

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE OSTEOTÉCNICA: PROPOSIÇÃO DE PROTOCOLO DETALHADO PARA PRÁTICA LABORATORIAL APROPRIADA

COMPARISON OF OSTEOTECHNICAL METHODS: PROPOSAL OF DETAILED PROTOCOL FOR APPROPRIATE LABORATORY PRACTICE

Joana Luzia Costa Batista Netta¹, Ramon Marques Macedo², *Alan Nilo da Costa²

¹Universidade Federal de Goiás. ²Instituto de Biologia, Universidade Federal de
Uberlândia, Brasil.*alan.costa@ufu.br

RESUMO

Para preparação de ossos existem diversos métodos, mas nem todos trazem boa relação custo-benefício ou o detalhamento adequado para sua correta execução. Assim, os objetivos deste trabalho foram testar a eficiência de três métodos de osteotécnica e estabelecer um protocolo simples e eficaz. Os métodos escolhidos para ensaio diferiam na existência de etapa inicial de neutralização em NaClO; no uso de fervura com NaHCO₃, imersão em NaOH ou em sabão para a etapa de remoção; e na imersão em H₂O₂ em diferentes concentrações na etapa de maceração. Cada procedimento foi avaliado segundo facilidade de execução, necessidade de repetição, tempo gasto e qualidade da peça obtida. Os procedimentos com melhores resultados foram usados para formular um protocolo detalhado, no qual ajustamos a concentração dos reagentes e o tempo de exposição. Nos três métodos, os diversos procedimentos testados variaram em eficiência. A fervura em soda-caustica foi ineficaz, exigindo repetições para resultados minimamente satisfatórios. A imersão em sabão foi o melhor procedimento para deterioração da pele e da musculatura. A maceração em água-oxigenada nas concentrações e tempo sugeridos nos métodos não gerou a limpeza e clareamento esperados. O protocolo que propomos, combinando os procedimentos mais eficientes com o devido ajuste na concentração de reagentes e no tempo de exposição, foi testado e apresentou ótimos resultados, com redução dos custos e possibilitando uma prática laboratorial mais eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: zoologia, coleção científica, estruturas anatômicas, osteologia, preparação de esqueletos.

ABSTRACT

There are several methods for preparing bones, but not all of them provide a good cost-benefit ratio or adequate detailing for correct execution. Thus, the objectives of this work were to test the efficiency of three osteotechnic methods and establish a simple and effective protocol. The methods chosen for testing differed in the

existence of an initial neutralization step in NaClO; when using boiling with NaHCO₃, immersion in NaOH or soap for the removal stage; and immersion in H₂O₂ at different concentrations in the maceration stage. Each method was assessed based on its ease of execution, necessity for repetition, time requirements, and the quality of the resulting specimen. The procedures with the best results were used to formulate a detailed protocol, in which we adjusted the concentration of reagents and exposure time. Across the three methods, the different procedures tested varied in efficiency. Boiling in caustic soda was ineffective, requiring repetitions for minimally satisfactory results. Immersion in soap was the best procedure for deteriorating skin and muscles. Maceration in hydrogen peroxide at the concentrations and time suggested in the methods did not generate the expected cleaning and whitening. The protocol we propose, combining the most efficient procedures with the appropriate adjustment in the concentration of reagents and exposure time, was tested and presented excellent results, reducing costs and enabling more efficient laboratory practice.

KEYWORDS: zoology, scientific collection, anatomy, osteology, skeletons preparation.

INTRODUÇÃO

A elaboração de coleções biológicas é uma atividade característica de Museus de História Natural e de inúmeras outras instituições de ensino e pesquisa. A reunião de exemplares animais, inteiros ou em partes, constitui uma coleção zoológica. Armazenado, ordenado e devidamente preservado, este acervo representa parte da diversidade animal fóssil e atual, sendo uma fonte importante de informações para biólogos, ambientalistas e outros pesquisadores⁽¹⁻³⁾. Além dos dados usuais de morfologia e genética, estas coleções são fontes importantes de informações que permitem inferências, relativamente precisas, sobre a ecologia e evolução das espécies, ajudando a elucidar os processos de surgimento, desenvolvimento e diversificação dos animais⁽⁴⁻⁶⁾.

