

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ASPECTOS BIOMECÂNICOS, BACTERIOLÓGICOS E  
MICOLÓGICOS DE DIÁFISES FEMORAIS CANINAS  
CONSERVADAS EM GLICERINA A 98% OU MEL**

**TESE DE DOUTORADO**

**Gustavo Frassetto Amendola**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**ASPECTOS BIOMECÂNICOS, BACTERIOLÓGICOS E  
MICOLÓGICOS DE DIÁFISES FEMORAIS CANINAS  
CONSERVADAS EM GLICERINA A 98% OU MEL**

**por**

**Gustavo Frassetto Amendola**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em  
Cirurgia Experimental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Dr. Alceu Gaspar Raiser**

**Santa Maria, RS. Brasil**

**2007**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa De Pós-graduação Em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**ASPECTOS BIOMECÂNICOS, BACTERIOLÓGICOS E  
MICOLÓGICOS DE DIÁFISES FEMORAIS CANINAS CONSERVADAS  
EM GLICERINA A 98% OU MEL**

elaborada por  
**Gustavo Frassetto Amendola**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Alceu Gaspar Raiser, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Renato Borges Fagundes, PhD. (UFSM)**

**Alexandre Mazzanti, Dr. (UFSM)**

**João Cesar Dias Oliveira, Dr. (UFSM)**

**Renato Xavier Faria, Dr. (URCAMP)**

Santa Maria, 12 de março de 2007.

Dedico a presente tese a três pessoas que eu gostava muito,  
aos meus avós Romeu e Haydée,  
que sempre foram bons amigos e também  
ao meu querido amigo Ricardo Alexandre Hippler,  
colega de graduação, mestrado e departamento.  
Um forte abraço para vocês aí em cima.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e por ter proporcionado tantas oportunidades com que fui agraciado.

Aos meus genitores, Delmo e Miriam, por terem sido bons pais e pela ajuda que sempre me foi prestada.

Ao meu orientador, Doutor Alceu Gaspar Raiser, por ter ensinado de forma tão magistral a maior parte do ensinamento sobre cirurgia que absorvi tanto no período de graduação como pós-graduação e também pelos votos de confiança que sempre me foram prestados.

Aos meus tios Fernando e Carmen, além das minhas primas, que sempre me ajudaram, principalmente nos momentos de extrema dificuldade e me acolheram de forma paternal quando necessitei.

Aos distintos Doutores Ney Pippi, João Eduardo e Alexandre, sumidades consagradas em Medicina Veterinária e que contribuíram não somente para a minha formação, mas também para a de uma miríade de profissionais competentes que se encontram no país e além dele.

Ao Doutor Jânio, à Daniela, ao Ayrton e à Estela, que me ajudaram muito na etapa micológica do meu trabalho, sempre atenciosos e compreensivos.

À Doutora Agueda, a Franciele e a Nilra, além dos outros estagiários que, de forma excepcional, contribuíram para que fosse realizada com sucesso a avaliação bacteriológica do presente estudo.

Ao Doutor José Mário e ao João do LMCC, por terem me permitido utilizar as dependências do referido laboratório e que sempre me ajudaram quando as dúvidas se fizeram presentes.

Aos Doutores Cláudio e João Francisco, atual e último coordenador do PPGMV, por terem proporcionado a oportunidade de eu poder opinar nas decisões do pujante programa, na qualidade de representante dos discentes doutorandos.

Aos colegas com que convivi, e que provavelmente não conseguirei enumerá-los por completo, pois foram tantos. Vamos lá: Ventura, Fabiano, Savassi, Ademar, Josaine, Adamas, De Conti, Juca, Raquel, Mário, Douglas, Bolson, Rafael, Alievi, Liege, Débora, Polydoro,

Sandro, Soraya, Charles, Fighera, Márcia, Cardona, Marina, Letícia, Graziela, Guilherme, Eduardo, Daniel, Tatiana, Fabíola, Denise, Kleber, Lucas, Rosana e outros tantos.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, em especial ao César da Radiologia e o Alvarino, que sempre foram amigos cordiais.

Aos amigos que fiz na Medicina, os doutores Ignácio, Chariff, Copetti e a doutora Sandra e também aos seus funcionários, que permitiram que fosse possível a coleta dos ossos dos cães por eles utilizados.

Ao Doutor Adriano, amigo que me auxiliou na estatística do trabalho realizado.

A todos os estagiários, especialmente ao Diego, hoje mestrando, que me ajudou de forma importante na coleta dos materiais.

Até ao Fabrício, que é muito chato, mas é meu amigo e colega e que nos conhecemos há muito tempo.

A Capes pela bolsa, sem a qual não teria sido possível a realização desse estudo.

Aos freqüentadores do LACE, pelas brincadeiras, discussões científicas, coleguismo e festas realizadas.

A Universidade Federal de Santa Maria, instituição que me acolheu em 1993 e que até hoje estive vinculado, seja como aluno ou professor.

A todos os que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho, o meu agradecimento e desejo de eterno sucesso.

A todos os cães que participaram e participam dos estudos científicos e aulas práticas, por terem doado seu único e precioso bem, a vida.

*“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”*

Albert Einstein (1879-1955)

## **RESUMO**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ASPECTOS BIOMECÂNICOS, BACTERIOLÓGICOS E MICOLÓGICOS DE DIÁFISES FEMORAIS CANINAS CONSERVADAS EM GLICERINA A 98% OU MEL**

AUTOR: GUSTAVO FRASSETTO AMENDOLA  
ORIENTADOR: ALCEU GASPAR RAISER  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de março de 2007.

Os implantes ósseos corticais desempenham função basicamente de sustentação mecânica. A exigência fundamental para que ocorra a osteointegração do enxerto é a estabilidade, sendo a resistência um fator de extrema relevância. O objetivo do presente estudo foi comparar a resistência compressiva axial de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel, mantidas por um período de 30 dias. Foram formados três grupos, cada um contendo 50 amostras. O primeiro grupo apresentou como agente conservante a glicerina a 98%, o segundo o mel e ainda houve um terceiro grupo onde os ossos foram coletados a fresco e imediatamente testados. Os ossos foram obtidos de maneira não asséptica, utilizando serra manual e realizou-se a remoção do perióstio e medula óssea. Posteriormente cada implante teve definido seu comprimento, diâmetro e espessura de cortical e foi determinado que o comprimento seria o dobro do diâmetro de cada diáfise. Os testes biomecânicos foram realizados em uma prensa de compressão axial, na qual as diáfises foram submetidas até a carga máxima quando houve fissura. Os grupos da glicerina a 98% e mel foram hidratados por um período de seis horas antes do teste compressivo, enquanto que no grupo de ossos testados a fresco não houve hidratação. No estudo bacteriológico, a contaminação foi avaliada usando três grupos, cada um com 35 amostras de um segmento femoral. O primeiro grupo foi analisado no momento da coleta e nos grupos da glicerina a 98% e do mel, após 30 dias de armazenamento. A mesma metodologia foi usada para a avaliação micológica. Os resultados demonstraram que a glicerina a 98% foi mais eficiente na manutenção da resistência óssea e também mais eficiente em eliminar bactérias e fungos.

Palavras-chave: enxerto ósseo; resistência; contaminação

## **ABSTRACT**

Doctor Thesis  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **BIOMECHANICAL, BACTERIOLOGICAL AND MYCOLOGICAL ASPECTS OF CANINE FEMORAL SHAFTS CONSERVED IN 98% GLYCERIN OR HONEY:**

AUTHOR: GUSTAVO FRASSETTO AMENDOLA  
ADVISER: ALCEU GASPAR RAISER  
Date and place: Santa Maria, March 12<sup>th</sup>, 2007.

The most important function of bone cortical allograft is basically of mechanical sustentation. The stability and resistance have an important signification in the success of bone grafting. The aim of this study was to compare the axial compressive resistance of canine femoral shafts conserved in 98% glycerin or honey, kept for 30 days. Three groups had been formed, each one with 50 samples. The first group presented the 98% glycerin as agent, the second group had the honey as way to conserve and still there was one third group where the bones had been fresh collected and immediately tested. The bones had been collected without asseptical care with manual saw and the periosteal layer and bone marrow were removed. Later, the length, diameter and cortical thickness of each implant were measured and then was determined that the length would be twice the diameter of each femoral shaft. The biomechanical evaluation were tested in a press of axial compression, where the shafts had been submitted until the maximum load, when the first fracture point happened. The 98%glycerin and honey groups were moisturized for six hours before the compressive test while the fresh bone group received no hydration. In the bacteriologic study, the contamination was evaluated using three groups, each one with 35 samples of a femoral segment. The first group was analyzed at the harvest time and in the 98% glycerin and honey groups, after 30 days of storage. The same methodology was used for the mycological evaluation. The results showed that the 98% glycerin was more efficient in keeping bone resistance and also more efficient in eliminating bacteria and fungi.

Key-words: bone graft; resistance; contamination

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Demonstrando a prensa de compressão axial marca Solotest e as medições realizadas com paquímetro digital no sentido crânio - caudal e médio - lateral.....	53
FIGURA 2 - Exemplo de agentes encontrados. Na foto A tem-se o crescimento de um bacilo, enquanto que na foto B é possível observar a presença de <i>Aspergillus niger</i> , os quais estavam presentes nos ossos conservados em mel.....	66
FIGURA 3 - Gráfico da regressão linear entre mel e glicerina em relação ao volume <i>versus</i> resistência dos ossos.....	77

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Os grupos dos ossos examinados a fresco (F), conservados em mel (M) e os ossos conservados em glicerina (G), além dos agentes que foram isolados através dos testes realizados em Ágar sangue. Avaliação bacteriológica.....	72
QUADRO 2 - Os grupos dos ossos examinados a fresco (F), conservados em mel (M) e os ossos conservados em glicerina (G), além dos agentes que foram isolados através dos testes realizados em Ágar <i>Saboraud</i> . Avaliação micológica.....	74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultado do volume dos grupos nos quais os ossos foram conservados em glicerina (G), mel (M) e dos ossos avaliados a fresco (F) relacionados com a carga (em Newton) que cada um dos ossos dos grupos suportaram. No final tem-se a relação Volume x Newton de cada grupo.....	61
TABELA 2 - $r$ significa o coeficiente de regressão, $r^2$ coeficiente de regressão linear, $y=a+bx$ equação de regressão linear, $a$ é a constante onde a reta encosta em N e $b$ é o slope, que é a inclinação das retas no gráfico, onde mostra que a glicerina foi mais eficiente que o mel.....	76
TABELA 3 - Resultado do Teste Qui-quadrado demonstrando que a glicerina foi mais eficiente que o mel na inibição do crescimento de bactérias ( $P < 0.0001$ ).....	77
TABELA 4 - Resultado do Teste Qui-quadrado demonstrando que a glicerina foi mais eficiente que o mel na inibição do crescimento de fungos ( $P < 0.0317$ ).....	78

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Implantes ósseos.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Comportamento biomecânico ósseo.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Glicerina e mel como conservantes.....</b>	<b>38</b>
2.3.1 Glicerina.....	38
2.3.2 Mel como agente conservante e terapêutico.....	43
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Coleta e conservação.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Ensaios biomecânicos.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Avaliação bacteriológica.....</b>	<b>54</b>
<b>3.4 Avaliação micológica.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Avaliação estatística.....</b>	<b>55</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Propriedades biomecânicas.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2 Glicerina como agente bactericida e fungicida.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3 Mel como agente bactericida e fungicida.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4 Avaliação estatística.....</b>	<b>76</b>
4.4.1 Ensaios biomecânicos.....	76
4.4.2 Avaliação bacteriológica.....	77
4.4.3 Avaliação micológica.....	78
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Enxertos ósseos diafisários são de extrema importância para a correção de grandes falhas ósseas e vários autores citam formas de preservação. O óxido de etileno foi utilizado por SCHENA et al. (1984) e a liofilização por JOHNSON et al. (1985) na conservação de ossos. Entretanto alguns autores, como GOLDBERG & STEVENSON (1987), preferiram utilizar ossos coletados a fresco. Todavia, podem ser citados ainda o congelamento (DUELAND et al., 1989; KERVIN et al., 1991), tintura de iodo a 2% (PINTO JÚNIOR, 1995), glicerina a 98% (COSTA, 1996) e o mel (AMENDOLA, 2001).

Testes biomecânicos têm se tornado cada vez mais comuns para avaliar a performance da rigidez de ossos. Cargas fisiológicas são aplicadas aos implantes para avaliar a sua estabilidade mecânica (SEDLIN, 1966; KOMANDER, 1976; BUCHARDT et al., 1978; PELKER et al., 1984; MALININ et al., 1989; KANG & KIM, 1993; CONRAD, 1993; SCHIMIDT et al., 1994; DUARTE & SCHAEFFER, 2000; BECKMANN et al., 2005).

O risco de transmissão de doenças infecciosas e de contaminação cirúrgica para os pacientes que recebem implantes de tecidos é de grande interesse na formação de um banco para estocagem de tecidos. Microorganismos são introduzidos durante a coleta, processamento e estocagem. Condições de assepsia fazem com que a possibilidade de transmissão de doenças bacterianas, fúngicas ou víricas seja praticamente excluída. Portanto, para minimizar os riscos de transmissão de doenças, deve-se monitorar rigorosamente todas as etapas, incluindo-se a cuidadosa seleção do doador, o processo de coleta e os meios de esterilização e/ou conservação dos tecidos a serem implantados (DZIEDZIC & STACHOWICZ, 1997).

Vários autores, como PIGOSSI et al. (1971), DALECK (1992), ALMEIDA (1996), NETO et al. (2000), OKAMOTO et al. (2000), CONTESINI et al. (2001) e STAINKI et al. (2001) realizaram experimentos utilizando a glicerina 98% como método ou meio conservante de diferentes materiais biológicos. Dentre eles citam-se a dura-máter, o peritônio, o pericárdio, a tíbia e a cartilagem, mostrando a eficácia de seu uso como meio conservante, ocorrendo, contudo divergência quanto ao tempo de conservação e a análise bacteriológica.

Embora o mel como conservante de ossos seja pouco utilizado, MSCHIVIDOBADSE (1978) comentou que utilizou em humanos implantes alogênicos esterilizados através de formaldeído e conservados em solução diluída contendo 50% de mel, obtendo resultados

satisfatórios, chegando a conclusão de que essa é uma forma de se obter um banco de ossos de alta qualidade.

Apoiando-se na evidência de que o mel possui propriedades anti-sépticas (EFEM et al., 1992), ossos têm sido mantidos nesse material por um período mínimo de 30 dias e posteriormente implantados em animais, proporcionando resultados satisfatórios, tal como relataram AMENDOLA (2001), GAIGA (2002) e ALIEVI (2006).

Os objetivos do presente estudo foram:

- Comparar biomecanicamente, através de compressão axial, diáfises femorais conservadas em glicerina ou mel para avaliar qual método permite uma maior manutenção da resistência óssea;
- Comparar os dois métodos anteriormente citados com ossos colhidos a fresco;
- Verificar se o modelo experimental demonstrou ser adequado para esse tipo de teste biomecânico;
- Avaliar bacteriologicamente e micologicamente qual o meio mais eficiente para a descontaminação de ossos colhidos de forma não asséptica;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Implantes ósseos

Desde a antiguidade existem relatos sobre enxertos e sua origem muitas vezes se encontra mesclada com episódios lendários. Os primeiros indivíduos a realizarem tal tipo de transplante seriam Cosme e Damião, nascidos no terceiro século do ano do Nosso Senhor. Cosme, clínico, e Damião, cirurgião, teriam realizado muitas curas e práticas médicas não usuais ao longo dos anos, desagradando o imperador romano Diocleciano, que acabou por sentenciá-los à morte no ano de 287 d.C. Supostamente, no século V, Cosme e Damião teriam patrocinado um milagre na Basílica de Roma: o administrador sofria muito devido a um tumor em um membro pélvico e, exausto, adormeceu durante suas orações. São Cosme e São Damião apareceram-lhe em sonho, removeram o membro doente e o substituíram pelo o de um homem que havia falecido no mesmo dia. Os relatos afirmam que tal cidadão havia acordado completamente sanado. Essa suposta operação milagrosa foi incorporada à tradição Católica e retratada por artistas tais como Fra Angelico, podendo suas pinturas ser observadas no Museu de São Marco em Florença (MANKIN et al., 1983).

Em 1688 um cirurgião holandês, Job van Meekeren, descreveu um procedimento em que transplantou com sucesso um fragmento de crânio canino para a abóbada craniana de um soldado que servia ao exército que atualmente protege o território russo. Isso não foi praticado sem algumas preocupações éticas e conseqüências morais. O paciente, posteriormente, solicitou que o enxerto fosse removido, visto que o procedimento resultou em sua excomunhão da Igreja Católica. Na segunda intervenção o referido militar veio a óbito (WEIGEL, 1993). O mesmo autor relatou que o auto-enxerto experimental de ossos em coelhos e cães foi conduzido primeiramente pelo francês Ollier, em 1867 e que o primeiro manual cirúrgico sobre enxerto ósseo, de autoria de F.H. Albee, foi publicado nos Estados Unidos, em 1915.

A partir da segunda metade do século XIX houve um incremento no interesse sobre o potencial biológico dos ossos e periósteo, sendo que através de uma intervenção cirúrgica em 1881, Macewen obteve a reconstrução da diáfise umeral de uma criança utilizando enxerto ósseo (FRIEDELANDER, 1987).

Enxertos e implantes ósseos são amplamente utilizados em humanos e animais para corrigir falhas ósseas que não seriam passíveis de síntese mediante simples aproximação dos

segmentos afetados. A diferença entre os dois termos está no fato de que enxertos são praticados com material viável ou vivo, enquanto que implante está relacionado com tecido não vivo ou ainda com material não biológico (STEVENSON, 1998).

Fraturas de ossos em membros locomotores são freqüentes em pequenos animais. Fraturas cominutivas ou multifragmentares são os traumatismos que apresentam maior dificuldade de tratamento. Em geral, a osteossíntese nesses casos não apresenta boa evolução pós-operatória. No entanto, a enxertia óssea na ortopedia veterinária tem sido uma alternativa segura e de eleição na reposição de perdas e falhas ósseas (REYNOLDS et al., 1951). Para isso torna-se necessário que os implantes homólogos sejam previamente retirados do animal doador e preservados em meio adequado (PINTO JÚNIOR, 1990).

Tradicionalmente os cirurgiões veterinários preferem o uso de ossos autógenos devido a superior capacidade osteogênica, facilidade de incorporação, e ausência de problemas imunológicos (ALEXANDRE, 1983). Os enxertos tubulares (cilindro completo) estão indicados para: fraturas diafisárias múltiplas ou cominutivas graves que não se prestam para a reconstituição anatômica; perdas de segmentos ósseos; para a reposição de segmentos removidos através de cirurgias, (neoplasias); reconstituição de não união óssea (PEIRMATTEI & FLO, 1999). AMENDOLA (2001) descreveu em um trabalho experimental que em cirurgias ortopédicas muitas vezes é impossível reparar o tecido ósseo devido a grandes perdas ósseas e para isso os implantes são extremamente importantes.

Alguns autores atribuíram algumas desvantagens em se utilizar enxerto alógeno a fresco. JOHNSON & STEIN (1988), utilizando ossos submetidos ao óxido de etileno, citaram que o enxerto ósseo conservado é superior ao enxerto ósseo cortical recentemente colhido, uma vez que este último é muito imunogênico, necessita de duas equipes cirúrgicas, dois procedimentos cirúrgicos simultâneos, implica no sacrifício de um doador a cada enxertia e acrescentou ainda a dificuldade de se obter doador saudável de porte compatível com o do receptor.

Porém, há uma série de fatores limitantes na obtenção dos implantes ósseos. Devido à grande variação dos tamanhos dos esqueletos dos animais, as possibilidades de se encontrar um doador que seja compatível com a conformação física do animal receptor diminui consideravelmente (PINTO JÚNIOR, 1990; 1995). Também é difícil obter ossos de cães doadores imediatamente para a cirurgia de enxertia, pois é necessária a remoção total de perióstio e restos teciduais aderidos ao osso para que não haja rejeição ao implante, procedimento que atrasaria consideravelmente o início da cirurgia. Além disso, é preciso que

o método de preservação seja viável, de fácil utilização, baixo custo e que seja acessível a clínicas e ambulatórios cirúrgicos de pequenos animais (ROE et al., 1988).

WEIGEL (1993) comentou que ossos conservados apresentam vantagens em relação ao material colhido a fresco, pois existe uma possibilidade menor de rejeição por parte do receptor, além de poder haver a formação de um banco de ossos.

Os aloenxertos ósseos corticais são biodegradáveis e comumente usados no tratamento de fraturas em mamíferos. Os enxertos podem ser conservados, resultando em morte celular, sendo que eles funcionam principalmente como ocupantes de espaço e suporte para crescimento de osso novo do hospedeiro. Os vários meios e métodos de conservação de ossos corticais visam diminuir a antigenicidade das células do doador a serem implantadas no hospedeiro, além de manter um estoque acessível de osso disponível (STEVENSON, 1998).

Quanto a métodos de conservação de implantes ósseos, numerosas são as alternativas propostas, sendo citados a glicerina por PIGOSSI (1967), tintura de iodo a 2% por PINTO JÚNIOR (1995) e o mel, por ALIEVI (2006), para conservar osso cortical alógeno em cães em falhas ósseas de fêmur.

DEL CARLO et al. (1999), usando aloenxertos ósseos caninos, compararam diferentes métodos de conservação: ossos autoclavados; glicerina; solução de tiomersal 1:1000; cefalosporina a 0,5% diluída em soro fisiológico e mantida no congelador a  $-16^{\circ}\text{C}$  e ossos mantidos em refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os autores concluíram que o melhor resultado obtido foi através da conservação óssea em solução fisiológica com cefalosporina em  $-16^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2 Comportamento biomecânico ósseo**

De acordo com HULSE & HYMAN (1998), as quatro forças fisiológicas primárias que podem ser aferidas sobre o osso são a compressão axial, a tensão axial, o envergamento (flexão) e a torção. Cada uma destas forças, isoladamente ou em conjunto, resulta em um padrão complexo de pressões e deformações internas no âmbito do osso.

Fatores importantes na gênese de fraturas são a magnitude, a duração e a direção das forças atuando no osso. As forças podem ser de tração ou compressão, neste caso chamado de forças axiais, pois são paralelas ao eixo longitudinal do osso. Estes esforços provocam encurtamento ou alongamento ósseos. Nos esforços de torção, a deformação angular provoca forças de cisalhamento, cuja tensão máxima ocorre no ponto mais distante do centro do eixo maior do osso, ou seja, na superfície cortical. Observando uma secção transversal do osso, as forças de reação no mesmo, quando submetido à torção, têm o sentido oposto ao da força de

torque aplicada. Contudo, quando se tem um defeito ósseo e este é submetido à tensão torsional, o sentido da tensão no osso é o mesmo da força externa aplicada na porção central de sua secção transversal. Neste caso, somente a superfície da região cortical do osso está resistindo à tensão imposta (BURSTEIN et al., 1972).

Quando um osso for submetido a uma carga de compressão, sofre uma deformação, que se divide em dois momentos. No primeiro, se for retirada a força deformadora, o osso retornará a sua forma inicial; é chamada deformação elástica. Num segundo momento, se maior estresse ou esforço for aplicado ao material, seu poder de retornar à forma original será excedido, e a isso se denomina deformação plástica. O ponto que delimita a divisão entre a deformação elástica da plástica é chamado de ponto de cessão ou limite de proporcionalidade (HARKESS et al., 1993).

O osso cortical diafisário é um material composto basicamente por hidroxiapatita, uma cerâmica de alta resistência, que lhe confere principalmente rigidez, e por uma matriz basicamente composta por colágeno, uma proteína responsável por suas propriedades elásticas e plásticas. Sua estrutura não homogênea, a existência de trabeculados ósseos com arquitetura bem definida (alinhamento principal) e a interposição de fluídos conferem ao mesmo características de anisotropia e de viscoelasticidade. Apresenta, *in vivo*, processo de cicatrização e remodelação contínuas, regulados por mecanismos complexos, inclusive por efeitos piezelétricos (MEARS, 1979). CAMARGO et al. (2002) comentaram que estas características fazem com que o osso apresente uma resistência adaptada às tensões pontuais, variáveis ao longo do tempo (idade, por exemplo), posição (localização anatômica) e às solicitações externas (frequência e intensidade de forças e nível de atividade).

Os ensaios mecânicos têm a finalidade de determinar as propriedades estruturais de diferentes tipos de materiais. Basicamente existem dois tipos de ensaios, que são os destrutivos e os não-destrutivos. O primeiro promove a ruptura ou inutilização do material e nessa categoria estão incluídos os testes de tração, impacto, torção, compressão, flexão e fadiga. Nos ensaios não destrutivos estão incluídos os testes de ultra-som, *magnoflux*, raios-X e outros que podem determinar as propriedades físicas ou mecânicas do material analisado (SOUZA, 1974).

O tipo de ensaio biomecânico empregado depende do tipo de material testado, da finalidade a que se destina, do tipo de esforços a que será submetido e das propriedades mecânicas a serem medidas. Para a análise de enxertos ósseos o principal teste a ser realizado é o de compressão axial (CASTANIA, 2002).

