peças anatômicas de peixes das espécies *Oligosarcus pintoi* e *Cichlasoma paranaense* e aplicação do questionário avaliativo, no laboratório de Biologia - CERNA - UEMS.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 2 tem-se o resultado dos questionários aplicados ao grupo Q1. Com relação à pergunta 1 (Fig. 2) observa-se que dos 14 participantes, 10 (72%) consideraram que as peças conservadas em formol apresentavam melhor aparência estética, 3 (21%) responderam que a glicerina pura mostrou melhor aparência, apenas 1 (7%) considerou que a mistura de glicerina e formol demonstrou melhor aparência estética, e todos relataram diferença entre os tratamentos utilizados.

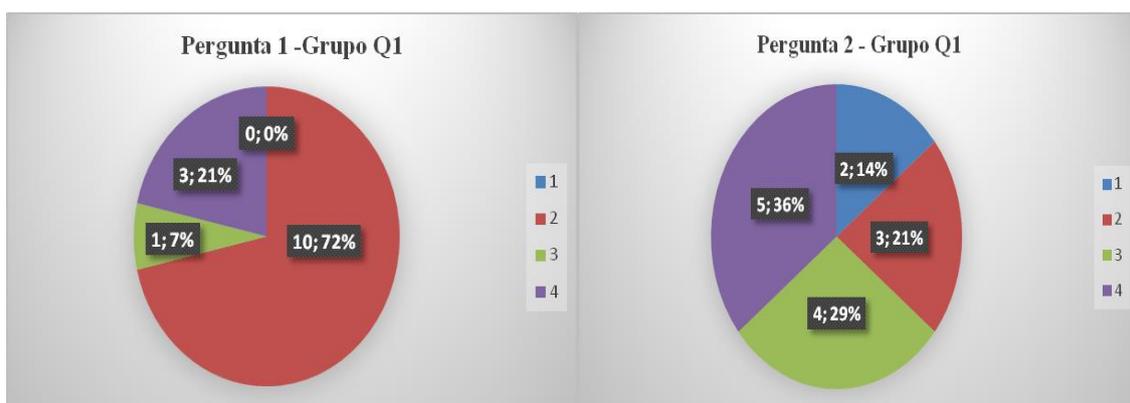


Figura 2 : Grupo Q1- Respostas referentes à pergunta 1 e 2 do questionário.

Com relação à pergunta 2 (Fig 2), 5 participantes (36%), consideraram que as peças do tratamentos GIII apresentaram aparência estética inferior em relação aos outros grupos, porém, 4 (29%) anotaram que o tratamento GII foi o tratamento de conservação inferior e 3 (21%) relataram que o grupo que menos conservou a aparência original foi o GI e 2 (14%) acreditam que não houve diferença entre os tratamentos. Analisando as respostas a essa pergunta verifica-se que não há uma diferenciação concreta entre os tratamentos.

Analisando as anotações feitas nos questionários, verifica-se que o fato que mais influenciou na consideração do tratamento GI como sendo o melhor, foi a melhor aparência dos olhos. Alguns também relataram diferenças de coloração e sinais de decomposição nos tratamentos GII e GIII. Os sinais de uma provável decomposição, na maioria dos casos, não foi fundamentada, alguns anotaram estarem relacionados à aparência dos olhos (mais profundos).

Na Figura 3 tem-se o resultado dos questionários aplicados ao grupo Q2. Com relação à pergunta 1 (Fig. 3) observa-se que dos 70 participantes, 31 (44%) relataram que o tratamento GI apresentou melhor aparência das peças, 24 (34%) observou que o

tratamento GII foi o melhor, 10 (15%) acharam que o GIII foi quem manteve a peça melhor conservada e 5 (7%) não observaram diferença entre os tratamentos.

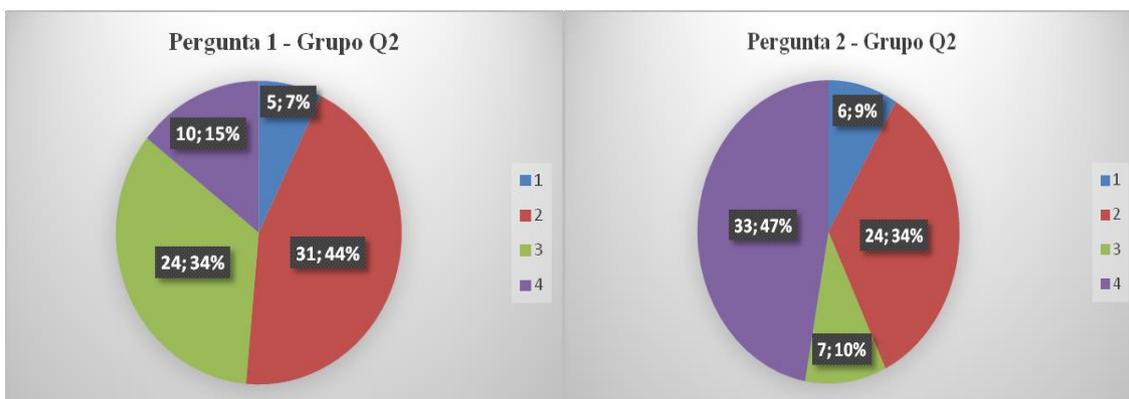


Figura 3 : Grupo Q2- Respostas referentes à pergunta 1 e 2 do questionário.