Dada a sua relevância, a preparação de coleções zoológicas é uma atividade antiga, existindo inúmeras e diferentes técnicas aplicáveis para diversos fins, tanto para peças derivadas de animais invertebrados quanto para vertebrados. Em geral, os métodos utilizados para preparação das estruturas esqueléticas e articulares de vertebrados são denominados de osteotécnicas^(7,8). Na literatura especializada pode se encontrar diferentes métodos, mas que seguem mais ou menos as mesmas etapas: neutralização, remoção dos tecidos superficiais,

maceração dos tecidos aderidos aos ossos, cocção e finalização. As maiores divergências existentes entre os métodos ocorrem nas etapas de remoção e maceração, nas quais podem ser utilizados diferentes processos químicos, biológicos ou mecânicos, aplicados isoladamente ou combinados^(9,10). A escolha do método adotado vai depender dos recursos financeiros e do espaço disponível.

Os protocolos de osteotécnica que combinam procedimentos e reagentes de baixo custo podem reduzir o tempo de preparação e possibilitar o desenvolvimento da atividade em laboratórios multifuncionais (ensino/pesquisa). Os métodos mais simples e menos dispendiosos para preparação de peças ósseas empregam a remoção mecânica dos tecidos superficiais com instrumentos cirúrgicos e a maceração, propriamente dita, em água pura ou combinada com substâncias químicas com capacidade de dissolver elementos não ósseos. Contudo, mesmo estas técnicas podem trazer certos problemas que restringem o seu uso em determinadas situações. Como exemplo, a remoção e maceração em água pura demandam muitas semanas e gera grande liberação de odores desagradáveis, não devendo ser realizadas em recintos fechados ou em laboratórios de uso coletivo.

Mesmo os diversos métodos e protocolos relacionados ao uso de reagentes são imprecisos ou inconsistentes, poucas vezes trazendo informações sobre a concentração a ser utilizada e o tempo de exposição das peças^(7,10-13). Tal imprecisão dificulta a execução dos métodos e pode comprometer a qualidade dos resultados, principalmente quando se considera a variação que pode existir no material osteológico a ser processado em função do tipo da peça e das dimensões do animal, além dos recursos e do tempo disponível para preparação. Com isso, torna-se necessário certo período de adequação do protocolo adotado à realidade do laboratório. Tudo isso transforma a prática da osteotécnica – relativamente simples quando comparada a outros procedimentos – em uma atividade difícil e desagradável para o ambiente laboratorial.

Os múltiplos usos impostos aos laboratórios das instituições de pesquisa e ensino exigem a adoção de práticas laboratoriais eficazes e que mantenham

salubres as condições do ambiente de trabalho. Portanto, o aprimoramento dos métodos para preparação de material osteológico, com a disponibilização de protocolos mais bem descritos, pode facilitar a formação de coleções zoológicas. Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram (i) testar a eficiência de três métodos de osteotécnica para a preparação de crânios de mamíferos de pequeno e médio porte e (ii) estabelecer, com base nos resultados, um protocolo simples e adequado ao ambiente laboratorial, que otimize o uso de reagentes e o tempo gasto na preparação das peças.