AN & DRAUGHN (2004) relataram diferentes métodos de avaliação biomecânica de ossos. Podem ser citados a medição da dureza óssea por meio de osteopenetrômetro, testes de microdureza, análise de propriedades viscoelásticas, ultra-som, *scanner* acústico, simulação computadorizada e indentação, além de diversos outros tipos de estudos.

Baseando-se no fato de que a maioria dos métodos de conservação exercem efeito deletério sobre a resistência óssea (DEL CARLO et al., 1999), vários testes biomecânicos têm sido realizados em ossos visando analisar suas características estruturais, tal como estudaram CORNU et al. (2003) e BALL et al. (2004).

Pesquisas sobre as propriedades dos ossos longos dos cães devem ser feitas para melhor entender as forças e os movimentos que o esqueleto apendicular deve resistir. Este tipo de estudo pode permitir aos cirurgiões substanciais avanços no restabelecimento de fraturas e aumentar o seu entendimento do remodelamento ósseo e da ocorrência de fratura com relação ao exercício e o trauma (MARKEL, 1994).

Diversas são as variáveis que irão proporcionar ou não o sucesso de um implante ósseo. Entre elas estão a capacidade osteoindutora e osteocondutora, o grau de antigenicidade e a contaminação do material implantado. Entretanto WEIGEL (1993) cita que um fator imprescindível para uma boa implantação é a rigidez na fixação entre leito doador e leito receptor, fato impossível quando realizado com ossos de baixa resistência mecânica.

WEIGEL (1993) comentou que a liofilização exerce efeito deletério significativo sobre a resistência óssea no que diz respeito à torção e ao encurvamento, sendo indicado apenas para enxertos trabeculares, coticotrabeculares ou ainda corticais de pequenas dimensões.

Recorrer a banco de ossos tem sido cada vez mais necessário nos últimos anos em virtude do aumento do número de cirurgias como: tumores ósseos, artrodeses de coluna, revisões de artroplastia total de quadril e traumatismos com perda óssea. Tem-se tentado criar alternativas de enxerto ósseo, como o uso de osso liofilizado, tanto bovino quanto humano. Os processos de liofilização e o tempo de reidratação do osso antes de sua utilização transoperatória têm sido implicados na alteração das propriedades biomecânicas do osso. Desse modo, MACEDO et al. (1999) realizaram um trabalho que comparou a resistência à compressão *in vitro* do osso bovino congelado e do osso bovino liofilizado reidratado. Utilizaram-se cilindros de 10 x 8mm provenientes de côndilos femorais bovinos, que foram testados em uma máquina de compressão automatizada. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados e também não houve diferença de resistência entre ossos hidratados e não hidratados.

A análise da resistência de ossos conservados para a utilização futura em implante é de extrema importância, já que esse material deve proporcionar adequado suporte estrutural. COSTA (1996) citou que os ossos conservados em glicerina tornam-se mais frágeis e quebradiços, porém a diminuição da resistência é um problema encontrado em todos os métodos de conservação. DEL CARLO et al. (1999) relataram que os ossos conservados por meio da glicerina e autoclavados sofreram decréscimo da resistência devido à desidratação e desnaturação protéica, respectivamente.

MARX et al. (1998) comentaram que na implantologia oral apresenta-se como condição fundamental a necessidade de uma quantidade suficiente de osso saudável no local receptor, tanto em altura quanto em largura. A partir dos avanços tecnológicos ocorridos no diagnóstico por imagem, principalmente com a introdução da tomografia computadorizada (TC), tem sido alcançada uma avaliação mais precisa e segura da quantidade, da qualidade e da densidade óssea presentes para a reabilitação dentofacial com implantes dentários. A capacidade tridimensional da TC permite também avaliar os resultados de cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar, identificando inclusive a invaginação dos tecidos moles nos locais de enxerto e diagnosticando doenças sinusais (GARG, 1999).

BALL et al. (2004) citaram que implantes osteocondrais utilizados em humanos geralmente são coletados e mantidos em solução de Ringer lactato em temperatura de 4°C durante um período de dois a cinco dias. Em uma análise biomecânica, foi verificado que se estes implantes tiverem um prazo de armazenamento estendido por duas semanas suas propriedades estruturais serão mantidas, não havendo efeito deletério na resistência do material biológico.

LI et al. (2004) utilizaram aloimplantes ósseos congelados nas faces laterais dos fêmures de 50 coelhos da raça Nova Zelândia. Estes animais foram avaliados durante duas, quatro, oito, 16 e 24 semanas após o ato cirúrgico e verificou-se que até a 16ª semana a resistência óssea havia declinado a um nível de 38% de seu estado original. A partir deste período o osso transplantado progressivamente readquiria sua resistência a medida que o leito doador ia sendo substituído pelo receptor.

Um estudo composto por dez cadáveres suínos foi realizado por KOH et al. (2004), visando avaliar o comportamento biomecânico de implantes osteocondrais colocados em membros pélvicos e submetidos a sete diferentes métodos de fixação. Foi utilizada uma prensa calibrada para gerar 80 N de carga e como resultado final foi possível verificar que, quanto maior o grau de incongruência que se apresentar na articulação, maior serão as forças vetoriais que irão comprometer a futura deambulação.

MELLO & GOMIDE (2005) realizaram um estudo que investigou os efeitos do flúor suplementar sobre as características dos ossos de ratas ovariectomizadas utilizadas como modelo de osteoporose experimental, por meio da correlação entre os parâmetros biomecânicos e as propriedades físicas e químicas desses ossos. No início do experimento, 78 ratas *Wistar*, com quatro meses de idade, foram divididas em oito grupos: grupo basal, que gerou os parâmetros iniciais do experimento; grupo I, formado por ratas não ovariectomizadas; e os grupos II a VII, constituídos por ratas ovariectomizadas submetidas a dosagens de fluoreto de sódio (NaF) de 0, 20, 40, 60, 80 e 100mg/L em solução, respectivamente, durante dois meses. Os resultados demonstraram que a ovariectomia promoveu osteopenia, observada pelos parâmetros morfométricos, físicos e químicos, provocando menor resistência biomecânica dos fêmures submetidos ao ensaio de flexão. Os ossos das ratas que ingeriram 40mg de flúor demonstraram melhores características físicas, bioquímicas e biomecânicas do que os das ratas submetidas a ooforectomia sem tratamento e os das não submetidas a ooforectomia. Desse modo, foi concluído que, além de promover uma proteção contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos causada pela castração, o flúor melhorou a qualidade óssea, demonstrada pelos resultados biomecânicos aumentados em relação ao grupo não ovariectomizado.

NAM et al. (2004) realizaram um experimento com 17 coelhos em que foram utilizados enxertos osteocondrais na articulação do joelho. O objetivo foi avaliar, através de impactação, o grau de resistência destes materiais cirurgicamente colocados em duas etapas (seis ou 12 semanas). Foi verificado que a resistência das articulações coletadas após eutanásia, em 12 semanas, era maior do que aquelas coletadas em seis semanas, demonstrando que houve perda de propriedades estruturais do osso e cartilagem implantados em um período breve, porém com o passar do tempo novamente houve acréscimo de resistência. Os autores concluíram que este procedimento é apto para ser utilizado na prática cirúrgica.

CUNHA (1998) estudou as propriedades biomecânicas do tecido ósseo cortico-esponjoso metafisário do dorso do radio-distal, comparando-as com as do tecido ósseo córtico-esponjoso da crista ilíaca e da superfície volar do escafóide. As amostras foram testadas por compressão axial, até a falência. Após análise das resistências máximas da elasticidade e das deformações, foi observada uma diferença significativamente menor entre os enxertos do dorso do radio-distal e da crista ilíaca, quando comparados a superfície volar do escafóide quanto à resistência máxima limite de elasticidade.

Os implantes, utilizados atualmente em ortopedia e ortodontia, apresentam inúmeros inconvenientes, dentre os quais se destaca a rejeição biológica que provoca a redução do desempenho biomecânico na região de tratamento. Uma alternativa para este problema seria a utilização de um material para estes implantes que atue como elemento estrutural durante o período de cura e que seja posteriormente absorvido pelo organismo, evitando assim a necessidade de sua remoção. BENTO (2003) realizou um estudo onde foi investigado o comportamento biomecânico de parafusos de osso cortical bovino liofilizado, implantados na diáfise femoral de coelhos, através de análise experimental e numérica em três grupos de fêmures: com implante de osso, com implante de titânio e sem implante. Na análise experimental, os fêmures foram submetidos ao ensaio mecânico destrutivo de flexão por quatro pontos. A simulação computacional dos ensaios foi realizada através de modelos de elementos finitos de modo tridimensional para cada grupo, para a verificação das tensões e deformações induzidas nos implantes e região próxima a este, em função da condição de osteointegração. Os resultados obtidos demonstram que os implantes de osso cortical bovino liofilizado apresentam requisitos biomecânicos satisfatórios.

URBAN et al. (2004) realizaram testes mecânicos compressivos em um novo tipo de material utilizado em ortopedia, que se chama sulfato de cálcio modificado. O material foi implantado em fêmures caninos e posteriormente coletados. Os resultados encontrados demonstraram que este material é três vezes mais resistente do que o sulfato de cálcio comum, além de apresentar ótimas características de biocompatibilidade.

FRANÇA (2002), através de testes compressivos, analisou a segurança e a resistência mecânica de 30 corpos vertebrais, de cadáveres humanos, submetidos à vertebroplastia. O autor injetou cimento acrílico no corpo vertebral por via transpedicular, observando seu extravasamento e a temperatura do corpo vertebral. Testou a resistência e comparou com a da própria vértebra quando íntegra. Esta técnica traz riscos às estruturas próximas, devido ao extravasamento do cimento. Quanto à temperatura, ela é segura desde que não ocorra o extravasamento. A resistência da vértebra, após o procedimento, depende do grau do achatamento inicial. Aquelas que tiveram achatamento menor apresentaram resistência maior.

CURCELLI (1999) realizou um estudo experimental, em ratos, para avaliar o efeito de anticoagulantes na consolidação óssea, conforme critérios clínicos, anatomopatológicos e biomecânicos. Manualmente, após perfuração do osso, foi produzida fratura, na diáfise da tíbia direita, mantida sem imobilização, em 72 ratos, divididos em três grupos. Doze horas após a fratura, foi iniciado tratamento com anticoagulante ou água destilada. Um grupo recebeu heparina sódica, outro, enoxaparina. O grupo controle recebeu água destilada.

Durante o experimento, os animais foram avaliados clinicamente e, após 28 dias, mortos para análise anatomopatológica e biomecânica. O estudo biomecânico, realizado por meio de ensaio de flexão, demonstrou coeficiente de rigidez e carga máxima semelhantes nos três grupos. Nenhuma diferença clínica, anatomopatológica ou biomecânica foi encontrada, resultando na consolidação de todas as fraturas de acordo com os critérios adotados, concluindo-se, portanto, que a heparina sódica e a enoxaparina, nas doses, via e tempo de administração utilizados, não interferiam na resistência da consolidação das fraturas de tíbia de ratos.

VASTEL et al. (2004) avaliaram o efeito de três tipos de métodos de esterilização, no quesito resistência, em ossos esponjosos provenientes de banco de ossos de doadores humanos. Através de um aparelho que emitia ondas de ultra-som foi verificado que ossos tratados com óxido de etileno ou extração lipídica apresentavam um decréscimo de resistência estrutural de 2,4 a 2,5% em períodos curtos ou médios de armazenamento. Entretanto, o produto chamado uréia 6M fez com que os ossos conservados tivessem um decréscimo de 30% em suas propriedades biomecânicas.

PENHA (2004) comentou que estudos *in vitro* demonstraram que a melatonina é capaz de acelerar a diferenciação de osteoblastos, aumentando a síntese de colágeno e conseqüentemente a resistência óssea. Considerando que a atividade de osteoblastos é importante para a estrutura óssea e suas propriedades mecânicas, e que a melatonina tem efeito estimulador sobre estas células, o autor realizou um estudo com objetivo de verificar a influência da redução da produção de melatonina sobre características mecânicas dos ossos em crescimento, analisada através de ensaios biomecânicos em flexão de três pontos. Foram utilizados 32 ratos *Wistar* distribuídos em dois grupos experimentais: *sham* (cirurgia fictícia) e pinealectomizados. Os animais pinealectomizados apresentaram ossos menos resistentes e os resultados indicaram influência da ausência da melatonina, causando atraso na formação da matriz do tecido ósseo, modificando alguns aspectos de suas características mecânicas.

MARTINS (2001) realizou um estudo visando avaliar o comportamento mecânico de uma falha de 3,5 mm no rádio de dezenove coelhos em que comparou a utilização dos biomateriais com o enxerto homólogo. Neste estudo foram utilizados enxerto ósseos orgânico e inorgânicos bovino, *pool* de proteína morfogenética bovina e colágeno bovino, como biomateriais em dez animais. Dois animais foram submetidos a retirada das asas ilíacas para posterior congelamento e implantação em sete animais, como enxerto homólogo. Em seis semanas estes animais foram submetidos a eutanásia e os rádios foram submetidos ao teste de flexão em três pontos, com o uso da carga no sítio da regeneração, sendo avaliados a carga

máxima e o deslocamento gerado pela observação da curva carga-deformação. O grupo controle foi o rádio não operado de todos os animais. Foi possível concluir que embora os enxertos homólogos obtivessem consolidação satisfatória, os biomateriais apresentaram uma variação mecânica intragrupo muito baixa, mostrando-se mais homogêneo.

CORNU et al. (2003) promoveram a impactação de 18 cabeças e colo femorais conservadas congeladas ou apenas refrigeradas. Antes de serem realizados os testes houve um período de reidratação de 30 minutos e então foi concluído que os espécimes conservados sob congelamento eram mais resistentes do que aqueles apenas resfriados.

LENHARO (2003) efetuou um estudo em mandíbula de cães em que foram avaliados implantes osseointegrados submetidos a carga imediata considerando a qualidade óssea formada na interface implante-osso, como também foi medido o grau de contato ósseo da referida interface. Foram utilizados quatro cães que, após as exodontias, receberam três implantes Osseotite 3,75 x 8,5 (Implant Innovations Incorporation) e, após os procedimentos de moldagem e de laboratório para a confecção da prótese em Níquel-Cromo. Após 240 dias, os implantes medial e distal foram contra-torqueados medindo-se a resistência do tecido ósseo neoformado. A média de contato ósseo foi de 77,5% e o teste de contratorque aplicado nos implantes apresentou média de 76,13 N/cm. Considerando as limitações deste trabalho, foi possível concluir que a carga imediata em segmentos parcialmente desdentados é uma técnica viável para reabilitação bucal.

HOFMANN et al. (2003) realizaram um estudo biomecânico em pinos confeccionados a partir de osso cortical proveniente de tíbias bovinas. Foram utilizados 40 pinos que possuíam 3mm de diâmetro e 60mm de comprimento e conservados por diferentes formas. Aplicando um esforço de arqueamento em três pontos dos pinos, os melhores resultados, no que diz respeito a resistência, foram obtidos com o tratamento utilizando-se acetona, enquanto os ossos tratados com óxido de etileno ou autoclavagem não mantiveram o mesmo grau de rigidez.

VAN BOERUM et al. (2003) promoveram testes de resistência rotacional em 14 fêmures humanos visando analisar duas formas de fixação de aloimplantes sustentados por pinos intramedulares. No primeiro grupo foi confeccionado um entalhe de 1 cm, permitindo acoplamento entre as interfaces proximal e distal dos leitos doador e receptor. O segundo grupo recebeu o mesmo tratamento, porém o tamanho do encaixe foi de 1,2cm. Houve diferença significativa no grau de rigidez a favor da segunda metodologia, pois enquanto o primeiro grupo apresentou um desvio angular de 23,3°, o segundo grupo rotou apenas 3°.

CASCIO et al. (2003) avaliaram de forma *ex vivo* em humanos o grau de resistência de três tipos de encaixe de aloenxertos fixados por placas (transverso, com degrau ou sigmóide). O escopo desse estudo foi avaliar qual método apresentava maior rigidez torsional e foi verificado que a fixação de forma sigmóide apresentou os resultados mais consistentes.

YAMAMOTO et al. (2003) compararam o grau de resistência compressiva entre ossos conservados sob congelamento ou autoclavagem, provenientes de um banco de aloenxertos visando substituir falhas ósseas em pacientes humanos que apresentavam osteossarcoma. Foi verificado que ambos proporcionaram bons resultados clínicos, porém as propriedades biomecânicas do osso autoclavado eram bem menores.

DUNLOP et al. (2003) realizaram esforços compressivos em cabeças femorais provenientes de cadáveres humanos. O objetivo deste estudo foi verificar o grau de influência dos restos de tecido adiposo e medula óssea entre os leitos receptor e doador. No primeiro grupo as cabeças femorais foram mantidas com os tecidos anteriormente citados, enquanto que no segundo grupo houve a remoção total dos mesmos. O resultado foi favorável significativamente para a segunda metodologia.

Em certas situações a perda de segmento ósseo fibular distal em humanos promove instabilidade da articulação do tornozelo. PACELLI et al. (2003) avaliaram biomecanicamente em 11 cadáveres qual a porcentagem do comprimento fibular que pode ser removido sem promover alterações angulares nesta articulação. A conclusão que os autores chegaram foi de que é necessário permanecer distalmente somente 10% do comprimento total da fíbula, o que significa em média seis centímetros ou menos.

BLOM et al. (2002) citaram que uma substância chamada hidroxiapatita tricálcica fosfatada é utilizada conjuntamente com aloenxertos ósseos visando incrementar as propriedades mecânicas em artroplastias coxofemorais em humanos. Para confirmar tal afirmação foram procedidos ensaios compressivos entre um primeiro grupo que continha apenas o aloenxerto e outros dois grupos com proporções variadas do material supracitado associado ao implante ósseo. O resultado obtido foi de que a resistência óssea era menor no primeiro grupo e maior nos dois seguintes.

HU et al. (2002) promoveram testes compressivos e de arqueamento em um composto formado por matriz óssea desmineralizada associada ao cimento ósseo. Estes materiais são utilizados como implantes para reparar perdas ósseas e o resultado dos testes comprovou que a sua resistência é suficiente para serem utilizados em humanos.

RANDAL et al. (2002) estudaram o efeito de dois métodos de conservação de ossos de ratos no que diz respeito aos efeitos causados sobre a sua resistência. Mediante um esforço

torsional foi verificado que os ossos que foram esterilizados por radiação eram significativamente menos rígidos do que os que sofreram congelamento.

TANG et al. (1998) utilizaram aloenxertos nas faces laterais das duas ulnas de 40 coelhos, sendo que nos membros direitos havia uma carga aquém da fisiológica e nos membros esquerdos havia suporte total. Ao final do período do experimento foram realizados testes biomecânicos destrutivos em três pontos do osso, sob forma de arqueamento. Foi possível concluir que em uma primeira fase a interface entre leito receptor e doador perde resistência, porém posteriormente ela é recuperada. Foi verificado também que os ossos obtidos dos membros onde a carga funcional foi fisiológica eram mais resistentes.

ORR et al. (2001) estudaram em coelhos, mediante esforço compressivo, as propriedades biomecânicas entre xenoenxerto bovino trabecular e o uso de hidroxiapatita sintética. Eles verificaram que, de forma *ex vivo*, o implante bovino apresentava características estruturais superiores, enquanto que, após 26 semanas de implantação do material, haviam melhores resultados nos ossos combinados com hidroxiapatita.

Aloimplantes ósseos são as principais fontes para a substituição de grandes falhas ósseas (WHEELER et al., 2001). Os autores coletaram sítios de implantação de uma tíbia, dois fêmures e dois úmeros de indivíduos variando entre dois a 13 anos. Foram realizados ensaios biomecânicos de arqueamento em quatro pontos dos referidos ossos e foi verificado que quando maior fosse a idade, menor seria a resistência óssea.

KARACHALIOS et al. (2000) avaliaram biomecanicamente a implantação de autoenxertos de 5mm nas ulnas direitas de 40 coelhos da raça Nova Zelândia. Os grupos tiveram os enxertos fixados por fios de Kirschner em posição fisiológica ou rotados em um ângulo de 180°. Após dois meses foi verificado que na primeira metodologia o grau de resistência óssea demonstrou ser mais eficiente.

HALASZ & KOVACZ (2000) analisaram as propriedades estruturais de diferentes ossos coletados de 18 cadáveres humanos. Estes ossos foram a crista ilíaca, o rádio, a face lateral e a espinha da escápula, a fíbula e seis diferentes partes da mandíbula. Foi verificado que a resistência da mandíbula e da fíbula eram aproximadas, enquanto todos os outros ossos apresentavam características estruturais inferiores.

BENEVENIA et al. (2000) avaliaram o efeito estrutural de dois métodos de fixação de aloenxertos ósseos em tíbias de cães (placas ou pinos intramedulares). Ambos os sistemas foram satisfatórios na formação de calo ósseo. Nos testes de arqueamento e torção os ossos que foram submetidos a fixação por placas demonstraram ser sustentados por um método mais eficiente, porém a significância estatística entre os dois grupos foi irrelevante.

SICA (1998) avaliou três métodos de fixação de fraturas em ossos zigomáticos de caninos, aplicando forças de flexão e tensão de cisalhamento. Foram utilizados 36 cães divididos em três grupos (fixação por fio de aço inoxidável, adesivo cirúrgico ósseo e grupo controle com ossos intactos). O resultado foi que nos ensaios de cisalhamento não houve diferença entre os grupos, enquanto que nos testes de flexão o grupo que apresentou união por adesivo foi o mais frágil, sendo o grupo controle o mais resistente.

SILVA & VOLPON (2004) pesquisaram os efeitos da falta de uso dos membros sobre o grau de resistência óssea em tíbias de ratos. Foram utilizados 53 animais que permaneceram durante 21 dias suspensos pelas caudas sem que os membros dos mesmos tocassem qualquer superfície. Após este período foi verificado biomecanicamente que os ratos apresentavam significativa perda da resistência óssea, comprovado por testes de flexão em três pontos.

WIDJAJA & HARTUNG (2001) verificaram que o uso de pinos intramedulares associados à parafusos eram superiores para o tratamento de fraturas de fêmures se comparados somente aos parafusos. Essa conclusão tem maior confirmação quando a fratura em questão for proveniente de um paciente osteoporótico. Em testes aplicando um esforço compressivo e destrutivo do osso e implantes metálicos, os autores verificaram que a associação das duas metodologias demonstrou maior resistência e também observaram que o ponto crítico da coesão estrutural dos ossos são os orifícios confeccionados para a introdução dos parafusos. Como resultado final recomendaram o uso desse método na rotina cirúrgica.

KADOYA et al. (2001) desenvolveram um novo tipo de disco intervertebral artificial para ser utilizado experimentalmente na coluna lombar de ovinos. Foram avaliadas as propriedades estáticas, viscoelásticas e de fadiga desses discos novos e também de discos submetidos à seis meses de uso nas vértebras dos ovinos. Foi possível verificar que o disco intervertebral artificial se mostrou semelhante ao esforço compressivo se comparado àqueles encontrados *in vivo* dos ovinos. Quando a análise foi em relação ao esforço torsional, os discos naturais demonstraram serem mais rígidos do que os artificiais. Os seis meses de uso pós-cirúrgico dos discos artificiais demonstraram que não houve nenhum tipo de deterioração e nem perda dos parâmetros biomecânicos. A conclusão final foi que o disco intervertebral protético apresentou potencial para ser aplicado na substituição de discos intervertebrais em humanos.

SCHENA et al. (1984) realizaram um estudo radiográfico e histológico comparando enxerto a fresco e implante ósseo liofilizado mantido a 70°C na reconstrução de falha segmentar diafisária em caninos. Os melhores resultados no quesito resistência foram obtidos

com o enxerto recentemente coletado, enquanto que com o implante houve retardo na consolidação e diminuição da resistência do material à compressão.

ZAHNG et al. (2005) realizaram um estudo em que compararam a compressão axial sobre a cabeça do fêmur de ratos com um modelo que simulava a condição de queda lateral, sendo que o tipo de fratura encontrada comumente em pacientes osteoporóticos é da segunda categoria. Para induzir a condição de osteoporose as ratas foram castradas em um grupo enquanto o outro grupo foi o controle. Após três meses os animais foram submetidos a eutanásia e seus fêmures foram coletados. Verificou-se que os fêmures dos animais do grupo controle foram mais resistentes e também foi possível concluir que o modelo de queda natural necessitou menor carga para que ocorresse a fratura.

DATTA et al. (2006) estudaram as propriedades viscoelásticas de enxertos ósseos mediante esforço compressivo. Foram utilizados ossos provenientes de seres humanos, suínos e ovinos, sendo que foram comparados ossos com e sem cartilagem articular. Concluiu-se que não houve diferença significativa entre os ossos com e sem cartilagem e também os autores aconselharam utilizar ossos ovinos quando forem realizar estudos *ex vivo*, visto que os resultados foram bastante semelhantes aos dos ossos humanos.

CRIPTON et al. (2001) utilizaram um método minimamente invasivo para estudar a pressão no interior de discos intervertebrais cervicais de humanos. O presente trabalho foi realizado de forma *ex vivo* e os discos foram submetidos a carga compressiva axial máxima de 800 N. Foi verificado que a pressão no interior dos discos aumenta linearmente a medida que a compressão também cresce e que as pressões máximas encontradas no interior dos discos estudados variaram de 2,4 a 3,5 Mpa.

