UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA

DIONE NATUREZA DE MORAES

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESINFECÇÃO POR OZÔNIO E CONSERVAÇÃO DE PELE DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* PARA ENXERTO CUTÂNEO EM MODELO ANIMAL

DEVELOPMENT OF THE OZONE DISINFECTION PROCESS AND SKIN CONSERVATION OF LITHOBATES CATESBEIANUS FOR SKIN GRAFT IN ANIMAL MODEL

SÃO PAULO – SP
2021

UNIVERSIDADE BRASIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DIONE NATUREZA DE MORAES

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESINFECÇÃO POR OZÔNIO E CONSERVAÇÃO DE PELE DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* PARA ENXERTO CUTÂNEO EM MODELO ANIMAL

Qualificação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Marcello Magri Amaral
Orientador
Profa. Dra. Adriana Pavinatto
Co-orientadora

SÃO PAULO – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M819d MORAES, Dione Natureza de.

Desenvolvimento de processo de desinfecção por Ozônio e conservação de pele de *Lithobates Catesbeianus* para enxerto cutâneo em modelo animal / Dione Natureza de Moraes. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

55 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral.

Coorientação: Profa. Dra. Adriana Pavinato.

1. Xenoenxerto. 2. Enxerto de pele. 3. Lithobates Catesbeianus. 4. Substituição de pele. 5. Pele de rã-touro. I. Amaral, Marcello Magri. II. Pavinato, Adriana. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

DIONE NATUREZA DE MORAES

"DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESINFECÇÃO POR OZÔNIO E CONSERVAÇÃO DE PELE DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* PARA ENXERTO CUTÂNEO EM MODELO ANIMAL".

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

_____
Prof(a). Dr(a) Marcello Magri Amaral (presidente-orientador)

_____
Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kozusny-Andreani (UNIVERSIDADE BRASIL)

_____
Prof(a). Dr(a) Lívia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

_____
Prof(a). Dr(a) Hueliton Wilian Kido (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)

_____
Prof(a). Dr(a) Cintia Cristina Santi Martignago (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

São Paulo,25 de agosto de 2021.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Marcello Magri Amaral

Houve alteração do Título: sim ( ) não (x):

_____
_____
_____

www.ub.edu.br

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO

UNIVERSIDADE BRASIL

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site http://www.universidadebrasil.edu.br, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site http://bancodeteses.capes.gov.br, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESINFECÇÃO POR OZÔNIO E CONSERVAÇÃO DE PELE DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* PARA ENXERTO CUTÂNEO EM MODELO ANIMAL"**

Autor(es):

Discente: **Dione Natureza de Moraes**
Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Marcello Magri Amaral**
Assinatura: _____

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)** Adriana Pavinatto
Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim ( ) não (x):

_____
_____
_____

Data: 25/08/2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que tornam os meus dias mais felizes e bonitos, com um carinho exclusivo as pessoas mais importantes de minha vida que são o meu alicerce: *in memoriam* para minhas duas avós que infelizmente não se encontram mais ao meu lado. Dedico também aos meus pais Gleice e Welton, pelo apoio que sempre me deram que sofreram e sorriram junto comigo durante a concretização deste trabalho, ao meu irmão Welton por todo companheirismo. Obrigada, por estarem sempre presentes em todos os momentos, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que através da força do teu Espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho. E consegui mais uma conquista ao concluir este trabalho.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso.

Aos meus pais Welton J. de Moraes e Glecejane R.de Moraes, por todo o amor e dedicação para comigo, por terem sido peças fundamentais para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou, pelo amor incondicional e pela paciência.

As minhas avós *in memoriam* Maria Martins e Maria Auxiliadora por todo amor, carinho, por todo o exemplo de vida e superação que sempre demonstraram, e mesmo estando longe, sempre se fazem presente em minha vida.

Ao meu irmão Welton J. que mesmo inconscientemente me incentivou, sendo além de irmão amigo, agradeço de coração.