METODOLOGIA

Para realização do presente estudo foram utilizadas carcaças de 13 espécies de mamíferos de pequeno e médio porte disponíveis no Laboratório Integrado de Zoologia, Ecologia e Botânica (LIZEB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizada em Catalão, Goiás, Brasil. As carcaças – provenientes de animais mortos por atropelamento – foram doadas ao LIZEB entre março e dezembro de 2014 pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Catalão e pela empresa administradora de rodovias MGO-Rodovias. Os espécimes utilizados foram das espécies bugio-preto *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), ouriço-cacheiro *Coendou prehensilis* (Linnaeus, 1758), gambá-de-orelha-branca *Didelphis albiventris* (Lund, 1840), tatu-peba *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758), furão-pequeno *Galictis cuja* (Molina, 1782), capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766), raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842), veado-mateiro *Mazama americana* (Erxleben, 1777), veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* (Fisher, 1814), tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus, 1758), quati *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) e tamanduá-mirim *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus, 1758). Nos ensaios foram usados apenas os crânios dos espécimes, que após processados, foram adicionados à coleção zoológica do LIZEB.

Doze crânios foram processados seguindo os três diferentes métodos de osteotécnica selecionados (Tabela 1), que divergiam principalmente na metodologia utilizada para remoção dos tecidos (pele e musculatura) aderidos aos ossos e do material encefálico.

Tabela 1. Métodos selecionados para preparação de 12 crânios de mamíferos no Laboratório Integrado de Ecologia, Zoologia e Botânica da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão. Os métodos foram comparados em termos de eficiência de execução, tempo total gasto e qualidade da peça obtida. NaClO: hipoclorito de sódio; NaOH: hidróxido de sódio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; NaHCO₃: bicarbonato de sódio. Concentração dos reagentes indicada entre parênteses.

Etapa	Método I¹	Método II²	Método III³
Neutralização	1. Imersão em NaClO ^{*,**} 2. Imersão em álcool (70%) ^{**}	1. Sem procedimento	1. Sem procedimento
Remoção	3. Três imersões em NaOH (10%) ^{**} 4. Intercalar imersões com remoção dos tecidos com pinça e bisturi	2. Imersão em água morna e sabão por 24 h 3. Retirar tecidos com pinça e bisturi	2. Imersão em água fervente e NaHCO ₃ [*] por 10-60 min 3. Retirar tecidos com pinça e bisturi
Maceração e cocção	5. Três imersões em H ₂ O ₂ ^{*,**}	4. Imersões em H ₂ O ₂ (12%) por 24 h 5. Raspagem com espátula	4. Quatro imersões: NaClO ^{*,**} , água, H ₂ O ₂ (6-9%) ^{**} , água
Finalização	6. Secar 7. Aplicar verniz incolor	6. Secar 7. Aplicar verniz incolor	5. Secar 6. Aplicar verniz incolor

1. Pauli (2013)⁽¹⁴⁾; 2. Vieira (2009)⁽¹⁵⁾; 3. Benedito-Cecílio (2005)⁽¹¹⁾;

*sem concentração especificada;

**sem intervalo de tempo especificado.

Em cada método foram processados quatro crânios de diferentes espécies, sendo atribuída uma nota (nota -1 = ruim, nota 0 = regular e nota 1 = bom) para o resultado obtido em cada etapa do método. A nota atribuída levou em conta a facilidade de execução, a necessidade de repetição do procedimento, o tempo total gasto e a qualidade da peça obtida. A partir dos resultados do teste dos três métodos, foi formulado um pré-protocolo com as etapas e os procedimentos que apresentaram os melhores resultados. A eficiência deste foi testada utilizando-se

nove crânios. Na realização da etapa de maceração e cocção do novo protocolo, os crânios foram igualmente divididos e imersos em três concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (0,5 – 1,0 – 1,5%) para determinação da menor concentração necessária para clareamento da peça. Também foram testados três intervalos de imersão da peça (12 – 24 – 48h) em cada concentração, com a retirada dos crânios ao final de cada intervalo de 12h para avaliação do grau de maceração alcançado e determinação do menor tempo necessário para limpeza total e clareamento. Ao final dos testes, um protocolo detalhado foi formulado com as concentrações de reagentes mais adequadas.

