

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – DARCY RIBEIRO

LARISSA PIM CALABREZ

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE PELE DE RÃ-  
TOURO (*Rana catesbeiana*) CONSERVADA PARA UTILIZAÇÃO COMO  
BIOMATERIAL

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

2021

LARISSA PIM CALABREZ

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE PELE DE RÃ-  
TOURO (*Rana catesbeiana*) CONSERVADA PARA UTILIZAÇÃO COMO  
BIOMATERIAL

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Sanidade Animal.

ORIENTADORA: Professora Paula Alessandra Di Filippo

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

2021

LARISSA PIM CALABREZ

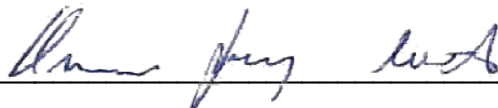
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE PELE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) CONSERVADA PARA UTILIZAÇÃO COMO BIOMATERIAL

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Sanidade Animal.

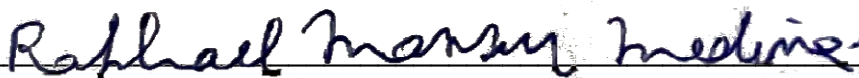
BANCA EXAMINADORA:



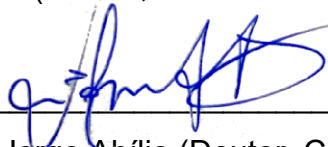
Dr<sup>a</sup> Rachel Bittencourt Ribeiro Rodrigues (Doutora, Ciência Animal, UENF) – UNESA



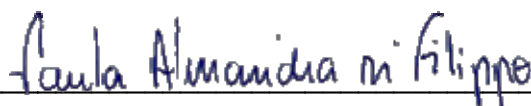
Dr. Hassan Jerdy Leandro (Doutor, Ciência Animal, UENF) – UENF



Dr. Raphael Mansur Medina (Doutor, Ciência Animal UENF) – Universidade Iguazú



Prof. Dr. Edmundo Jorge Abílio (Doutor, Cirurgia Gerl UFRJ) - UENF



Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Paula Alessandra Di Filippo (Doutora – Cirurgia Veterinária, UNESP) –

UENF

(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sem Ele não teria nunca chegado até aqui.

À minha avó Marlene, pelo incentivo de sempre, tenho certeza que nada do que aconteceu até hoje foi por acaso, sei que fez o melhor por mim sempre, e que mesmo estando em outro plano, está sempre comigo, me apoiando em todas as minhas escolhas como sempre fez em vida.

À minha mãe Denise, por todas as dificuldades enfrentadas para que eu chegasse até aqui e pelo incentivo para que eu sempre siga em frente.

Ao meu amigo Guilherme por ser meu ouvinte, companheiro de perrengues, de comemorações, de alegrias e tristezas, de vida! Por fazer com que esses dois anos se tornassem mais fáceis de viver.

À minha família do coração: Juninho, Nath e Beto, por terem me mostrado que a felicidade está nas coisas simples, por recarregarem minhas baterias quando eu mesma pensei que não conseguiria mais. Mesmo tendo sido nesse final, foi no período mais difícil e estressante que vocês apareceram e me mostraram o verdadeiro significado daquela minha frase: “E ta tudo bem!”, ou pelo menos, “Vai ficar tudo bem!”

Aos amigos do “Deus me livre de fofoca” pela ajuda de nos momentos de perrengue, pelos encontros, pelos momentos em que eu só queria largar tudo e encontrar com vocês para esquecer os problemas e rir um pouco. Por fazerem esse período se tornar bem mais leve!

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Paula Alessandra Di Filippo, por aceitar me orientar, pelo incentivo e pela paciência. Obrigada pela oportunidade e por toda a bagagem que você contribuiu para que eu adquirisse nesse período.

Ao meu coorientador e orientador de vida, Prof. Edmundo Jorge Abílio. Por despertar em mim o amor pela carreira acadêmica. Eu nem sei como agradecer por tudo o que o senhor já fez e por toda a sua contribuição na minha carreira profissional. Muita gratidão por tudo o que já vivemos e que ainda vamos viver!

Aos membros da banca Rachel Bittencourt Ribeiro Rodrigues, Hassan Jerdy Leandro, e Raphael Mansur Medina, por aceitarem contribuir com o meu trabalho disponibilizando seu tempo e conhecimento. Em especial ao Hassan por ter ajudado também no experimento, dando sempre idéias e críticas construtivas e disponibilizando seu tempo para analisar e fotografar tantas lâminas.

Aos professores chefes dos laboratórios de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho e Sanidade Animal (LSA) Prof. Olney Mota, por disponibilizarem as instalações e insumos dos laboratórios que coordenam, bem como equipe e bolsistas para que o experimento fosse adiante. Em especial ao Prof. Eulógio por todas as dicas, ensinamentos, conversas e apoio durante este período e pela amizade.

À enfermeira do hospital veterinário e segunda mãe, Marília, por estar sempre pronta para ajudar nos experimentos, na vida, em tudo o que for preciso. Por ser uma mãezona que está sempre cuidando de mim!

Às colegas Nayara, Maria Luiza e Lara por disponibilizarem do seu tempo para me ajudar com o experimento. Pelas dicas, pelo imenso aprendizado que tive com vocês todas, e por sempre estarem dispostas a tirar minhas dúvidas e ajudar no que precisei.

Aos técnicos do laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), que auxiliaram na confecção das lâminas, me ensinando também o processo. Foi um aprendizado que valeu muito a pena.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por ser morada, por ser o local onde descobri uma vocação e algo que quero seguir para o resto da vida e por todo o conhecimento aqui adquirido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio à pesquisa concedido.

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE PELE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) CONSERVADA PARA UTILIZAÇÃO COMO BIOMATERIAL

O uso de membranas biológicas na rotina médico veterinária tem evoluído com o passar dos anos. Dentro deste nicho, o uso de peles como a pele de rã em curativos biológicos tem sido visado considerando seus bons resultados em terapias. A fim de avaliar a viabilidade da conservação da pele de rã para posterior uso como membrana biológica, o presente trabalho caracterizou o tecido nos aspectos histológico e microbiológico. Foram coletadas 16 peles de rã-touro as quais foram, em função do método de conservação, subdivididas em dois grupos com 8 peles cada, a saber o grupo GC, submetido ao congelamento em freezer a  $-4^{\circ}$ , em solução de glicerina a 20%, e o grupo GG, conservado em glicerina a 98%. As peles foram analisadas em cinco tempos, sendo eles: A fresco (T0), 30 dias (T30), 60 dias (T60), 90 dias (T90) e 120 dias (T120) de conservação. A análise microbiológica se deu por cultivo de fragmentos de pele em meios de crescimento e posteriormente em placas com meios de cultura. Já a análise histológica se deu pela observação do tecido em microscópio óptico. A análise dos dados se deu de forma comparativa. Em todos os tempos analisados em ambos os tratamentos, não houve crescimento bacteriano ou fúngico. Sob o ponto de vista histológico, a estrutura da pele e o arranjo de colágeno mantiveram-se íntegros, com resultados similares em todos os tempos e meios de conservação. Conclui-se que, ambos os tratamentos são eficientes, sendo capazes de manter as características morfofuncionais do tecido, e ainda o mantendo livre de agentes contaminantes por 120 dias.

Palavras chave: membranas biológicas, tecido, conservação.

## ABSRTACT

### MICROBIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FROG (*Rana catesbeiana*) SKIN CONSERVED FOR USE AS BIOMATERIAL

The use of biological membranes in the veterinary medical routine has evolved over the years. Within this niche, the use of skins like frog skin in biological dressings has been targeted in view of their good results in therapies. In order to evaluate the feasibility of conserving frog skin for later use as a biological membrane, the present work characterized the tissue in the histological and microbiological aspects. 16 bullfrog skins were collected which, depending on the conservation method, were subdivided into two groups with 8 skins each, being the GC group, subjected to freezing at  $-4^{\circ}$  freezer, in 20% glycerin solution and the GG group, preserved in 98% glycerin. The skins were analyzed in five stages, being: Fresh (T0), 30 days (T30), 60 days (T60), 90 days (T90) and 120 days (T120) of conservation. The microbiological analysis was carried out by culturing skin fragments in growth media and then in plates with culture media. Histological analysis was performed by observing the tissue under an optical microscope. Data analysis took place in a comparative way. At all times analyzed in both treatments, there was no bacterial or fungal growth. From the histological point of view, the structure of the skin and the arrangement of collagen remained intact, with similar results in all times and means of conservation. It is concluded that both treatments are efficient, being able to maintain the morphofunctional characteristics of the tissue, and still keeping it free of contaminating agents for 120 days.

Keywords: biological membranes, tissue, therapy.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografia evidenciando a região da epiderme da pele de rã Touro. Pode-se observar o estrato córneo (\*), camada espinhosa (>), camada basal ( $\beta$ ) e melanóforos (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 40x).  
..... 11
- Figura 2: Fotomicrografia evidenciando as camadas da derme: estrato esponjoso (\*) e estrato compacto (>). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 20x).  
..... 12
- Figura 3: Fotomicrografia evidenciando as glândulas alveolares. Glândula serosa (seta) e glândula mucosa (<). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 20x).  
..... 12
- Figura 4: Fotomicrografia da glândula granular. Pode-se observar as estruturas específicas: Células de musculatura lisa (\*), conteúdo granular eosinofílico ( $\beta$ ), camada de células cúbicas (<), ducto (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).  
..... 13
- Figura 5: Fotomicrografia da glândula mucosa. Pode-se observar as estruturas específicas: Camada de células cúbicas (\*), conteúdo basofílico (>), ducto (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).  
..... 14
- Figura 6: Fotomicrografia evidenciando toda a extensão da pele de rã Touro, em destaque a camada EK (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 4x).  
..... 15
- Figura 7: Obtenção das peles de rã touro: Peles recém coletadas, evidenciando a porção ventral (esquerda) e dorsal (direita). Fonte: Arquivo pessoal.  
..... 27

Figura 8: Preparo das peles. A) Massagem em solução de clorexidine degermante a 2 %, por 5 minutos. B) Molho em solução de clorexidine por 30 minutos. Fonte: Arquivo pessoal.....27

Figura 9: Acondicionamento das peles em seus respectivos meios. Potes de tampa vermelha correspondendo ao Grupo Congelamento e potes de tampa preta correspondendo ao Grupo Glicerina. A imagem também evidencia a coleta dos fragmentos já imersos em formol 10% dos respectivos indivíduos. Fonte: Arquivo pessoal.....28

Figura 10: Imagem evidenciando toda a técnica para a obtenção dos fragmentos de pele para análise. Coleta realizada em capela de fluxo laminar, com EPI e instrumental esterilizado. Fonte: Arquivo pessoal. ....29

Figura 11: Imagem evidenciando os fragmentos removidos para as análises. À esquerda, dois fragmentos menores que serão submetidos à análise microbiológica e à direita um fragmento maior que será analisado histologicamente.....29

Figura 12: Imagem evidenciando os fragmentos de pele de rã nos caldos BHI e Sabouraud. Fonte: Arquivo pessoal. ....30

Figura 13: Inócuos dos tubos transferidos com alça de platina para as placas de Petri com os respectivos meios. Fonte: Arquivo pessoal. ....31

Figura 14: Placas acondicionadas em estufa bacteriológica a 37°C. Fonte: Arquivo pessoal.....31

Figura 15: Peles clivadas e armazenadas nos histossetes identificados para posterior processamento. Fonte: Arquivo pessoal. ....32

Figura 16: Inclusora Leica EG 1150. Fonte: Arquivo pessoal.....34

Figura 17: A) Inclusão em bloco de parafina. B) Histossete servindo de base para a confecção do bloco. Fonte: Arquivo pessoal.....33

Figura 18: Micrótomo Leica RM 2145. Realização de cortes de 20  $\mu\text{m}$  para reparo do bloco e posterior corte de 5  $\mu\text{m}$  para confecção da lâmina. Fonte: Arquivo pessoal.33

Figura 19: Imagem evidenciando as peles de rã submetidas a meios de conservação diferentes. À esquerda a pele submetida à conservação em glicerina a 98% e à direita a pele submetida ao congelamento em solução de cloreto de sódio a 0,9% e glicerina a 20%.....35

Figura 20: Fotomicrografias das análises histológicas do Grupo Glicerina (GG), nos 5 tempos de conservação. Evidenciando manutenção das estruturas morfológicas celulares em todos os tempos analisados. Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).....36