Ao meu orientador o prof. Dr. Marcello Magri e minha Co-orientdora profa Adriana Pavinatto por todo conhecimento, empenho, e capacidade que souberam valorizar e ajudar a concluir este trabalho.

A professora Dra Dora Inês que com todo seu amor paciência, delicadeza, inteligência, que apesar de todas a dificuldades, pode me ajudar e me guiar, para que tudo ocorresse da melhor maneira, jamais poderei retribuir.

A Ketlin e André por me apoiarem desde o início do doutorado por toda amizade, por todas as vezes que sempre me receberam de coração aberto, amo vocês.

A todos meus amigos por todas as palavras de amor e carinho, por sempre estarem comigo quando precisei, e agora estamos longe mas guardo cada um em meu coração.

As pessoas maravilhosas que tenho convivido no último ano, vocês foram essenciais, sempre me apoiando, e estando comigo nos momentos felizes e tristes, gostaria de agradecer e lhes dizer o quanto amo vocês, Ana Carla, Ana Paula, Yuri Macedo, Luan Cunha, Silvio Tadeu, obrigada por todos os momentos que passamos juntos.

“É preciso ter perseverança para alcançar seus objetivos e fé para não desistir nunca. Pois, ... “fé é a certeza de coisas que se esperam, e a convicção de fatos que não se vêem”.

(Bíblia Shedd – Hb 11.1)

RESUMO

A substituição de pele é um passo importante para o tratamento de várias etiologias. Atualmente existe disponível no mercado vários tipos de enxertos, cada um com as suas especificidades, sendo utilizados de após um estudo clínico sobre o estado de saúde do paciente. A utilização da pele rã-touro (*Lithobates Catesbeianus*) vem se mostrando promissora como um possível enxerto cutâneo, devido a sua composição celular, alta concentração de colágeno, água e nutrientes, biocompatibilidade, interação biológica com o substrato com a liberação de biomoduladores teciduais. Neste trabalho foi desenvolvido protocolo de esterilização e conservação das peles de Rã-touro (Lithobates Catesbeianus), e avaliação de sua eficácia como enxerto cutaneo em modelo animal. Foram testas a esterilização com ozônio e conservação em 4 diferentes soluções ozonizadas (solução salina, óleo de melaleuca, óleo de copaíba e quitosana). O protocolo de desinfecção por ozônio e conservação em óleo de copaíba ozonizado manteve a pele inerte de qualquer microrganismo por um período de doze meses. A avaliação em modelo animal foi realizada por análise histológica e por tomografia por coerência óptica. Estas análises demonstram resultados promissores para futuras aplicações clínicas, a pele se mostrou excelente para ser usada como xenoenxerto, pois houve boa adesão do enxerto, presença de fibroblastos e formação de derme neoformada. Comparativamente ao autoenxerto (controle), este xenoenxerto apresentou maior presença de infiltrados inflamatório o que indica o início do crescimento do tecido de granulação.

Palavras-chave: Xenoenxerto, enxerto de pele, *Lithobates Catesbeianus,* substituição de pele, pele de rã-touro.

ABSTRACT

Skin replacement is an important step in the treatment of various etiologies. Currently, there are several types of grafts available on the market, each with its own specificities, being used after a clinical study on the patient's health status. The use of bullfrog skin (*Lithobates Catesbeianus*) has shown promise as a possible skin graft, due to its cellular composition, high concentration of collagen, water and nutrients, biocompatibility, biological interaction with the substrate with the release of tissue biomodulators. In this work, a protocol for the sterilization and preservation of the bullfrog (*Lithobates Catesbeianus*) skins was developed, and its efficacy as a skin graft in an animal model was evaluated. Sterilization with ozone and conservation in 4 different ozonized solutions (saline solution, tea tree oil, copaiba oil and chitosan) were tested. The protocol of ozone disinfection and conservation in ozonized copaiba oil kept the skin inert to any microorganism for a period of twelve months. The evaluation in animal model was performed by histological analysis and by optical coherence tomography. These analyzes show promising results for future clinical applications, the skin proved to be excellent for use as a xenograft, as there was good graft adhesion, presence of fibroblasts and formation of a newly formed dermis. Compared to the autograft (control), this xenograft showed a greater presence of inflammatory infiltrates, which indicates the beginning of granulation tissue growth.