RESULTADOS

Os três métodos de osteotécnica testados, em suas diferentes etapas, apresentaram grande variação na facilidade de execução e na necessidade de repetição de procedimentos, que refletiram no tempo total gasto e na qualidade da peça obtida. A etapa de neutralização, presente no método I, proporcionou relativo conforto na preparação e execução das etapas seguintes. Isto ocorreu porque a imersão da peça em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 15min reduziu muito a liberação de odores desagradáveis. Contudo, o procedimento seguinte, de imersão em álcool não eliminou o cheiro de hipoclorito de sódio da peça, como proposto. No método II, com início direto na etapa de remoção, foi necessária a adição de hipoclorito de sódio (1%) à solução de sabão, para redução dos odores liberados pela peça durante as 24h de duração do procedimento. A fervura em solução de bicarbonato de sódio, primeiro procedimento executado no método III, excluiu a necessidade da etapa de neutralização.

Na etapa de remoção, a imersão das peças em solução de hidróxido de sódio ou à fervura em solução de bicarbonato de sódio (procedimentos executados nos métodos I e III, respectivamente) foram consideradas ineficientes. A realização de três imersões de 10 min dos crânios em solução de hidróxido de sódio facilitou apenas a remoção da pele e outros tecidos mais superficiais. Além disso, este procedimento tornou o tecido muscular “quebradiço” e de difícil

retirada com pinça e bisturi. Mesmo após ser repetido por um tempo maior (15 min), o resultado obtido foi o mesmo. A fervura com bicarbonato de sódio facilitou a remoção dos tecidos moles, mas também foi necessária a repetição do procedimento mais uma vez para a total retirada da musculatura. A imersão em solução de sabão (método II) foi o procedimento mais eficiente para remoção. Após o período de 24 h na solução, a pele e a musculatura foram facilmente removidas dos ossos, sendo gastos cerca de 10 min para limpeza de cada crânio com instrumentos cirúrgicos. Contudo, foi necessária a adição de hipoclorito de sódio (1%) à solução de sabão para neutralizar os odores produzidos durante o período de imersão das peças.

O procedimento de imersões alternadas em hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e água limpa (método III), por 10 min cada, não foi suficiente para maceração e clareamento dos crânios. As três imersões rápidas, também por 10 min cada, apenas em peróxido de hidrogênio (método I) também não foi eficaz. Já a imersão prolongada (24 h) em peróxido de hidrogênio (método II) possibilitou total maceração dos ligamentos e fragmentos de musculatura ainda aderidos diretamente aos ossos. Ao final desse procedimento, os crânios também estavam suficientemente clareados, podendo ser lavados e finalizados. Nos três métodos foram realizados os mesmos procedimentos para finalização das peças, consistindo na secagem e aplicação de verniz incolor. A secagem completa em laboratório à temperatura ambiente demandou um longo período, cinco dias ou mais, que variou bastante em função do tamanho da peça.

Com os procedimentos que apresentaram os melhores resultados foi elaborado um protocolo detalhado de osteotécnica, com o mínimo uso de reagentes, para laboratórios multifuncionais (Tabela 2). Neste protocolo foi incluída a neutralização como primeira etapa, que além de reduzir de imediato os odores desagradáveis, permitiu a limpeza e desinfecção das peças para o manuseio; o hipoclorito de sódio (1%) foi adicionado à solução de sabão utilizada no primeiro procedimento da etapa de remoção também para redução de odores. O tempo de imersão em solução de sabão, adequado para a deterioração da pele e

musculatura para a remoção variou entre 24-48 h, dependendo da espessura dos tecidos aderidos aos ossos. A maceração foi iniciada com a imersão da peça em solução de peróxido de hidrogênio em baixa concentração (0,5%) para forçar o desprendimento dos restos maiores e mais resistentes de tecidos musculares, seguindo-se de uma limpeza mais minuciosa. No terceiro procedimento da maceração, a solução de peróxido de hidrogênio em concentração de 1,5% apresentou o melhor resultado, entre as concentrações testadas. O tempo ideal de imersão da peça nesta solução para a adequada limpeza e clareamento das estruturas ósseas variou entre 24-48 h, dependendo do tamanho da peça e da quantidade de tecido ainda aderido. Todas as soluções, tanto para a limpeza quanto para dissolução os tecidos, foram filtradas com peneira após sua utilização, para recuperar pequenos ossos desprendidos e para separar o material sólido para correto descarte, evitando-se o entupimento e a produção de odores no encanamento do laboratório.