Com relação à pergunta 2 (Fig. 3) observa-se que 33,47% dos participantes consideraram que tratamento GIII foi inferior aos demais; 24,34% consideraram o tratamento GI inferior; 7,10% consideraram o tratamento GII inferior e 6,9% não observaram diferenças entre os tratamentos.

Com relação ao tratamento GIII, a maioria das alegações de inferioridade também foi fundamentada na aparência dos olhos e não do peixe como um todo. Com relação ao tratamento GI, a maioria das alegações de inferioridade foi fundamentada na coloração do peixe, a qual consideraram estar mais desbotada ou esbranquiçada que os demais tratamentos.

Com relação as nossas observações foi possível verificar que a glicerina conservou as peças anatômicas de maneira adequada, com uma boa penetração fato este também observado por Silva et al. (2008) e por Hammer et al. (2011).

O processo de glicerinação utilizado permitiu clareza na observação das peças, resultando em uma boa identificação das estruturas quando comparadas com conservante formol, fato este também observado por Gigeck et al. (2009).

A glicerina manteve a integridade, coloração e flexibilidade das peças anatômicas, não havendo contaminação fúngica e bacteriana do meio de conservação.

Aparentemente não houve sinais de decomposição externa. Apenas um ressecamento dos olhos, fato este relatado pelos observadores como sinal de decomposição e aparência estética inferior.

Vale ressaltar que este estudo foi realizado com peças anatômicas pequenas, de 50 a 110 milímetros, e um tempo curto de conservação (4 dias). Entretanto, alguns autores

relatam a necessidade de injeção de conservante nas peças anatômicas e também de um tempo maior de conservação para peças maiores (Karam et al., 2016, Gigeck et al., 2009).

4.5 CONCLUSÕES

As três técnicas de conservação estudadas mostraram ser eficientes quanto à conservação das peças anatômicas, tanto em relação à conservação biológica quanto à aparência física. Mesmo após um ano em álcool, os peixes mantiveram sua integridade estrutural, boa aparência e perfeita visibilidade de suas partes anatômicas. A aparência e o estado de conservação em que se encontraram favorecem, com segurança, o uso das peças em laboratórios didáticos.

Além da capacidade de conservação, deve-se levar em consideração o baixo custo, um menor impacto ambiental e a baixa toxicidade da glicerina. Sendo assim, sua utilização torna-se mais interessante que a do formol, sendo perfeitamente viável.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Bjorner, J.B., Olsen, J. Questionnaires in epidemiology. In: Olsen J, Saracci R, Trichopoulos D, editors. Teaching epidemiology: a guide for teachers in epidemiology, public health and clinical medicine. 3^a.ed. New York: Oxford University Press; 2010. p.93-103.

Chor, D., Alves, M.G., Giatti, L., Cade, N.V., Nunes, M.A., Molina et al, Questionário do ELSA-Brasil: desafios na elaboração de instrumento multidimensional. *Rev Saúde Pública*. 2013;47:27–36.

Karam, R. G., Cury, F. S., Ambrósio, C. E., Furlanetto, C. A. Mançanares. Uso da glicerina para a substituição do formaldeído na conservação de peças anatômica. *Rev. Vet. Bras*. 36(7):671-675. 2016.

Gigek, T., Neto, A. C. A., Oliveira, J. E. M., Carvalho, W. L., Pereira, F. V. Estudo Analítico da técnica de Glicerinação Empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos. In: V Simpósio de Ciências da UNESP – DRACENA. Setembro de 2009.

Hammer, N., Löffler, S., Feja, C., Bechmann, I., Steinke, H. Substitution of formaldehyde in cross anatomy is possible. *J. Natl Cancer Inst*. 103:610-611. 2011.

Mattos, M. G.; Rossetto Jr., Blecher, A. J. Teoria e prática da metodologia da pesquisa em educação física: construindo sua monografia, artigo e projeto de ação. São Paulo: Phorte, 2004. 176 p.

Morrow, J.R., Jackson, A.W., Disch, J.G., Mood, D.P. Medida e Avaliação do Desempenho Humano. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Raabacow, F. M., Gomes, M. A., Marques, P., Bertoldo, T. R. B. Questionário de medidas de atividade física em idosos. *Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum*. 2006;8(4):99-106.

Silva, E.M., Souza Filho, G.D., Marques, T., Furtado, J. M. Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas; experiência da disciplina de anatomia humana do departamento de morfologia do UniFOA Cadernos UniFOA. Volta Redonda, ano 3, edição especial, Maio. 2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, pôde-se concluir que a glicerinação é uma técnica tão eficiente quanto a formolização, na conservação de peças anatômicas, sendo viável a sua utilização para conservação de peças anatômicas.

Com a execução desse trabalho espera-se que mais estudos sejam realizados a fim de verificar a eficiência desse protocolo em mais espécies de peixes, viabilizando dessa forma, o uso da glicerinação como prática de rotina nos laboratórios de anatomia, visando eliminar e/ou diminuir o uso de formol. Isso irá propiciar melhoria nas condições de trabalho, menor agressão à saúde de professores, técnicos e alunos e ainda diminuir os impactos ambientais.