LERNER et al. (1998) avaliaram se alterações morfológicas das placas de crescimento de fêmures de coelhos têm relação com a resistência a fratura das mesmas. Foram utilizados cinco grupos de coelhos com um, sete, 14, 21 e 42 dias e cada grupo era composto por seis animais. No dia anterior à eutanásia os animais receberam calcêina por via intravenosa. Foram realizadas micro-tomografias computadorizadas de diferentes partes das cartilagens de crescimento para analisar suas diferenças e chegou-se a conclusão que ossos que crescem mais lentamente são menos resistentes ao esforço compressivo. Contudo, os autores relataram que não conseguiram descobrir na totalidade por que os ossos crescem de forma diferente e que as maiores disparidades de resultado aconteceram no grupo de 42 dias quando submetidos a esforço compressivo no sentido antero-posterior, em que houve uma maior correlação entre a taxa de crescimento ósseo e o grau de resistência dos fêmures.

GOH et al. (1995) avaliaram o grau de resistência óssea de cabeças e colos femorais provenientes de seres humanos. Foram utilizados 40 pares de fêmures divididos em três grupos. O primeiro grupo foi de controle, o segundo (grupo fraturado) foi considerado o grupo onde houve osteotomia e posterior fixação por parafusos e placas compressivas e o terceiro (grupo consolidado) apresentou o mesmo tipo de fixação, porém sem a osteotomia, visando simular a condição de uma fratura consolidada mas ainda com os implantes metálicos presentes. Como conclusão observou-se que os ossos do segundo grupo apresentaram resistência 43,5% inferior ao grupo controle e o terceiro grupo apresentou resistência 15,2% inferior ao primeiro grupo.

OUYANG et al. (1997), visando compreender como a densidade de osso trabecular em vértebras humanas pode ser correlacionada com fraturas, avaliaram segmentos vertebrais (T<sub>12</sub>-L<sub>4</sub>) de três indivíduos orientais masculinos. Os valores de densidade óssea oscilaram entre 0,46 a 0,71 g/cm<sup>3</sup>. Os autores puderam concluir que a densidade de osso esponjoso apresenta correlação linear com a resistência óssea quando for estudada uma forma cilíndrica tal como um corpo vertebral, porém alertaram que o número de amostras foi pequeno para que se chegasse a conclusões mais confiáveis.

BANSE et al. (1996) comentaram que os resultados de testes de resistência óssea podem variar entre ossos contralaterais de um mesmo doador, mesmo que não haja nenhum processo de conservação nesse processo. Para tanto avaliaram a simetria mecânica de dez pares de cabeças femorais obtidas a partir de seres humanos que não apresentavam nenhuma enfermidade óssea. As cabeças femorais foram submetidas a um posicionamento exatamente simétrico e secções das mesmas foram realizadas visando estudar as propriedades mecânicas da porção óssea trabecular através de teste de resistência compressiva. Como resultado foi verificado que, apesar de haver diferenças entre ossos do mesmo doador, nenhuma delas demonstrou ser de grau significativo e que quando um modelo de teste de resistência for de comprovada confiança, ossos contralaterais de um mesmo doador podem ser utilizados de forma a proporcionar resultados precisos.

BAYRAKTAR et al. (2004) realizaram um estudo visando comparar a propriedades biomecânicas das porções trabecular e cortical de cabeças femorais provenientes de 11 doadores humanos. Os autores comentaram que a razão para que este estudo fosse realizado é que existem dados que sugerem que as propriedades elásticas e compressivas são bastante similares entre as duas partes desse osso. Foi possível concluir que a porção de osso esponjoso da cabeça do fêmur apresenta resistência 25% inferior ao osso cortical.

RAPILLARD et al. (2006) comentaram que existe uma grande correlação entre a idade de seres humanos e a incidência de fraturas compressivas não traumáticas em corpos vertebrais. Neste estudo os autores avaliaram o grau de resistência da porção óssea trabecular de vértebras torácicas e lombares provenientes de quatro doadores, variando entre 29 e 86 anos. Os autores concluíram que quanto maior for a idade menor será a resistência óssea vertebral perante esforço compressivo e que, maior volume de massa óssea trabecular apresentado em indivíduos jovens, contribui para uma maior resistência neste segmento etário.

A dinâmica axial contribui para a formação de calo ósseo e conseqüente consolidação óssea de fraturas. LIU et al. (2005) procuraram avaliar biomecanicamente a eficácia de dois sistemas de fixação externa de fraturas (Dynafix e Orthofix). A avaliação foi feita de forma computadorizada visando pesquisar os efeitos axiais. Os autores concluíram que significantes movimentos não axiais ocorreram durante as avaliações, porém mediante regulagens periódicas estes movimentos podem ser minimizados. Também ficou evidenciado que o sistema Dynafix demonstrou ser mais eficiente na capacidade de reduzir movimentos não axiais não desejáveis.

MÜLLER et al. (2004) comentaram que alguns trabalhos experimentais investigaram a ação dos AINH (antiinflamatórios não hormonais) no processo de consolidação de fraturas, por meio de estudos clínicos e histológicos, porém são escassas as análises biomecânicas. Para tanto, foram avaliados 20 ratos da linhagem *Wistar*, divididos aleatoriamente em dois grupos iguais: grupo A (controle) e grupo B (tratado com diclofenaco sódico). Em ambos os grupos foram realizadas fraturas abertas, após perfuração, na tíbia direita. A administração da droga foi por via intramuscular, dose única diária, por 28 dias. Os animais foram pesados semanalmente. Após a eutanásia as tíbias foram dissecadas, pesadas e submetidas a ensaio biomecânico de flexão analisando-se carga máxima, deformação e coeficiente de rigidez. Observou-se que no grupo tratado com AINH não houve aumento do peso corpóreo a partir da segunda semana e as tíbias fraturadas foram mais pesadas. Neste grupo o calo ósseo suportou menor carga máxima, apresentando maior deformação e menor coeficiente de rigidez. Nos animais tratados, o osso não fraturado também se mostrou menos rígido. Concluiu-se, nas condições estudadas, que o diclofenaco sódico alterou o processo de consolidação e o metabolismo ósseo, levando a retardo na maturação do calo e menor rigidez do osso intacto, respectivamente.

CAMARGO et al. (2002) objetivaram avaliar o enfraquecimento causado pela confecção de janela óssea cortical. Os autores confeccionaram uma janela circular no osso

cortical da diáfise de oito fêmures caninos e uma janela quadrada nos oito pares dos fêmures contralaterais, com diagonal semelhante ao diâmetro da janela circular primariamente confeccionada. As peças anatômicas foram submetidas a teste de tensão torsional em uma máquina de ensaios mecânicos, obtendo-se o torque máximo e a rigidez à torção. Os resultados mostraram que, para o fêmur com janela circular, o torque máximo médio foi de  $13,65 \pm 5,12$  Nm, e a rigidez média foi de  $1,18 \pm 0,45$  Nm/grau, enquanto que para a janela quadrada o torque máximo médio foi de  $13,39 \pm 5,23$  Nm, e a rigidez média foi de  $1,05 \pm 0,41$  Nm/grau. A resistência nos ossos com janela circular e quadrada submetidos à tensão torsional foi praticamente igual, fato este corroborado pela análise estatística que não revelou diferença significativa.

As propriedades bifásicas biomecânicas compressivas que atuam sobre discos intervertebrais de bovinos ainda não foram descritas, sendo de grande importância para o entendimento do funcionamento dessas estruturas. PÉRIÉ et al. (2005), mediante um método de compressão confinada e um módulo linear e outro não linear bifásico avaliaram o grau de permeabilidade hidráulica e módulo compressivo. Ficou concluído que uma resistência compressiva menor e uma maior permeabilidade hidráulica foram encontradas no núcleo pulposo em relação ao anel fibroso e também que os esforços impostos a essas estruturas simulam danos irreparáveis em uma simulação que mimetizou condições de indivíduos *in vivo*.

MORGAN & KEAVENY (2001) procuraram comparar a resistência de ossos esponjosos de diferentes partes de humanos. Os testes realizados foram de resistência compressiva e força tênsil. Para tanto foram coletados corpos vertebrais, tíbias proximais, trocanteres maiores e colos femorais provenientes de 61 indivíduos com idade média de 67 anos. Como resultado observou-se que o osso trabecular do trocanter maior é menos resistente do que o colo femoral no que diz respeito ao quesito compressão. Comparando o trocanter com corpo vertebral o resultado foi que o último foi mais resistente a tensão, enquanto que o primeiro suportou maior carga compressiva. O colo femoral demonstrou ser o mais resistente de todos em relação a compressão enquanto que a vértebra foi o mesmo para a tensão. Como conclusão foi inferido que a resistência varia entre sítios ósseos mas não entre mesmos sítios.

KRISCHAK et al. (2003) avaliaram a resistência de cabeças de fêmures e a densidade mineral óssea das mesmas antes de serem substituídas por próteses de titânio. Após um período de sete anos os autores compararam como se encontrava a osteointegração com o implante. As cabeças femorais foram submetidas a esforço compressivo destrutivo. Foi possível concluir que a resistência é um importante fator para prever se haverá afrouxamento

do implante enquanto que a densidade mineral não demonstrou ser um parâmetro de grau confiável.

As fraturas ósseas são muito sensíveis aos diferentes movimentos as quais são submetidas durante as primeiras fases de consolidação, no que diz respeito ao tipo de diferenciação tecidual. A compressão axial é considerada um importante adjuvante para a união dos segmentos ósseos e EPARI et al. (2006) compararam este efeito com os vetores torsionais que agem sobre fraturas. Foram avaliadas as pressões que existem entre as interfaces ósseas e também o fluxo de fluídos na fase inicial de formação de calo ósseo, além da categoria de formação tecidual. Como resultado o movimento torsional apresentou um ambiente de fratura interfragmentar com menor fluxo de líquidos e menor resistência, enquanto que moderada compressão axial obteve melhores resultados. A somatória dos dois efeitos não apresentou nenhuma potencialização de efeitos.

Metástases ósseas apresentam um grau significativo de relação com fraturas patológicas da articulação coxo-femural em seres humanos. KANEKO et al. (2004) visaram avaliar o comportamento de ossos trabeculares afetados por metástases mediante tomografia computadorizada. Foram obtidos 16 fêmures provenientes de indivíduos que vieram a óbito devido a neoplasias (câncer de próstata, pulmão e glândula mamária) e quatro em que não ocorreu nenhuma enfermidade cancerosa. Os ossos foram coletados de porções esponjosas dos fêmures e submetidos a esforço compressivo. Como resultado final foi possível verificar que a relação entre os achados em tomografia computadorizada não são compatíveis com os resultados encontrados em testes de resistência. Desse modo, a resistência biomecânica continua sendo um modelo mais fiel a esse tipo de avaliação.

CONNOLLY et al. (1989) relataram que a resistência tênsil é proporcional ao tempo de cura. A possibilidade de precocidade de preenchimento de falha na consolidação possibilita sustentação e estabilização ósseas, favorecendo a reparação e com isso diminuindo o tempo total de restabelecimento do paciente.

BINI et al. (2002) realizaram ensaios visando avaliar a resistência em cabeças femorais provenientes de seres humanos. Os parâmetros utilizados para avaliar o grau de resistência dessas estas estruturas foram os testes envolvendo os esforços compressivos e tênsis porque os mesmos demonstram apresentar maior confiabilidade em relação aos testes de arqueamento. Foi possível concluir que os ossos foram mais resistentes aos esforços tênsis do que aos esforços compressivos.

RAMASAMY & AKKUS (2006) visaram analisar variações de propriedades micromecânicas em diferentes porções femorais de ratos. Os autores inferiram, através de

estudos anteriores, que a porção anterior femoral de ratos seria mais resistente que a posterior no quesito tensão enquanto que a posterior seria mais resistente a compressão. Foi verificado que a deposição de minerais não variou conforme o local de estudo, porém a orientação das fibras colágenas demonstrou apresentar uma configuração mais homogênea na porção anterior em comparação a porção posterior. Dessa forma foi possível concluir que a orientação das fibras presta relevante importância para o mecanismo das fraturas.

Placas de crescimento epifisárias apresentam uma grande variação em sua composição e morfologia. A carga mecânica pode alterar o crescimento de ossos longos conforme agir sobre estas estruturas cartilaginosas. VILLEMURE et al. (2006) avaliaram o efeito da compressão axial sobre o disco de crescimento da tíbia proximal de ratos comparando microscopicamente com os efeitos sobre condrócitos. Foram avaliadas as zonas de condrócitos em repouso, hipertróficos e proliferativos. Como resultado evidenciou-se que, mesmo comparando as três regiões submetidas a mesma carga compressiva, a variação de crescimento ósseo é muito grande.

WACHTER et al. (2001) avaliaram a porosidade e a densidade mineral de ossos corticais através de tomografias computadorizadas visando comparar o grau de resistência dessas estruturas. Foram utilizados segmentos ósseos provenientes de diáfises femorais de 24 pacientes humanos sendo que todos foram submetidos a implantação de prótese da articulação desse osso com o acetábulo. O tamanho da amostra foi padronizado em 4,5mm. Os resultados demonstraram que não existem correlações entre porosidade e elasticidade. Entretanto, ficou evidenciada que as propriedades biomecânicas apresentam estreita relação com a densidade mineral. Este estudo pode ser considerado um eficiente meio de prever a resistência femoral de uma forma não destrutiva, importante para prever qual procedimento ortopédico será mais indicado para o tipo de osso em questão.

MEAKIN et al. (2001) avaliaram biomecanicamente a substituição do núcleo pulposo do disco intervertebral de ovinos por material compatível, porém sintético. A razão para a realização de tal estudo é que, quando o material central discal é removido, o anel fibroso torna-se muito mais sensível a lesões originadas por esforço compressivo devido a precoce degeneração do mesmo. Foram utilizados 33 discos intervertebrais que foram submetidos ao congelamento. Em um grupo o núcleo pulposo foi somente extraído, enquanto que no outro, além de ser submetido a esse procedimento, também recebeu a substituição por material polimérico e os dois foram comprimidos mediante ensaio axial. Ficou demonstrado que a reposição do núcleo pulposo por material sintético previne a degeneração da porção fibrosa dessas estruturas.

O tipo de união vertebral mais realizado em medicina humana é a artrodese dorsolateral dos processos transversos da coluna lombar, devido a presença de abundante suprimento sanguíneo proveniente da musculatura adjacente e a fatores biomecânicos, como a ausência de excessiva carga compressiva sobre o enxerto (MUSCHLER & LANE, 1992; FEIGHAN et al., 1995).

BRIANZA et al. (2006) realizaram um ensaio não destrutivo em porções distais de raios e ulnas caninos visando comparar o grau de resistência proporcional desses ossos em cães de porte pequeno, médio e grande. O objetivo desse estudo foi avaliar porque as lesões nessas porções ósseas ocorrem devido a diferentes causas conforme o porte do animal. Foi verificado que raças de pequeno porte são mais susceptíveis a descontinuidade óssea por apresentarem proporcionalmente um canal medular menor.

HADDOCK et al. (2004) realizaram um estudo visando analisar se a arquitetura e densidade da porção esponjosa de corpos vertebrais em humanos apresentavam influência no percentual de fraturas dos mesmos. Os autores basearam-se em um estudo realizado em porções trabeculares de tíbias provenientes de bovinos. Foram utilizadas 35 vértebras provenientes de nove doadores humanos com uma idade média de 74 anos e submetidas biomecanicamente a esforço compressivo. Como a estrutura e a densidade esponjosa óssea bovina é muito diferente da humana, ficou evidenciado que os mecanismos de fratura dessas estruturas se deve a constituição ultraestrutural dos mesmos.

ROBINSON et al. (2005) avaliaram de forma *ex vivo* a resistência de aloenxertos usados em próteses de quadril. Para tanto foram utilizados ossos sem adição de cimento ósseo e ossos com diferentes proporções de cimento. O estudo constou de 14 ossos e a carga a qual os ossos foram submetidos foi de 750, 1500 e 2250 N. O tipo de ensaio biomecânico realizado foi através de esforço compressivo axial no interior de um tubo de alumínio. Foi possível concluir que a introdução de moderada quantidade de cimento apresenta um comportamento similar ao de uma grande quantidade e que ossos sem este material são pouco resistentes para a utilização *in vivo*.

Microfraturas representam importante fator para a perda de resistência óssea, porém não se sabe qual a relação com o tipo de vetor originário. REILLY & CURREY (2000) procuraram estudar os efeitos de microfraturas sobre a resistência ao impacto em tíbias e úmeros bovinos. Foram utilizados animais com idade oscilando de um a um ano e seis meses e os danos causados puderam ser evidenciados mediante o estudo microscópico, associados à fluoresceína, após os ensaios biomecânicos realizados. Os autores submeteram os ossos a forças de arqueamento de 27%, fazendo assim com que ocorresse os referidos microdanos.

Posteriormente os espécimes foram submetidos a impacto destrutivo. O achado foi de que os ossos submetidos previamente ao esforço de arqueamento apresentaram sua resistência severamente reduzida na superfície onde houve compressão enquanto que onde houve tensão a redução não apresentou grau relevante.

REMIGER et al. (1997) procuraram avaliar a resistência ao esforço rotacional entre tíbias que apresentaram fixação de placas através de parafusos atravessando somente uma cortical óssea com outros que atingiram ambas. Foram utilizados três grupos. No primeiro grupo foram comparados osso íntegro com perfurações unicorticais, no segundo houve o mesmo tipo de comparação mas com orifícios bicorticais e no terceiro foi comparado o grupo unicortical com o bicortical. Os achados revelaram que houve um decréscimo na resistência de respectivamente 21,6, 31,4 e 26,7% em detrimento do segundo elemento de cada grupo. A conclusão foi de que tíbias com orifícios unicorticais são menos resistentes a rotação do que ossos intactos, porém apresentaram uma significante maior resistência do que os que tiveram as duas corticais perfuradas.

COOK et al. (2006) avaliaram de forma não destrutiva a resistência da cabeça de fêmures através de ultra-som periférico e também de módulo de compressão para avaliar as propriedades compressivas e o risco de fratura dessa estrutura. Foram utilizadas amostras provenientes de 20 indivíduos que apresentaram fratura nesta região. O resultado demonstrou que existe uma grande correlação entre o ensaio compressivo e o ultra-som para a análise da integridade das cabeças femorais, porém o mesmo não acontece com outros ossos tais como rádio, tíbia, falanges e calcâneo. Também foi concluído que o estudo foi importante não somente à análise da densidade óssea mas também evidenciou os mecanismos de fratura.

Microfissuras produzem importante efeito deletério sobre a qualidade óssea e aumentam de forma significativa o risco de fraturas. MULLER et al. (2006) visaram comparar o uso de ultra-som linear, que é um método não destrutivo, com a compressão mecânica em diáfises femorais humanas afetadas por esse tipo de dano. O estudo avaliou qual o grau de correlação possível entre os dois métodos para que não seja necessária a destruição do osso. Os autores comprovaram estatisticamente que o método ecográfico pode ser utilizado de forma confiável para substituir o teste compressivo.

CLARO NETO (1997) realizou a reconstrução de segmentos diafisários utilizando a poliuretana de mamona associada ao enxerto e comentou que a adição de carbonato de cálcio ao implante aumentou a resistência e a porosidade, favorecendo sua indicação como material de implantação óssea.

NETO et al. (1999) realizaram um estudo utilizando diferentes segmentos de porções de tíbia e fêmures. Um orifício central foi confeccionado em cada porção óssea e então acoplado a um parafuso metálico, que foi inserido nas duas porções corticais. Os espécimes foram submetidos a um teste biomecânico de extração que revelou que a resistência da cavidade proporcionada pela espiral dos parafusos depende significativamente do local em que o mesmo é inserido. Além disso, o osso diafisário é qualitativamente e quantitativamente mais resistente do que o osso metafisário.

RABELO (2003) comentou que várias técnicas cirúrgicas utilizando implantes têm sido empregadas com o intuito de criar alternativas para a reconstituição da parede abdominal ventral em bovinos. O autor avaliou a viabilidade do centro tendíneo difragmático homólogo, conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4% e mantidos por 30 dias, na hernioplastia umbilical de bovinos. Inicialmente, realizou-se testes físicos de tração e alongamento até ruptura, em dez tiras com 5 a 6 mm de largura, do exemplar *in natura* e dos respectivos exemplares conservados em glicerina a 98% e glutaraldeído a 4% para a avaliação da influência de ambos os conservantes sobre o tecido biológico a ser implantado. Os testes físicos realizados mostraram que em sete amostras conservadas em glutaraldeído a 4% suportaram maior força de tensão, quando comparadas com os respectivos exemplares *in natura* e conservados em glicerina a 98%. Duas amostras apresentaram comportamento semelhante quanto ao ponto de rompimento, para ambos os conservantes. Apenas em uma amostra, verificou-se que o material *in natura*, apresentou um ponto de rompimento superior às amostras conservadas.

REYES (1999) objetivou comparar experimentalmente o grau de cicatrização e a resistência à tração axial livre, obtidos no tendão das unidades músculo-tendíneas do extensor ulnar do carpo de cães, submetidos à tenectomia parcial e tenoplastia substitutiva com pericárdio de equino preservado em glicerina 98%, através de análise histológica e testes físicos de resistência à tração. Foram utilizados 42 cães, divididos em oito grupos experimentais e avaliados em diferentes períodos. Aos 168 dias de pós-operatório observou-se completa e adequada reparação cicatricial, com matriz extracelular densamente colagenizada que substituiu totalmente o pericárdio, quando as unidades músculo-tendíneas mostraram, através de análise dos alongamentos (mm) em função das cargas (N) aplicadas no limite de resistência máxima, o seguinte comportamento: necessitaram de carga  $175.70 \pm 47.67$  N e  $174,13 \pm 33.73$  N para produzir alongamentos de  $9.32 \pm 1.96$  mm e  $9.88 \pm 1.98$  mm, respectivamente. As respostas obtidas, tanto quanto a resistência à tração até ruptura nos permitem concluir que o pericárdio serviu de arcabouço para orientação e desenvolvimento de

novo tecido de reparação de tipo modelado semelhante ao tendão submetido à tenectomia parcial.

## **2.3 Glicerina e mel como conservantes**

### **2.3.1 Glicerina**

A glicerina faz parte dos lipídios, compostos de origem biológica que se dissolvem em solventes apolares como o clorofórmio ou o éter dietílico. Somente pequena parcela da fração total de lipídios extraídos por solvente apolar é constituída de ácidos carboxílicos de cadeia longa. A maior parte desses ácidos orgânicos encontra-se na forma de ésteres de glicerol (SOLOMONS, 1996). Segundo FERREIRA (1999), a glicerina, sinônimo glicerol, é uma substância orgânica, triálcool, que se une aos ácidos graxos para formar as gorduras; líquido incolor, higroscópico, espesso e xaroposo; funde a 17°C e entra em ebulição a 290°C. Entre os meios químicos de conservação de tecidos, a glicerina tem oferecido bons resultados conservando a integridade celular mesmo que provocando a desidratação tecidual (OKAMOTO et al., 2000).

A glicerina tem sido utilizada com sucesso na conservação de ossos, tal como realizaram DEL CARLO et al. (1999) e ZILLOTTO et al. (2003) na reconstrução de falhas ósseas em membros de caninos.

Por ser um poderoso anti-séptico, além de atuar como agente fixador e desidratante, a glicerina é indicada para a conservação não somente de ossos, mas também de diferentes materiais biológicos (PINTO JÚNIOR et al., 1996).

PIGOSSI et al. (1971) comentaram que, em alguns casos de cirurgias reconstrutivas, se torna necessária a utilização de enxertos e os materiais devem ser conservados para preservar sua viabilidade para que ocorra a reação biológica desejada de reparação. No referido trabalho foi verificado um efeito positivo da glicerina no efeito de manter o material biológico em condições aptas à substituição tecidual.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de se tornar possível a conservação dos tecidos ósseos por longos períodos de tempo. Dentre estas, a conservação em glicerina tem merecido destaque pois, além de ser um método acessível economicamente, não é necessário empregar a autoclavagem e tampouco o congelamento, técnicas que causam danos ao tecido ósseo, e prejudicam a formação de calo ósseo no pós-cirúrgico; além disso, não foi observada diferença considerável quanto ao crescimento de microorganismos na

glicerina a 98% autoclavada e *in natura*, num período igual ou menor a 24 meses (ROE et al., 1988), tampouco rejeição do organismo ao meio conservante na evolução pós-operatória.

CAVASSANI et al. (2001) avaliaram a função osteoindutora atribuída aos fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%, por 30 dias, à temperatura ambiente. Esses fragmentos foram obtidos de fêmures e tíbias de ratos doadores. O implante desta matriz óssea foi realizado no tecido subcutâneo e intramuscular de ratos receptores. A análise histopatológica foi realizada no 30º, 60º e 90º dia após o implante. Aos 30 dias, notou-se resposta osteogênica positiva, inclusive com mielogênese, que aos 60 e 90 dias foram efetivamente concluídas. Nesses períodos, observou-se a presença de fragmentos de matriz óssea calcificada, sugerindo que fossem tecido ósseo neoformado a partir da atividade osteoblástica observada aos 30 dias. Diante desses resultados, concluiu-se que a glicerina é um bom meio para conservação de fragmentos ósseos para uso em enxertos, uma vez que a função osteoindutora foi preservada.