Tabela 2. Proposta de protocolo de osteotécnica, formulado com procedimentos simples e eficazes, para preparação de peças ósseas em laboratórios multifuncionais. NaClO: hipoclorito de sódio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Concentração dos reagentes indicada entre parênteses.

Etapa	Descrição do procedimento
Neutralização	1. Imersão em hipoclorito de sódio (1%) por 15 min para redução de odores *
Remoção	2. Imersão por 24-48 h em solução de sabão * 3. Adição de hipoclorito de sódio (1%) a cada 24 h para redução de odores 4. Imersão em água limpa para remoção do sabão por 10 min * 5. Remoção do material aderido aos ossos com pinça e bisturi
Maceração e cocção	6. Imersão H ₂ O ₂ (0,5%) por 3-4 h 7. Filtrar solução das imersões para recuperar ossos desprendidos (ex. dentes) * 8. Remoção do restante do material aderido aos ossos com pinça e bisturi 9. Imersão em H ₂ O ₂ (1,5%) por 24-48 h 10. Filtrar a solução para recuperar ossos desprendidos *
Finalização	11. Secar em estufa a 40° C por 24-48 h ** 12. Aplicar verniz incolor

* Descartar filtrado sólido no lixo para evitar entupimentos e odores desagradáveis na tubulação do laboratório;

** Secar ossos articulados na sua posição original para não dificultar a sua montagem devido às pequenas deformações que podem advir da secagem.

DISCUSSÃO

Historicamente, poucas são as espécies de vertebrados existentes que têm a sua anatomia completamente conhecida⁽¹⁶⁾. As coleções zoológicas representam uma ferramenta importante e necessária para ampliação dos estudos e aquisição deste conhecimento. No que concerne à preparação de peças ósseas para coleções, existem diversos métodos de osteotécnica, mas nem todos trazem uma boa relação custo-benefício. Além disso, a escassez de detalhes na descrição dos métodos exige um laborioso processo de adequação dos procedimentos aos recursos e espaço disponível. Entre os três métodos testados (Tabela 1) para a preparação de crânios, dois apresentaram diversos procedimentos com resultados insatisfatórios, exigindo-se inúmeras repetições a fim de se alcançar um melhor resultado. O protocolo proposto, combinando os procedimentos testados mais eficazes, com a adição de certos processos e os devidos ajustes na concentração de reagentes e no tempo de exposição das peças, possibilitou uma prática laboratorial mais rápida e econômica, de fácil execução e com ótimos resultados.

Independente dos procedimentos escolhidos para remoção e maceração dos tecidos moles, recomendamos a adoção da etapa de neutralização para iniciar o preparo das peças. Espécies silvestres podem ser reservatório e portadores de zoonoses^(17,18). Sendo assim, as carcaças destes animais podem oferecer certo risco de contaminação por estas doenças, além de outras relacionadas com matéria animal em decomposição, durante o processo de preparação⁽⁷⁾. A imersão em hipoclorito de sódio, além de cortar quase totalmente a emissão de odores desagradáveis durante o preparo das etapas iniciais de osteotécnica, possibilita relativa desinfecção da peça. Este procedimento, combinado com o uso de equipamentos de proteção e os processos adequados de limpeza, pode contribuir para redução do risco de contaminação do técnico e do laboratório⁽¹⁹⁾.

