

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MEMBRANA AMNIÓTICA CONSERVADA POR ATÉ 48 MESES EM GLICERINA 99% EM TEMPERATURA AMBIENTE

Camila Almeida Ramalho¹, Kelly Cristine de Sousa Pontes²,
Andrea Pacheco Batista Borges³, Rodrigo Viana Sepúlveda⁴,
Renato Barros Eleotério⁵, Rogério Pinto⁶

Resumo: *Diversas enfermidades acometem o olho dos animais domésticos, de tal forma que podem comprometer a visão desses. Na Medicina Veterinária e Humana, a membrana amniótica tem demonstrado resultados satisfatórios em cirurgias oftálmicas e a necessidade de meios de armazenamento que mantenham sua esterilidade se faz necessária. Foram utilizados 80 frascos contendo amostras de membrana amniótica bovina conservada em glicerina 99%, em meio ambiente, divididos aleatoriamente em quatro grupos de igual número. As membranas foram avaliadas após 1, 6, 12 e 48 meses de armazenamento. Com o objetivo de avaliar a possível presença de bactérias e fungos nas amostras, essas foram inoculadas em ágar-sangue e incubadas a 37°C por 48 horas, em ágar Sabouraud a 25°C durante 5 a 10 dias e a 37°C por 48 horas. Não houve crescimento fúngico ou bacteriano em nenhuma das amostras. Conclui-se que a glicerina é um excelente meio de conservação de membrana amniótica bovina, mantendo o tecido isento de bactérias e fungos por um período de até 48 meses.*

Palavras-chave: *Âmnion, cirurgia, glicerol, meios de conservação, membranas biológicas.*

¹Graduanda em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA, Viçosa, MG. E-mail: ramalho.vet@hotmail.com

²Professora do curso de Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA, Viçosa, MG. E-mail: kellycpontes@yahoo.com.br

³Professora do curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG. E-mail: andrea@ufv.br

⁴Mestrando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG. E-mail: digosepulveda@hotmail.com

⁵Doutorando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG. E-mail: renato_ufv@hotmail.com

⁶Professor do curso de Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA, Viçosa, MG. E-mail: zootecnistarpinto@gmail.com

Introdução

Muitos tipos de membranas biológicas vêm sendo estudadas em procedimentos cirúrgicos oftálmicos reconstrutivos. Dentre os diversos tipos de membranas biológicas, a amniótica é a que tem demonstrado maior eficiência e tem sido amplamente utilizada na Medicina Veterinária e Humana. Ela pode ser empregada de várias formas, porém, o seu uso em cirurgias oftálmicas merece destaque devido às inúmeras propriedades que possui. Tem efeitos anti-inflamatórios e antifibrose de cicatrizes, além de conter fatores de crescimento que promovem a cicatrização de feridas epiteliais da superfície bulbar.

A manutenção da esterilidade é preocupação fundamental qualquer que seja o método de conservação de um biomaterial. Assim, vários meios têm sido estudados para preservação de membranas biológicas e a glicerina tem demonstrado bons resultados. A glicerina, ou glicerol, possui excelente ação antisséptica, além de atuar como agente fixador e desidratante. Esta composição está indicada para conservação de vários materiais biológicos por preservar a concentração iônica e a integridade celular. Além disso, ela é de baixo custo e de fácil manuseio, o que estimula o seu uso em novas pesquisas. O modo adequado de conservação do âmion é importante e, sem dúvida, o uso deste material degenerado prejudica o sucesso do tratamento, confirmando a necessidade de eficiência do meio de conservação. Porém, não existem relatos na literatura que identifiquem por quanto tempo a membrana amniótica permanece viável conservada em glicerina 99% em temperatura ambiente, no que diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica, para ser utilizada em cirurgias. Desse modo, foi proposto neste trabalho, a avaliação microbiológica de membrana amniótica bovina preservada em glicerina 99%, em temperatura ambiente por até 48 meses, para posterior utilização em cirurgia oftálmica.