Figura 21: Fotomicrografias das análises histológicas do Grupo Congelamento (GC), nos 5 tempos de conservação. Evidenciando manutenção das estruturas morfológicas celulares em todos os tempos analisados. Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x). .....38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados das avaliações microbiológicas do Grupo Glicerina (GG). ....	35
Tabela 2: Resultados das avaliações microbiológicas do Grupo Congelamento (GC). .....	34
Tabela 3: Resultados das avaliações macroscópicas do Grupo Congelamento (GC). .....	35
Tabela 4: Resultados das avaliações macroscópicas do Grupo Glicerina (GG) .....	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>8</b>
2.1	TEGUMENTO DE RÃ-TOURO ( <i>Rana catesbeiana</i> )	8
2.2	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	15
2.3	MEMBRANAS BIOLÓGICAS EM CURATIVOS	18
2.3.1	<b>Pele de rã como membrana biológica</b>	<b>20</b>
2.4	MEIOS DE CONSERVAÇÃO	21
2.4.1	<b>Glicerina a 98%</b>	<b>22</b>
2.4.2	<b>Congelamento associado à glicerina</b>	<b>22</b>
2.5	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS UTILIZADOS EM CURATIVOS	23
2.5.1	<b>Análise histológica</b>	<b>23</b>
2.5.2	<b>Análise microbiológica</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1	LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS	25
3.2	PREPARO DAS PELES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	28
3.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	30
3.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele consiste na principal forma de barreira mecânica do organismo, sendo assim, participa ativamente em processos como termorregulação, proteção ultravioleta, auxílio em funções imunológicas iniciais, além de conferir proteção individual. Devido a este importante papel desempenhado por tal tecido, cada vez mais se busca terapias alternativas com a finalidade de solucionar de forma rápida e não prejudicial qualquer quebra na barreira cutânea, seja ela extensa, profunda ou superficial. (SHORES, GABRIEL & GUPTA, 2007).

O uso de biomateriais vem sendo amplamente difundido em medicina humana e na veterinária. Juntamente à sua crescente utilização está também a busca por biomateriais de melhor viabilidade, que atendam a todos os requisitos de um ótimo material, que deve ser inerte, não apresentar rejeição do receptor e ser mecanicamente resistente. Independente da origem, os biomateriais têm como principal função o auxílio no tratamento de lesões (PIRES, BIERHALZ & MORAES, 2015).

Dentre os materiais biológicos utilizados no tratamento de lesões cutâneas, a pele de rã-touro já foi alvo de pesquisas e experimentos em animais e humanos, graças a sua alta concentração de colágeno. (PICCOLO, PICCOLO & PICCOLO, 2008). Tais tipos de materiais biológicos são preferíveis, tendo em vista que o colágeno apresenta características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, que são ideais para um biomaterial eficiente. Além disso, este componente confere sustentação e orientação à maioria dos tecidos, auxiliando também no processo de epitelização (LIMA-JUNIOR et al., 2017).

Além de consistir em um material de fácil acesso, baixo custo, que, na maioria das vezes, é descartado pelos abatedouros, a pele de rã também apresenta propriedades antimicrobianas que atuam formando uma barreira protetora contra microrganismos oportunistas no leito da ferida, quando aplicados como curativos (FALCÃO et al., 2002; FERREIRA et al., 2006).

Para o uso desse tipo de material biológico, faz-se necessário um bom meio conservante, para que ocorra possibilidade de manter o material armazenado por longos períodos, sem que haja perda de sua estrutura morfofuncional, e ainda o

mantenha livre de agentes contaminantes, para que, ao ser implantado, não produza reação inflamatória local, nem mesmo rejeição do paciente. Diversos produtos e meios como o formol, glicerina, glutaraldeído, álcool, e até mesmo o congelamento em soluções específicas têm sido utilizados como métodos de conservação, e sua indicação varia de acordo com a finalidade do material a ser conservado (GUIMARÃES et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a viabilidade da pele de rã conservada em glicerina a 98% e sob congelamento (-4°C), com a finalidade de implementar um banco de peles para utilização em curativos biológicos. Para tanto, foram realizadas análises histológicas e microbiológicas em tempos distintos de conservação que foram de trinta a cento e vinte dias.

É sabido que a pele de rã-touro já vem sendo testada como curativo biológico em animais e humanos com eficácia comprovada na redução do tempo de cicatrização de feridas e manutenção da nutrição do leito, porém tais estudos mostram métodos de conservação onerosos e mais complexos. A escolha de tais métodos de conservação se deu pela facilidade de utilização em clínicas e pelo baixo custo, além da escassez de informação literária a respeito deste tipo de tecido armazenado por longos períodos de tempo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TEGUMENTO DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*)

A classe Anura vem sendo constantemente estudada no país tendo em vista sua vasta disponibilidade de informações, que vão desde a taxonomia, conservação e evolução, até estudos mais direcionados como bioquímica, histologia e biomecânica (DE PAULA & TOLEDO, 2014).

Particularmente a espécie *Rana catesbeiana* tem sido alvo de pesquisas, considerando sua larga produção no país, sendo um anfíbio de importância comercial difundida em todo o território nacional, além de ser acessível a aquisição de suas peles ou outros componentes para potencial utilização terapêutica (FERREIRA et al., 2006).

A pele dos anuros consiste em uma estrutura pouco queratinizada, permeável, e possui importante papel no controle de fluidos corporais e equilíbrio eletrolítico. Algumas espécies apresentam em sua superfície glândulas de veneno e mucosas, que são responsáveis por manter a umidade corporal e realizar trocas gasosas, caracterizando a respiração cutânea (DE PAULA & TOLEDO, 2014).

A pele de rã, em particular, secreta grande quantidade de substâncias químicas antibacterianas por meio do muco epidérmico, secreção advinda das glândulas mucosas. Substâncias essas que podem ser utilizadas dentro do meio farmacêutico na fabricação de medicamentos, podendo inclusive atuar como antibióticos (CLARCK, 1994; SCHWARTZ et al., 2005).

Acredita-se que estas secreções da pele de anfíbios apresentem ainda peptídeos antimicrobianos que atuam como barreira contra agentes patogênicos ou oportunistas. Tal ação pode contribuir positivamente na sua utilização como membrana biológica, uma vez que um bom biomaterial deve ser livre de microrganismos contaminantes (SILVA, 2011).

Com relação à sua morfologia, a pele das rãs se prende ao corpo somente ao longo de determinadas linhas, apresentando grande elasticidade. Sua coloração varia de acordo com o meio em que vivem e alguns fatores internos, porém



normalmente apresentam-se esverdeadas ou pardas na região dorsal e esbranquiçadas na região ventral (STORER et al., 1995).

Devido ao fato de apresentar abundante presença de colágeno em sua composição, consiste em um material utilizado na indústria cosmética, podendo inclusive caracterizar-se como um bom biomaterial na utilização como curativo oclusivo e auxílio na aceleração do processo de reparo de feridas cutâneas (SCHWARTZ et al., 2005).

Histologicamente, a pele de rã Touro, apresenta epiderme revestida por tecido epitelial estratificado pavimentoso pouco queratinizado. Na derme papilar distingue-se o estrato esponjoso, constituído por tecido conjuntivo frouxo, enquanto que na região reticular observa-se estrato compacto, constituído por tecido conjuntivo denso modelado. Sob a análise histoquímica, a derme demonstra grande quantidade de fibras colágenas e elásticas, sem presença de fibras musculares (FERREIRA et al., 2006).

Além do colágeno, pode-se encontrar presente na epiderme de espécimes da classe Anura, lipídeos que, podem auxiliar no processo de reparo tecidual, aprimorando o processo de epitelização da ferida, o que colabora grandemente para uma redução do tempo de cicatrização (RAGHAVAN K et al., 2010).

### 2.1.1 Epiderme

A epiderme da rã Touro é coberta por muco, derivada do ectoderma, e constituída por tecido epitelial estratificado pouco queratinizado, apresentando aproximadamente 5 a 7 camadas celulares. A camada mais superficial da epiderme consiste no estrato córneo, que apresenta uma monocamada de células queratinizadas (Fig. 1) (HASLAM et al., 2014).

Comparando a pele de rã à de mamíferos, pode-se observar que o estrato córneo se apresenta mais delgado. Já comparando com os peixes, pode-se observar que a presença do estrato córneo na epiderme das rãs, consiste em uma questão evolutiva adaptativa aos anfíbios, já que os peixes não apresentam a camada córnea (SCHEMPP, EMDE & WOLFLE, 2009).

Ainda sobre o estrato córneo, pode-se observar em diversas espécies de anfíbios, a ocorrência sazonal da renovação desta camada. Uma nova camada córnea é formada abaixo da camada anterior e esta se desprende. O processo da “muda” pode durar até 14 dias e está relacionado a mudanças nos níveis do hormônio tireoidiano, que tem como consequência a indução da atividade mitótica na camada germinativa (STORER et al., 1998).

Abaixo da camada córnea, o epitélio se divide em camada granulosa, camada espinhosa contendo várias camadas de células poligonais, e camada basal ou germinativa, que se encontra intimamente ligada à derme (HASLAM et al., 2014).

Diferentemente dos mamíferos, que possuem melanócitos nas camadas mais superficiais da epiderme, as células que designam a coloração da pele das rãs (cromatóforos) limitam-se à região da camada basal, já em contato com a derme. Tais células são divididas em iridóforos, que refletem luz, melanóforos, compostos pelo pigmento melanina e xantóforos que apresentam tons amarelados. (STORER et al., 1998).

De acordo com Ferreira et al. (2006), a pele de espécimes de rã Touro apresenta como células pigmentares somente os melanóforos, sendo que estes encontram-se preferencialmente na região dorsal do corpo do animal.

Além do muco produzido pelas glândulas situadas na derme, as células da epiderme das rãs também produzem muco que é secretado pelos espaços intracelulares, e irá atuar de forma hidrofílica para acumular líquido, mantendo, desta forma, a umidade da pele, reduzindo a desidratação e permitindo a troca gasosa cutânea (HASLAM et al., 2014).

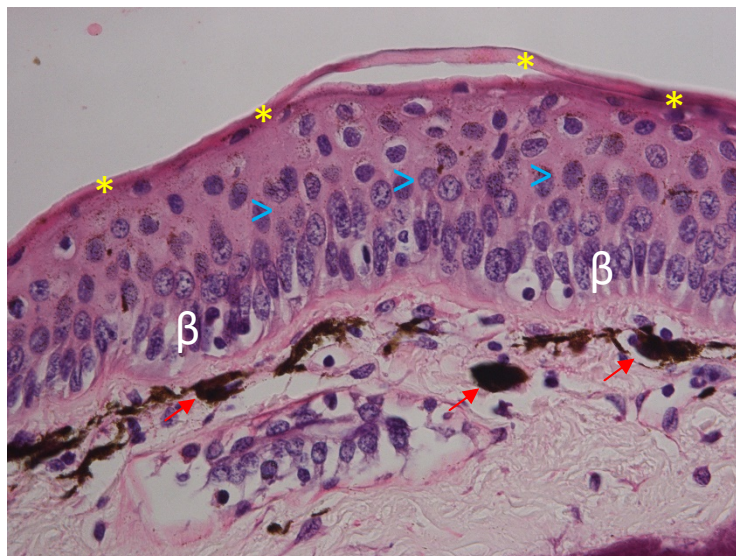


Figura 1: Fotomicrografia evidenciando a região da epiderme da pele de rã Touro. Pode-se observar o estrato córneo (\*), camada espinhosa (>), camada basal ( $\beta$ ) e melanóforos (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 40x).

### 2.1.2 Derme

Imediatamente abaixo da epiderme, apresenta-se a derme, de origem mesodérmica, que, assim como em mamíferos, possui duas divisões distintas. A primeira e mais superficial camada dérmica é o estrato esponjoso, e a camada mais profunda é o estrato compacto (Fig. 2). Ambas as camadas constituídas por fibras colágenas (FERREIRA et al., 2006).

O estrato esponjoso é composto por tecido conjuntivo frouxo, apresentando fibras colágenas pouco compactadas dispostas desordenadamente. Além do colágeno presente, nesta camada também estão as glândulas alveolares, vasos sanguíneos e nervos. O estrato compacto apresenta fibras de tecido conjuntivo denso, dispostas de forma ortogonal, e consiste na maior camada da pele das rãs (HASLAM et al., 2014).