Para a etapa de remoção, os procedimentos que empregam fervura ou imersão em água – com ou sem adição de reagentes de fácil aquisição no comércio – são indubitavelmente métodos simples. O uso de substâncias

especiais, como enzimas digestivas⁽²⁰⁾ ou processos biológicos, como larva de insetos⁽²¹⁾ podem ser dispendiosos e de difícil acesso. Contudo, a fervura em solução de bicarbonato de sódio ou a imersão em hidróxido de sódio não tiveram o resultado esperado. A simples imersão da peça em solução de sabão e hipoclorito de sódio (1%) resultou no maior desprendimento da tela subcutânea e dos músculos aderidos aos ossos, facilitando o descarte com os instrumentos cirúrgicos. O uso deste procedimento com marcas de sabão com ação de limpeza intensa, principalmente por trabalharem com pH mais baixo, pode melhorar a etapa de remoção, sem elevar significativamente os custos⁽⁹⁾.

Além de eficiente na remoção, a imersão continuada em água por longo período (20 dias ou mais) possibilitaria a completa deterioração dos tecidos moles e limpeza dos ossos^(9,22). Contudo, a maceração realizada com solução de reagentes com capacidade de dissolver elementos não ósseos oferece melhor relação custo-benefício por reduzir o tempo de preparo. A imersão da peça em solução de peróxido de hidrogênio, como no protocolo proposto, permitiu a rápida dissolução dos ligamentos e músculos e o clareamento dos ossos. Este procedimento pode apresentar um custo elevado, quando se usa uma alta concentração de reagente (6-12%), conforme sugerido na literatura para acelerar o processo^(9,11,23). A imersão em soluções de baixa concentração de peróxido de hidrogênio (0,5 e 1,5%) intercaladas com a remoção final do excesso de tecido aderido, como realizada no protocolo proposto, substituiu o uso de altas concentrações e resultou na completa limpeza e clareamento dos ossos. Além da redução dos custos, as concentrações mais baixas utilizadas evitam a corrosão das peças.

CONCLUSÃO

Em geral, as instituições de ensino e pesquisa possuem recursos financeiros e espaço limitados, sendo necessário controlar os gastos e aperfeiçoar o uso de seus laboratórios. Para tanto, a adoção de métodos eficientes e de baixo

custo são necessários. Neste contexto, nosso protocolo de osteotécnica pode facilitar, ou mesmo viabilizar, a prática de preparação de ossos para coleções zoológicas com fins didáticos e científicos. Primeiro, porque congrega técnicas simples e eficientes, entre diversas opções testadas e devidamente comparadas. Segundo, descreve em detalhes os passos, com a concentração dos reagentes e o tempo de exposição das peças aos mesmos. Tal detalhamento é relevante porque exclui a necessidade do teste e adequação dos seus procedimentos, sendo está uma atividade inerente na adoção de algum outro protocolo disponível na literatura para a prática de osteotécnica. Além de facilitar a prática, reduzindo custos e o tempo de execução, as estruturas ósseas produzidas com esse protocolo apresentaram qualidade semelhante ou superior àquela alcançada com outros métodos.

REFERÊNCIAS

- (1) Zaher, H; Young, PS. 2003. As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. *Ciência e Cultura*. 55 (3): 24–26.
- (2) Bisbal, F. 2013. Uso de museos y colecciones en los estudios de vertebrados en Venezuela. *Interciencia*. 38 (12): 870–873.
- (3) Shultz AJ, Adams BJ, Bell KC, Ludt WB, Pauly GB, Vendetti JE. 2021. Natural history collections are critical resources for contemporary and future studies of urban evolution. *Evol Appl*. 14: 233–247. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.13045>.
- (4) Hildebrand, M; Goslow, G. 2006. *Análise da Estrutura dos Vertebrados*. 2. ed. São Paulo: Atheneu.
- (5) Marroig, G; Cheverud, JMA. 2001. Comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution*. 55(12): 2576–2600.
- (6) Hilton, EJ; Watkins-Colwell, GJ; Huber, SK. 2021. The Expanding Role of Natural History Collections. *Ichthyology & Herpetology*. 109: 379–391. DOI: <https://doi.org/10.1643/t2020018>.