As intervenções cirúrgicas oncológicas, devido às suas ressecções amplas, freqüentemente tornam necessário o uso de osso para transplantação. O transplante autólogo poderia ser substituído por osso conservado, o que condiciona o cirurgião a previamente armazenar o osso preservado e transplantável, sendo a glicerina pura um bom método de manutenção deste tecido. Porém, não se sabia ainda se era possível manter durante longo período de tempo os ossos conservados na glicerina, e, além disso, não se sabiam quais microorganismos eventualmente poderiam desenvolver-se nas amostras armazenadas por longos períodos de tempo (PINTO JÚNIOR, 1990; 1995). GIOSO et al. (2002) realizaram um estudo onde ossos caninos foram mantidos em glicerina a 98% por um período de até nove anos e não houve crescimento bacteriano significativo.

DEL CARLO et al. (1999), utilizando aloimplantes ósseos, observaram que de seis métodos de conservação estudados a glicerina a 98% em temperatura ambiente e o método de congelamento foram os que proporcionaram melhores resultados em caninos.

ZILIOTTO et al. (2003) utilizaram implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina visando reconstituir membros pélvicos de caninos afetados por osteossarcoma. Foram utilizadas placas compressivas para a osteossíntese e para aumentar a resistência do material implantado foi introduzido no canal medular poliuretano de mamona, pois a glicerina exerce efeito deletério sobre a integridade óssea. Como resultado foi verificado que a glicerina foi eficiente como método de conservação, pois não houve sinais de infecção e nem rejeição, além de haver adequado grau de osteoindução e osteocondução.

CORONADO et al. (2000) testaram a capacidade viricida do óxido de etileno e da glicerina em implantes ósseos alógenos de felinos. O banco era composto por ossos de animais comprovadamente contaminados por retrovírus felino. Foi concluído que houve adequada osteointegração em ambos os grupos, porém a glicerina não foi eficiente no quesito de evitar a infecção, ao contrário do óxido de etileno.

PAULO (1997) realizou um experimento onde foram avaliados os resultados da aplicação da membrana amniótica de eqüinos, conservada em glicerina a 98% e em ácido acético a 0,25% sob congelamento, sobre feridas experimentais produzidas no dorso de cães. Foram provocadas três feridas circulares em cada animal e elas foram observadas durante 20 dias. Nas culturas obtidas antes do processamento das membranas amnióticas houve o crescimento de *Pseudomonas* spp., *Enterobacter agglomerans* e *Streptococcus* spp., o que não foi observado nas amostras coletadas após a conservação. As bactérias mais freqüentemente isoladas das secreções purulentas das feridas foram *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp.. Baseado nos resultados obtidos concluiu-se que a membrana amniótica eqüina, conservada em glicerina a 98% e em ácido acético a 0,25%, não promove a aceleração da cicatrização mas impede a retração das bordas das feridas cutâneas experimentais no cão e não impede o desenvolvimento de microorganismos nestas feridas. Concluiu-se ainda que fatores climáticos provavelmente influam na viabilidade das membranas conservadas.

PIGOSSI et al. (1971) evidenciaram que a glicerina reduz a antigenicidade de membranas biológicas e recomendaram o armazenamento do material por um período não inferior a 30 dias. Também foi verificada a ação bactericida da glicerina sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

KRAUSPENHAR et al. (2002) testaram os efeitos *in vitro* da glicerina sobre tendões inoculados com bactérias gram negativas e gram positivas e verificaram 100% de eficácia, porém são necessários ao menos 30 dias para a completa esterilização. Foi também observado que bactérias gram positivas são mais resistentes à ação do conservante.

PINTO JUNIOR et al. (1996) relataram que em estudo microbiológico de glicerina onde não houve nenhum tipo de processamento ou glicerina autoclavada como meio de conservação não houve crescimento bacteriano e fúngico.

Essa capacidade antimicrobiana se deve ao fato de que a glicerina a 98% é um agente fixador e desidratante de atuação rápida, agindo como um poderoso antisséptico (ALVARENGA, 1992).

FRANCISCO (2001) avaliou aloenxerto de cartilagem auricular de cães, conservado em glicerina a 98%, no reparo de defeito palatino produzido experimentalmente em cães.

Foram empregados 15 cães adultos, sem raça definida, divididos aleatoriamente em cinco grupos de três animais cada, e submetidos a procedimento cirúrgico para criação de defeito no palato secundário e posterior reparo com aloenxerto de cartilagem auricular. As observações clínicas e macroscópicas realizadas durante o período experimental, demonstraram que não houve deiscência de sutura, edema ou necrose de tecidos. A avaliação microbiológica revelou ser negativa para bactérias. Os resultados obtidos permitem concluir que o aloenxerto de cartilagem auricular pode ser utilizado para reparação de defeitos palatinos, pois propicia bom isolamento entre cavidade nasal e oral.

SAMPAIO (2004) utilizou membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina a 98% no recobrimento de úlceras corneanas experimentais. Para o desenvolvimento da metodologia proposta foram utilizados 70 coelhos. A avaliação clínica revelou que a membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, apesar de não apresentar nenhum agente contaminante, estimulou uma resposta inflamatória aguda maior que a membrana aplicada a fresco. O autor concluiu que a epitelização do defeito foi mais rápida nas córneas que receberam o enxerto de membrana a fresco, indicando que o método conservante não foi eficiente para reduzir a antigenicidade.

OLIVEIRA (2002), em um estudo experimental, propôs como alternativa do tratamento cirúrgico de defeitos traqueais em eqüinos, o emprego de pericárdio homólogo preservado em glicerina a 98% mantido à temperatura ambiente. Foram utilizados doze eqüinos adultos, machos e fêmeas e 42 do período pós-operatório. A boa evolução clínica dos animais associada aos achados laboratoriais de que a glicerina agiu como bom descontaminante, permitiu concluir ser a traqueoplastia em eqüinos, utilizando pericárdio homólogo preservado em glicerina a 98%, uma boa alternativa ao tratamento de lesões traqueais, obtendo-se cura por primeira intenção.

RABELO (2003) utilizou centro frênico homólogo, conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4% e mantidos por 30 dias para a correção de hérnias umbilicais em 10 bovinos. Foi avaliada a atividade anti-séptica dos conservantes, por meio de exames microbiológicos de fragmentos colhidos do material *in natura* e dos respectivos exemplares submetidos à conservação. Observou-se crescimento bacteriano apenas em quatro amostras no material *in natura*. Os mesmos exames realizados em amostras conservadas não revelaram nenhum crescimento. Com base nestes resultados, conclui-se que o centro tendíneo diafragmático de bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4% demonstrou ser uma opção eficiente na correção de hérnias umbilicais em bovinos jovens.

LUCCI (1998) comentou que a esclera humana é frequentemente usada em cirurgias oftalmológicas e deve ser preservada em desinfetante que evite sua contaminação e que a descontamine. O objetivo de seu estudo foi determinar a eficácia das substâncias: glicerina, álcool absoluto e cloreto de benzalcônio (1:5000) como desinfetantes da esclera humana. Seis escleras humanas foram trepanadas em 174 discos de esclera de 6 mm de diâmetro. Fragmentos de esclera frescos, provenientes de cada globo ocular, foram submetidos à cultura para determinar a existência de um microrganismo. Os discos de esclera foram divididos em três grupos. Foi estudada a ação dos três meios de desinfecção para descontaminar a esclera humana: glicerina, álcool absoluto e cloreto de benzalcônio. Para controle da viabilidade dos microrganismos, um grupo de discos de esclera contaminados foi imerso em meio de cultura TSB e submetido à cultura nos mesmos intervalos de tempo dos discos de esclera imersos nos meios desinfetantes. Dois discos de esclera foram removidos de cada tubo nos dias um, dois, três, quatro, sete, 10 e 14 deste estudo. Um disco escleral foi macerado com homogenizador de tecidos e semeado em ágar sangue, utilizando-se alça calibrada 0,001 ml, e o outro foi semeado inteiro. As placas de ágar sangue foram incubadas a 37°C e colônias bacterianas foram contadas com 24 e 48 horas. *Staphylococcus aureus* foi recuperado da esclera preservada em glicerina por até quatro dias; *Pseudomonas aeruginosa* foi recuperada até dois dias e *Bacillus cereus* foi recuperado durante os 14 dias deste estudo. Todas as três bactérias foram recuperadas nos dias de esclera que permaneceram imersos no TSB durante todo o estudo. O cloreto de benzalcônio demonstrou ser melhor desinfetante *in vitro* que a glicerina. Entretanto, o autor comentou que estudos *in vivo* são necessários para provar a utilidade do cloreto de benzalcônio como desinfetante de esclera.

FARIA (2003) utilizou membranas biológicas conservadas em glicerina a 98% ou mel envolvendo lesões ósseas femorais. Foram realizados exames bacteriológicos semeados em meio Agar Sangue Ovino 5% e Agar Mac Conkey incubados a 37°C por 48 horas, sendo todos os resultados negativos. Nas amostras onde o meio foi enriquecido com Thioglicolato e BHI (infusão de cérebro e coração) e incubados a 37°C por 48 horas somente o meio glicerina não desenvolveu *Bacillus* spp..

COSTA (1996) realizou um estudo utilizando aloenxerto ósseo cortical conservado em glicerina 98% e fixado com placas e parafusos de aço inoxidável 304 para a reconstrução de falha óssea (quatro centímetros) experimental em cães. As amostras foram coletadas sem preocupação com a contaminação. Foi concluído que os ossos não precisavam ser colhidos sob cuidados assépticos, uma vez que a glicerina apresentou ação bactericida e fungicida.

Além disso, a glicerina mostrou-se eficiente como meio de conservação de ossos à temperatura ambiente, mantendo o material livre de contaminação durante a estocagem.

### 2.3.2 Mel como agente conservante e terapêutico

O mel tem sido utilizado no tratamento de enfermidades em seres vivos há pelo menos 4000 anos, conforme evidências encontradas no Egito (GREENWOOD, 1993). Nessa época já eram conhecidos os benefícios desse substrato no processo de reparação de feridas, promovendo absorção de edema, limpeza de contaminação, promoção do crescimento de tecido de granulação e diminuição de odores desagradáveis (POSTMES et al., 1993).

Nos tempos pré-históricos e primitivos o referido substrato apícola foi utilizado como meio conservante de cadáveres. No antigo Egito e na Grécia o mel foi muito usado em embalsamamento. Quando Alexandre, o Grande, veio à óbito durante sua conquista ao oriente, seu corpo foi conduzido em um caixão dourado imerso em mel até a Macedônia, sua terra natal (IOIRISH, 1981; CRANE, 1983). Herodes I, Rei da Judéia, que executou sua esposa Mariamne, manteve seu corpo preservado em mel por sete anos e, ainda no mundo antigo, trechos da Odisséia comentam que o corpo de Aquiles foi embalsamado em uma profusão de unguentos e mel doce (CRANE, 1983).

O mel tem sido utilizado desde a antiguidade como substância capaz de conservar tecidos. IOIRISH (1981) comentou que tribos indígenas do Ceilão, atual Sri Lanka, após coletarem a carne de animais e a impregnarem com mel, mantinham as mesmas em troncos de árvores à cerca de um metro do solo e o alimento mantinha-se apto ao consumo por um período de até um ano.

Além das propriedades nutricionais, a utilização do mel na medicina popular se deve também às suas propriedades farmacológicas. Dentre estas propriedades, a atividade antimicrobiana tem despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos (EFEM, 1988; ZULMA & LULAT, 1989; MOLAN, 1992; WILLIX et al., 1992; EFEM et al., 1992; EFEM, 1993; KROL, et al., 1993). PEREIRA et al. (1995) comentaram também que o mel possui numerosas propriedades terapêuticas, tais como poder antimicrobiano, antiinflamatório e efeito antipirético.

Propriedades cicatrizante (KUMAR et al., 1993) e antioxidante (OSZMIANSKI & LEE, 1990) estão também relacionadas a este derivado apícola.

GONÇALVES et al. (2005) , comentaram que diversas propriedades medicinais, tais como ação antimicrobiana, antifúngica, cicatrizante e antioxidante são popularmente relatadas

ao mel. Poucos estudos têm sido realizados sobre a atividade antimicrobiana do mel. Para tal estudo foi empregado o método da difusão em ágar, utilizando-se discos de 6 mm de diâmetro em presença de diferentes microorganismos, obtidos todos de focos de infecções clínicas. Os testes indicaram resistência em: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* alfa-hemolítico; e indicaram sensibilidade em: *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus Pyogenes* bem como *Staphylococcus* spp. coagulase. Vinte e três antibióticos comerciais distintos foram também avaliados no presente estudo. Os resultados obtidos revelaram um excelente potencial terapêutico deste produto apícola.

SUBRAHMANYAN (1993) utilizou o mel como conservante de pele para implante em 28 humanos acometidos por queimaduras ou úlceras. Os implantes foram acondicionados em frascos com mel e mantidos à temperatura de 4°C e os resultados obtidos ao final do estudo foram satisfatórios, ainda que três pacientes necessitassem nova intervenção para que houvesse adesão da pele implantada.

Comparando o tratamento através de antibióticos convencionais ou mel em gangrena do tecido escrotal em humanos, EFEM (1993) verificou que o segundo método demonstrou ser bem mais eficaz, pois os pacientes tratados com mel não apresentaram mortalidade, enquanto que os tratados com amoxicilina e metronidazole apresentaram um índice de mortalidade de 15%.

FASIKA et al. (1996) utilizaram enxertos na cavidade oral de humanos contendo gel impregnado com mel e obtiveram bons resultados no que diz respeito à permanência do material implantado ao leito receptor. Salientaram ainda que esse substrato possui as vantagens de ser obtido com facilidade e apresenta custo acessível.

Várias substâncias tais como açúcares, ácidos orgânicos e diversos elementos químicos (WHITE, 1975) foram identificadas no mel. Algumas enzimas secretadas por glândulas do aparelho digestório das abelhas são introduzidas no néctar já a partir de sua coleta, tendo como exemplo a glicose oxidase, que converte a glicose em glicolactona, produzindo também o peróxido de hidrogênio. Este último é considerado por muitos autores como sendo o responsável pela atividade antimicrobiana constatada no mel (MENDES & COELHO, 1983). Também foram encontradas vitaminas e alguns flavonóides com ação antimicrobiana (SABATIER et al., 1992).

A gangrena de Fournier é uma afecção que acomete seres humanos na região perineal, genital ou até mesmo na parede abdominal. THAMAZ et al. (2006), em um estudo com 33 pacientes humanos, compararam o tratamento de tal enfermidade utilizando antibióticos

isoladamente ou antibióticos associados ao mel. Os autores concluíram que a adição de mel ao tratamento desta enfermidade diminuiu de forma significativa os índices de morbidade e mortalidade.

CASTRO (2004) utilizou 30 coelhas da raça Nova Zelândia para comparar o uso tópico do mel, da oxitetraciclina e da hidrocortisona, combinadas e isoladas, na reparação de feridas cutâneas por segunda intenção. Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos. Realizaram-se seis feridas com saca bocado (*Punch*) de 8mm em cada animal, sendo três de cada lado da região dorso caudal ao osso coxal, com espaçamento entre as lesões de quatro centímetros. Os grupos foram constituídos na seguinte ordem: grupo T - grupo controle; grupo C - hidrocortisona; grupo V - vaselina (veículo); grupo M - mel; grupo Tco - Terracortril; grupo Oxi - oxitetraciclina. Os fragmentos de pele contendo as feridas foram colhidos com uma incisão elíptica na seguinte ordem: no segundo, quinto, nono, 15º, 21º e 30º dia pós-cirúrgico. As avaliações, clínicas e histopatológicas revelaram que os animais tratados com o mel apresentaram menor tamanho das feridas. Nos animais tratados com hidrocortisona e Terracortril foi visualizado retardo na cicatrização das feridas.

Baseado no fato de que o mel possui numerosos componentes e propriedades curativas, foram estudadas as suas características antineoplásicas e verificou-se a ação inibitória do crescimento de carcinomas cutâneos em ratos. Isso foi atribuído ao fato de ocorrer diminuição da síntese de DNA, reduzindo assim o crescimento da massa tumoral. (MITAMURA et al., 1996).

GRIBEL & PASHISNKII (1990), estudando as propriedades antitumorais do mel em ratos, verificaram que esse componente apresenta moderada ação antineoplásica e grande atividade antimetastática. Outra contribuição foi a exacerbação do efeito de certas drogas usadas nesse tipo de enfermidade. O 5-fluoruracil e a ciclofosfamida tiveram seus efeitos potencializados quando usados em conjunto com o mel.

Tecidos biológicos têm sido conservados em mel para posterior implantação, tais como vasos sanguíneos (PIPIA, 1968), pele (GUPTA, 1977) e córneas (ABRAMOV & MARKICHEVA, 1983; MOHAN et al., 1996).

ABRAMOV & MARKICHEVA (1983) analisaram os resultados da ceratoplastia lamelar usando córneas conservadas em mel. A intervenção com propósitos curativos foi realizada em 43 humanos acometidos de queimaduras oculares, úlceras corneanas e ceratites. Os resultados obtidos foram satisfatórios, sendo que na maioria dos casos a córnea tornou-se transparente. Os autores recomendaram esse material para o uso em pacientes clínicos.

Diversos autores avaliaram enxertos ósseos e mel, tais como CAHPMAN & VILLAR (1992) e MOLLAN & ALLEN (1996).

POSTMES et al. (1993) comentaram que o mel não pode ser tratado como substância estéril, sendo necessária a análise microbiológica antes de ser utilizado com propósitos medicinais. SUBRAHMANYAM (1993) utilizou mel resfriado a 4°C para o armazenamento de enxertos de pele, porém realizou exames laboratoriais que confirmaram que esse composto se encontrava livre de microorganismos. POSTMES et al. (1993) ainda citaram como alternativa o uso de irradiação para promover a esterilização de mel contaminado.

GREENWOOD (1993) e POSTMES (1993) comentaram que as propriedades antibacterianas do açúcar e do mel são devidas a produção de um grande nível de osmolaridade local, dificultando a proliferação microbiana. Entretanto, no caso do mel, a atividade antimicrobiana pode ser atribuída também a um composto conhecido como peróxido de hidrogênio, produto final de uma reação enzimática entre a glicose oxidase da abelha com a glicose encontrada diluída no mel.

BARIZON et al. (1999) comprovaram o efeito antimicrobiano do mel através de testes utilizando diluição inibitória máxima e comentaram que esse composto possui ação sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Se houver o acréscimo de própolis ao mel obtém-se uma solução que também apresentará atividade sobre fungos na forma de levedura.

MATHEWS & BINNINGTON (2002) descreveram que o mel possui propriedades bactericidas que são atribuídas não somente a sua alta osmolaridade, mas também por possuir peróxido de hidrogênio, ácido fórmico e por sua acidez, além de conter diversas outras substâncias em sua constituição.

VARDI et al. (1998) citaram que o mel é constituído por 40% de glicose, 40% de frutose e 20% de água, com presença de ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, enzimas e apresenta em média um pH de 3,6.

Quando produzido pelas abelhas o mel é líquido, mas a cristalização, ou granulação, é um processo natural, que acaba por acontecer com o decorrer do tempo. A temperatura de armazenamento do mel tem grande influência na velocidade de cristalização, que também está diretamente relacionada à sua composição, ou seja, à relação glicose/água. A cristalização do mel consiste na separação da glicose, menos solúvel que a levulose, e na conseqüente formação de hidratos de glicose, em formas sólidas. Em temperaturas de armazenamento de 10 a 18°C o mel cristaliza-se rapidamente. Em temperaturas superiores a 30°C a solidificação ocorre muito lentamente. A consistência não afeta a composição do mel, entretanto temperaturas superiores a 50°C podem destruir vitaminas e enzimas (ANGERAMI, 1991).

O mel tem demonstrado potente atividade antimicrobiana, efetiva frente a um amplo espectro de bactérias, além de possuir propriedades antifúngicas. A atividade vista em soluções diluídas de mel, claramente indica que a ação antibacteriana não se deve apenas a alta concentração de açúcar contida no mel (MOLAN, 1992).

COOPER et al. (1999) verificaram que a concentração de mel para alcançar a atividade de água necessária para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* é de 22%. Porém, em seu experimento, verificaram que o mel em concentrações variando entre 2 e 4% já era capaz de inibir o crescimento desta bactéria, confirmando assim que o modo de ação do mel não se dá exclusivamente pela sua osmolaridade.

PIGOSSI et al., (1971) comentaram que a glicerina não é capaz de impedir o crescimento bacteriano de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringes*. GREENWOOD (1993) usou com bastante sucesso mel de abelhas em feridas e úlceras baseado no fato de que essa substância possui propriedades inibitórias do crescimento bacteriano. POSTMES et al. (1993) comprovaram, através de exames laboratoriais, semeando em ágar diluído com diferentes concentrações de mel, que esse componente impediu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringes*. Foram utilizados méis oriundos de limeira, árvores frutíferas, acácia e ainda houve um grupo controle onde não havia mel. O mel proveniente de árvores frutíferas demonstrou ser o mais eficiente no quesito antimicrobiano.

Esta atividade antibacteriana adicional é devido à produção de peróxido de hidrogênio pela ação das enzimas do mel, e também pelas substâncias antimicrobianas derivadas das plantas que originaram o mel (MOLAN, 1992).

Abcessos piogênicos e feridas infectadas sendo tratados por aplicação tópica e diária de mel sofrem regressão bastante rápida, através da eliminação de secreções, crescimento de tecido de granulação e também através de uma melhor incorporação de enxertos de pele quando esses forem utilizados, devido ao fato do mel ser capaz de inibir a ação de microorganismos gram-positivos e gram-negativos (FAROUK et al., 1988).

BERGMAN et al., (1983) comentaram que o baixo pH do mel pode inibir o crescimento bacteriano. EFEM et al. (1992) realizaram um estudo *in vitro* em que avaliaram o espectro antibacteriano e antifúngico do mel. Para isso bactérias foram coletadas de abcessos mamários, feridas cirúrgicas infectadas, gangrena e celulite, sendo depois isoladas e incubadas em meios apropriados. Já as amostras de fungos foram obtidas de um laboratório de micologia. As bactérias que foram mais sensíveis ao mel foram *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Outras bactérias como *Enterococcus faecalis*,

*Klebsiela pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus* spp., *Clostridium welchii* e *Clostridium tetani* também foram sensíveis ao mel, porém ele não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium oedematiens*.

SMITH (1998) recomendou que as coletas devem ser realizadas sempre de forma asséptica. AMENDOLA (2001) não coletou ossos de maneira asséptica e ao realizar exames bacteriológicos do mel no qual segmentos ósseos haviam sido preservados, verificou que houve o desenvolvimento de *Bacillus* spp., porém nenhum sinal clínico de infecção foi visto quando o implante foi utilizado. FARIA (2003) utilizou membranas biológicas conservadas em mel envolvendo lesões ósseas femorais. Foram realizados exames bacteriológicos semeados em meio Agar Sangue Ovino 5% e Agar Mac Conkey incubados a 37°C por 48 horas e foi verificado também o crescimento somente de *Bacillus* spp..

TURNBULL & KRAMER (1995) comentaram que *Bacillus* spp. são quase sempre saprófitas e largamente distribuídos na natureza, particularmente no solo de onde são espalhados pela poeira e água, e em materiais de origem animal e vegetal.

Para verificar que a ação antibacteriana do mel não se dá exclusivamente pela propriedade hiperosmótica, EFEM et al. (1992) compararam a inoculação de material infectado com o melado, substância de mesma osmolaridade. O resultado foi de que o melado proporcionou apenas a inibição parcial de *Streptococcus pyogenes*.

POSTMES et al. (1993) comentaram que a adição de 5% de sangue de ovinos pode eliminar a atividade antibacteriana do mel pela ação da enzima catalase. Porém, o que se sabe é que a catalase vai atuar apenas sobre o peróxido de hidrogênio, inativando-o (COOPER et al., 1999).

LEVY JÚNIOR (1997) comparou a atividade antimicrobiana entre méis e própolis obtidos da abelha *apis mellifera* e de seis espécies de abelhas *meliponinae*. As amostras de própolis analisadas, das diferentes espécies de abelhas, não apresentaram diferenças significativas quanto à atividade antimicrobiana, no entanto, a numericamente mais ativa foi obtida de *apis mellifera*. Os resultados demonstraram que o própolis possui maior atividade antimicrobiana em presença de *Staphylococcus aureus* do que os méis.