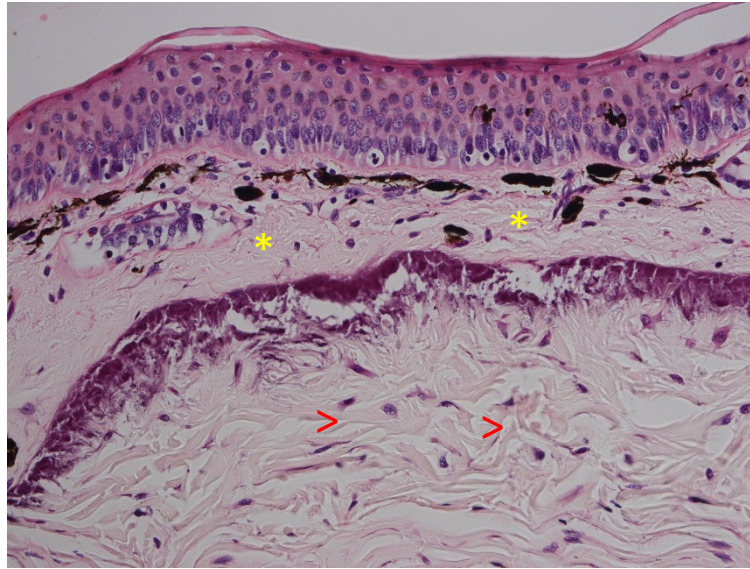


Figura 2: Fotomicrografia evidenciando as camadas da derme: estrato esponjoso (\*) e estrato compacto (>). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 20x).

No estrato esponjoso, alojam-se as glândulas alveolares (Fig. 3), que consistem nas glândulas granulares ou serosas e glândulas mucosas. Tais glândulas possuem ductos que se projetam na epiderme até a superfície externa da pele (FERREIRA et al., 2006).

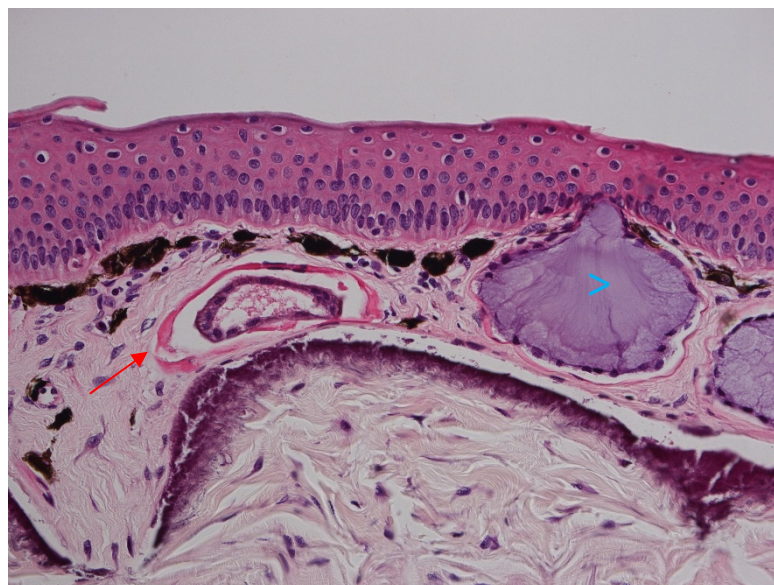


Figura 3: Fotomicrografia evidenciando as glândulas alveolares. Glândula serosa (seta) e glândula mucosa (>). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 20x).

As glândulas granulares, ou serosas (Fig. 4), consistem em uma camada de células cúbicas secretoras, circundadas por células musculares lisas, que atuam promovendo sua compressão, auxiliando na ejeção das secreções granulares. São também conhecidas como glândulas do veneno, sua secreção é de característica leitosa e espessa e os grânulos secretados em seu conteúdo apresentam toxicidade variável, de acordo com as espécies de anuros (NOBLE & NOBLE, 1944).

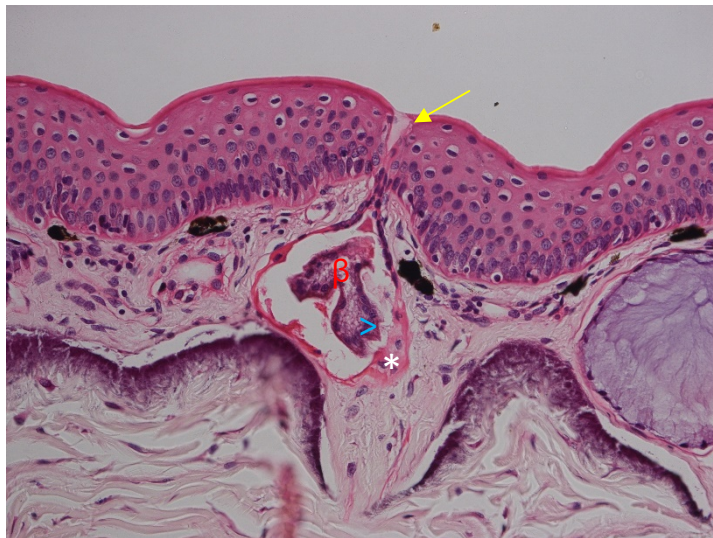


Figura 4: Fotomicrografia da glândula granular. Pode-se observar as estruturas específicas: Células de musculatura lisa (\*), conteúdo granular eosinofílico ( $\beta$ ), camada de células cúbicas (>), ducto (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).

As glândulas mucosas (Fig. 5) apresentam-se em maior número e são compostas por uma camada de células cúbicas secretoras. Sua secreção é responsável pela manutenção da umidade corpórea, essencial para a respiração cutânea. Além disso, mantém a pele escorregadia, o que serve de proteção contra predadores (NOBLE & NOBLE, 1944; FERREIRA, et al., 2006).

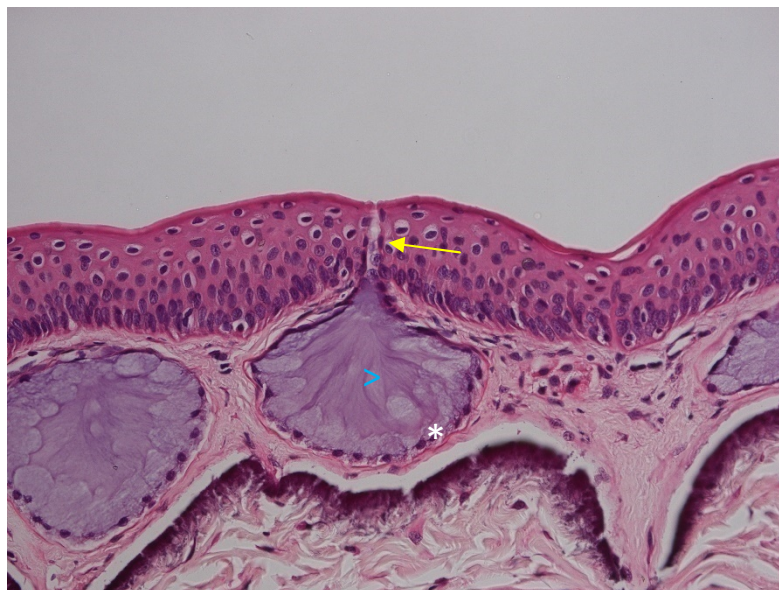


Figura 5: Fotomicrografia da glândula mucosa. Pode-se observar as estruturas específicas: Camada de células cúbicas (\*), conteúdo basofílico (>), ducto (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).

Dividindo a derme esponjosa da derme compacta, pode-se observar uma camada acelular, contendo depósitos basofílicos irregulares dispostos irregularmente. Tal região consiste na camada de Eberth-Katschenko (EK) (Fig. 6), também chamada de substância fundamental por alguns autores. Esta camada está presente em diversas espécies de anuros e sua fisiologia ainda é incerta (MANGIONE et al., 2011).

Tal região consiste em uma camada mineralizada, rica em fosfato de cálcio e glicosaminoglicanos. Para alguns autores, a camada EK pode ser um remanescente de um esqueleto dérmico ancestral, tendo em vista que algumas características desta camada como a precipitação de sais associados com células são semelhantes ao que acontece em esqueletizações, bem como precipitações de cálcio e fósforo nas fibras colágenas (MANGIONE et al., 2011). Já outros citam a camada como sendo a principal atuante no balanço hídrico, tendo em vista a atuação do cálcio na absorção e retenção hídrica.

É sabido ainda que esta camada não está presente somente na espécie *Rana catesbeiana*, como também em diversas outras espécies de anuros (SILVA, SILVA-SOARES & BRITO, 2017).

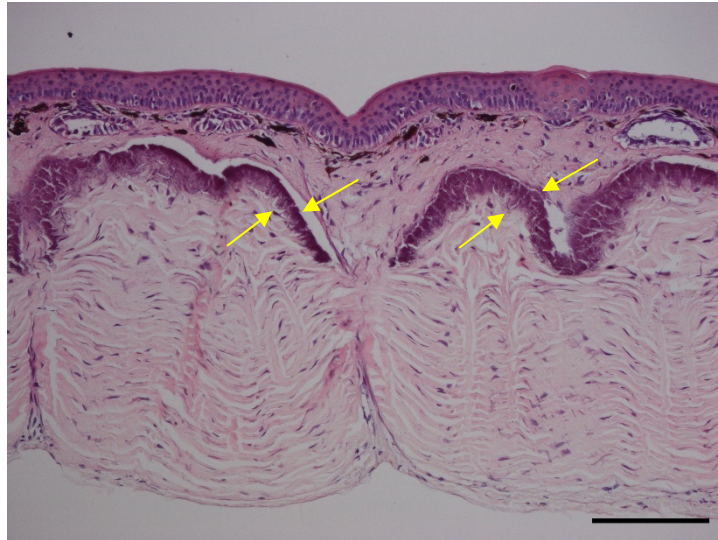


Figura 6: Fotomicrografia evidenciando toda a extensão da pele de rã Touro, em destaque a camada EK (seta). Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 4x).

## 2.2 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A pele consiste na barreira primária de proteção do organismo contra agentes do meio externo. Devido a isso, está constantemente sujeita a lesões e agressões que interferem diretamente na homeostasia tecidual. Com isso, há uma perda de continuidade cutânea, o que, fisiologicamente, deve ser reparado de alguma forma, a fim de restaurar a homeostasia local conferindo novamente proteção ao organismo (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Quando ocorre perda da continuidade da barreira cutânea, uma série de processos fisiológicos, sistêmicos e locais se iniciam no organismo, a fim de reparar o dano tecidual ocorrido. Tal reparo pode ocorrer por regeneração, quando acontece uma perfeita restauração tecidual, ou por cicatrização, onde o defeito cutâneo é substituído por colágeno e tecido fibroso (TAZIMA, VICENTE & MORIYA, 2008).

Ainda que a regeneração seja o tipo de reparo ideal para todos os tecidos, por consistir na recuperação da integridade tecidual, dificilmente ocorrerá na pele, tendo em vista o tipo celular envolvido no processo. Sendo assim, o reparo de feridas se dará basicamente por três fases: Inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação (TAZIMA, VICENTE & MORIYA, 2008).

Tais fases ocorrem em uma cronologia sobreposta. Sendo assim não é possível demarcar perfeitamente o início ou fim de cada fase. Apesar disso, apresentam características marcantes e distintas, o que possibilita sua identificação e posterior tratamento adequado, tendo em vista que cada fase requer um tratamento específico (LAURENO & RODRIGUES, 2011).

A primeira etapa consiste na fase inflamatória e tem início no momento em que ocorre a lesão tecidual, perdurando por cerca de três dias. O dano vascular provoca hemorragia, que é inicialmente contida por mediadores facilitadores da coagulação, que atuam na ativação plaquetária, provocando sua adesão e agregação. Juntamente a isso ocorre a deposição de fibrina, que atua como ponte para a translocação celular. Após a ação plaquetária imediata, é desencadeada a cascata de coagulação (SINGER & CLARK, 1999).

Com o aumento da permeabilidade vascular decorrente da reação inflamatória, tem-se o extravasamento de líquido e posterior edema, além da migração leucocitária que é facilitada e é predominantemente marcada pela presença de neutrófilos e monócitos, cuja principal função é realizar o debridamento das superfícies da ferida, bem como a fagocitose de partículas antigênicas e corpos estranhos (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Posteriormente, ocorre a quimiotaxia de macrófagos que além de possuírem função de lise e fagocitose, também atuam na indução da angiogênese e formação de tecido de granulação, sendo responsáveis pela liberação de diversos fatores de crescimento que auxiliam no processo cicatricial. Os macrófagos consistem nas células responsáveis pela transição entre a fase inflamatória e proliferativa, auxiliando na migração celular de elementos como fibroblastos e células endoteliais (LAURENO & RODRIGUES, 2011).