- (7) Auricchio, P; Salomão, MDG. 2002. Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. São Paulo: Aurja: Instituto Pau-brasil de História Natural.
- (8) Dall’Olio, AJ. 2002. Técnicas de taxidermia e osteotécnica. São Paulo: LEGNAR Informática & Editora Ltda.
- (9) Silveira, MJ; Teixeira, GM; Oliveira, EF. 2008. Análise de processos alternativos na preparação de esqueletos para uso didático. Acta Scientiarum - Biological Sciences. 30 (4): 465–472.
- (10) Torrijos, JSS; González, GLS; Martínez, LASN; Medina, GM, Valencia-Caballero, L. 2023. Methodological Proposal for the Adequate Use of the Osteotechnics Technique. Int. J. Morphol. 41(5):1281-1287.
- (11) Beneditto-Cecilio, E. 2005. Coleta e preparação de material zoológico. Maringá: Universidade Estadual de Maringá.
- (12) Khan, MSI; Chowdhury, MM; Rahman, MM; Suvo, MSH.; Begum, MR. 2013. Preparation of Indian Lion (*Leo panthera*) Skeleton for Exhibition at Chittagong Zoo Keywords : Introduction. Journal of Veterinary Anatomy. 6: 77–80.
- (13) Villarroel, GMA & Troncoso, FNA. 2017. Combination of Osteotecnia and Preservation of Muscles in Unique Assembly of *Canis lupus familiaris*. Int. J. Morphol., 35(1):351-356.
- (14) Pauli, PT; Reinke, MD; Fortunatt, A; Luca, AS. 2013. Preparação de coleção para o acervo didático do laboratório de Zoologia , campus Juína - MT. In: Anais da II Jornada científica do IFTM - Campus Juína. Juína: Instituto Federal do Mato Grosso. 1–8.
- (15) Vieira, LF; Silva, FM; Sena, SS; Lima, RN. 2009. Produção didática de vertebrados: osteotécnica. In: Anais dos IV Congresso de Pesquisa e Inovação de Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. Belém: CONNEPI. 1–6.
- (16) Liem, KF; Bemis, WE; Walker, WF; Grande, L. 2014. Anatomia funcional dos vertebrados. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning.
- (17) Ávila-Pires, FD. 1989. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. Cadernos de Saúde Pública. 5(1): 82–97.
- (18) Soare, C; McNeilly, TN; Seguino, A. 2021. A review of potential risk factors linked to shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in wild deer populations and the practices affecting the microbial contamination of wild deer carcasses

with enteric bacteria. Food Control. 127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108128>.

(19) Sangioni, LA; Pereira, DIB; Vogel, FSF; Botton, SA. 2013. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. *Ciência Rural*. 43(1): 91–99.

(20) Baker, P; Davis, S; Payne, S; Revill, M. 2003. On prepraing animal skeletons: a simple and effective method. *International Council for Archaeozoology*. 4(1) :4–15.

(21) Covrel, C; Cipriano, VB; Rueff-Barroso, CR; Bittencourt, AS. 2011. Preparação de esquelos pela digestão de Dermetes: uma técnica eficiente, fácil e barata. *Journal of Morphological Science*.

(22) Nunes, DP; Perônico, C. 2003. Implantação e proposta de informatização da coleção osteológica de referência do Laboratório De Zoologia e Anatomia Comparada do Unileste-MG. 1–6.

(23) Vieira, LF; Silva, FM; Sena, SS; Lima, RN. 2009. Produção didática de vertebrados: osteotécnica. In: *Anais dos IV Congresso de Pesquisa e Inovação de Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica*. Belém: CONNEPI. 1–6.