BARIZON et al. (1999) comentaram que o mel é um substrato que possui ação bactericida. COOPER et al. (1999) realizaram um estudo buscando avaliar a atividade antibacteriana, através da concentração inibitória mínima (CIM), de dois tipos de mel. Para isso utilizaram um mel produzido a partir das flores de *Leptospermum scoparium* e outro originário de flores do campo. A bactéria utilizada para tal teste foi o *Staphylococcus aureus*, obtido de feridas infectadas de pacientes atendidos em um hospital humano. Buscando testar

apenas a atividade antibacteriana advinda dos componentes fitoquímicos, os autores submeteram o mel à ação da catalase, removendo assim qualquer quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pelo mel. A CIM de cada tipo de mel foi determinada pela técnica de incorporação em Agar e a quantidade de *Staphylococcus aureus* inoculada foi de  $1,25 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro. Houve, segundo os autores, uma surpreendente similaridade entre os valores encontrados, sendo que a CIM do mel de *Leptospermum scoparium* variou entre 2 e 3% e a do mel obtido das flores do campo ficou entre 3 e 4%. Esses valores foram muito menores que os 29% obtidos pelo açúcar para inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*, mostrando que a ação do mel não se dá exclusivamente por sua osmolaridade.

OLIVEIRA (2004) realizou um estudo que avaliou a qualidade bacteriológica e micológica mediante análise de 40 amostras de mel sendo 20 coletadas assepticamente e 20 pelo próprio produtor que foram submetidas às determinações de coliformes fecais, coliformes a 45°C, *Salmonella*, esporos anaeróbios, bolores e leveduras. As amostras foram coletadas de diversas cidades do Estado do Maranhão e sendo analisadas não apresentaram bactérias do grupo coliforme e *Salmonella*. As contagens de bactérias anaeróbias esporuladas estavam de acordo com a legislação americana. Quanto à contagem de bactérias mesófilas, três (42,8 %) amostras coletadas pelo produtor e impróprias para consumo eram de mel da cidade de Arari, das coletadas assepticamente, uma (14,8 %) era de Arari e uma (100 %) de Peri Mirim. Na quantificação de bolores e leveduras, 13 (65 %) das amostras coletadas pelo produtor, todas as de Anajatuba, São João Batista, São Luís e Vitória do Mearim e cinco (25 %) das amostras coletadas assepticamente as de Vitória do Mearim apresentaram contagens mais elevadas para bolores e leveduras, portanto impróprias para consumo. Com a inclusão da análise de mesófilos, segundo os padrões internacionais, há um aumento de 5 % nos índices de rejeição nos dois grupos de amostras.

A composição química de méis e própolis provenientes de duas espécies de abelhas, *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* foi analisada, tendo sido encontrados alguns compostos típicos de própolis brasileiras, tanto em méis quanto em própolis. Quanto à sua atividade antibacterianas frente a *Staphylococcus aureus*, foram encontradas concentrações inibitórias mínimas (CIM) de distintos valores, sendo  $\geq 126$  mg/mL (méis) e  $\geq 0,36$  mg/mL (própolis) evidenciando a atividade antimicrobiana desta resina. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre as CIM dos méis ( $p \leq 0,05$ ) ocorrendo o mesmo para as CIM das própolis. Os resultados da análise estatística multivariada mostraram que existem correlações entre a composição química e a CIM dos méis e própolis de *Apis mellifera* e

*Tetragonista angustula*. No presente trabalho foi avaliada a atividade antibacteriana de própolis em dois tipos de cepas de *Staphylococcus aureus*. O própolis desempenha um papel de assepsia na colméia, então é lógico esperar uma atividade antibacteriana *in vitro*. Este estudo demonstrou o potencial que a própolis apresenta como um agente antimicrobiano e confirma a sua ação como um medicamento natural (MIORIN, 2003)

COOPER et al. (2002) procuraram avaliar se a atividade antimicrobiana do mel de *Manuka* se dá exclusivamente devido a sua alta osmolaridade ou devido a outros fatores. Para tanto foram coletadas 18 amostras provenientes de feridas humanas contendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, sete amostras de *Enterococci* resistentes a vancomicina também de feridas e sete amostras de *Enterococci* resistentes a vancomicina colhidas em superfícies hospitalares. Foram comparadas as atividades antimicrobianas do mel *in natura* anteriormente citado com o mel artificial, que não apresenta a enzima peroxidase. Foi verificado que mesmo os dois tipos de méis sendo diluídos em até três vezes seu volume em água, o mel natural demonstrou apresentar significativa maior eficiência no quesito bactericida. Isto comprova que ação sobre microorganismos não ocorre exclusivamente pela osmolaridade, mas sim também por outros fatores.

A origem dos esporos que irão ocasionar a enfermidade conhecida como botulismo muitas vezes é desconhecida, entretanto é um fato constatado que o mel de abelhas age como veiculador de tal enfermidade. Casos dessa enfermidade foram relatados com frequência em diversas nações, especialmente nos Estados Unidos da América. Apesar dessas informações, em 1984, na França foi diagnosticado somente um caso em um indivíduo de idade reduzida (PATY et al., 1987). DELMAS et al. (1994) comentaram que o botulismo é uma enfermidade que pode ser transmitida através de feridas cutâneas abertas e também de alimentos contaminados, geralmente mal armazenados em recipiente metálicos. Comumente encontra-se paralisia em indivíduos acometidos por esse clostrídio. Os autores avaliaram microbiologicamente 90 amostras de méis do leste da França e mais 26 amostras de méis provenientes de diferentes partes do planeta visando avaliar a presença de *Clostridium botulinum*. O resultado encontrado foi que embora oito amostras foram encontradas positivas para a clostrídio, nenhuma revelou apresentar o agente patogênico anteriormente referido.

Para avaliar a ação antifúngica do mel, EFEM et al. (1992) incorporaram no meio de cultura diferentes proporções de mel (1:1, 1:2, 1:5). Foi observado que no grupo com maior quantidade de mel (1:1) não houve crescimento fúngico, porém no grupo 1:2 houve crescimento esparso e no grupo 1:5 crescimento considerável. Da mesma forma que em experimento com bactérias, foi efetuado outro experimento com melado, onde houve

crescimento fúngico. Os fungos testados foram *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium citricum*, *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans* e *Candida albicans*.

Em um estudo, dois lotes de mel foram testados para verificar a presença de contaminação. Um lote estava contaminado com 520 unidades formadoras de colônia (UFC) por 100g de mel, no qual foram identificados *Clostridium perfringes*, enquanto que em outro havia *Bacillus* spp. (4200 UFC/100g de mel). O uso de radiação gama tornou ambos os lotes esterilizados, sem afetar a atividade antibacteriana. O uso do mel esterilizado provou ter grande poder medicinal (POSTMES et al., 1993).

O ar ambiente possui consideráveis quantidades de esporos de diversos tipos de fungos. Desde que as condições do meio sejam favoráveis, será possível o desenvolvimento desses seres em alimentos como farinhas, massa, açúcares e fruta. O mel, pelo contrário, caso bem conservado nunca se cobre de bolores. Essa característica foi comprovada através de um estudo contendo 20 amostras de mel de trigo sarraceno contaminado por dez tipos diferentes de fungos retirados de gêneros alimentícios. Nesse experimento não houve proliferação fúngica apesar do mel ser rico em proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais, comprovando também a capacidade antifúngica do mel (IOIRISH, 1981).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Coleta e conservação**

Foram coletadas diáfises femorais provenientes de 100 caninos provenientes do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A coleta foi realizada somente em cães hígidos, sem histórico clínico de doenças sistêmicas ou infectocontagiosas que pudessem interferir na pesquisa. Os ossos que apresentaram alguma deformidade foram excluídos.

Os fêmures direito e esquerdo de cada canino tiveram suas diáfises coletadas de forma não asséptica e com serra manual. Foram removidos a medula óssea e o perióstio e cada um dos espécimes foi acondicionado em glicerina ou mel, respectiva e alternadamente. O intervalo entre a coleta e a realização dos ensaios biomecânicos foi 30 dias.

#### **3.2 Ensaios biomecânicos**

Foram formados dois grupos, cada um contendo 50 ossos, denominados:

$G_{(1-50)}$ : glicerina

$M_{(1-50)}$ : mel,

ou seja, houveram 50 ossos conservados em glicerina (25 do membro esquerdo e 25 do membro direito) e outros 50 (25 do membro esquerdo e 25 do membro direito), conservados em mel. Sempre foram comparados diretamente os ossos do mesmo animal de ambos os grupos.

Para fins da obtenção de um parâmetro, houve a formação de um terceiro grupo, onde os ossos foram coletados à fresco ( $F_{(1-50)}$ ) e imediatamente testados, composto também por 50 corpos de prova, termo utilizado para as unidades experimentais utilizadas em testes de resistência.

Os testes de resistência foram realizados no Laboratório de Materiais da Construção Civil (LMCC) desta Universidade. Foi utilizada uma prensa de compressão axial (Figura 1A) que exerceu uma força sobre os ossos, revelando um valor de leitura (L) que posteriormente foi convertido para a unidade Newton (N) mediante a fórmula  $P = 15,322 \times L + 4,45$  onde P significa o resultado final em N.

Foi padronizado que quando aparecesse o primeiro sinal de fissura ou falta de continuidade, devido a impactação em suportar a carga aplicada, esse seria o momento de interromper a compressão e aferir o valor obtido.

A referida prensa possui um anel de deformação que foi comprimido contra o osso testado. Quanto maior fosse a mudança na conformação do seu perímetro, maior foi o valor na leitura (L).

Os ossos foram medidos com paquímetro digital no sentido cranio-caudal e médio-lateral e após foi feita uma média de seu diâmetro (Figura 1B). Para fins de padronização ficou estabelecido que comprimento do implante testado foi o dobro do diâmetro externo. Também foi mensurada a espessura média da camada cortical óssea. Com todos esses dados foi possível calcular o volume de cada osso através da fórmula do cilindro oco que é:

$$V = \pi \times h \times (R^2 - r^2)$$

Onde o significado de cada elemento é:

V: volume em cm<sup>3</sup>

$\pi$ : 3,14159

h: altura (o comprimento)

R: Raio maior (metade do diâmetro externo)

r: Raio menor (metade do diâmetro interno)

Também foi realizado o alinhamento entre as porções superior e a inferior do cilindro ósseo, de modo que o ângulo reto formado entre o eixo maior e a base fosse consistente com o mesmo e a porção superior.

Antes da realização dos ensaios foi promovida a hidratação dos ossos em solução fisiológica a 0,9% por um período de seis horas, quando foram mantidos em mel ou glicerina.

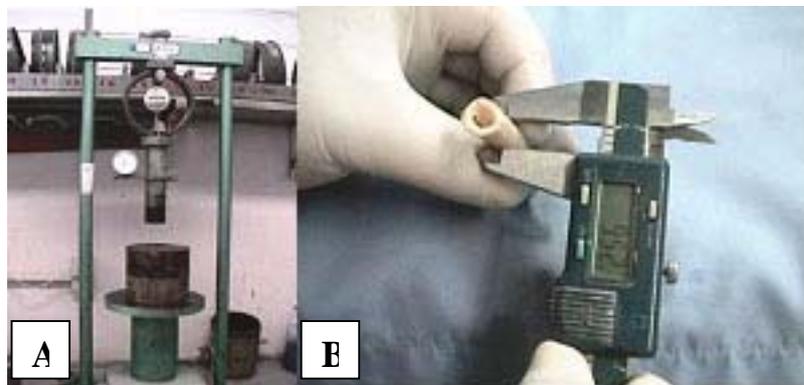


Figura 1 – Demonstrando a prensa de compressão axial marca Solotest e as medições realizadas com paquímetro digital no sentido crânio – caudal e médio – lateral de fêmures caninos.

### 3.3 Avaliação bacteriológica

Os ossos foram coletados de forma não asséptica, lavados com água corrente em profusão e mantidos em *Eppendorf* esterilizado em todos os grupos. Para que houvesse padronização das amostras foi estipulado que cada amostra medisse 8 mm<sup>3</sup>.

Foram constituídos três grupos, cada um contendo 35 amostras. Um grupo foi constituído por amostras recém coletadas e diretamente enviadas ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da UFSM (B<sub>(1-35)</sub>), outro onde os ossos foram mantidos em glicerina por 30 dias (BG<sub>(1-35)</sub>) e um terceiro onde as amostras foram mantidas em mel pelo mesmo período (BM<sub>(1-35)</sub>).

As porções de ossos provenientes dos referidos caninos recém coletados foram acondicionadas em microtubos estéreis sendo acrescido a eles, 500µl de água peptonada 0,1%. Após 30 segundos de agitação no vórtex, 100µl da água peptonada foram semeados em placas de Agar Sangue e Agar Mac Conkey, ambas com o auxílio de espátula de Drigalsky. As amostras foram então incubadas a 37°C durante 48 horas. Com relação aos segmentos ósseos conservados os procedimentos foram os seguintes: semeadura de 100µl da glicerina e do osso nos meios de cultura Agar Sangue e Agar Mac Conkey com auxílio de espátula de Drigalsky. Os tubos contendo osso e mel foram submetidos ao banho-maria (37°C) por 2 minutos e em seguida, da mesma forma como aconteceu com o grupo da glicerina, semeados para a pesquisa bacteriológica. Todos os cultivos foram incubados a 37°C por 48 horas, sendo posteriormente identificados a partir das características tintórias e bioquímicas.

### 3.4 Avaliação micológica

Quanto à coleta, a metodologia foi idêntica ao que aconteceu com os espécimes enviados ao exame bacteriológico. Os ossos foram coletados de forma não asséptica, lavados com água corrente em profusão e mantidos em *Eppendorf* esterilizado em todos os grupos. Para que houvesse padronização das amostras foi estipulado que cada amostra medisse 8 mm<sup>3</sup>.

Foram constituídos três grupos, cada um composto por 35 amostras. O primeiro grupo (F<sub>(1-35)</sub>) foi constituído por amostras recém coletadas e diretamente enviadas ao laboratório de micologia (LAPEMI), outro onde os ossos foram mantidos em glicerina por 30 dias (FG<sub>(1-35)</sub>) e um terceiro onde as amostras foram mantidas em mel pelo mesmo período (FM<sub>(1-35)</sub>).

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo Agar *Sabouraud* dextrose, acrescido de cloranfenicol, ficando incubadas a 30<sup>0</sup>C, por um período de 30 dias, sendo inspecionadas diariamente para visualização de crescimento de colônias fúngicas. Com o objetivo de estimular a formação de estruturas fúngicas para posterior caracterização, as colônias que cresceram nas placas com Agar *Sabouraud*, foram repicadas para tubos contendo agar batata, ficando incubados a 30<sup>0</sup>C, durante 15 dias. Procedeu-se, então, a identificação do fungo, avaliando-se as características macro e micromorfológicas das colônias. As características macromorfológicas consideradas foram: tempo de crescimento do fungo, tamanho, cor e aspecto das colônias e presença de pigmentos. Já, nas características micromorfológicas, considerou-se a morfologia e cor das hifas, e presença de macroconídeos e microconídeos.

A avaliação micromorfológica das colônias foi feita através do exame direto entre lâmina e lamínula utilizando-se corante azul de algodão e observação em microscopia óptica em aumento de 40X. Nas colônias onde não foi possível realizar-se a identificação por meio de exame direto, realizou-se a técnica do microcultivo.

### **3.5 Avaliação estatística**

O programa utilizado para avaliar estatisticamente os dados foi PRISM 4.0 for Windows GraphPad, Califórnia. Os dados referentes à análise biomecânica foram avaliados através dos testes t pareado e regressão linear entre volume (cm<sup>3</sup>) e carga (N), enquanto que o estudo bacteriológico e micológico foram avaliados pelo teste Qui-quadrado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Propriedades biomecânicas

Nos três grupos avaliados foi verificado que os ossos que suportaram maior força compressiva em N por  $\text{cm}^3$  foi o grupo onde as diáfises foram mantidas em glicerina por 30 dias. O segundo grupo mais resistente foi o do mel e o último foi quando os ossos foram colhidos à fresco. Cada grupo suportou em média por centímetro cúbico, respectivamente, 6339,939  $\text{N}/\text{cm}^3$ , 5906,387  $\text{N}/\text{cm}^3$  e 4888,532  $\text{N}/\text{cm}^3$ . A dimensão volumétrica de cada amostra e a respectiva carga que cada uma suportou pode ser visualizada na Tabela 1.

Os ossos coletados a fresco, mantidos em mel ou glicerina 98% foram eleitos por serem utilizados em ampla escala em procedimentos ortopédicos. GOLDBERG & STEVENSON (1987) comentaram que o método que proporciona melhores resultados no que diz respeito a biomecânica óssea é a colheita à fresco. Entretanto enxertos frescos têm demonstrado serem insatisfatórios devido a resposta imunogênica e a lenta incorporação decorrente. Métodos de preservação e modificações nos enxertos têm sido desenvolvidas visando diminuir a antigenicidade dos enxertos.

Apesar dos achados no presente estudo revelarem que o grupo de ossos coletados a fresco suportou menor carga compressiva não infere que essa categoria óssea seja menos resistente que ossos conservados. O que aconteceu foi que no grupo da glicerina e do mel foram usados ossos contralaterais de um mesmo animal, enquanto que no outro grupo foram utilizados outros caninos. BRIANZA et al. (2006) comentaram que se for avaliada a resistência de uma amostra óssea de volume padronizado, de animais de mesmas dimensões e pesos, entretanto de raças diferentes, os valores ainda assim seriam diferentes. Isto ocorre devido à geometria óssea distinta, pois, por exemplo, uma secção transversal mais cilíndrica ou mais ovalada e um canal medular mais estreito ou mais amplo influem de forma importante para a resistência. No presente estudo foi verificado que matematicamente os ossos do grupo controle eram maiores e suportaram maior carga em valores totais, porém proporcionalmente suportaram menor carga compressiva por  $\text{cm}^3$ . Pode ser inferido então que no presente estudo os ossos menores foram mais resistentes, porém isto não pode ser extrapolado para outros estudos, e também não afirma que ossos maiores sempre serão menos resistentes proporcionalmente, pois deve haver uma padronização entre raça e tamanho para que a comparação seja confiável.

MELO et al. (1998) observaram que as características biológicas de ossos conservados em glicerina eram de um osso mais esbranquiçado e quebradiço à manipulação, sendo mais pronunciadas nos implantes conservados por períodos mais longos. Para evitar que os enxertos quebrassem os autores indicaram a reidratação, sendo que quanto maior o tempo menos quebradiço seria o osso. No presente estudo realizado na UFSM apenas poucas amostras do grupo da glicerina apresentaram microfissuras (quatro ossos), porém após a hidratação as mesmas visivelmente desapareceram.

LUCAS et al. (2001) compararam três métodos de conservação de ossos, que foram o congelamento, a glicerina e o mel. Os fêmures foram mantidos por um período não inferior a 30 dias e após foram submetidos a um ensaio compressivo destrutivo. Foi possível verificar que os ossos provenientes do grupo do mel eram significativamente mais resistentes do que o dos outros meios, enquanto que a glicerina proporcionava até mesmo fraturas espontâneas nas diáfises femorais. Entretanto estes autores mantiveram os ossos inteiros e não apenas segmentos diafisários como aconteceu na presente pesquisa.

A glicerina tem demonstrado ser um eficiente meio de conservação de ossos (PINTO JÚNIOR et al., 1996; COSTA, 1996; MELO et al., 1998). Ela acarreta, todavia, problemas relacionados as propriedades biomecânicas de ossos conservados nesse material, tornando-os quebradiços e exigindo longo tempo de hidratação (MELO et al., 1998), além de não promover uma esterilização efetiva dos mesmos (MELO et al., 1998; DEL CARLO et al., 1999).

Outros métodos que causam efeito deletério sobre as propriedades biomecânicas de ossos são a esterilização por óxido de etileno (JOHNSON & STEIN, 1988; WAGNER et al., 1994) e a liofilização (DEL CARLO et al., 1999). ALIEVI (2006), em estudo utilizando fêmures caninos, comentou que o mel, além de ser um adequado meio de conservação, não causou fragilidade aos implantes ósseos quando os mesmos foram perfurados e fixados a placas metálicas. Deve ser salientado que, ao contrário do presente estudo, os achados foram baseados em fatos subjetivos.

O período de hidratação eleito foi baseado em BECKMANN et al. (2005), que avaliaram a resistência de diáfises ósseas femorais conservadas em glicerina e submetidas a diferentes períodos de hidratação anteriormente ao ensaio compressivo axial destrutivo. Os ossos foram distribuídos em um primeiro grupo que não foi submetido a nenhum processo de hidratação e a outros três grupos que foram hidratados por uma, seis, e 24 horas, respectivamente. O grupo de seis horas foi o que apresentou melhores resultados no quesito resistência.

Um fator associado ao desempenho estrutural de um enxerto ósseo é a reidratação do mesmo antes do implante. Existem trabalhos que mostram tanto a diminuição (SEDLIN, 1966; KOMANDER, 1976) como o aumento (BURCHARDT et al., 1978;) da resistência a compressão de corpos de prova liofilizados e até mesmo a não alteração significativa desta propriedade (PELKER et al., 1984; MALININ et al., 1989). Os estudos realizados por CONRAD et al. (1993) não demonstraram diferenças significativas quanto a força de compressão entre enxertos ósseos liofilizados reidratados por 24 horas e enxertos congelados, porém no mesmo estudo, enxertos liofilizados não reidratados pareceram ser mais resistentes à compressão. Esta incerteza de comportamento levou DUARTE & SCHAEFFER, (2000) a realizar um trabalho que apontou a relação direta entre a força máxima de compressão esperada e a razão de deformação ou rigidez do enxerto ósseo, utilizando ossos liofilizados ou congelados, independente do processo de armazenamento utilizado e da reidratação ou não do enxerto pré-ensaio. O tempo de reidratação de enxertos liofilizados mostrou, também, não desempenhar um papel significativo, sugerindo a não necessidade de reidratação durante o ato cirúrgico. No atual trabalho o período de hidratação de seis horas demonstrou ser eficiente e importante, pois o aspecto ressecado no momento da retirada do osso do conservante desaparecia após esse tempo de imersão em solução fisiológica.

Neste trabalho foi utilizada solução fisiológica a temperatura ambiente, pois obviamente os ossos não seriam implantados em animais. SCHENA et al. (1984) e MELO et al., (1998) hidrataram ossos em soro fisiológico morno por longos períodos. ALIEVI (2006) utilizou a hidratação prévia de ossos conservados em mel por um período de 15 minutos antes de sua implantação em fêmures caninos. Este autor relatou que o tempo de hidratação, utilizando solução salina morna, foi menor que o utilizado pelos autores anteriormente citados. Mesmo assim os resultados foram satisfatórios para a remoção do meio conservante e parcial impregnação de fluídos no implante, haja visto que não houveram fissuras nem fraturas durante o tempo de conservação e nem na perfuração por brocas e parafusos.

GAIGA (2002) avaliou o emprego de pinos absorvíveis confeccionados a partir de tibia e fíbula canina e conservados em glicerina 98% ou mel, no tratamento de fraturas transversais umerais de pombos domésticos. Ele constatou que o pino conservado em mel apresentava mais fácil manuseio que o mantido em glicerina, já que esse era mais quebradiço e de mais difícil confecção. Não foram observados sinais clínicos de rejeição nem infecção em ambos os grupos, porém houve reabsorção mais rápida e menor resposta inflamatória quando os pinos eram mantidos em mel. Com isso foi possível concluir que o mel foi superior na manutenção das características biomecânicas de ossos quando comparado à glicerina.

Entretanto o presente estudo biomecânico demonstrou ser necessário um período de hidratação bem maior para que a manipulação de ossos conservados em glicerina seja satisfatória.

WEIGEL (1993) comentou que a liofilização exerce efeito deletério significativo sobre a resistência óssea no que diz respeito à torção e encurvamento, sendo indicada apenas para enxertos trabeculares, corticotrabeculares ou ainda corticais de pequenas dimensões. COSTA (1996) citou que os ossos conservados em glicerina tornam-se mais frágeis e quebradiços, porém a diminuição da resistência é um problema encontrado em todos os métodos de conservação. DEL CARLO et al. (1999) relataram que os ossos conservados por meio de glicerina ou autoclavados sofreram decréscimo de resistência devido à desidratação e desnaturação protéica, respectivamente.

WADSWORTH & HENRY (1981) comentaram que a resistência óssea de enxertos mantidos sob o congelamento demonstrou que esse método foi adjuvante no insucesso de alguns procedimentos ortopédicos realizados. Os autores utilizaram aloenxertos obtidos sob condições de assepsia em sala cirúrgica, esterilizados em autoclave e mantidos em freezer doméstico (-15°C a -20°C) até a sua utilização em cães e gatos. Nos gatos, o percentual de sucesso na osteointegração foi de 90%, devendo-se as fraturas dos enxertos a falha de 10%. Já no caso dos cães a taxa de sucesso foi de apenas 36%, atribuindo-se as falhas à não união do enxerto por formação de seqüestro ósseo, infecção e fixação inadequada.

Uma das vantagens dos métodos de conservação utilizados foi que o custo demonstrou ser bastante acessível e o processo de armazenagem revelou ser simples. SCHENA et al. (1984) realizaram um estudo comparando autoenxerto mantido a fresco, aloenxerto fresco e aloenxerto liofilizado mantido a -70°C na reconstrução de falha óssea diafisária segmentar em fêmures caninos. Os enxertos foram fixados mediante o uso de placas e parafusos. Os resultados permitiram concluir que o autoenxerto fresco é superior aos demais quanto ao tempo de consolidação, embora o aloenxerto fresco também promova união consistente. Verificou-se que o processo de liofilização fragiliza o enxerto, sujeitando o mesmo mais facilmente a fraturas por compressão, além da desvantagem representada pelo elevado custo do equipamento e o longo tempo para o processamento do material.