A fase proliferativa é marcada pela neovascularização que atuará como agente carreador de componentes responsáveis para a reepitelização, além do auxílio para a síntese do tecido de granulação, que consiste em um componente rico em vasos sanguíneos, colágeno, elastina, fibroblastos, entre outros compostos responsáveis pelo processo de reepitelização. Com 24 horas após o início da lesão, já existe migração de queratinócitos, que são responsáveis pela reconstrução da integridade da permeabilidade da epiderme. Após isso, ocorre a proliferação dessas células,



levando assim à reestruturação da membrana basal e posterior reepitelização completa (LAURENO & RODRIGUES, 2011; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

No processo de formação do tecido de granulação, há a proliferação endotelial e de fibroblastos. Tal processo é denominado fibroplasia. Os macrófagos atuantes na ferida agem modulando a proliferação de fibroblastos, que é estimulada pela baixa pressão parcial de oxigênio, que é atenuada de acordo com a progressão da angiogênese. A síntese de colágeno também é um fator marcante nesse momento (LAURENO & RODRIGUES, 2011).

A neoformação vascular que se dá devido à redução de fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual, começa a ser reduzida quando esses fatores encontram-se exacerbados no local. Inicia-se então o processo de contração dos bordos da lesão e por fim, a epitelização total, que culminará na total oclusão das superfícies da ferida (LAURENO & RODRIGUES, 2011).

Como última fase do processo de cicatrização tem-se a remodelação, que consiste na fase de maior duração, podendo perfazer meses. Nela é possível observar como principal característica o aumento da força tensil tecidual, além da redução do tamanho da cicatriz e eritema. A atividade celular e vascularização local tornam-se reduzidas, e a substituição de colágeno tipo III, abundante no tecido de granulação, para colágeno tipo I é acentuada (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

As fibras de colágeno dispõem-se paralelamente às linhas de tensão e gradativamente tornam-se mais espessas, proporcionando maior resistência local. Tal ação consiste na maturação do colágeno e marca o fim do processo cicatricial (SINGER & CLARK, 1999).

Os processos descritos apresentam-se de forma contínua, tendo início no primeiro momento do trauma e encerrando-se quando o local já está recoberto por fibras colágenas tipo I. Esses acontecimentos podem ser retardados por alguns fatores, locais ou sistêmicos que prejudicam de alguma forma o reparo tecidual (SINGER & CLARK, 1999; LAURENO & RODRIGUES, 2011).

Corpos estranhos, sujidades ou debris celulares no interior da ferida, além de movimentação intensa no sítio são fatores locais que interferem ativamente no processo cicatricial. Infecção local pode atuar formando uma barreira física, prejudicando o desenvolvimento ordenado do tecido de granulação e a deposição de colágeno. A movimentação contínua provoca ruptura dos neocapilares que se

formam na tentativa de aderência tecidual e esse trauma constante acarreta atraso significativo na cicatrização tecidual (GUO & DIPIETRO, 2010; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Outros fatores, denominados sistêmicos, também podem influenciar no tempo do processo de reparo tecidual, sendo eles idade, sexo, níveis hormonais, estresse, doenças como diabetes, uremia, medicações a base de glicocorticóides, quimioterápicos ou antiinflamatórios não esteroidais, obesidade, condições imunossupressoras como vírus da imunodeficiência, quimioterapia, câncer, radioterapia e nutrição (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Sendo assim, a escolha do melhor tratamento deve ser levada em consideração, tendo em vista não somente a atividade celular local, como também os demais fatores clínicos do paciente, a fim de promover o melhor manejo individual (GUO & DIPIETRO, 2010).

### 2.3 MEMBRANAS BIOLÓGICAS EM CURATIVOS

Antecedendo o estudo em membranas biológicas, faz-se necessário conceituar os biomateriais como sendo todas as substâncias que interagem com o sistema biológico, com qualquer objetivo terapêutico. Tais produtos têm apresentado importante papel no tratamento de inúmeras lesões. Entre os biomateriais, encontram-se os materiais inorgânicos, como implantes metálicos, marcapassos, e os orgânicos, como alguns tipos de fios de sutura, membranas biológicas como pericárdio bovino, túnica albugínea bovina, centro tendíneo, entre outros. Independentemente de sua origem, apresentam como característica ideal principal o fato de serem resistentes e não apresentarem rejeição ao paciente receptor (PIRES, BIERHALZ & MORAES, 2015).

Os primeiros estudos realizados buscando introduzir o uso de membranas biológicas em medicina veterinária, foram desenvolvidos em 1971 por Pigossi et al., que utilizaram dura-máter homóloga em cães, conservada em glicerina. Tal estudo foi pioneiro e deu início a uma série de pesquisas posteriores na área, o que

culminou no grande número de meios conservantes e materiais biológicos existentes na atualidade (GUIMARÃES et al., 2007).

A utilização de membranas biológicas em medicina veterinária tem sido alvo de inúmeros estudos, tendo em vista as diversas vantagens descobertas nesse tipo de terapia. Membranas biológicas consistem em materiais de baixo custo, fácil acesso, fácil armazenamento e excelentes resultados nas mais diversas áreas empregadas (GUIMARÃES et al., 2007). Além disso, os curativos biológicos reduzem as perdas metabólicas, previnem infecções e proporcionam maior conforto ao paciente (PICCOLO, PICCOLO & PICCOLO, 2008).

O objetivo principal do uso de uma membrana biológica é o de fornecer direcionamento para o desenvolvimento tecidual e o reparo de um órgão ou tecido, a fim de que esse retome sua atividade original. Para isso, os estudos nesta área de pesquisa vêm crescendo, com vistas a encontrar o material biológico ideal para cada tipo de situação (GUIMARÃES et al., 2007).

Em meio às membranas biológicas estudadas, podem ser descritos pericárdio e peritônio, centro tendíneo diafragmático, dura-máter e fáscia lata. Tais materiais vêm sendo amplamente testados e utilizados dentro do meio científico (ALVARENGA, 1992).

Uma das vantagens do uso de membranas biológicas, se comparadas às membranas sintéticas, é o baixo índice de complicações relacionadas à reação inflamatória exacerbada, o que defende sua utilização dentro da medicina tanto para enxertia quanto para curativos (QUITZAN et al., 2003).

Atualmente, um setor que tem sido amplamente desenvolvido é o de terapias alternativas para o tratamento de feridas, e com isso, cresce a demanda de um bom biomaterial para ser utilizado como curativo, a fim de acelerar o processo cicatricial, nutrindo o leito da ferida, promovendo boa hidratação e epitelização (ALVES et al., 2015).

Para tal, tecidos ricos em colágeno têm sido pesquisados, tendo em vista que esse componente constitui o principal fator no processo de reparo tecidual. Além disso, o colágeno apresenta baixo potencial antigênico, o que confere uma característica primordial para uma boa membrana biológica, já que o objetivo principal é não provocar rejeição por parte do receptor (ALVES et al., 2015).

A pele de tilápia já tem sido utilizada em pesquisas e gerado bons resultados. Sabe-se que constitui um bom biomaterial, de fácil acesso e baixo custo (ALVES et al., 2015).

A pele de rã consiste em uma alternativa semelhante por possuir características histológicas pareadas como a riqueza de colágeno, além de apresentar secreções que atuam como barreira antimicrobiana, podendo se tornar também um bom biomaterial para auxílio em terapias para reparo tecidual em feridas cutâneas (FALCÃO et al., 2002).

### **2.3.1 Pele de rã como membrana biológica**

A ranicultura tem se tornado uma atividade em ascensão no país. Além da produção para o aproveitamento da carne, a indústria de aproveitamento de pele vem crescendo, tendo em vista que este tecido consiste em 11% do peso vivo do animal, podendo ser utilizada na confecção de diversos objetos como bolsas, cintos, luvas e sapatos. Devido à crescente produção, torna-se cada vez mais fácil o acesso a este material, o que justifica a sua exploração para finalidades alternativas (LIMA, CRUZ & MOURA, 1999).

Sob o ponto de vista clínico experimental, estudos em ratos foram realizados utilizando pele de rã liofilizada associada a pomada manipulada à base de trietanolamina, metilparabeno e propilparabeno no tratamento de feridas cutâneas profundas, e mostraram redução significativa no tempo de cicatrização tecidual, se comparado à terapia convencional apenas utilizando pomada (BAZAZ et al., 2013).

Em medicina humana, a pele de rã tem sido utilizada íntegra, no tratamento de queimaduras e evidenciou nos estudos experimentais, menor tempo de cicatrização, melhor epitelização e menor índice de infecção, se comparado a terapias alternativas. Além disso, foi observado maior conforto dos pacientes tratados com esse tipo de curativo, levando em consideração o nível da dor (PICCOLO, PICCOLO & PICCOLO, 2008).

Além do uso direto da pele como curativo oclusivo, o extrato da pele de rã já foi isolado para terapias experimentais no tratamento de feridas (BORSARI et al.,

2014). Sabe-se ainda que os lipídeos presentes na pele de anfíbios apresentam propriedades que atuam diretamente na potencialização do processo cicatricial de feridas cutâneas, o que justifica a busca por pesquisa e experimentação nesse tipo de tecido como biomaterial (RAGHAVAN K et al., 2010).

Como representa uma área ainda pouco explorada experimentalmente, mais ensaios clínicos ainda se fazem necessários para comprovar fidedignamente sua viabilidade para a utilização como membrana biológica (PICCOLO, PICCOLO & PICCOLO, 2008).

## 2.4 MEIOS DE CONSERVAÇÃO

Concomitante ao crescente estudo sobre a utilização de membranas biológicas na medicina cresce também a busca por métodos de conservação que se adequem às necessidades mediante determinadas situações. Meios de conservação ideais devem ser inertes, aumentar a resistência do biomaterial à tração, não ser prejudiciais aos tecidos biológicos, reduzir a antigenicidade, impedir a proliferação de microorganismos mesmo que sob longos períodos, além de impedir a decomposição tecidual (MOTA, 2002).

Diversos meios têm sido estudados a fim de avaliar o que proporciona as condições ideais ao material a ser conservado. Tais meios consistem em solução supersaturada de açúcar, solução supersaturada de sal, glicerina a 98%, glutaraldeído, álcool absoluto, congelamento, entre outros (GUIMARÃES et al., 2007).

Vale ressaltar que apesar da conservação eficiente de diversos meios, tal eficiência se dá pela manutenção estrutural tecidual, porém não pela vitalidade celular. Porém, a intenção da utilização das membranas biológicas consiste na proveniência de um tecido de sustento para o depósito de fibroblastos no local aplicado (RAISER et al., 2001).

### **2.4.1 Glicerina a 98%**

A glicerina consiste em um meio de conservação amplamente utilizado na área médica, tendo em vista que apresenta propriedades ideais para a manutenção de membranas biológicas por longos períodos de tempo (RAISER et al., 2001).

Estudo sobre a conservação de dura-máter homóloga em glicerina demonstrou que tal solução constitui um forte antisséptico. Além disso, conserva os tecidos por meio da desidratação celular, que ocorre sem alterar a concentração iônica das células, promovendo apenas a substituição do líquido intracelular. Com isso, a arquitetura celular é preservada e conseqüentemente a conservação é qualificada (PIGOSSI, 1964).

Tendo em vista que sua conservação atua por meio da desidratação, todo tecido submetido à conservação por glicerina deve passar por um processo de reidratação por um período que varia de acordo com a densidade do tecido e período de conservação do mesmo (RAISER et al., 2001).

Ainda que reidratada, a membrana biológica submetida à conservação por glicerina não recobre seu aspecto inicial, permanecendo menos maleável se comparada com o material a fresco. Porém, apesar disso, consiste em um meio conservante hábil e inerte, tendo em vista que não altera a morfologia e constituição celular, garantindo a integridade da membrana, ainda que com perdas líquidas (RAISER et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2007).

Tal solução não apresenta toxicidade, ainda que com materiais conservados por longos períodos de tempo, bem como a ausência de indícios de agentes contaminantes mesmo em soluções de maior tempo, devido à sua propriedade antisséptica (GUIMARÃES et al., 2007).