Keywords: Xenograft, skin graft, *Lithobates Catesbeianus*, skin replacement, bull-frog skin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Amostra da pele de Rã-touro in natura, sob a perspectiva frontal e posterior. _____14
Figura 2Histologia de tecido utilizado no grupo AE (pele do rato) e no grupo XE (pele de rã-touro)_____25
Figura 3 Imagem representativa do AE e XE após 7 dias._____26
Figura 4 Corte histológico corado com HE representativo dos achados nos grupos XA e XE._____27
Figura 5 Corte histológico corado com HE na região de pele hígida, interface e enxerto dos grupos dos grupos AE (A, B e C) e XE (C,D e E)_____28
Figura 6 Boxplot do escore para cada um dos grupos estudados _____30
Figura 7 Presença de fibroblastos._____31
Figura 8 Presença de infiltrado inflamatório _____31
Figura 9Imagem OCT das peles antes da aplicação cirúrgica. _____32
Figura 10 Imagens OCT para 0, 3 e 7 dias após procedimento cirúrgico. _____33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características físicas do óleo de Copaifera officinalis._____16
Tabela 2 Resultado dos grupos testados _____23
Tabela 3 apresenta o resultado da classificação das lâminas no escore proposto por Basaran et al. [22] modificado. _____29

Sumário

1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 3
Objetivo geral: 3
Objetivo Específico 3
3 REVISÃO DA LITERATURA 4
3.1 ANATOMIA DA PELE 4
3.3 LESÕES CUTÂNEAS 4
3.4 Enxertos 6
3.5 RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeiana*) 8
3.6 OZÔNIO 10
3.6.1 GERAÇÃO DO OZÔNIO 11
3.6.2 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO OZÔNIO 12
4 METODOLOGIA 13
4.1 Obtenção das amostras de pele de Rã-touro (Lithobates Catesbeiana) 13
4.2 Processamento das Amostras de pele de rã-touro 13
4.3 Desinfecção através do ozônio 14
4.4 Etapa 1 – Desinfecção e Estabilidade 15
4.4.1 Grupo 1: Pele ozonizada + solução salina 15
4.4.2 Grupo 2: Pele ozonizada + óleo de copaíba 16
4.4.3 Grupo 3: Pele ozonizada + óleo de Melaleuca 17
4.4.4 Grupo 3: Pele ozonizada + Quitosana 17
4.5 Etapa 1 – Avaliação de estabilidade e análise microbiológica 17
4.6 Etapa 2 – Animais de experimentação 18
4.7 Etapa 2 – Aplicação do enxerto cutâneo em modelo animal 19
4.8 IMAGEAMENTO OCT 20
4.9 Avaliação histológica descritiva e semi-quantitativa 21
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 22
5.1 Etapa 1 – Análise de desinfecção e estabilidade 22
5.2 Etapa 2 – Aplicação do enxerto cutâneo em modelo animal 25
6 CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS 36
ANEXO A – PROTOCOLO DO CEUA 41

1 INTRODUÇÃO

A pele humana está sempre exposta e sujeita a lesões e situações clínicas que podem ir de pequenas queimaduras a grandes traumas. Lesões mais extensas podem resultar na perda de grande parte do tecido, necessitando de um grande processo de reconstrução (PHILLIPS TJ. 1998).

A substituição da pele, enxerto cutâneo, é uma etapa importante no tratamento de diversas etiologias. Esses enxertos têm o objetivo de auxiliar no reparo de lesões cutâneas, dependendo da reposição utilizada. Diversos estudos e avanços na utilização de materiais sintéticos e biológicos vem sendo desenvolvidos, existindo ainda a necessidade de mais testes com os materiais disponíveis no mercado para melhorias e adaptações em seu modo de uso (Lima-Junior, E.M.; Picollo,N.S.; Miranda,M.J.B.; Ribeiro, W. L. C.; Alves, A. P. B. N; , Ferreira, G. E.; Parente, E. A.; 2017). Nesse cenário, há a necessidade de novas tecnologias que possam ser utilizadas para substituir a pele durante o processo de lesões cutâneas.