JOHNSON & STEIN (1988) avaliaram aloenxertos frescos com segmentos ósseos esterilizados pelo óxido de etileno. Os autores relataram que aloenxertos ósseos corticais esterilizados com óxido de etileno na concentração de 12% e mantidos na temperatura de 22°C tornam-se bastante quebradiços, ocorrendo pequenas fissuras ou lascas durante a preparação para a fixação dos parafusos, o que exige um número maior de ossos para

substituir os danificados. Possivelmente se os autores tivessem hidratado os ossos por um período de pelo menos seis horas os resultados seriam melhores.

WAGNER et al. (1994) reportaram a ocorrência de dois casos de fraturas em aloenxertos ósseos corticais conservados pelo óxido de etileno, bem como o encurvamento das placas que os fixavam. Apesar dos autores não justificarem a falha no método de esterilização, não houve instabilidade durante o período de observação.

No presente estudo a glicerina foi comparada com o mel, porém outros autores estudaram o comportamento deste agente com outros meios conservantes. Segundo ZILIOTO et al. (2003), os implantes ósseos conservados em glicerina tornam-se menos resistentes que os fragmentos ósseos frescos, podendo sofrer fraturas no momento da colocação dos parafusos. Porém, esta queda na resistência também ocorre quando a conservação é feita por congelamento. Para aumentar a resistência dos implantes ósseos, especificamente na técnica preservadora do membro, o canal medular dos fragmentos ósseos a serem implantados foram preenchidos com poliuretana de mamona e fixados por meio de placas de compressão dinâmica, obtendo bons resultados no quesito resistência compressiva.

Deve ser levado em conta que o presente estudo foi realizado com ossos coletados de cadáveres. Um dos problemas dos testes de avaliação das propriedades biomecânicas é que estes são realizados *in vitro*; conseqüentemente são negligenciados os processos biológicos aos quais o osso é submetido *in vivo*. Tais processos seriam: a revascularização, a remodelação (PELKER et al.,1984), necrose do enxerto e algumas alterações bioquímicas do colágeno (KANG & KIM, 1993). Por isso, a maioria dos dados provenientes de avaliações biomecânicas ao serem extrapoladas para a prática clínica requer confirmações *in vivo*, necessitando de novos trabalhos.

Tabela 1 - Resultado do volume em cm<sup>3</sup> dos grupos nos quais os ossos foram conservados em glicerina (G), mel (M) e dos ossos avaliados a fresco (F) relacionados com a carga (em Newton) que cada um dos ossos dos grupos suportaram. No final tem-se a relação Volume x Newton de cada grupo.

<b>Grupo G</b>	<b>volume G</b>	<b>N G</b>	<b>Grupo M</b>	<b>volume M</b>	<b>N M</b>	<b>Grupo F</b>	<b>volume F</b>	<b>N F</b>
g1	1,62559	12721,71	m1	1,62561	10959,68	f1	3,92071	10270,19
g2	1,79071	6240,59	m2	1,79082	7267,07	f2	1,84254	7359,01
g3	1,03949	6439,69	m3	1,03945	6822,74	f3	1,50796	5567,4
g4	0,58258	5338,21	m4	0,58251	3095,79	f4	1,12155	5724,84
g5	0,39628	4564,96	m5	0,39619	5260,89	f5	0,91892	6746,13
g6	0,48818	4688,68	m6	0,48825	4487,64	f6	1,9635	9810,53
g7	0,42412	3482,41	m7	0,42415	3559,74	f7	2,474	9963,75
g8	0,8405	7512,23	m8	0,8401	6899,35	f8	0,83635	7052,57
g9	1,64934	8120,71	m9	1,64939	8278,33	f9	0,64139	5724,84
g10	2,14414	12108,83	m10	2,14419	11802,39	f10	2,73319	9963,75
g11	1,46869	8661,38	m11	1,46871	7512,23	f11	1,37288	5879,49
g12	1,58179	7588,84	m12	1,58175	7971,89	f12	1,62559	8431,55
g13	0,63617	5879,49	m13	0,63612	5879,49	f13	3,6521	11036,29
g14	0,96057	5879,49	m14	0,96052	6669,52	f14	3,14316	9657,31
g15	3,99912	12874,93	m15	3,99917	8584,77	f15	0,93946	4796,94
g16	0,75448	7052,57	m16	0,75451	6133,25	f16	1,80208	7895,28
g17	0,56096	4023,69	m17	0,56099	3559,74	f17	1,34327	6133,25
g18	0,76661	4332,99	m18	0,76657	3250,44	f18	0,89535	6592,91
g19	1,07801	3405,09	m19	1,07805	6286,47	f19	2,34583	8278,33
g20	0,69429	6746,13	m20	0,69433	5260,89	f20	1,50796	7895,28
g21	0,90323	6439,69	m21	0,90321	7818,67	f21	0,98696	5724,84
g22	1,95093	11342,73	m22	1,95095	7665,45	f22	1,48044	7895,28
g23	0,98696	7818,67	m23	0,98689	4951,59	f23	0,66765	5415,54
g24	0,79168	5260,89	m24	0,79171	6592,91	f24	1,1365	6034,14
g25	0,50822	5260,89	m25	0,50817	4642,29	f25	1,24407	7971,89
g26	1,20468	5567,4	m26	1,20472	7052,57	f26	0,84446	5910,42
g27	1,64934	8814,6	m27	1,64929	8431,55	f27	0,8405	5647,51

Continua...

g28	2,0071	10959,68	m28	2,0065	11419,34	f28	1,43498	9657,31
g29	2,76313	10116,97	m29	2,76309	9274,26	f29	1,89344	9810,53
g30	1,42616	11266,12	m30	1,42621	7971,89	f30	1,79699	9504,09
g31	0,68041	5879,49	m31	0,68035	4178,34	f31	0,96057	5802,16
g32	0,44485	4796,94	m32	0,44479	3869,04	f32	0,49009	4796,94
g33	0,71063	4487,64	m33	0,71058	4874,26	f33	1,45318	6592,91
g34	0,74022	5260,89	m34	0,74018	5724,84	f34	1,33807	8048,5
g35	0,82158	6822,74	m35	0,82164	6034,14	f35	1,29176	6133,25
g36	0,63632	4642,29	m36	0,6367	4487,64	f36	2,45044	7205,79
g37	0,75197	6286,47	m37	0,75191	6034,14	f37	2,06365	11189,51
g38	0,68787	6286,47	m38	0,68795	5724,84	f38	2,73319	15556,28
g39	1,44199	5879,49	m39	1,44192	6899,35	f39	1,26806	8891,21
g40	2,41023	11495,95	m40	2,41017	11342,73	f40	1,14555	6332,43
g41	0,71063	3559,74	m41	0,71068	3869,04	f41	1,38299	9550,05
g42	1,07801	9197,65	m42	1,07795	7971,89	f42	1,54887	7282,4
g43	1,07801	8737,99	m43	1,07809	8891,21	f43	2,30195	7052,57
g44	1,38431	9963,75	m44	1,38427	9657,31	f44	2,0071	9121,04
g45	0,53087	6439,69	m45	0,53092	4023,69	f45	1,60949	7282,4
g46	0,56077	6945,96	m46	0,56082	6363,08	f46	0,73287	3714,39
g47	0,41017	4332,99	m47	0,41015	4023,69	f47	0,79149	5567,4
g48	1,24426	10883,07	m48	1,24431	9044,43	f48	0,48617	5106,24
g49	0,63617	4951,59	m49	0,63614	4487,64	f49	0,88656	6363,08
g50	0,79168	4023,69	m50	0,79172	4487,64	f50	0,89535	5260,89
Total	55,424	351384,8		55,42336	327351,8		76,75118	375200,6
rel VxN		6339,939			5906,387			4888,532

## 4.2 Glicerina como agente bactericida e fungicida

A manutenção da esterilidade é preocupação fundamental, qualquer que seja o método de conservação (SLATTER, 1998).

PIGOSSI (1964) efetuou estudo experimental de implante ortotópico de dura-máter homogênea, conservada em glicerina. Segundo esse autor a glicerina desidrata o tecido substituindo a maior parte de água intracelular. Entretanto, não altera a concentração iônica das células, atuando como eficaz protetor da integridade celular. Pela avaliação histológica do implante, o pesquisador constatou ausência de processo inflamatório agudo, o que assegura a esterilidade do produto e a ausência de antigenicidade. No atual estudo utilizando caninos a glicerina isoladamente como meio conservante, foi semeada em Agar Sangue e não houve crescimento bacteriano, porém não pode ser afirmado que se encontrou estéril, pois poderia haver a presença de outros agentes microscópicos.

Foi possível verificar no presente estudo que das 35 amostras analisadas no exame bacteriológico 16 apresentaram contaminação quando avaliadas no momento da coleta e a glicerina foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em 14 espécimes. PIGOSSI (1967) realizou pesquisa sobre a ação anti-séptica e antigênica da glicerina na conservação de dura-máter humana e de caninos. Concluiu que a glicerina reduz a antigenicidade de peças nela conservadas e, que além de outras propriedades, ela é um agente desidratante de atuação rápida e age como poderoso anti-séptico de amplo espectro de ação.

PINTO JUNIOR et al. (1996) comentaram que a glicerina, mesmo sem ser processada ou esterilizada apresenta atividade antifúngica. No atual estudo micológico foi verificado que das 35 amostras obtidas e analisadas no momento da coleta, oito apresentaram contaminação por fungos e que a glicerina foi eficiente em eliminar todos esses agentes.

Os resultados das avaliações bacteriológicas e micológicas da glicerina podem ser visualizados nos Quadros 1 e 2.

PIGOSSI et al. (1971) pesquisaram a ação bactericida da glicerina, realizando testes em peças de dura-máter espontaneamente contaminadas e testes *in vitro*, adicionando à glicerina, a mais ou menos 98%, inóculos de colônias de diversos microorganismos escolhidos principalmente entre os patógenos mais prevalentes na rotina médica como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus aureus* entre muitos outros. Entretanto no atual estudo realizado com segmentos ósseos os agentes encontrados na maior parte foram contaminantes ambientais, tal como *Bacillus* spp. e *Coccus* spp..

MELO et al., (1998) avaliaram de forma bacteriológica aloenxertos ósseos conservados em glicerina e observaram o crescimento de microorganismos em 21,4% das amostras de segmentos ósseos. *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* spp. foram os agentes encontrados. O resultado sugere que a glicerina não permitiu o crescimento, mas também não eliminou as bactérias presentes nos ossos. Os achados deste autor não concordam com o que foi encontrado no presente estudo com diáfises femorais, pois em 45,71% das amostras recém coletadas houve presença de contaminação e após os 30 dias de conservação somente 5,71% permaneceram contaminadas, demonstrando a ação bactericida da glicerina.

Uma grande vantagem encontrada foi que para todo o experimento realizado foi necessário somente um litro de glicerina e o processo de armazenagem foi bastante simples, concordando com CAVASSANI et al., (2001), os quais comentaram que a evidência da preservação da atividade osteogênica de fragmentos ósseos pela glicerina possibilita que bancos de ossos destinados à enxertia estoquem fragmentos de matriz óssea mineralizada ou matriz óssea desmineralizada em lugar de peças íntegras e grandes, otimizando a utilização de espaço de armazenamento e a quantidade de glicerina.

Foram realizados experimentos com um banco de ossos preservados em glicerina, confirmando ser este um método de preservação simples, barato e bactericida, pois é possível armazenar os ossos imersos em glicerina à temperatura ambiente, não sendo necessário o congelamento e outros métodos lesivos (SCHENA & MCURNING, 1983; BLOOMBERG et al., 1984; HART et al., 1984); esta é outra vantagem da utilização da glicerina, pois armazenando-se à temperatura ambiente não há formação de cristais intra e extracelulares, além de alterações eletrolíticas deletérias às células e potencialmente destrutivas à matriz óssea. Seu efeito asséptico na conservação de tecido ósseo deve-se particularmente às suas propriedades físicas (SCHENEIDER & MAZUR, 1984), e, portanto não há problema quanto ao fenômeno da resistência bacteriana, assim como ocorre com o tiomersal.

Os ossos conservados em glicerina foram mantidos por um período de 30 dias, porém alguns autores avaliaram este e outros métodos por maior tempo, tal como o óxido de etileno como meio de conservação de fragmentos ósseos (PHILLIPS et al, 1988; ROE et al., 1988; JOHNSON et al., 1992; TSCHAMALA et al., 1994; WAGNER et al., 1994; PINTO JÚNIOR, 1995). Porém sua viabilidade é questionável após 32 semanas de estocagem, sendo que o período máximo de estocagem aceitável é de seis a 18 meses.

GIOSO et al. (2002) inferiram que a glicerina também é um meio de preservação simples, barato e asséptico, tal como o tiomersal, e o substitui com sucesso. Pelo trabalho anteriormente citado pôde-se constatar que a glicerina é capaz de conservar o tecido ósseo

por um prazo de nove anos de armazenamento (108 meses aproximadamente), superando o óxido de etileno neste aspecto. Levando-se em consideração que o número de amostras positivas para crescimento microbiano foi estatisticamente muito pequeno em comparação com as amostras negativas, deve-se considerar, portanto, a glicerina como um excelente meio de conservação de tecido ósseo, mantendo o tecido isento de microorganismos por um período de até nove anos.

Algumas formas esporuladas dos agentes apresentados foram encontradas no presente estudo. GIOSO et al. (2002) trabalharam com ossos conservados em glicerina a 98%, por nove anos. Através de testes microbiológicos foram pesquisadas bactérias, nas epífises e no canal medular e não foi encontrado um número estatisticamente significativo para que interferissem na enxertia óssea. A flora bacteriana presente no implante biológico de tendão calcâneo comum após a ação da glicerina a 98% foi avaliada e este meio segundo KRAUSPENHAR (2003) previne a proliferação bacteriana.

Para PIGOSSI et al. (1971) embora a glicerina seja um poderoso anti-séptico ela não atua sobre algumas formas esporuladas mais resistentes. Apesar da glicerina ter apresentado bom efeito bactericida, algumas bactérias permaneceram viáveis, porém a maior parte dos agentes encontrados não eram de caráter patogênico. Isso explica porque, em estudos experimentais, a glicerina mostrou ser um meio adequado para a conservação de implantes ósseos, obtendo altos índices de incorporação, tal como quando foram reconstruídas com sucesso as porções diafisárias de ossos longos substituídas por segmentos corticais conservados em glicerina, sendo todos os procedimentos realizados em caninos (PINTO JÚNIOR et al., 1996; COSTA, 1996; MELO et al., 1998).

### **4.3 Mel como agente bactericida e fungicida**

Foi possível verificar que das 35 amostras analisadas no exame bacteriológico coletadas a fresco, 16 apresentaram contaminação. Nas 35 amostras avaliadas bacteriologicamente foi evidenciada a presença de *Bacillus* spp. no mel, pois o meio de cultura encontrava-se contaminado por esse agente. Também houve o crescimento de *Coccus* spp. em dois casos e *Proteus* spp. em uma amostra. Dessa forma houve crescimento bacteriano em todas as amostras.

No atual estudo micológico foi verificado que das 35 amostras obtidas e analisadas no momento da coleta oito apresentaram contaminação por fungos e que o mel foi eficiente em eliminar apenas três agentes, permanecendo cinco fungos. Dessa forma o mel não foi 100%

eficiente como fungicida, ao contrário do que aconteceu com a glicerina. Alguns desses agentes encontrados no mel podem ser observados na Figura 2.

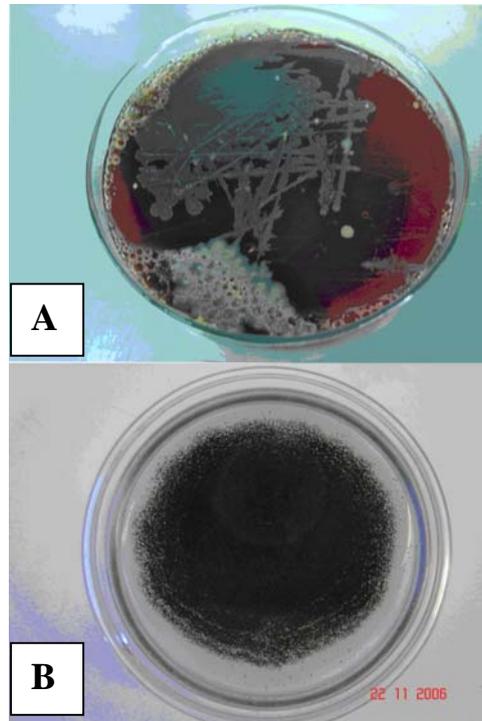


Figura 2 – Exemplo de agentes encontrados. Na foto A tem-se o crescimento de um bacilo enquanto que na foto B, é possível observar a presença de *Aspergillus niger*, os quais estavam presentes nos ossos conservados em mel.

Os resultados das avaliações bacteriológicas e micológicas do mel podem ser visualizados nos Quadros 1 e 2.

Baseando-se no fato anteriormente citado pode ser inferido que não se pode considerar o mel como substância livre de patógenos. POSTMES et al. (1993) comentaram que o mel não pode ser tratado como substância estéril, sendo necessária a análise microbiológica antes de ser utilizado com propósitos para a conservação de materiais biológicos ou uso terapêutico em seres vivos. SUBRAHMANYAM (1993) utilizou mel resfriado a 4°C para o armazenamento de enxertos de pele, porém realizou exames laboratoriais para verificar a ausência ou não de bactérias. POSTMES et al. (1993) ainda citaram como alternativa o uso de irradiação para promover a esterilização de mel contaminado. RAGAZANI (2004) realizou um estudo que teve por objetivo verificar a qualidade microbiológica do mel comercializado em alguns estados brasileiros (SP, MG, GO, CE, MT, SC). Cem amostras de méis oriunda dos referidos locais foram submetidas a análise laboratorial. Como resultado 7% foram positivas para *Clostridium botulinum*; 2% para *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e 5% para

*Staphylococcus* spp. coagulase negativo; bolores e leveduras encontraram-se fora dos padrões recomendados pela legislação brasileira. Nenhuma amostra revelou a presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.. Concluiu-se ser importante avaliar a qualidade microbiológica do mel, sobretudo a presença destes microrganismos uma vez que podem ser veiculadores de toxiiinfecção alimentar, e principalmente causar o botulismo infantil, que representa um alto risco à saúde do consumidor infantil, principalmente aqueles menores de um ano de idade, faixa etária em que a incidência é maior devido às características específicas absorptivas do trato digestório destes indivíduos.

O mel utilizado foi submetido à análise de umidade e foi verificado um percentual de 18,2%, estando em conformidade com a literatura. LENGLER (1999) comentou que um componente do mel que representa fator limitante na sua estocagem é a água. Devido a sua alta higroscopicidade, o mel apresenta facilidade em absorver e ceder água. Mel com umidade superior a 25% fermentará com facilidade. Em geral o conteúdo de água do mel varia de 13% a 25%, aquele que apresenta umidade inferior torna-se difícil de ser manipulado, mas presta-se para ser misturado com outros méis. Quando o armazenamento acontecer em ambiente com umidade relativa do ar superior a 60% a água é absorvida; quando a estocagem é feita em ambiente com umidade relativa inferior a essa porcentagem ele libera água.

Através de exames laboratoriais foi possível comprovar que o mel utilizado era completamente natural, não apresentando nenhum tipo de adulteração. O mel é um produto natural elaborado pelas abelhas (*Apis mellifera* e Meliponídeos), sendo que para a produção do mesmo elas extraem o néctar das flores, transformam e combinam com substâncias próprias armazenando em favos, em suas colméias. O mel possui uma baixa atividade de água o que dificulta o desenvolvimento microbiano, porém na sua manipulação às vezes aumenta esta atividade de água, propiciando o desenvolvimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e ocasionalmente *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, e esporos de *Clostridium botulinum* que, em condições ideais, podem germinar e serem agentes causadores do botulismo infantil (RAGAZANI, 2004).

Amostras de mel foram avaliadas para encontrar a atividade de água e foi obtido um valor de 0,645, ou seja, um pouco mais alto do que o preconizado pela literatura. ANGERAMI (1991) comentou que o mel pode eventualmente fermentar devido ao desenvolvimento de leveduras osmófilas, capazes de se desenvolver nele. As leveduras normalmente estão presentes no mel, mas só se desenvolvem se encontram condições de umidade e de temperatura adequadas. O mel pode eventualmente absorver umidade do ambiente, contribuindo para que a sua fermentação ocorra. O segredo disso esconde-se por

detrás da sigla Aa, que significa atividade de água. O mel é um composto de baixa Aa. Alimentos com Aa igual ou superior a 0,85 apresentam uma facilidade para o desenvolvimento de vários microorganismos, entretanto o mel apresenta 0,6 ou menos dessa atividade. Geralmente as bactérias são mais exigentes na quantidade de água do que os fungos para que ocorra o seu desenvolvimento.

Durante o período em que o presente estudo foi realizado, devido às condições climáticas deste estado, houve uma grande variação de temperatura e umidade, o que pode ter afetado as propriedades do mel, visto que esse mel não foi armazenado em temperatura constante. LENGLER (1999) comentou que um fator importante na estocagem do mel é a temperatura, pois as oscilações tanto podem causar mudanças na sua composição física como química. Temperaturas acima de 20°C podem destruir enzimas e o mel torna-se mais escuro. Mesmo no mel cristalizado quando em ambiente com temperatura superior a 20°C a parte superficial pode tornar-se líquida, ocasionando em muitos casos a fermentação. A estocagem deve ocorrer entre 10 e 11°C, em ambiente com umidade relativa do ar abaixo de 60%. O mel com umidade inferior a 17,1% independentemente do grau de contaminação não fermentará em 12 meses. Com umidade de 17,1 a 18% com a presença de até 1000 esporos de levedura por grama de mel também não fermentará por esse período e quando a umidade for superior a 19% com apenas um esporo de levedura haverá fermentação antes dos 12 meses.

As amostras do meio conservante mel foram periodicamente testadas e não foi avaliada a presença de fungos. SCHUCH et al. (2003) realizaram um trabalho que objetivou detectar presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em produtos de um entreposto do interior do Estado do Rio Grande do Sul, para a identificação de possíveis fontes de contaminação e a avaliação da possibilidade da transferência de esporos para colméias de apiários adjacentes a partir de produtos importados contaminados. Foram analisados mel e pólen importados disponíveis no entreposto, favo do ninho (crias, pólen e mel) colhido de uma colméia sadia, mel estocado em um dos apiários e abelhas adultas. Os resultados foram positivos na presença dos referidos esporos em relação ao mel e pólen importados, a três grupos de abelhas adultas e ao mel do favo.

O mel utilizado foi obtido através de árvores silvestres e sendo da procedência de um único produtor, sendo que para a realização do estudo foram necessários dois quilos deste produto. GREENWOOD (1993) relatou que méis oriundos de diferentes floradas possuem maior ou menor grau de ação sobre germes, além de atuar de forma seletiva em alguns casos, não destruindo um agente que o de outra florada destruiria. POSTMES et al. (1993) comentaram ainda que é muito importante o tipo de florada em que o mel foi obtido, sendo de

menor importância o grau de diluição desse material. Em um estudo utilizando o método de diluição em ágar e tendo como agente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, foi considerado que o produto originário de floradas de limeira demonstrou maior e mais ampla atividade bactericida do que aqueles originários de floradas de outras árvores frutíferas e de acácia. Não houve crescimento de nenhum dos microorganismos anteriormente citados quando foi utilizado o mel obtido pela limeira.

O fato de um determinado tipo de mel possuir maior poder antimicrobiano do que o de outra florada é explicado por IOIRISH (1981) e GREENWOOD (1993), que comentaram que essas flores possuem diferentes substâncias antimicrobianas e conforme o tipo de mel a ser produzido pelas abelhas também apresentarão diferentes graus de atividade germicida.

IOIRISH (1981) relatou que o mel preserva os produtos orgânicos da decomposição não somente porque isola do ar ambiente, mas também porque possui ácido fórmico, outro produto derivado da secreção das abelhas. Comentou ainda que foi verificado através de exames laboratoriais que as substâncias bactericidas existentes no mel tinham como origem não apenas o néctar ou pólen de flores, mas também um produto secretado através das próprias abelhas.

Os únicos agentes bacterianos encontrados nas amostras periodicamente enviadas ao exame bacteriológico do mel na presente pesquisa foram bacilos. POSTMES et al. (1993) comentaram que muitas vezes são encontrados bacilos não patogênicos em diferentes tipos de méis, entretanto também é evidenciada, por vezes, a presença de esporos clostridiais que podem vir a causar botulismo e gangrena. Os mesmos autores comentaram ainda que o mel utilizado para propósitos de conservação de tecidos deve ser obtido através de colméias livres de pesticidas e antibióticos, como a tetraciclina, pois estes produtos podem apresentar-se de forma residual nos méis. Também citaram que é importante a remoção de qualquer fração de sangue, pois comprovaram, através de exames laboratoriais, que a adição de 5% de sangue ovino ao mel apresentou como resultado completa inibição da atividade antibacteriana.