### **2.4.2 Congelamento associado à glicerina**

O congelamento é um dos métodos de conservação mais antigos, e pode ser utilizado nos mais variados tecidos por longos períodos de tempo. Apesar de

constituir um método eficiente, promove efeitos deletérios ao tecido, uma vez que baixas temperaturas propiciam a formação de cristais de gelo intracelulares, o que pode promover ruptura de membrana celular e desordem de matriz extracelular (SCHIOZER, 2012).

Visando evitar os efeitos deletérios do congelamento puro, foi proposta a inoculação do material a ser preservado em solução de glicerina a 15%, e posterior submissão ao congelamento. Tal solução auxilia na preservação da membrana celular, favorecendo a preservação do tecido (BILINGHAM & REYNOLDS, 1952).

A solução de glicerina a 20% acrescida de solução fisiológica a 0,9% associada ao congelamento tem sido utilizada em bancos de pele de cão. Tal processo mostrou boa preservação do material. Além disso, também foi evidenciada ausência de agentes contaminantes nas culturas pós conservação (LEMOS, 2007).

Essa técnica de conservação além de manter a estrutura organizacional celular do tecido preservando as estruturas teciduais e estrutura de colágeno, inibe o crescimento bacteriano, tendo em vista que o glicerol apresenta alto potencial antisséptico (LEMOS, 2007).

## 2.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS UTILIZADOS EM CURATIVOS

### 2.5.1 Análise histológica

A análise histológica consiste em um método microscópico de avaliação tecidual que permite observar de forma fidedigna os tipos celulares presentes em um tecido, podendo quantificá-los e qualificá-los (TIMM, 2005).

A técnica empregada na confecção de lâminas histológicas passa por uma série de processos que vão desde a coleta e fixação do material biológico, até sua inclusão em parafina, microtomia e, posterior transferência para uma lâmina de vidro para a observação em microscópio, que será facilitada com a realização de

colorações que serão específicas ou genéricas, dependendo do objetivo (TIMM, 2005).

Diferentes são as colorações específicas para os mais variados tipos celulares. Os corantes hematoxilina e eosina são os métodos mais utilizados para coloração dos mais variados tipos de lâminas histopatológicas. A hematoxilina consiste em um componente básico, e com isso, cora os elementos ácidos a nível celular, conferindo a coloração azulada. Já a eosina é um corante ácido, logo, atua corando as regiões básicas celulares, promovendo a esses a cor rosa (GARTNER & HIATT, 1999).

Além destas, outras colocações específicas são utilizadas como: Tricrômico de Masson, orceína, weigert, prata, hematoxilina férrica, ácido periódico reativo de Schiff e Wright e giemsa. Tais colorações são amplamente utilizadas em laboratórios de histologia e apresentam a finalidade de corar tecidos como o muscular, fibras elásticas, reticulares, colágenas, entre outros tecidos de especificidade (GARTNER & HIATT, 1999).

### **2.5.2 Análise microbiológica**

O potencial de sucesso de um tratamento de feridas cutâneas está diretamente relacionado ao índice de contaminação local. O tipo de curativo empregado na terapia deve apresentar potencial antisséptico, a fim de reduzir a taxa de microrganismos que promovem injúrias e retardo no reparo tecidual (GRAGNANI et al., 2005).

Feridas extensas são altamente susceptíveis à contaminação externa, tendo em vista que a pele apresenta flora natural que em contato com lesões, podem se tornar oportunistas e patógenos (LEMOS, 2007). Queimaduras, especificamente, apresentam um microambiente propício para o crescimento de bactérias. Além de prejudicar a cicatrização, a alta carga bacteriana presente na ferida pode prejudicar a incorporação de enxertos e atuação de curativos, sejam eles biológicos ou sintéticos (GRAGNANI et al., 2005).



A fim de identificar, isolar e avaliar o melhor tratamento, culturas e antibiogramas devem ser realizados das feridas e curativos infectados. A seleção dos meios de cultura se dá com base na diversidade de microrganismos que o mesmo pode abranger (ANVISA, 2004).

Os caldos de enriquecimento consistem em meios ricos em nutrientes específicos para o crescimento bacteriano ou fúngico, a depender do tipo de caldo. Consistem na primeira avaliação e são utilizados para estimular o crescimento bacteriano ou fúngico, para que posteriormente, estes sejam semeados em placas com os meios de cultura (ANVISA, 2004).

O Brain Heart Infusion (BHI) é um meio derivado de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona consiste em fonte de carbono, enxofre, nitrogênio e vitaminas, já a dextrose é um carboidrato utilizado pelos microrganismos para fermentação (ANVISA, 2004).

Outro meio importante, nesse caso para o crescimento fúngico é o Ágar Sabouraud, que representa um meio abrangente, o qual promove nutrientes favoráveis ao crescimento de leveduras e fungos filamentosos, que consistem nos microrganismos fúngicos mais comumente relatados em infecções (ANVISA, 2004).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS**

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), e de Sanidade Animal (LSA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Foram avaliadas peles de 16 rãs Touro, advindas de criatório particular localizado na cidade de Itaperuna, RJ. As peles foram obtidas todas no mesmo dia e pertenciam a animais de mesmo peso e idade, fêmeas e machos, submetidos ao mesmo processo de criação. O abate dos animais foi realizado de acordo com as normas sanitárias e de bem estar do abatedouro.

### 3.2 PREPARO DAS PELES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O preparo de pele de rãs seguiu a metodologia adaptada à descrita para a pele de tilápia (LIMA-JUNIOR et al., 2017). As peles foram recebidas a fresco (Fig. 7) advindas do abatedouro, mantidas sob refrigeração em isopor com gelo durante o transporte do abatedouro à Universidade, por aproximadamente três horas. Na sequência, as peles foram lavadas com solução de cloreto de sódio a 0,9% e imediatamente após, foi realizada lavagem com solução de clorexidina degermante a 2% e descanso na mesma solução por um período de 30 minutos (Fig. 8). Após este período, as peles foram novamente banhadas em solução de cloreto de sódio a 0,9% e submetidas a outro repouso em solução de clorexidina degermante a 2% durante 30 minutos. Durante os banhos em solução de clorexidina, as peles foram massageadas uma a uma durante 5 minutos cada, para melhor ação do degermante.

Após os dois banhos em clorexidina, a solução foi removida com o auxílio de solução de cloreto de sódio a 0,9%. As peles estavam então prontas para serem submetidas à conservação. Antes, porém, fragmentos de cada amostra de pele foram retirados para análise e somente após coleta, as peles foram acondicionadas nos recipientes e submetidas à conservação (Fig. 9). Estes primeiros fragmentos removidos consistiram na análise de tempo zero, sendo submetidos às análises histológica e microbiológica.

Oito peles foram então imersas em solução de glicerina a 98%, compondo o Grupo Glicerina (GG) e permanecendo sob temperatura ambiente (Aprox. 28°C) durante o estudo. As outras 8 peles compuseram o Grupo Congelamento (GC) e foram imersas em solução de glicerina a 20% e mantidas sob congelamento (Aprox. -4°C). Todas as peles foram acondicionadas em potes herméticos de 500ml, limpos previamente com solução de álcool etílico a 7% e esterilizados por fervura, sendo imersos em água em ebulição (Aprox. 100°C), durante 15 minutos.

As amostras de ambos os grupos foram avaliadas em cinco momentos, sendo eles: Imediatamente após a coleta (tempo zero, T0), após 30 dias (T30), 60 dias (T60), 90 dias (T90) e 120 dias (T120) de conservação.



Figura 7: Obtenção das peles de rã touro: Peles recém-coletadas, evidenciando a porção ventral (esquerda) e dorsal (direita). Fonte: Arquivo pessoal.

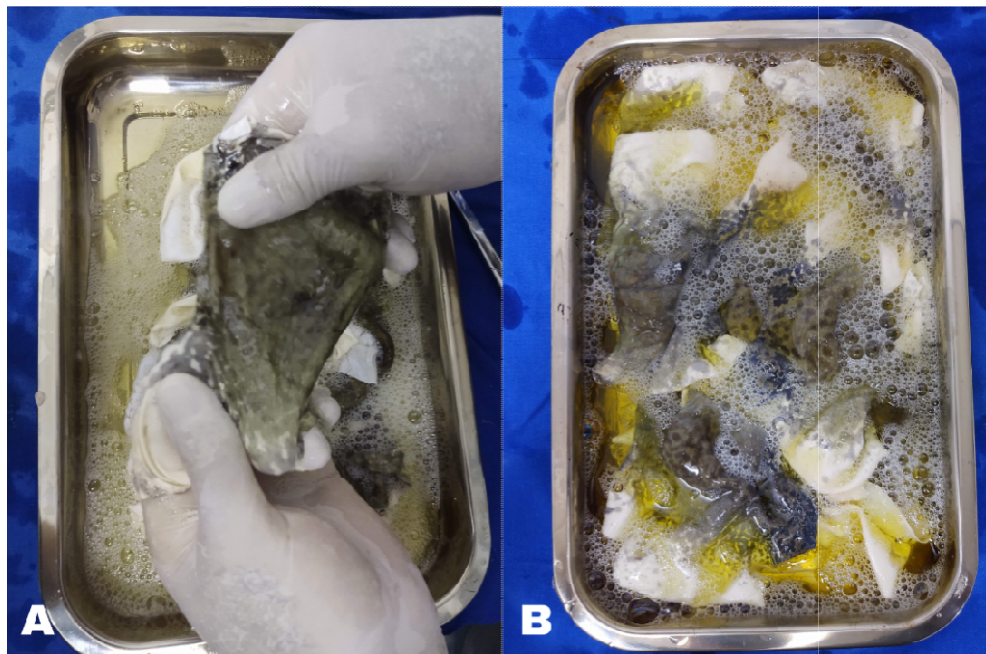


Figura 8: Preparo das peles. A) Massagem em solução de clorexidina degermante a 2%, por 5 minutos. B) Molho em solução de clorexidina por 30 minutos. Fonte: Arquivo pessoal.

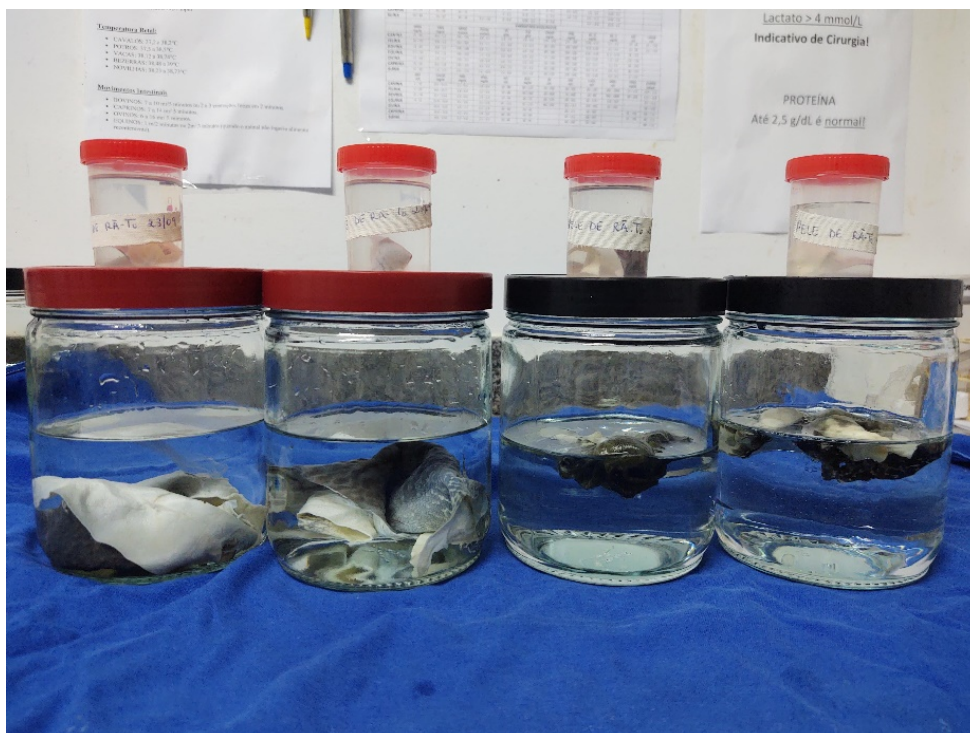


Figura 9: Acondicionamento das peles em seus respectivos meios. Potes de tampa vermelha correspondendo ao Grupo Congelamento e potes de tampa preta correspondendo ao Grupo Glicerina. A imagem também evidencia a coleta dos fragmentos já imersos em formol 10% dos respectivos indivíduos. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Nos momentos T0, T30, T60, T90 e T120, foram realizadas as coletas dos fragmentos para as análises histológicas e microbiológicas. A coleta dos fragmentos de pele foi realizada em capela de fluxo laminar com instrumental esterilizado e equipamento de proteção individual (luvas de procedimento, máscara e jaleco). (Fig 10). Os materiais cirúrgicos foram flambados entre as diferentes peles e a placa de Petri trocada por outra placa estéril. Estes procedimentos se repetiram para todas as peles analisadas. O Grupo Congelamento, especificamente, sofreu um processo distinto anterior à coleta dos fragmentos, que consistiu no descongelamento em banho Maria a 42°C, para possibilitar o manuseio do tecido e a coleta dos fragmentos.