Material e Métodos

A membrana amniótica foi preparada segundo as orientações da literatura (KIM & TSENG, 1995), sendo coletada, de forma asséptica, de uma fêmea bovina sadia, gestante e com feto a termo, encaminhada ao Hospital

Veterinário da Universidade Federal de Viçosa para realização de cesariana eletiva. A membrana amniótica, juntamente com o córion, foi lavada em solução fisiológica estéril a 0,9% em temperatura ambiente, imersa em solução tampão fosfato estéril, contendo 1000UI/ml de penicilina G, 20 mcg/ml de estreptomicina e 2,5 mcg/ml de anfotericina B2, separada manualmente do córion, estendida sobre papel de nitrocelulose com sua face epitelial voltada para cima, e cortada no tamanho de 0,5cm². Posteriormente, foi imerso um fragmento da membrana em frasco de vidro estéril contendo glicerina 99% em quantidade suficiente para cobri-lo. Foram preparados 80 frascos contendo a membrana amniótica com glicerina 99%, que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de número igual, G1, G2, G3 e G4.

Os frascos foram estocados em temperatura ambiente por um período mínimo de 30 dias e as membranas foram avaliadas microbiologicamente de acordo com Pontes et al. (2008). As membranas foram avaliadas após 1, 6, 12 e 48 meses de armazenamento.

Os fragmentos das membranas foram coletados assepticamente, utilizando material autoclavado e em câmara de fluxo laminar. Foram triturados com solução salina a 0,85% estéril e inoculados em placas contendo ágar-sangue e em placas contendo ágar Sabouraud. As amostras inoculadas em ágar-sangue foram incubadas a 37°C por 48 horas, visando isolamento de bactérias e, as em ágar Sabouraud a 25°C durante 5 a 10 dias e a 37°C por 48 horas visando o crescimento de fungos.

As análises microbiológicas dos grupos de membranas G1, G2 e G3 foram realizadas no laboratório de microbiologia da UFV e as membranas do grupo G4, no laboratório de microbiologia da UNIVIÇOSA/ESUV.

Resultados e Discussão

A glicerina 99% foi escolhida para ser utilizada como meio de conservação da membrana amniótica bovina neste trabalho porque, ao ser mantida em temperatura ambiente, apresentou como vantagens o baixo custo, fácil manipulação (PIGOSSI, 1967) e aquisição (PONTES et al., 2008), além de possuir propriedade antisséptica, atuando como bactericida e fungicida (GIOSO et al., 2002; PONTES et al., 2008). Este meio de conservação reduz a

antigenicidade do tecido (PIGOSSI, 1967), preserva a sua textura e aumenta a sua resistência, sem alterar o grau de elasticidade ou causar alterações eletrolíticas deletérias às células e à matriz extracelular (PIGOSSI, 1967).

Foi verificada a ação bactericida da glicerina sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém a glicerina não é capaz de impedir o crescimento bacteriano de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (PIGOSSI *et al.*, 1971) e não atua sobre algumas formas esporuladas mais resistentes (PIGOSSI *et al.*, 1971) e vírus (CORONADO *et al.*, 1998).

A utilização da membrana amniótica bovina neste estudo deu-se, principalmente, à facilidade de obtenção, ausência de imunogenicidade e por possuir maiores espessura e resistência, quando comparada à canina (PONTES *et al.*, 2008).

A finalidade da avaliação microbiológica das membranas foi constatar a presença ou ausência de fungos ou bactérias no material em períodos pré-estabelecidos. Nos grupos G1, G2 e G3 não foi verificado crescimento bacteriano e fúngico em nenhuma das amostras após inoculação das membranas em ágar-sangue e Sabouraud, durante o período de 1 a 12 meses. Entretanto, no grupo G4, verificou-se entre as 20 amostras de membrana amniótica conservadas em glicerina 99%, que duas apresentaram crescimento fúngico. As análises microbiológicas foram repetidas e não foi observado crescimento fúngico e bacteriano, sugerindo que a manipulação das membranas durante coleta para a primeira análise microbiológica possa ter levado à sua contaminação, corroborando Gioso (*et al.* 2002) que constataram que a simples manipulação dos ossos, por mais cuidadosa que fosse, poderia introduzir microrganismos contaminantes nas amostras.