Assim como preconizado por MATHEWS & BINNINGTON (2002), o mel utilizado nesse experimento não foi submetido ao processo de pasteurização e nenhum outro tratamento de esterilização, pois segundo os autores tais procedimentos poderiam afetar-lhe suas propriedades antimicrobianas.

Conforme POSTMES et al. (1993), o mel utilizado com propósitos medicinais deve ser sempre submetido à análise microbiológica antes de sua utilização, pois pode conter esporos clostridiais, podendo causar posteriormente botulismo ou gangrena.

Uma alternativa eficiente seria submeter o mel a esterilização mediante radiação gama (CHAPMAN & VILLAR, 1992), o que não afeta sua atividade bactericida (MOLAN & ALLEN, 1996). Neste experimento, porém, optou-se por não esterilizá-lo, para afastar o risco de tornar inativa alguma substância essencial a sua qualidade de composto conservante. Endente-se necessária a realização de estudos para avaliar a conservação de tecido ósseo em mel submetido a esterilização via radiação gama.

Apesar das propriedades antimicrobianas do mel, MSCHIVIDOBADSE (1978), submeteu os implantes ósseos à esterilização utilizando formaldeído diluído na concentração de 1% e posteriormente mantidos em solução contendo 50% de mel. Todavia, tal projeto foi realizado a mais de 25 anos quando as bases científicas acerca das propriedades do mel ainda eram bastante frágeis e, como os implantes foram obtidos em condições não estéreis e eram aplicados em seres humanos, exigiam-se cuidados mínimos de assepsia para não submeter o paciente a riscos possivelmente fatais.

Baseando-se no fato de que houve a presença de agentes infecciosos, ainda que não patogênicos, ossos conservados nesse agente e posteriormente implantados devem ser imersos em substância degermante e os animais receptores necessitam antibioticoterapia. ALIEVI (2006) realizou com sucesso a reconstrução da diáfise femoral de caninos utilizando implantes ósseos corticais conservados em mel por um período de 28 dias e fixados por placas compressivas e parafusos. Em tal estudo foi utilizada antibiótico profilático, pois, conforme SMITH (1998), em todos os procedimentos ortopédicos onde houver material implantado deve ser utilizada tal medicação. A cefalexina foi eleita para este fim devido ao fato de possuir amplo espectro, rápida concentração tecidual máxima e boa penetração óssea, características importantes segundo o autor. Além dessas, também foi considerada sua cômoda via de administração, o longo intervalo entre cada administração e o baixo custo.

O congelamento é um meio de armazenamento amplamente utilizado em Medicina Veterinária no que diz respeito a armazenagem de segmentos ósseos (DUELAND et al., 1989). Apesar disso, o risco da permanência de alguns agentes infecciosos viáveis (bactérias e/ou fungos) quando se utiliza o congelamento como método de conservação é presente (KERVIN et al., 1991). Os resultados obtidos em diferentes estudos têm sido satisfatórios, mas o método exige equipamento especializado para manter a temperatura sempre de forma constante, energia elétrica e ampla área para a permanência dos refrigeradores, o que dificulta sua utilização em hospitais veterinários e em algumas clínicas e hospitais. Por outro lado, a formação de um banco de ossos utilizando o mel como meio de conservação dispensa tais

necessidades, tornando assim a sua utilização muito mais acessível aos profissionais envolvidos com tal tipo de procedimento.

Os recipientes contendo ossos conservados em mel foram mantidos em local com temperatura amena e longe da luz solar direta, porém não houve isolamento total de luz. MATHEWS & BINNINGTON (2002), recomendaram, porém, que haja um bloqueio completo de luz nos frascos contendo os implantes ósseos e que eles sejam mantidos em local com temperatura amena, pois tanto a luz como as altas temperaturas podem afetar as propriedades conservantes do mel

Não houve a manutenção de uma temperatura fixa no atual estudo, visto que a armazenagem ocorreu em temperatura ambiente, o que obviamente permitiu oscilações. GUPTA (1977) avaliou a preservação da pele de cobaias (*Cavia porcellus*) conservadas em mel, autoclavado ou não, à temperatura ambiente ou a 4°C. Ao final de seis semanas, tanto no mel esterilizado quanto naquele que não foi submetido a autoclavagem mantido a 4°C, 90% das amostras encontravam-se adequadamente preservadas. Nas amostras conservadas em temperatura ambiente foi obtido 100% de eficácia. Não foram observados sinais de autólise em nenhuma das amostras, mas elas apresentavam aspecto compacto e denso, o que foi justificado pela ação higroscópica do mel. Apesar de não ser utilizada tal técnica na prática, o autor comentou que o implante, mesmo não sendo material viável, poderia ser comparado a um implante liofilizado, proporcionando cobertura temporária a feridas, prevenido a dor e perda de fluídos e também agindo como agente antimicrobiano.

SUBRAHMANYAM (1993) preservou segmentos de pele em mel não processado, não diluído e estéril em diferentes temperaturas. Um grupo foi mantido em temperatura ambiente e o outro a 4°C. O autor verificou que quando os espécimes eram removidos do meio conservante a consistência era firme e a coloração era amarela escurecida, voltando a coloração e texturas normais após o período de hidratação em solução salina estéril. No presente estudo com ossos também foi possível verificar essas evidências com relação a coloração e textura.

<b>F</b>	<b>ISOLADO</b>	<b>M</b>	<b>ISOLADO</b>	<b>G</b>	<b>ISOLADO</b>
B1	<i>cocus spp.</i>	BM1	<i>bacillus spp.</i>	BG1	Ausente
B2	<i>bacillus spp.</i>	BM2	<i>bacillus spp.</i>	BG2	Ausente
B3	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BM3	<i>bacillus spp.</i>	BG3	Ausente
B4	Ausente	BM4	<i>bacillus spp.</i>	BG4	Ausente
B5	Ausente	BM5	<i>bacillus spp.</i>	BG5	Ausente
B6	Ausente	BM6	<i>bacillus spp.</i>	BG6	Ausente
B7	Ausente	BM7	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BG7	Ausente
B8	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BM8	<i>bacillus spp.</i>	BG8	Ausente
B9	<i>bacillus spp., diplococcus spp.</i>	BM9	<i>bacillus spp.</i>	BG9	Ausente
B10	<i>bacillus spp.</i>	BM10	<i>bacillus spp.</i>	BG10	Ausente
B11	<i>bacillus spp.</i>	BM11	<i>bacillus spp.</i>	BG11	Ausente
B12	<i>bacillus spp.</i>	BM12	<i>bacillus spp.</i>	BG12	Ausente
B13	<i>coccus spp.</i>	BM13	<i>bacillus spp.</i>	BG13	Ausente
B14	Ausente	BM14	<i>bacillus spp.</i>	BG14	Ausente
B15	<i>bacillus spp.</i>	BM15	<i>bacillus spp.</i>	BG15	Ausente
B16	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BM16	<i>bacillus spp.</i>	BG16	Ausente
B17	<i>bacillus spp.</i>	BM17	<i>bacillus spp.</i>	BG17	Ausente
B18	Ausente	BM18	<i>bacillus spp.</i>	BG18	Ausente
B19	Ausente	BM19	<i>bacillus spp.</i>	BG19	Ausente
B20	Ausente	BM20	<i>bacillus spp.</i>	BG20	Ausente
B21	Ausente	BM21	<i>bacillus spp.</i>	BG21	Ausente
B22	Ausente	BM22	<i>bacillus spp.</i>	BG22	Ausente
B23	Ausente	BM23	<i>bacillus spp.</i>	BG23	Ausente
B24	Ausente	BM24	<i>bacillus spp.</i>	BG24	Ausente
B25	Ausente	BM25	<i>bacillus spp.</i>	BG25	Ausente
B26	Ausente	BM26	<i>bacillus spp., proteus spp.</i>	BG26	Ausente
B27	Ausente	BM27	<i>bacillus spp.</i>	BG27	Ausente
B28	Ausente	BM28	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BG28	Ausente
B29	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>	BM29	<i>bacillus spp.</i>	BG29	<i>bacillus spp., coccus spp.</i>

B30	<i>coccus</i> spp.	BM30	<i>bacillus</i> spp.	BG30	<i>coccus</i> spp.
B31	<i>coccus</i> spp.	BM31	<i>bacillus</i> spp.	BG31	Ausente
B32	<i>coccus</i> spp.	BM32	<i>bacillus</i> spp.	BG32	Ausente
B33	Ausente	BM33	<i>bacillus</i> spp.	BG33	Ausente
B34	Ausente	BM34	<i>bacillus</i> spp.	BG34	Ausente
B35	Ausente	BM35	<i>bacillus</i> spp.	BG35	Ausente

Quadro 1 - Os grupos dos ossos examinados a fresco (F), conservados em mel (M) e os ossos conservados em glicerina (G), além dos agentes que foram isolados através dos testes realizados em Agar sangue. Avaliação bacteriológica.

<b>F</b>	<b>ISOLADO</b>	<b>M</b>	<b>ISOLADO</b>	<b>G</b>	<b>ISOLADO</b>
F1	<i>Alternaria</i> spp.	FM1	Ausência	FG1	Ausência
F2	Ausência	FM2	<i>Thermomyces</i> spp.	FG2	Ausência
F3	<i>Penicillium</i> spp.	FM3	Ausência	FG3	Ausência
F4	<i>Fusarium</i> spp.	FM4	Ausência	FG4	Ausência
F5	Ausência	FM5	Ausência	FG5	Ausência
F6	Ausência	FM6	Ausência	FG6	Ausência
F7	Ausência	FM7	Ausência	FG7	Ausência
F8	Ausência	FM8	Ausência	FG8	Ausência
F9	Ausência	FM9	Ausência	FG9	Ausência
F10	<i>Trichoderma</i> spp.	FM10	Ausência	FG10	Ausência
F11	Ausência	FM11	Ausência	FG11	Ausência
F12	Ausência	FM12	fungo fil. s/ identif.	FG12	Ausência
F13	<i>Cladosporium</i> spp.	FM13	Ausência	FG13	Ausência
F14	Ausência	FM14	Ausência	FG14	Ausência
F15	fungo fil. s/ identif	FM15	Ausência	FG15	Ausência
F16	Ausência	FM16	<i>Aspergillus niger</i> .	FG16	Ausência
F17	<i>Phoma</i> spp.	FM17	Ausência	FG17	Ausência
F18	Ausência	FM18	<i>Chaetomium</i> spp.	FG18	Ausência
F19	Ausência	FM19	Ausência	FG19	Ausência
F20	Ausência	FM20	Ausência	FG20	Ausência
F21	Ausência	FM21	Ausência	FG21	Ausência
F22	Ausência	FM22	Ausência	FG22	Ausência
F23	Ausência	FM23	Ausência	FG23	Ausência
F24	Ausência	FM24	Ausência	FG24	Ausência
F25	Ausência	FM25	Ausência	FG25	Ausência
F26	Ausência	FM26	Ausência	FG26	Ausência
F27	Ausência	FM27	Ausência	FG27	Ausência
F28	Ausência	FM28	Ausência	FG28	Ausência
F29	Ausência	FM29	Ausência	FG29	Ausência
F30	Ausência	FM30	Ausência	FG30	Ausência

F31	Ausência	FM31	Ausência	FG31	Ausência
F32	Ausência	FM32	Ausência	FG32	Ausência
F33	Ausência	FM33	Ausência	FG33	Ausência
F34	Ausência	FM34	<i>Syncephalastrum</i> spp.	FG34	Ausência
F35	<i>Rhodotorulla</i> spp.	FM35	Ausência	FG35	Ausência

Quadro 2 - Os grupos dos ossos examinados a fresco (F), conservados em mel (M) e os ossos conservados em glicerina (G), além dos agentes que foram isolados através dos testes realizados em Ágar *Saboraud*. Avaliação micológica.

#### 4.4 Avaliação estatística

##### 4.4.1 Ensaio biomecânicos

No teste t pareado foi estipulado que o grupo onde os ossos foram mantidos em glicerina possuíam as mesmas dimensões volumétricas do grupo onde o mel foi utilizado, pois não houve diferença estatística nestas medidas, visto que eram ossos contralaterais de um mesmo animal. Dessa forma foi possível comparar de forma confiável as médias de carga (N) que cada grupo suportou. A média do grupo da glicerina foi de 7027,7N, com desvio padrão de 2630,7, para mais ou para menos e a do mel foi 6547,0N, com desvio padrão de 2256,7, para mais ou para menos. Isto significa que houve diferença significativa, assim sendo, são dois grupos diferentes estatisticamente, pois o valor obtido foi  $P = 0,0155$ . Levando-se em consideração que qualquer resultado onde  $P$  for menor que 0,05 representa resultado significativo, foi possível verificar que os ossos conservados em glicerina suportaram um esforço maior que os ossos mantidos em mel.

No teste de regressão linear também foi evidenciado que o grupo da glicerina foi mais eficiente na manutenção da resistência do que o agente mel. Isto pode ser evidenciado pela Tabela 2 e pela Figura 3, onde a reta azul (glicerina) se encontra sobre a reta vermelha (mel), demonstrando que existe diferença significativa da relação volume *versus* resistência a favor do grupo onde os ossos foram mantidos em glicerina a 98%. A presente avaliação também demonstrou que quanto proporcionalmente maior for o volume estudado, sempre a glicerina irá suportar maior esforço compressivo axial.

Tabela 2 -  $r$  significa o coeficiente de regressão,  $r^2$  coeficiente de regressão linear,  $y = a + bx$  equação de regressão linear,  $a$  é a constante onde a reta encosta em  $N$  e  $b$  é o slope, que é a inclinação das retas no gráfico, onde mostra que a glicerina foi mais eficiente que o mel

CONSERVANTE	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Y = a + b . x</b>
MEL	50	0,74	0,55	$Y = 3878 + 2,407.x$
GLICERINA	50	0,78	0,60	$Y = 3767 + 2,490.x$

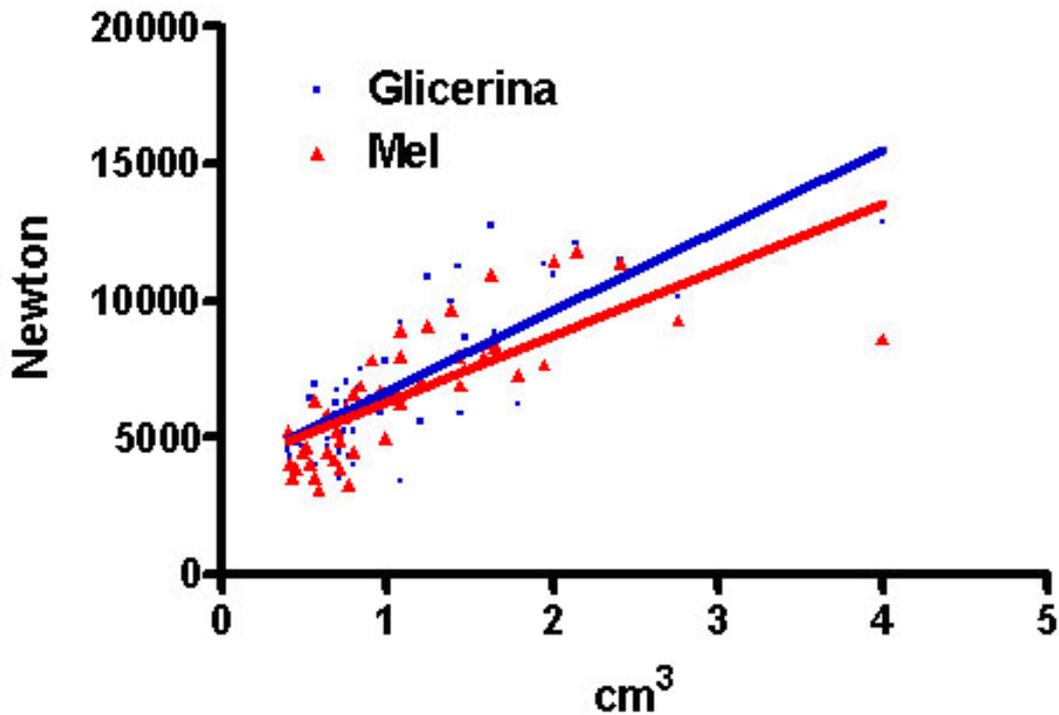


Figura 3 – Gráfico da regressão linear entre mel e glicerina em relação ao volume *versus* resistência dos ossos

#### 4.4.2 Avaliação bacteriológica

Na avaliação estatística dos achados bacteriológicos foi utilizado como parâmetro o teste Qui-quadrado. Foi verificado que a glicerina demonstrou ser um agente bactericida muito mais eficaz que o mel, pois apresentou um  $P < 0.0001$ , sendo que abaixo de  $P < 0,01$  já se considera extremamente significativa esta diferença. Tal comparação pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado do Teste Qui-quadrado demonstrando que a glicerina foi mais eficiente que o mel na inibição do crescimento de bactérias ( $P < 0.0001$ ).

AGENTE	CRESCIMENTO	AUSÊNCIA	TOTAL
GLICERINA	2 (3%)	33 (47%)	35 (50%)
MEL	35 (50%)	0 (0%)	35 (50%)
TOTAL	37 (53%)	33 (47%)	70 (100%)

#### 4.4.3 Avaliação micológica

Na avaliação estatística dos achados micológicos também foi utilizado como parâmetro o teste Qui-quadrado. Foi verificado que a glicerina demonstrou ser um agente fungicida mais eficaz que o mel, pois apresentou um  $P < 0.0317$ , sendo que abaixo de  $P < 0,05$  já se considera significativa esta diferença. Tal comparação pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado do Teste Qui-quadrado demonstrando que a glicerina foi mais eficiente que o mel na inibição do crescimento de fungos ( $P < 0.0317$ ).

AGENTE	CRESCIMENTO	AUSÊNCIA	TOTAL
GLICERINA	0 (0%)	35 (50%)	35 (50%)
MEL	5 (7%)	30 (43%)	35 (50%)
TOTAL	5 (7%)	65 (93%)	70 (100%)

## 5 CONCLUSÕES

- Com relação aos ensaios biomecânicos compressivos foi possível concluir que a glicerina é estatisticamente mais eficiente que o mel, pois foram comparados ossos provenientes de mesmos animais, mesmas dimensões e ainda assim o primeiro agente manteve fêmures mais íntegros. Por outro lado, foi verificado que não é possível comparar de forma biomecânica ossos provenientes de animais diferentes, devido as diferenças raciais e individuais citadas no estudo;
- A prensa compressiva utilizada foi eficiente na obtenção dos valores encontrados, concordando com os modelos descritos na literatura. Também o parâmetro estipulado para as medições ósseas demonstrou ser eficiente nos grupos anteriormente citados, visto que não houve diferenças significativas de volume entre amostras contralaterais de um mesmo animal;
- Na avaliação bacteriológica a glicerina foi superior como agente bactericida. O mel, apesar de possuir agentes não patogênicos, não é eficiente nesse aspecto e não pode ser recomendado como agente conservante sem prévio processamento;
- Na avaliação micológica, embora o crescimento fúngico não fosse tão grande, a glicerina eliminou todos os agentes estudados, fato não acontecido com o mel;
- Para finalizar, ficou demonstrado que as coletas de segmentos ósseos devem ser sempre através de modo asséptico, pois por menor que seja a porcentagem, sempre há o risco de permanecerem patógenos. Os meios devem sempre ser testados antes da coleta e o material a ser implantado deve ser analisado para que não haja dúvida da presença de patógenos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOV, V.G.; MARKICHEVA, N.A. Therapeutic lamellar keratoplasty with honey preserved material. **Ophthalmol Zh.**, v. 38, n. 2, p. 81-3, 1983.

ALIEVI, M. M. **Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstituição de falha óssea diafisária em fêmur de cães.** 2006. 88f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006

ALMEIDA, E.L. **Reconstrução do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9% - Estudo experimental.** 1996. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Curso de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ALEXANDRE, J. W. Use of combination of cortical bone allografts and cancellous bone autografts to replace massive bone loss in fresh fractures and selected nonunions. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 19, n. 5, p. 671-678, 1983.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C.R. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos.** Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia - Universidade Estadual Paulista de Botucatu, 1992. p.33-39.

AMENDOLA, G.F. **Correção de defeito ósseo femural em cães utilizando implante ósseo cortical homólogo conservado em mel.** 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, 2001.

AN, Y.H.; DRAUGHN, R.A. **Mechanical testing of bone and bone-implant interface.** 2004. Capturado em 16 janeiro 2005. Online. Disponível na Internet: <http://www.musc.edu/orthores/book-an2/html>.

ANGERAMI, S. Porque o mel se cristaliza. **Revista Brasileira de Apicultura**. n. 5, p. 14-5, set/out, 1991.

BALL, S.T. et al. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. **Clin Orthop**, v. 418, p. 246-52, Jan 2004.

BANSE, X. et al. Comparative left-right mechanical testing of cancellous bone from normal femoral heads. **J Biomech**, v. 29, n. 10, p. 1247-53, 1996.

BARIZON, E. et al. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcoólica, mel e mel com própolis, **Revista da Universidade de Franca**, ed. Especial, p. 51, agosto, 1999.

BAYRAKTAR, H.H. et al. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. **J Biomech**, v. 37, p. 27-35, 2004.

BECKMANN, D. et al. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA. 2005. Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria, 2005. **Anais...**

BENEVENIA, J. et al. Mechanical environment affects allograft incorporation. **J Biomed Mater Res**, v. 53, n. 1, p. 67-72, 2000.

BENTO, D.A. **Análise de resistência mecânica em implantes de osso - um enfoque numérico e experimental**. 2003. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2003.

BERGMAN, A. et al. Acceleration of wound healing by topical application of honey. **Am J Surg**, v. 145, n. 3, 1983.

BINI, F. et al. Microtensile measurements of single trabeculae stiffness in human femur. **J Biomech**, v. 35, p. 1515-19, 2002.

BLOM, A.W. et al. Subsidence in impaction grafting: the effect of adding a ceramic bone graft extender to bone. **Proc Inst Mech Eng [H]**, v. 216, n. 4, p. 265-70, 2002.

BLOOMBERG, M.S. et al. Frozen diaphyseal bone allografts combined with external pin splintage in small animal orthopedic surgery. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 20, p. 393-402, 1984.

BOOTHE, H.W. Materiais de sutura, adesivos teciduais, grampeadores e grampos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia em pequenos animais**. Philadelphia: W.B. Saunders. 1995. cap. 19, p. 253-63.

BRIANZA, S.Z.M. et al. Cross-sectional geometrical properties of distal radius and ulna in large, medium and toy breed dogs. **J Biomech**, v. 39, p. 302-11, 2006.

BURCHARDT, H. et al. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs. **J Bone Joint Surg**, v. 60, n. 8, p. 1082-90, 1978.

BURSTEIN, A.H. et al. The effect of screw holes. **J Bone Joint Surg**, v. 54, p. 1143-1156, 1972.

CAMARGO, O.P. et al. Análise comparativa da resistência de fêmures de cães após a confecção de janelas ósseas circular e quadrada. **Acta Ortop Bras**, v. 10, n. 2, p. 41-7, 2002.

CASCIO, B.M. et al. A mechanical comparison and review of transverse, step-cut, and sigmoid osteotomies. **Clin Orthop**, n. 411, p. 296-304, Jun 2003.

CASTANIA, V.A. **Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, em cães - análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias**. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, 2002.

CASTRO, A.U. **Uso tópico do mel de abelha (*Apis mellifera*), da oxitetraciclina e da hidro cortisona, combinadas e isoladas, na reparação de feridas cutâneas, por segunda intenção, em coelhos.** 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

CAVASSANI, M.M. et al. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%. Estudo experimental em ratos. **Ci Rural**, v. 31, n. 3, p. 445-8, 2001.

CHAPMAN, P.G.; VILLAR, R.N. The bacteriology of bone allografts. **J Bone Joint Surg**, v. 74B, n. 8, p. 398-9, 1992.

CLARO NETO, S. **Caracterizações físico-químicas de um poliuretano derivado do óleo de mamona utilizado para implantes ósseos.** 1997. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

CONNOLLY, J.F. et al. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J Bone Joint Surg**, v. 71A, n. 5, p. 684-91, 1989.

CONRAD, E.U. et al. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. **Clin Orthop**, v. 290, p. 279-84, 1993.

CONTESINI, E.A. et al. **Palatoplastia com implante de cartilagem da pina auricular conservada em glicerina a 98%, após indução experimental de fenda palatina em cães.** In: CONGRESSO DA ANCLIVEPA, 2001, Fortaleza, Ce. **Anais...** Fortaleza: ANCLIVEPA-Ce, 2001. 296p. p. 165.

COOK, R.B. et al. Using peripheral quantitative ultrasound to predict Fracture Mechanics and compressive properties at the head of the femur. **J Biomech**, v. 39, p. 9, 2006.

COOPER, R.A. et al. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **J R Soc Med**, v. 92, n. 6, p. 283-5, 1999.

COOPER, R.A. et al. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. **Journal Appl Microbiol**, v. 93, p. 857-63, 2002.

CORNU, O. et al. Impaction bone grafting with freeze-dried irradiated bone. Part II. Changes in stiffness and compactness of morselized grafts: experiments in cadavers. **Acta Orthop Scand**, v. 74, n. 5, p. 553-8, Oct 2003.