Com o auxílio de uma pinça anatômica e uma tesoura cirúrgica, sobre uma placa de Petri, a pele foi então exposta e três fragmentos foram removidos, os dois

primeiros, medindo aproximadamente 2cmx0,5cm, para as análises bacteriana e fúngica e o segundo, medindo aproximadamente 2cmx6cm, para a análise histopatológica (Fig.11).

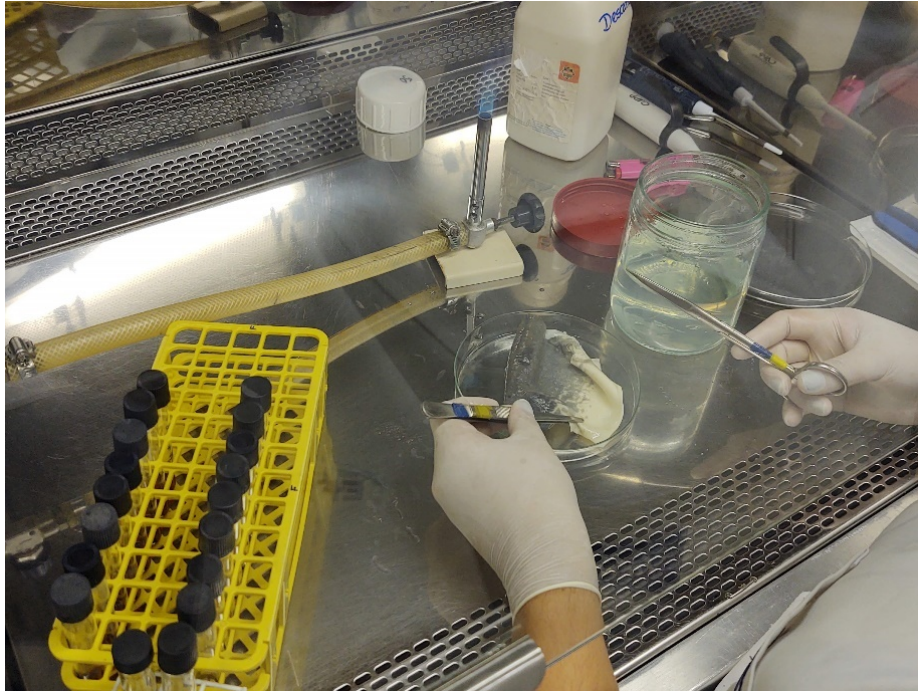


Figura 10: Imagem evidenciando toda a técnica para a obtenção dos fragmentos de pele para análise. Coleta realizada em capela de fluxo laminar, com EPI e instrumental esterilizado. Fonte: Arquivo pessoal.

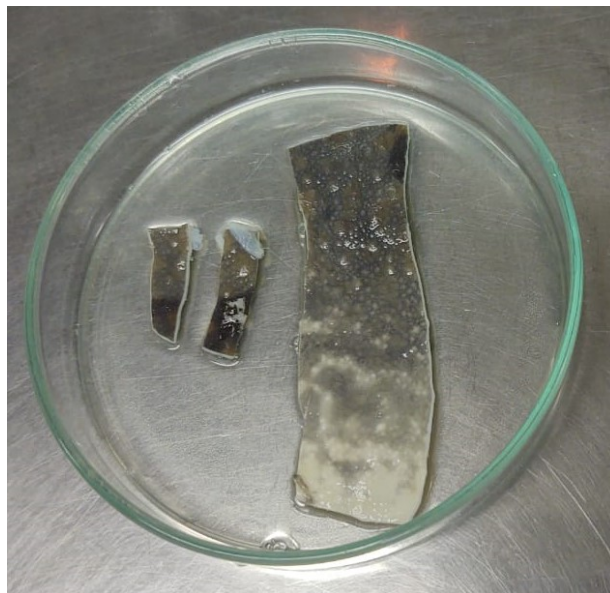


Figura 11: Imagem evidenciando os fragmentos removidos para as análises. À esquerda, dois fragmentos menores que serão submetidos à análise microbiológica e à direita um fragmento maior que será analisado histologicamente.

### 3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Em todos os momentos de avaliação, dois pequenos fragmentos da pele de rã medindo aproximadamente 2cmx0,5cm foram retirados para a avaliação microbiológica. Os fragmentos foram acondicionados em tubos cônicos de 15ml contendo os respectivos meios de enriquecimento: 2ml de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e 2 mL Caldo Sabouraud Dextrose (Acumedia, EUA) (Fig. 12) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C, por aproximadamente 16 horas para análise microbiológica.

Posteriormente, inócuos dos tubos com Caldo BHI e Caldo Sabouraud foram transferidos com alça de platina pela técnica de esgotamento por estrias para placas de Petri (Fig. 13) com meio Ágar BHI (Himedia) e Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi), respectivamente, de modo a obter o isolamento de microrganismos. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C (Fig. 14) por 24 horas e observado o crescimento de colônias a cada 24 horas, durante 4 dias.



Figura 12: Imagem evidenciando os fragmentos de pele de rã nos caldos BHI e Sabouraud. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 13: Inócuos dos tubos transferidos com alça de platina para as placas de Petri com os respectivos meios. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 14: Placas acondicionadas em estufa bacteriológica a 37°C. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.

Fragmentos de pele de rã foram coletados e fixados em formalina tamponada neutra a 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente foram clivados e identificados para, serem então processados (Fig. 15).



Figura 15: Peles clivadas e armazenadas nos histossetes identificados para posterior processamento. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante o processamento automático (Leica ASP300S), as amostras passaram pelas etapas de desidratação, clarificação e impregnação em parafina, sendo a última de suma importância para manter a morfologia celular e a rigidez do tecido para realização do corte no micrótomo. Após o último banho em parafina, as amostras foram postas em blocos de parafina com o auxílio da inclusora Leica EG 1150 (Fig. 16), em que os blocos são formados manualmente, utilizando o histossete como base (Fig. 17).

Finalizando o processo de inclusão, foram realizados cortes seriados 5 $\mu$ m de espessura no micrótomo Leica RM 2145 (Fig. 18) para a confecção das lâminas e coloração com Hematoxilina e Eosina (H/E) para posteriormente, avaliação por microscopia de luz.





Figura 16: Inclusora Leica EG 1150. Fonte: Arquivo pessoal.

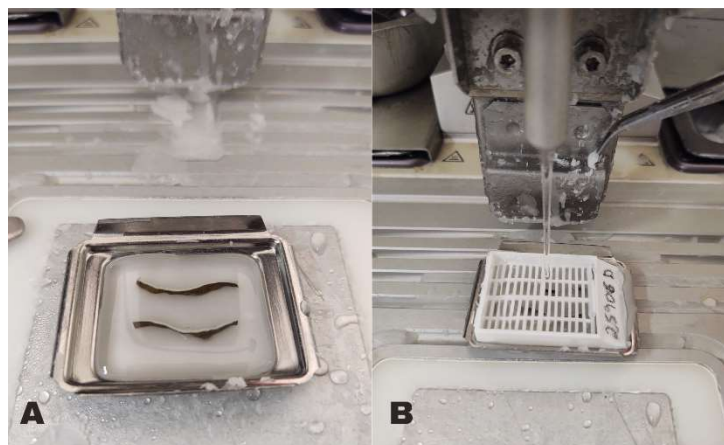


Figura 17: A) Inclusão em bloco de parafina. B) Histosete servindo de base para a confecção do bloco. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 18: Micrótomo Leica RM 2145. Realização de cortes de 20  $\mu\text{m}$  para reparo do bloco e posterior corte de 5  $\mu\text{m}$  para confecção da lâmina. Fonte: Arquivo pessoal.

## 4 RESULTADOS

A conservação em glicerina e sob congelamento, somados ao preparo prévio das peles com solução à base de clorexidina a 2%, impediram o crescimento bacteriano e fúngico nas amostras em todos os tempos analisados (Tab.1 e 2).

Tabela 1: Resultados das avaliações microbiológicas do Grupo Glicerina (GG).

<b>PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO</b>	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T90</b>	<b>T120</b>
<b>CRESCIMENTO FÚNGICO</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>CRESCIMENTO BACTERIANO</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Tabela 2: Resultados das avaliações microbiológicas do Grupo Congelamento (GC).

<b>PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO</b>	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T90</b>	<b>T120</b>
<b>CRESCIMENTO FÚNGICO</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>CRESCIMENTO BACTERIANO</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

O armazenamento das peles sob temperatura de -4°C em freezer doméstico se mostrou viável, visto que não foram necessários equipamentos sofisticados, o que facilita o armazenamento em clínicas, por exemplo. Porém, sua desvantagem é a demanda de energia elétrica, o que pode tornar o armazenamento vulnerável a quedas de energia, podendo então comprometer a qualidade do material acondicionado.

As amostras de pele conservadas em temperatura -4°C (grupo GC) apresentaram uma melhor maleabilidade tecidual, porquanto se mantiveram em solução de baixa concentração de glicerina, o que provavelmente resultou em uma menor perda líquida tecidual, justificando os achados. (Tab. 3).

Já as amostras de pele conservadas em glicerina a 98% (grupo GG), apresentaram-se rígidas, e de difícil manuseio (Tab. 4). Em decorrência, pode haver maior dificuldade também à sua aplicação clínica futura (Fig. 19).



Figura 19: Imagem evidenciando as peles de rã submetidas a meios de conservação diferentes. À esquerda a pele submetida à conservação em glicerina a 98% e à direita a pele submetida ao congelamento em solução de cloreto de sódio a 0,9% e glicerina a 20%.

Tabela 3: Avaliação macroscópica das peles de rã do Grupo Congelamento, submetidas aos tempos de conservação.

PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	T0	T30	T60	T90	T120
<b>COR</b>	Preta, branca, esverdeada	Não se alterou	Não se alterou	Não se alterou	Não se alterou
<b>CONSISTÊNCIA</b>	Maleável	Não se alterou	Não se alterou	Não se alterou	Não se alterou

Tabela 4: Avaliação macroscópica das peles de rã do Grupo Glicerina, submetidas aos tempos de conservação.

PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	T0	T30	T60	T90	T120
<b>COR</b>	Preta, branca, esverdeada	Amarelada	Amarelada	Amarelada	Amarelada
<b>CONSISTÊNCIA</b>	Maleável	Rígida	Rígida	Rígida	Rígida

Nas avaliações microscópicas, foi possível observar a manutenção morfológica das estruturas teciduais, células epiteliais, glândulas e fibras colágenas

em todos os meios de conservação e tempos analisados, o que indica que ambos os meios de conservação não interferem na viabilidade tecidual, ainda que submetidos a um longo período de conservação (Fig 20 e 21).