Dessa forma, o presente trabalho analisou microbiologicamente as membranas amnióticas a partir de 30 dias, pois, para que haja perda da capacidade de estimular reação imunológica, a membrana deve permanecer pelo menos por 30 dias em glicerina (PIGOSSI, 1967). Krauspenhar (*et al.* 2003), em um estudo sobre os efeitos da glicerina sobre tendões inoculados com bactérias gram negativas e gram positivas, concluíram que o período mínimo para preservação dos enxertos de tendão calcâneo seria de 30 dias, pois a eliminação de bactérias gram negativas poderia requerer até 27 dias.

Por meio do presente trabalho, foi atribuída à glicerina 99% a ausência de crescimento fúngico e bacteriano durante conservação de membrana amniótica bovina por um período de até 48 meses. Brun (et al. 2002) também demonstraram o seu poder antisséptico, mesmo a longo prazo, quando conservaram retalho de pericárdio em glicerina 98%, durante 11 anos, e não observaram crescimento de bactérias e fungos, considerando a glicerina um meio eficiente para conservação de pericárdio. A glicerina também se mostrou eficiente em conservar tecido ósseo, que após nove anos de armazenamento não apresentou crescimento bacteriano significativo e os fragmentos ósseos ainda continham medula óssea íntegra, que preenchia todo o canal medular (GOSO et al., 2002).

Monteiro (et al. 2000) usaram membrana amniótica no tratamento de úlcera de córnea e afirmaram que o modo adequado de conservação do âmnion é importante, pois o uso deste material degenerado prejudica o sucesso do tratamento, confirmando a necessidade do meio de conservação ser eficiente.

Conclusões

Conclui-se que a glicerina é um excelente meio de conservação de membrana amniótica bovina, mantendo o tecido isento de bactérias e fungos por um período de até 48 meses em temperatura ambiente.

Comitê de Ética e Biossegurança

O presente ensaio biológico foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – FACISA/UNIVISO, atendendo às resoluções do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sendo aprovado sob número 00113/2012 - 1 e conduzido de acordo com as normas do Manual sobre Bioética e Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – FACISA/UNIVISO.

Agradecimentos

Agradecemos à Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – FACISA/

UNIVIÇOSA, à Universidade Federal de Viçosa – UFV, à Opthalmos Indústria Farmacêutica, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CNPQ pelo apoio concedido.

Referências Bibliográficas

BRUN, M. V. et al. Traqueoplastia em cães com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da FZVA**, v.9, n.1, p.113-142, 2002.

CORONADO, Jr. et al. Virucidal and osteogenic effects of 98% glycerol and ethylene oxide preservation of bone allograft in the cat. In: Annual Conference of Veterinary Orthopedic Society, 1998, Colorado, USA. Proceedings... Snowmass: **Veterinary Orthopedics Society**. p. 31, 1998.

GIOSO, M.A. et al. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.4, p.242-246, ago. 2002.

KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n.5, p.473-484, 1995.

KRAUSPENHAR, L.C. **Viabilidade bacteriana no meio de conservação glicerina 98% do tendão calcâneo comum**. 62f. Dissertação (Mestrado em cirurgia veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2003.

MONTEIRO, E.C.L. et al. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63, n.1, p.33-37, fev. 2000.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. 36f. Tese de doutorado (Livre docência) Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, 1967.

PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 17, p. 263-78, 1971.

PONTES, K.C.S. et al. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – Aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1069-1074, out. 2008.