CORONADO, G.S. et al. Effects of a 98% solution of glycerol or sterilization with ethylene oxide on FeLV in bone allografts and effects on bone incorporation of allografts in cats. **Am J Vet Res**, v. 6, n. 61, p. 665-71, Jun 2000.

COSTA, J.L. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placas e parafusos de aço inoxidável da série 304 – Estudo experimental em cães.** 1996. 100f. Dissertação (Mestrado) - Jaboticabal: UNESP. 1996.

CRANE, E. **O livro do mel.** São Paulo: Nobel, cap. 5, 1983, 226 p.

CRIPTON, P.A. et al. A minimally disruptive technique for measuring intervertebral disc pressure in vitro: application to the cervical spine. **J Biomech**, v. 34, p. 545-49, 2001.

CUNHA, M.R.R. **Propriedades biomecânicas do tecido ósseo metafisário do rádio-distal: estudo comparativo com o íliaco e o escafoíde.** 1998. 66f. Dissertação, (Mestrado em Ortopedia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CURCELLI, E.C. **Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura de tíbia do rato: avaliação clínica, anatomopatológica e biomecânica.** 1999. 140f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 1999.

DALECK, C.R. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ci Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-83, 1992.

DATTA, A. et al. A comparison of the viscoelastic properties of bone grafts. **Clin Biomech**, v. 21, p. 761-66, 2006.

DEL CARLO, R.J. et al. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **R Bras Ci Vet**, v. 6, n. 3, p. 121-26, set-dez 1999.

DELMAS, C. et al. Survey of honey for Clostridium botulinium in eastern france. **Food Microbiol**, v.11, p. 515-8, 1994.

DISEGI, J.A.; ESCHBACH, L. Stainless steel in bone surgery. **Injury**, v. 4, n. 31, p. 2-6, Dec 2000.

DUARTE, L.S; SCHAEFFER,L. Compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. **Rev Bras Eng Bioméd**, v. 16, n. 2, p. 89-93, mai/ago 2000.

DUNLOP, D.G. et al. Techniques to improve the shear strength of impacted bone graft: the effect of particle size and washing of the graft. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, n. 4, p. 639-46, Apr 2003.

DUELAND, R.T. et al. Cryopreserved intercalary bone allografts: early experience (1975-1980) in eight canine cases. **J Am An Hosp Assoc**, v. 25, n. 3, p. 305-16, 1989.

DZIEDZIC, G.A.; STACHOWICZ, W. Sterilization of tissue alligrafts. In: PHILIPS, G.; VERSEN, R.; STRONG, D.M. **NATHER advances in the banking**. London: World Scientific, 1997. P. 261-73.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. **Br J Surg**, v. 75, p. 679-81, 1988.

EFEM, S.E.E. et al. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. **Infection**, v. 20, n. 4, p. 227-9, 1992.

EFEM, S.E.E. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. **Surgery**, v. 113, n. 2, p. 200-4, 1993.

EPARI, D.R. et al. Mechanical conditions in the initial phase of bone healing. **Clin Biomech**, v. 21, p. 646-55, 2006.

FARIA, R.X. **Isolamento do ambiente de lesão óssea por membrana biológica heterógena, conservada em mel ou glicerina.** 2003. 65f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

FAROUK, A. et al. Studies on sudanese bee honey; laboratory and clinical evaluation, **Internat J of Crude Drug Res**, v. 26, n. 3, p. 161-8, 1988.

FASIKA, O.M. et al. Oral cavity onlay grafting using foam impregnated with honey - a case report. **Afr J Med Sci**, v. 25, n. 3, p. 297, 1996.

FEIGHAN, J.E. et al. Biologic and biomechanic evaluation of posterior lumbar fusion in the rabbit - The effect of fixation rigidity. **Spine**, v. 20, n. 14, p. 1561-7, 1995.

FERREIRA, A.B.H. **Novo Aurélio século XXI: o dicionário da língua portuguesa.** 3.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999. 2128p.

FRANCISCO, M.M.S **Aloenxerto de cartilagem auricular conservado em glicerina em defeito palatino produzido experimentalmente em cães.** 2001. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

FRANÇA, A.F. Estudo experimental da vertebroplastia: análise biomecânica e segurança da técnica. **Acta Ortop Bras**, v. 10, n. 1, p. 31-47, 2002.

FRIEDELANDER, E.G. Current concepts review bone grafts. **J Bone Joint Surg**, v. 60-A, n. 5, p. 786-91. 1987.

GAIGA, L.H. **Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em glicerina a 98% ou mel em pombos domésticos (*Columba livia*).** 2002. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

GARG, A.K. Augmentation grafting of the maxillary sinus for placement of dental implants: anatomy, physiology, and procedures. **Implant Dent**,; v. 8, n. 36-46, 1999.

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 Cir Bras**, v. 17, n. 4, p. 242-6, 2002.

GOH, J.C.H. et al. Biomechanical study on femoral neck fracture fixation in relation to bone mineral density. **Clin Biomech**, v. 10, n. 6, p. 304-8, 1995.

GOLDBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts e allografts. **Clin Orthop**, n. 225, p. 90-1, 1987.

GREENWOOD, D. Honey for superficial wounds and ulcers. **Lancet**, v. 341, p. 90-1, 1993.

GRIBEL, V.N.; PASHINSKII, V.G. The antitumor properties of honey. **Vopr Onkol**, v. 30, n. 6, p. 704-9, 1990.

GONÇALVES, A.L. et al. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Himenoptera: apidae, meliponini). **Arq Inst Biol**, v. 72, n. 4, p. 455-9, 2005.

GUPTA, M. Preservation of split skin grafts in honey: a preliminary study. **Indian J Surg**, v. 11, p. 591-8, 1977.

HADDOCK, S.M. et al. Similarity in the fatigue behavior of trabecular bone across site and species. **J Biomech**, v. 37, p. 181-7, 2004.

HALASZ, J.; KOVACS, A. Biomechanical study on bone grafts harvested from cadavers. **Fogorv Sz**, v. 93, n. 5, p. 149-54, May 2000.

HARKESS, J.W. et al. “Princípios das fraturas e luxações” in: **Fraturas em adultos**. São Paulo, Manole, cap. 1, p. 1-178, 1993.

HART, M.M. et al. Bone banking: a cost effective method for establishing community hospital bone bank. **Clin Orthop Res**, v. 206, p. 295-300, 1984.

HOFMANN, C. et al. Influence of processing and sterilization on the mechanical properties of pins made from bovine cortical bone. **Unfallchirurg**, v. 6, n. 106, p. 478-82, Jun 2003.

HU, Y.S. et al. Biomechanical study on the composite of allogenic decalcified bone matrix gelatin and bone cement. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 16, n. 2, p. 97-9, Mar 2002.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biologia e biomecânica das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998, v. 2, cap. 120, p. 1893-1984.

IOIRISH, N. **As abelhas, farmacêuticas com asas**. São Paulo: Mir, 1981. Cap. 3, 229 p.

JOHNSON, A.L. et al. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. **Am J Vet Res**, v. 46, n. 5, p. 1050-56, 1985.

JOHNSON, A.L. et al. Effect of ethylene oxide sterilization and storage conditions on canine cortical bone harvested for banking. **Vet Surg**, v. 16, n. 6, p. 418-22, 1987.

JOHNSON, A.L.; STEIN, L.E. Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. **Am J Vet Res**, v. 49, n. 1, p. 101-5, 1988.

JOHNSON, A.L. et al. Evaluation of canine cortical bone graft remodelling. **Vet Surg**, v. 21, n. 4, p. 293-8, 1992.

KADOYA, K. et al. Biomechanical and morphologic evaluation of a three-dimensional fabric sheep artificial intervertebral disc; *in vitro* and *in vivo* analysis. **Spine**, v. 14, n. 26, p. 1562-9, Jul 2001.

KANEKO, T.S. et al. Mechanical properties, density and quantitative CT scan data of trabecular bone with and without metastases. **J Biomech**, v. 37, p. 523-30, 2004.

KANG J.S.; KIM N.H. The biomechanical properties of deep freezing and freeze drying and their biomechanical changes after in-vivo allograft. **Yonsei Med J**, v. 36, p. 332-335, 1993.

KARACHALIOS, T. et al. Influence of orthotopic placement on the incorporation and mechanical strength of a loaded structural cortical graft: an experimental study in rabbits. **Orthopedics**, v. 23, n. 8, p. 815-21, Aug 2000.

KERVIN, S.C. et al. **Bone grafting and banking. Compendium continuing education for the practicing veterinarian.** v. 13, n. 10, p. 1558-63, 1991.

KLOKKEVOLD, P.R. et al. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res**, v. 4, n. 12, p. 350-7, Aug 2001.

KOH, J.L. et al. The effect of graft height mismatch on contact pressure following osteochondral grafting: a biomechanical study. **Am J Sports Med**, v. 32, n. 2, p. 317-20, Mar 2004.

KOMANDER, A. Influence of preservation on some mechanical properties of human haversian bone. **Mater Med Pol.** v. 8, p. 13, 1976.

KRAUSPENHAR, L.C. et al. **Viabilidade bacteriana no meio de conservação glicerina 98% do tendão calcâneo comum.** Santa Maria, 2002, 18p. Seminário (Disciplina Pós-Graduação) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

KRAUSPENHAR, L. C. **Viabilidade bacteriana na glicerina a 98% e em implantes de tendão calcâneo comum de cães.** 2003. 31f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

KRISCHAK, G.D. et al. Influence of preoperative mechanical bone quality and bone mineral density on aseptic loosening of total hip arthroplasty after seven years. **Clin Biomech**, v. 18, p. 916-23, 2003.

KROL, W. et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforsch**, v. 43, n. 5, p. 607-9, 1993.

KUMAR, A. et al. Efficacy of some indigenous drugs in tissue repair in buffaloes. **Indian Vet J**, v. 70, p. 42-4, 1993.

LENHARO, A. **Análises biomecânica e histológica da interface de implantes osseointegrados submetidos a carga mastigatória imediata em mandíbulas de cães**. 2003. 154f., Tese (Doutorado em Odontologia), Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Araçatuba, 2003.

LENGLER, S. **Apicultura - produtos, manejo, nutrição e sanidade**. 2.ed. Santa Maria: UFSM, 1999.

LERNER, A. et al. Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? **J Biomech**, v. 31, p. 327-35, 1998.

LEVY JÚNIOR, N.C. **Atividade antimicrobiana de méis e própolis de *apis mellifera* e *meliponinae* brasileiros**. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 1997.

LI, Y. et al. The experimental study of histomorphology and biomechanical of cortical strut allograft in proximal femoral. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, v. 2, n. 42, p. 107-9, Jan 2004.

LIU, R.W. et al. Computational simulation of axial dynamization on long bone fractures. **Clin Biomech**, v. 20, p. 83-90, 2005.

LUCAS, S.S. et al. Avaliação biomecânica de três métodos de conservação de ossos para enxerto. In: **Anais do VI Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão e da IV Mostra de iniciação Científica da UNICRUZ**, Universidade de Cruz Alta, 2001.

LUCCI, L.M.D. **Estudo in vitro da descontaminação da esclera humana**. 1998. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Oftalmológica) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

MACEDO, C.A.S. et al. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Rev Bras Ortop**, v. 4, n. 9/10, Set/Out, 1999.

MALININ, T. et al. Effects of freeze drying on the femoral strength and notch sensitivity of human femoral diaphysis. **ORS 35th Annual Meeting**, Las Vegas, Nevada, 6-9 Feb, 1989.

MANKIN, H.J. et al. Clinical experience with allograft implantation. **Clin Orthop**, n. 174, p. 69-6, 1983.

MARKEL, M.D. Mechanical properties of long bones in dogs. **Am J Vet Res**, v. 55, n. 8, p. 1178-83, 1994.

MARTINS, C.A.Q. **Estudo da resistência de ossos submetidos a processo de reparação induzidos por biomateriais e enxerto homólogo**. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, p. 638-46, 1998.

MATHEWS, K.A.; BINNINGTON, A.G. Wound management using honey. **Sm an Exot**, v. 24, n. 1, p. 53-60, 2002.

MEAKIN, J.R. et al. Replacing the nucleus pulposus of the intervertebral disc. **Clin Biomech**, v. 16, p. 560-65, 2001.

MEARS, D.C. The tissues of the musculoskeletal system; In: **Materials and orthopaedic surgery**, Baltimore, Williams & Wilkins, 1979, p. 762.

MELO, E.G. et al. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tíbia de cão. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 50, n. 4, p. 385-94, 1998.

MELLO, L.C.P.; GOMIDE, L.B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Rev Nutr**, v. 18, n. 5, p. 593-600, 2005

MENDES, B.A.; COELHO, E.M. Considerações sobre características de mel de abelhas - análises e critérios inspeção. **Informe Agropecuário**, v. 9, n. 106, p. 56-7, 1983.

MIORIN, P.L. **Composição química e atividade antibacteriana do mel e do própolis de *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* contra *Staphylococcus aureus***. 2003. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MITAMURA, M. et al. Effects of a new clerodane diterpeneoid isolated from propolis on chemically induce skin tumors in mice. **Anticancer Res**, v. 16, n. 5A, p. 2669-72, 1996.

MOHAN, M. et al. Preservation of cornea in honey. **Indian J Ophtalmol**, v. 28, n. 5A, p. 2669-72, 1996.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v. 73, p. 5-28, 1992.

MOLAN, P.C.; ALLEN, K.L. The effect of gama-irradiation on the antibacterial activity of honey. **J Pharm Pharmacol**, v. 48, p. 1206-9, 1996.

MORGAN, E.F.; KEAVENY, T.A. Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. **J Biomech**, v. 34, p. 567-77, 2001.

MSCHIVIDOBADSE, V.M.; Allogenic transplantation of sterilized bones and halfjoints. **Zentralbl Chir**, v. 103, n. 7, p. 1138-48, 1978.

MULLER, M. et al. Fatigue damage in cortical bone detected using nonlinear ultrasound. **J Biomech**, v. 39, p. 9, 2006.

MÜLLER, S.S. et al. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortop Bras**, v. 12, n. 4, p. 197-204, out./dez, 2004.

MUSCHLER, G.F.; LANE, J.M. Spinal fusion: principles of bone fusion. In: ROTHMAN, R. H.; SIMEONE, F. A., **The spine**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 63-72.

NAM, E.K. et al. Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model. **Am J Sports Med**, v. 32, n. 2, p. 308-16, Mar 2004.

NETO, J.M.C. et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBCAV, 2000. 96p. p. 104.

OKAMOTO, T. et al. Homogeneous implant in rat tibias of matrix preserved in 98% glycerin: histomorphologic study. **Braz Dent J**, v. 11, n. 2, p. 79-87, 2000.

OLIVEIRA, E.G. **Qualidade microbiológica e físico-química do mel da abelha tíuba (*Melípona compressipes fasciculata*) produzido no Estado do Maranhão**. 2004. 83f. Dissertação (Mestrado em Química dos Produtos Naturais) - Universidade Federal do Maranhão, Piauí, 2004.

OLIVEIRA, V.A. **Emprego de pericárdio homólogo preservado em glicerina a 98%, no reparo cirúrgico de traquéia de eqüinos (traqueoplastia)**. 2002. 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ORR, T.E. et al. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 1953-9, Jul 2001.

OSZMANSKY, J.; LEE, C.Y. Inhibition of polyphenol oxidase activity browning by honey. **Agric Food Chem**, v. 8, n. 10, p. 1892-5, 1990.

OUYANG, J. et al. Biomechanical characteristics of human trabecular bone. **Clin Biomech**, v. 12, n. 7/8, p. 522-24, 1997.

PACELLI, L.L. et al. A biomechanical analysis of donor-site ankle instability following free fibular graft harvest. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, n. 4, p. 597-603, Apr 2003.

PATY, E. et al. Un cas de botulisme chez un nourrisson de 11 mois. **Arch Fr Pediatr**, v. 44, p. 129-30, 1987.

PAULO, N. M. **Estudo comparativo entre membrana amniótica de equino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas experimentais no cão**. 1997. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PELKER R.R. et al. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. **J Orthop Res**, v. 1, p. 405-411, 1984.

PENHA, D.S.G. **Ensaio biomecânico comparativo em ossos de ratos normais e pinealectomizados**. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2004.

PEREIRA, P.C.M. et al. Use of honey as nutritional therapeutic supplement in the treatment of infectious diseases. **J Venom Anim Toxins**, v. 1, n. 2, 1995.

PÉRIÉ, D. et al. Confined compression experiments on bovine nucleus pulposus and annulus fibrosus: sensitivity of the experiment in the determination of compressive modulus and hydraulic permeability. **J Biomech**, v. 38, p. 2164-71, 2005.

PHILLIPS, L. et al. Cortical bone allografts. **Comp Cont Educ Pract Vet**, v. 10, n. 10, p. 1167-76, 1988.

PIERMATEI, D. L.; FLO, G. L. Enxertos ósseos. In: **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 3, p.139-145, 1999.

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

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

PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante de dura-máter homóloga conservada em glicerina a temperatura ambiente. **Rev Assoc Med Bras**, v. 17, , n. 8, p. 263-78, 1971.

PINTO JÚNIOR, H.S. **Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães.** 1990. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 1990.

PINTO JÚNIOR, H.S. **Utilização de enxerto ósseo homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães.** 1995. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

PINTO JÚNIOR, H.S. et al. Enxertos ósseos homólogos preservados em glicerina a 98%. Técnica de enxertia e avaliação clínico-cirúrgica. **A Hora Veterinária**, n. 92, p. 72-6, 1996.

PIPIA, K.I. Homografting using blood vessels preserved in a honey solution. **Eksp Khir Anestesiol**, v. 13, n. 3, p. 19-22, 1968.

POSTMES, T. et al. Honey for wounds, ulcers and skin graft preservation. **Lancet**, v. 341, n. 8847, p. 756-57, 1993.

RABELO, R.E. **Emprego do centro tendíneo diafragmático homólogo conservado em glicerina a 98% e em glutaraldeído a 4% como implante para hernioplastias umbilicais recidivantes em bovinos.** 2003. 72f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

RAGAZANI, A.V.F. **Avaliação microbológica do mel comercializado no estado de São Paulo e outros estados brasileiros.** 2004. 38f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Jaboticabal, São Paulo, 2004.

RAMASAMY, J.G.; AKKUS, O. Local variations in the micromechanical properties of mouse femur: The involvement of collagen fiber orientation and mineralization. **J Biomech**, v. 39, p. 1-9, 2006.

RAPILLARD, L. et al. Compressive fatigue behavior of human vertebral trabecular bone. **J Biomech**, v. 39, p. 2133-39, 2006.

RANDALL, R.L. et al. Sequential dependence of freeze-drying and irradiation on biomechanical properties of rat bone. **Am J Orthop**, v. 31, n. 3, p. 129-34, Mar 2002.

REILLY, G.C.; CURREY, J.D. The effects of damage and microcracking on the impact strength of bone. **J Biomech**, v. 33, p. 337-43, 2000.

REMIGER, A.R. et al. The torsional strength of bones with residual screw holes from plates with unicortical and bicortical purchase. **Clin Biomech**, v. 12, n. 1, p. 71-7, 1997.

REYES, E.E.F. **Implante de pericárdio de equino preservado em glicerina a 98% como substituto biológico de segmento de tendão do músculo extensor ulnar do carpo em cães (*Canis familiaris*). Estudo experimental.** 1999. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

REYNOLDS, F.C. et al. Clinical evaluation of the merthiolate bone bank and homogenous bone graft. **J Bone Jt Surg**. v. 33, p. 873-7, 1951.

ROBINSON, M.C. et al. Structural characteristics of impaction allografting for revision total hip arthroplasty. **Clin Biomech**, v. 20, p. 853-5, 2005.

ROE, S.C. et al. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. **Am J Vet Res**, v. 49, n. 6, p. 873-7, 1988.

SABATIER, S. et al. Identificatinon of flavonoids in sunflower honey. **J Food Sci**, v. 57, n. 3, p. 773-4, 1992.

SAMPAIO, R.L. **Avaliação clínica, histopatologia e imunohistoquímica de córneas tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina. estudo experimental em coelhos.** 2004. 212f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2004.

SCHENA, C.J.; MCCURNING, D.M. The use of fresh cortical and cancellous allografts in the repair of fractured femur in a dog: a case report. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 19, p. 252-88, 1983.

SCHENA, C.J. et al. Segmental freeze-dried and fresh cortical allografts in the canine femur. II- a sequential histological comparison over a one-year time interval. **J Am An Hosp Assoc**, v. 21, p. 193-205, 1984.

SCHENEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 68-73, 1984.

SCHIMIDT, S.S. et al. **Biomechanical evaluation of fracture fixation methods.** 1994. Capturado em 18 maio 2003. Online. Disponível na Internet: <http://www.guide.stanford.edu/publication/dev7.html-7k>.

SCHUCH, D.M.T. et al. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. **Pesq Agropec Bras**, v. 38, n. 3, p. 441-4, mar. 2003.

SEDLIN, E.D.; HIRSCH, C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. **Acta Orthop Scand**, v. 37, p. 29-48. 1966.

SICA, D.G. Ensaio biomecânicos de flexão e cisalhamento em disjunções do arco zigomático, utilizando osteossíntese clássica ou adesivo butil-2-cianoacrilato, em cães. **Acta Cir Bras**, v. 13, n. 4, p. 248-255, Out-Dez 1998.

SILVA, A.V.; VOLPON, J.B. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortop Bras**, 2004, v. 12, n. 1, p. 22-31, Jan-Mar 2004.

SLATTER, D.H. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. 2 v. 2380 p.

SMITH, M.M. Infecções ortopédicas. In: SLATTER, D.H. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. v. 2, cap. 126, p. 1996-2005.

SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica 2**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. 554p.

SOUZA, S.A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. São Paulo: Edgar Blücher, 235p., 1974.

STAINKI, D.R. et al. Emprego de enxerto biológico na reconstrução de ferida experimental no esôfago cervical de ovinos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 53, n. 4, p. 424-30, 2001.

STEVENSON, A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998a, v. 2, cap. 127, p. 2006-17.

SUBRAHMANYAM, M. Storage of skin grafts preserved in honey. **Lancet**, v. 341, Jan., p. 63-4, 1993.

TANG, T. et al. Incorporation of cortical allograft: a biomechanical study. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, v. 36, n. 5, p. 272-4, May 1998.

THAMAZ, L. et al. Fournier's gangrene: Report of thirty-three cases and a review of the literature. **Int J Urol**, v. 13, p. 960-7, 2006.

TSHAMALA, M. et al. Biomechanical properties of ethilene oxide sterilized and cryopreserved cortical bone allografts. **Vet Comp Orthop Traumat**, v. 7, n. 1, p. 25-30, 1994.

TURNBULL, P.C.; KRAMER, J.M. Bacillus. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6ed. Massachssets: Congress, p. 349-56, 1995.

URBAN, R.M. et al. Effects of altered crystalline structure and increased initial compressive strength of calcium sulfate bone graft substitute pellets on new bone formation. **Orthopedics**, v. 27, n. 1, p. 113-8, Jan 2004.

VAN BOERUM, D.H. et al. Rotational stability of a modified step-cut for use in intercalary allografts. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, n. 6, p. 1073-8, Jun 2003.

VARDI, A. et al. Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection. **Acta Pediatric**, v. 87, p. 429-32, 1998.

VASTEL, L. et al. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. **Biomaterials**, v. 25, n. 11, p. 2105-10, May 2004 .

VILLEMURE, I. et al. Non-uniform strain distribution within rat cartilaginous growth plate under uniaxial compression. **J Biomech**, v. 39, p. 1-8, 2006.

WACHTER, N.J. et al. Prediction of strength of cortical bone *in vitro* by microcomputed tomography. **Clin Biomech**, v. 16, p. 252-56, 2001.

WADSWORTH, P.L.; HENRY, W.B. Diaphyseal allografts in the repair of long bones fractures. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 17, n. 4, p. 525-34, 1981.

WAGNER, S.D. et al. Failure of ethylene oxide-sterilized cortical allografts in two dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 30, p. 181-9, 1994.

WEIGEL, P.J. Bone grafting. In: BOJRAB, J. M. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. cap. 98. p. 678-85.

WHEELER, D.L. et al. Biomechanical evaluation of retrieved massive allografts: preliminary results. **Biomed Sci Instrum**, n. 37, p. 251-6, 2001.

WHITE, J.W. Physical characteristics of honey. In: **Honey, a comprehensive survey**. London: Heineman, cap. 6, p. 207-39, 1975.

WIDJAIA, W.; HARTUNG, C. Biomechanical comparison of different fixations of femur-interlocking-nails. **Clin Biomech**, v. 16, n. 8, p. 702-5, Oct 2001.

WILLIX, D.J. et al. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of *bacteria* activity of *manuka* honey and other honey. **J Appl Bacteriol**, v. 73, p. 388-94, 1992.

YAMAMOTO, N. et al. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. **J Orthop Sci**, v. 8, n. 3, p. 374-80, 2003.

ZHANG, G. et al. A comparative study between axial compression and lateral fall configuration tested in a rat proximal femur model. **Clin Biomech**, v. 20, p. 729-35, 2005.

ZILIOTTO, L. et al. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 2, p. 107-115, mar-abr 2003.

ZULMA, A.; LULAT, A. Honey - a remedy rediscovered. **J R Soc Med**, v. 82, p. 384-5, 1989.