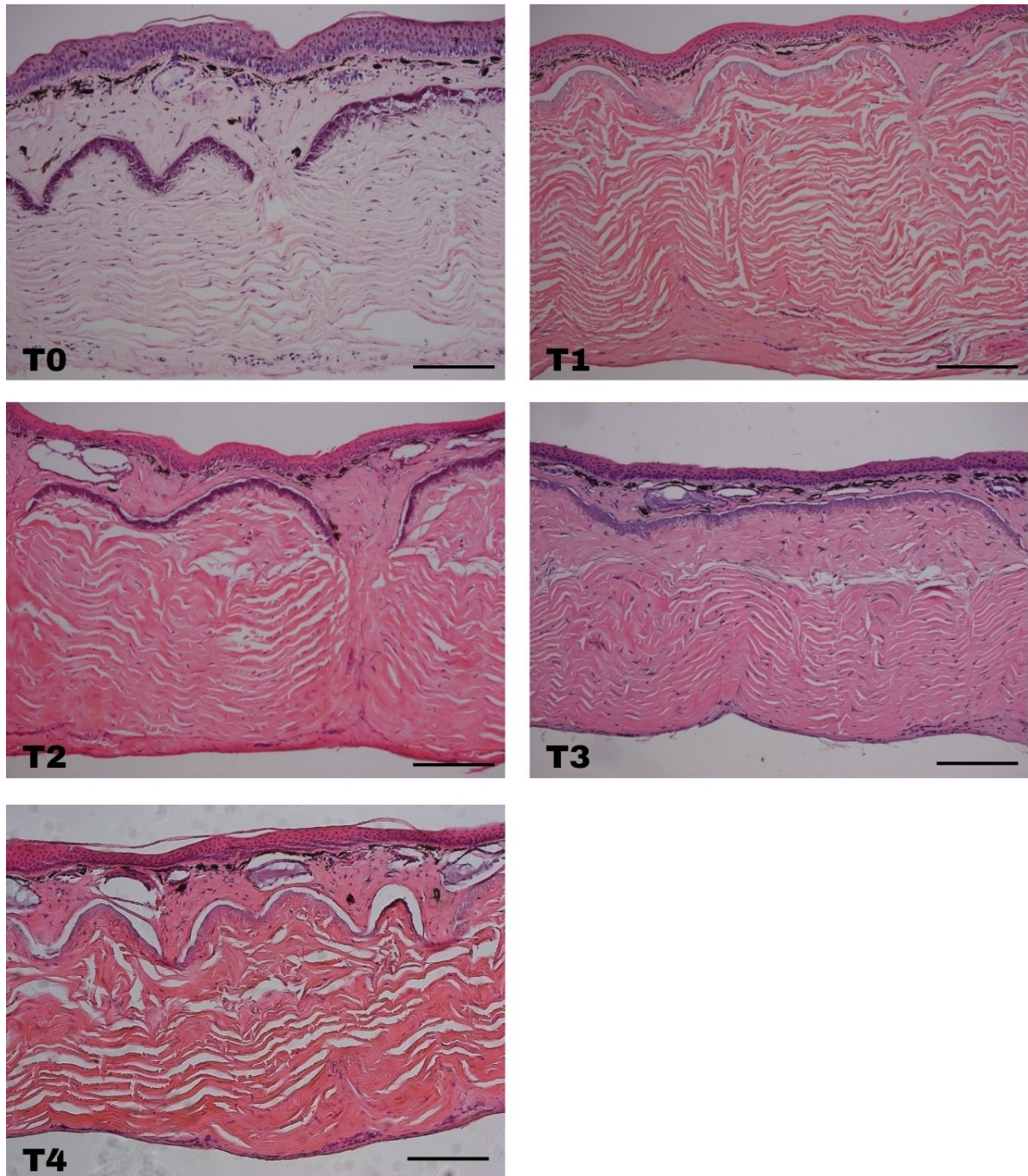


Figura 20: Fotomicrografias das análises histológicas do Grupo Glicerina (GG), nos 5 tempos de conservação. Evidenciando manutenção das estruturas morfológicas celulares em todos os tempos analisados. Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).

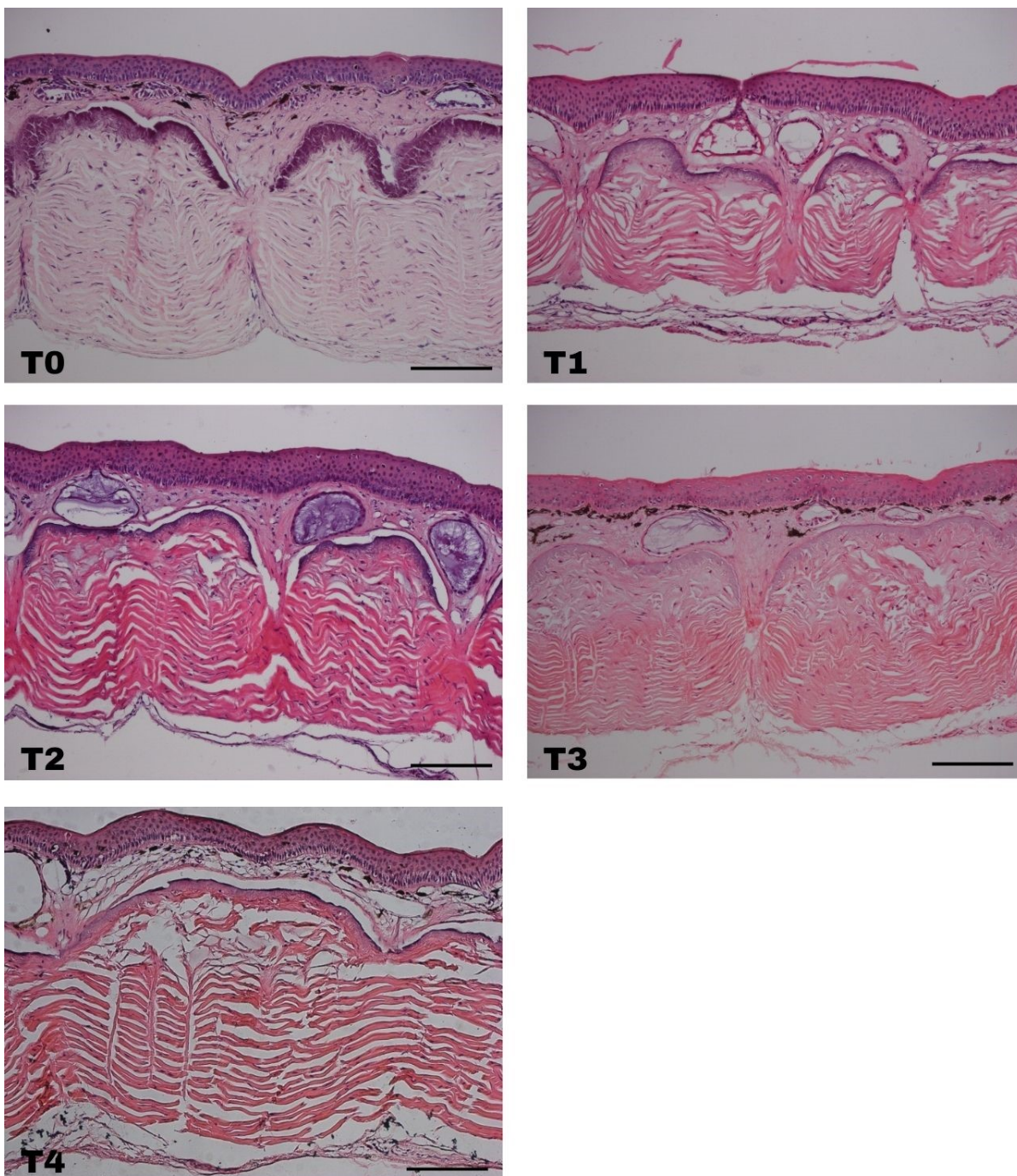


Figura 21: Fotomicrografias das análises histológicas do Grupo Congelamento (GC), nos 5 tempos de conservação. Evidenciando manutenção das estruturas morfológicas celulares em todos os tempos analisados. Fonte: Arquivo pessoal. (Coloração: Hematoxilina-eosina, 10x).

## 5 DISCUSSÃO

A glicerina a 98% e o congelamento em solução de glicerina a 20% e cloreto de sódio a 0,9% representam meios amplamente difundidos e utilizados em bancos de pele humana, em virtude da sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, devido à ação antimicrobiana da glicerina. Estas características foram ao encontro dos resultados desta pesquisa, visto a ausência de crescimento de microrganismos contaminantes em todos os tempos de conservação analisados.

Animais como as rãs, além de apresentarem os microrganismos normais da sua pele, também apresentam no tegumento bactérias e fungos provenientes do ambiente em que habitam. Sendo assim, a identificação e o isolamento de microrganismos específicos de determinadas espécies de anuros, tornam-se dificultados, uma vez que sofre grande influência do meio em que esses animais vivem (KUENEMAN et al., 2013). Apesar disto, os processos de lavagem das peles e manutenção nos meios de conservação mostraram-se eficientes, já que não houve crescimento microbiano nas amostras analisadas.

Resultados descritos por Lemos et al. (2007), demonstraram que o congelamento de pele de cão em solução de cloreto de sódio a 0,9% e glicérol a 20%, consiste em um método de conservação eficiente na manutenção de um ambiente livre de agentes contaminantes, o que corrobora com os resultados deste estudo. Porém, o estudo de Lemos et al. (2007) apresentou disparidade do presente estudo no tempo zero, que obteve crescimento bacteriano, o que difere parcialmente dos resultados desta pesquisa.

Em pesquisa análoga realizada por Menezes, et al. (2004) utilizando pele de cão submetida à conservação em glicerina a 98% em temperatura ambiente foi observada a eficácia do composto químico em evitar o crescimento fúngico somente a partir de 30 dias. Tais autores associam este resultado com o fato de o efeito antisséptico da glicerina só começar a atuar a partir de 30 dias de conservação, já que aos 15 dias de análise houve crescimento fúngico nas amostras. Estes resultados distinguem-se deste estudo se compararmos as primeiras análises, já que em nosso estudo não houve crescimento fúngico, ou bacteriano desde a primeira análise microbiológica.

As diferenças entre os resultados dos três estudos podem residir no tipo de pele estudada, tendo em vista que a pele de rã não apresenta pelos, que consistem em porta para agentes microbianos. Adicionalmente, as peles de rã passaram por dois banhos de imersão de 30 minutos em solução de clorexidine a 2%, e não somente uma lavagem como nos estudos de Menezes, et al. (2004) e Lemos et al., (2007).

Corroborando os resultados do nosso trabalho o estudo em que amostras de tendão calcâneo conservado em glicerina a 98%, em temperatura ambiente, por períodos de 30 dias a 6 meses, foram utilizadas para enxerto (RAISER, et al., 2001). No estudo de Raiser et al. (2001), apesar de não ter sido realizada análise microbiológica do tecido implantado, os animais não apresentaram reação inflamatória polimorfonuclear que caracterizasse infecção, comprovando assim, novamente, a eficácia da glicerina com relação a sua capacidade antisséptica.

A eficácia da glicerina a 98% e do congelamento em solução de cloreto de sódio a 0,9%, é relatada também na conservação de osso humano em banco de ossos hospitalar, apresentando resultados semelhantes ao presente estudo sob o ponto de vista microbiológico. (STEFFEN, 2018).

Sob o ponto de vista macroscópico, as amostras conservadas sob congelamento apresentaram melhor maleabilidade tecidual, já que obtiveram menor perda líquida devido à imersão em solução de baixa concentração de glicerina. Achados semelhantes foram descritos em estudo com conservação de pele de cão sob congelamento em solução semelhante, evidenciando ausência de perda de maleabilidade tecidual (LEMOS et al., 2007).

Já as amostras de pele conservadas em glicerina a 98% apresentaram-se rígidas e de difícil manuseio, semelhante ao observado em pele humana também conservada em glicerina 98% analisada por Wood et al. (2014). Isso ocorre porque a glicerina consiste em um composto químico higroscópico e, com isso, os tecidos acondicionados em tal meio, sofrem perda líquida significativa, promovendo alterações viscoelásticas importantes no tecido.

Devido à desidratação que ocorre no tecido após a conservação em glicerina a 98%, a coloração do tecido tende a tornar-se um pouco mais escurecida, fato este que foi observado em nossa pesquisa na análise das peles submetidas à

conservação em glicerina a 98%. Isso decorre da perda líquida que acontece no processo de conservação (WOOD, et al., 2014).

Semelhante ao que foi observado por Ferreira, et al. (2014) em seu estudo, utilizando peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar (300%) e glicerina a 98%, o tecido conservado em glicerina a 98% também apresentou-se menos maleável, porém, o tecido conservado em solução de açúcar mostrou-se maleável, o que comprova que tal meio de conservação pode apresentar este benefício, se comparado à glicerina a 98%.

Assim como descrito por Lemos et al. (2007), o descongelamento realizado nas peles submetidas ao congelamento se deu por imersão em “banho Maria” a 42°C. Este tipo de descongelamento, assim como no trabalho relacionado, não promoveu deterioração ao tecido. O tempo de descongelamento foi de em média 10 minutos, e variou de acordo com os tamanhos das peles.

Ainda que promova conservação por desidratação celular, histologicamente, a glicerina não interfere na arquitetura e na morfologia celular. Nosso estudo pôde observar tal resultado em todos os tempos de conservação, evidenciando viabilidade morfológica celular nas amostras submetidas tanto à conservação por glicerina a 98%, quanto aos submetidos ao congelamento.

Apesar de o congelamento puro formar cristais de gelo que alteram a morfologia celular, a glicerina acrescida ao meio de congelamento impediu a ocorrência destes, o que auxiliou na manutenção tecidual, como já observado por Lemos et al. (2007). Tal ocorrência justifica-se, pois a porção de glicerina presente na solução impede a formação de cristais de gelo no meio intracelular, já que esta tem papel higroscópico, ao retirar a água do meio intracelular, de forma que não ocorra formação de cristais, o que impede a destruição celular (LEMOS et al., 2007).

Achados semelhantes foram observados em membranas biológicas de ovinos conservados em glicerina a 98%. Pericárdio parietal, peritônio parietal, túnica vaginal parietal e fáschia lata foram avaliados e os tecidos, de uma forma geral, não apresentaram alterações de morfologia e arquitetura celular em todos os tempos avaliados (BARBOS, et al. 2012).

A caracterização histológica da pele de rã-touro identificada neste estudo foi similar à descrição prévia realizada por Ferreira et al. (2006), os quais, evidenciaram estruturas importantes, porém diferentes da pele de mamíferos. A pele de rã



apresenta em sua epiderme um epitélio pavimentoso pouco queratinizado, apresentando intimamente relacionados à sua membrana basal as células responsáveis pela pigmentação, os melanóforos. Já a derme, é dividida em duas porções distintas, que consistem no estrato esponjoso e estrato compacto. O estrato esponjoso é formado por tecido conjuntivo frouxo e apresenta vasos e glândulas mucosas e serosas, importantes para a umidificação da pele e produção de veneno, respectivamente. Já o estrato compacto é formado por tecido conjuntivo denso organizado em feixes que se dispõem de forma circular. (FERREIRA, et al., 2006).

A pele de rã se mostrou ainda, como sendo rica em colágeno, e sua utilização como membrana biológica se justifica positivamente corroborando com o trabalho semelhante de Lima-Junior et al. (2017), que utilizou pele de tilápia como membrana biológica no tratamento de feridas, tendo como principal justificativa a abundância em colágeno presente no tecido.

Guimarães, et al. (2007), em estudo avaliando outros tipos de membranas biológicas de origem bovina, como centro tendíneo, dura máter, fáscia lata, pericárdio, peritônio e túnica vaginal, mostraram que a conservação por glicerina a 98% também foi eficiente sob o ponto de vista de manutenção das estruturas morfológicas celulares, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

## **6 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que, apesar de ambos os meios de conservação apresentarem pontos positivos e negativos levando em consideração condições de armazenamento, custo e manuseio tecidual, tanto a glicerina a 98% quanto o congelamento em glicerina a 20% consistem em métodos eficientes de conservação de pele de rã, sob o ponto de vista microbiológico e histológico, posto que inibem o crescimento de microrganismos e mantêm a viabilidade celular do tecido conservado.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, p. 33-42, 1992.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. (Ed.). **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, p. 33-42, 1992.

ALVES, A. P. N. N.; VERDE, M. E. Q. L.; JÚNIOR, A. E. C. F.; SILVA, P. G. DE B.; FEITOSA, V. P.; JÚNIOR, E. M. L.; MIRANDA, M. J. B. DE; FILHO, M. O. DE M. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.14, n.3, p203-210, 2015.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços da saúde**. Editora: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ed., 2004.

BANKS, J.W. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BARBOSA, R. R.; LEAL, L. M.; MARTINS, L. L.; FILHO, S. P. G.; BOSSO, A. C. S.; MACHADO, M. R. F. Estrutura e ultra-estrutura de membranas biológicas de ovinos da raça Santa Inês (*Ovis aries*, L., 1758) a fresco e conservadas em glicerina. **Biotemas**. v.25, n.2, p.97-107, 2012.

BAZAZ, M. R.; MASHEREGHI, M.; SHAHRI, N. M.; MASHREGHI, M.; ASOODEH, A.; RASSOULI, M. B.; GOLMOHAMMADZADEH, S. Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice. **Pharmaceutical Biology**. v.51, n.12, p.1600-1606, 2013.

BILLINGHAM, R. E.; REYNOLDS, J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. **British Journal of Plastic Surgery**. v.5, n.1, p25-36, 1952.

BORSARI, F. N.; LEAL, L. M.; FREITAS, H. M. G. DE; SASAHARA, T. H. DE C.; MACHADO, M. R. F. Aplicação da membrana de látex natural e do extrato de pele de rã (*Lithobates catesbeiana*) em feridas cirúrgicas cutâneas de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Cirurgia Veterinária**. v.21, n.3, p.150-155, 2014.

CAMARGO, A. D. DE; CAMARGO, P. C. DE; LEAL, L. M.; FILHO, S. P. G.; MARTINS, L. L.; SHIMANO, A.; MACHADO, M. R. F. Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.2, p.185-191, 2014.

CLARK, D.P.; DURELL, S.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M. Ranalexin, a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.14, p.10849-10855, 1994.

DE PAULA, C.D.; TOLEDO, L.F. Anfíbios (Rã, Sapo e Cobra-cega). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Editora GEN/Roca, 2014

FALCÃO, S. C.; LOPES, S. L.; COELHO, A. R. DE B.; ALMEIDA, E. L. DE. Pele de Rana Catesbeiana como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães: Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.3, p.151-159, 2002.

FERREIRA, D. S.; JÚNIOR, P. E. A.; MAIA, C. S.; SILVA, W. E.; FRANÇA, D. F.; MORAES, E. F.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C. Caracterização histológica da pele de rã-touro (*Ranacatesbeiana*, Shaw 1802). **Biológico**. v.68, p.239-243, 2006.

FERREIRA, E.; LUCAS, E.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v.37, n.1, p.44-51, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GRAGNANI, A.; GONÇALVES, M. DE L.; FERIANI, G.; FERREIRA, L. M. Análise microbiológica em queimaduras. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**. v.20, n.4, p.237-240, 2005.

GUIMARÃES, G. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; CRUZ, C. DA; CAPALBO, A. C.; SANTOS, A. L. Q. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Bioscience Journal**. v.23, n.3, p.120-127, 2007.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Woung Healing. **Journal of Dental Research**. v.89, n.3, p.219-299, 2010.

HASLAM, I. S.; ROUBOS, E. W.; MANGONI, M. L.; YOSHIZATO, K.; VAUDRY, H.; KLOEPPER, J. E.; PATTWELL, D. M.; MADERSON, P. F. A.; PAUS, R. From frog integument to human skin: dermatological perpectives from frog skin biology. **Biological Reviews**. v.89, p. 618-655, 2014.

HIBBELER, R. C. **Resistência dos materiais**, 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Pearson Prentice Hall, p.674, 2009.

KUA, E. H. J.; GOH, C. Q.; TING, Y.; CHUA, A.; SONG, C. Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differencer in clinical outcomes and in vitro tissue viability. **Cell Tissue Bank**. v.13, p.269-279, 2012.

KUENEMAN, J. G.; PARFREY, L. W.; WOODHAMS, D. C.; ARCHER, H. M.; KNIGHT, R.; MCKENZIE, V. J. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. **University of Colorado**. 2013.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Wound healing. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**. v.69, n.3, p.355-367, 2011.

LEMO, P. F. B. A.; COELHO, M. C. O. C.; MONTEIRO, V. L. C.; COSTA NETO, E. O.; ANDRADE, L. S. S. Implantação de banco de pele congelada a -4°C para aplicação como curativo biológico. **Medicina Veterinária**. v.1, n.2, p.1-6, 2007.

LIMA, S.L; CRUZ, T.A.; MOURA, M.O. Ranicultura: análise da cadeia produtiva. **Folha de Viçosa**, p.220, 1999.

LIMA-JUNIOR, E. M.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B. DE; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES-FILHO, M. O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.16, n.1, p10-17, 2017.

MANGIONE, S., GARCIA, G., CARDOZO, O. M..The Eberth-Katschenko layer in three species of *Ceratophryines* anurans (Anura: Ceratophryidae). **Acta Zoologica**921: 21-26, 2011.

MENEZES, F. F.; COELHO, M. C. O. C.; LEÃO, A. M. A. C.; PEREIRA JÚNIOR, J. R.; GARCIA, E. A. C.; MOTA, R. A. Avaliação fúngica da pele de cães conservada em glicerol 98%. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.14, p.202, 2004.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; BELETTI, M. E.; FREITAS, P. M. C.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 13-17, 2002.

NOBLE, G. A.; NOBLE, E. R. On the histology of frog skin glands. **Wiley - Transactions of the American Microscopical Society**. v.63, n.3, p. 254-263, 1944.

OLIVEIRA, E. G. DE. Ranicultura: Novos desafios e perspectivas do mercado. **Ciência Animal**. v.21, n.1, p.173-186, 2015.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M.; DIAS, R. V. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. **Acta VeterináriaBrasilica**. v.6, n.4, p.267-271, 2012.

PICCOLO, N. S.; PICCOLO, M. S.; PICCOLO, M. T. S. The use of frogskin as a biological dressing for temporary cover of burn wounds. In: **Eisenmann-Klein M., Neuhann-Lorenz C. (eds) Innovations in Plastic and Aesthetic Surgery**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.

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

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A.M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. v.38, n.7, p.957-971, 2015.

QUEIROZ, F. F. DE; CORDEIRO, G. C.; RODRIGUES, A. B. F.; SILVEIRA, L. S. DA. Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservada em glicerina

98% para utilização como membrana biológica. **Ciência Rural**. v.42, n.3, p.501-506, 2012.

QUITZAN, J. G.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; CROCCI, A. J. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.18, n.4, 2003.

RAGHAVAN K, V.; BABU, M.; RAJARAM, R.; PURNA SAI, K. Efficacy of frog skin lipids in wound healing. **Lipids Health and Disease**. v.9, n.74, 2010.

RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; PIPPI, N. L.; ZINN, L. L.; SILVEIRA, D. S.; BORDIN, A. I.; BAIOTTO, G. C.; RIOS, M. V.; SILVEIRA, A. F. DA. Homoinplante ortotópico de tendão calcâneo em cães. Conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**. v.31, n.1, p.89-94, 2001.

SANTOS, C. A.; SANTOS, A. A. Assistência de enfermagem no atendimento pré-hospitalar ao paciente queimado: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.16, n.1, p.28-33, 2017.

SCHEMPP, C.; EMDE, M.; WOFLE, U. Dermatology in the Darwin anniversary. Part I: Evolution of the integument. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. v.7, p.750-757, 2009.

SCHIOZER, W. Banco de pele no Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.12, n.2, p.53-55, 2012.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva da tilápia. **Texto para Discussão – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**. n.2328, 2017.

SCHWATZ, C. A.; CASTRO, M. DE S.; JÚNIOR, O. R. P.; MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, E. N. F.; SEBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. **Herpetologia no Brasil**. v.2, p.200-225, 2005.

SHORES, T. J.; GABRIEL, A.; GUPTA, S. Skin Substitutes and Alternatives: A Review. **Advances in skin & wound care**. v.20, p.493-508, 2007.

SILVA, T. P. DA. Potencial terapêutico de peptídeos antimicrobianos isolados de venenos de anfíbios. 23 f., il. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)-

Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

SILVA, H. A. M. DA; SILVA-SOARES, T.; BRITO-GITIRANA, L. DE  
Comparative analysis of the integument of different  
tree frog species from *Olygon* and *Scinax* genera (Anura: Hylidae). **Zoologia**. v.34, 2017.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**. v.341, n.10, p.738-746, 1999.

STEFFEN, N. **Manual para implantação de banco de pele humana no Brasil**. São Paulo, 2018.

STORER, T.I.; USINGER, R L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. **Zoologia geral**. 6.ed. São Paulo: Nacional, p.618-623, 1995.

TAZIMA, M. DE F. G. S.; VICENTE, Y. A. DE M. V. DE A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Fundamentos em clínica cirúrgica (Simpósio) – 1ª parte Capítulo II**. v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TIMM, L. DE L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas

WOOD, J. M. B.; SOLDIN, M.; SHAW, T. J.; SZARKO, M. The biomechanical and histological sequelae of common skin banking methods. **Journal of Biomechanics**. v.47, p.1215-1219, 2014.