A rã-touro (*Lithobates Catesbeianus*) é um anfíbio de grande importância comercial na criação de rãs, com boa adaptação em cativeiro e manejo simples. Seu valor comercial está relacionado à sua de carne e couro para produção de calçados, cintos, bolsas, carteiras, luvas, objetos e produtos ornamentais. Na pele destes anfíbios, existe um grande número de glândulas, que produzem um fluido aquoso que mantém a umidade de sua pele, essencial para a respiração cutânea. Este fluido torna sua pele escorregadia, sendo também uma importante defesa contra predadores. Devido suas características, a pele desta rã é vista como uma possível biomaterial para enxerto no tratamento de lesões cutâneas (VELLY, M. L. M.., 2001; FERREIRA, D. S .; JÚNIOR, P. E. A .; MAIA, C. S.; SILVA, W. E .; FRANÇA, D. F .; MORAES, E. F .; TEIXEIRA, 2006.)

O uso de reposição biológica da pele requer cuidados, principalmente relacionados à desinfecção adequada. Diversos métodos podem ser empregados para obter o processo de desinfecção. A desinfecção por gás ozônio é um dos métodos promissores para este fim pois não cria resistência medicamentosa, como no caso do uso de antibióticos. O gás ozônio é conhecido por seu alto efeito antimicrobiano, é um agente oxidante eficaz para inativar vírus, bactérias, fungos e

protozoários. A inativação ou redução de microrganismos é função de sua concentração, do tempo de exposição e do microrganismo envolvido na contaminação. A vantagem desta técnica de desinfecção é o baixo custo e reduzido tempo de aplicação (BOCCI V. 1996; SUK-NAM K, KUI-JIN K, JOUNG-HYUN P. 2013)

A associação do uso de pele de rã-touro, desinfectada pela técnica de ozonização, e suas formas de conservação para uso como biomaterial para enxerto de pele, ainda não foi explorada na literatura.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo de esterilização e conservação das peles de Rã-touro (*Lithobates Catesbeianus*), e avaliação de sua eficácia como enxerto cutaneo em modelo animal.

Objetivo Específico

- Desenvolver e aplicar do protocolo de esterilização das peles de rã-touro utilizando técnica de ozonização
- Realizar de teste de estabilidade (*shelf-life)* das peles esterilizadas.
- Aplicar os enxertos de pele em modelo animal.
- Avaliar o processo cicatricial das feridas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ANATOMIA DA PELE

O maior órgão do corpo humano é a pele, que desempenha diversas funções relacionadas às atividades biológicas, bioquímicas e o cumprimento de diversos papeis na proteção do corpo humano. Diversos fatores podem comprometer a função dérmica, como traumatismo, doenças inflamatórias, tabagismo, diabetes, desnutrição, obesidade, imunossupressão, entre outros. Sendo assim o estudo do processo de cicatrização das lesões cutâneas torna- se de extrema importância independente do agente causador (BROUGHTON G, JANIS JE, 2006;. PHILLIPS TJ. 1998)

Apesar dos avanços no processo de cuidado de feridas, as lesões podem se iniciar por um pequeno corte ou até mesmo uma incisão cirúrgica. Em contrapartida, nas feridas crônicas o processo de cicatrização ocorre de forma bem lenta. A fase aguda de um trauma pode evoluir para uma ferida crônica quando associadas a outras doenças, como diabetes e doenças cardiovasculares (PHILLIPS TJ. 1998)

A pele é sempre vulnerável a lesão devido à grande exposição a riscos ambientais, podendo levar a perda da sua integridade. Portanto a prevenção de infecção de feridas vem se tornando um desafio, devido à facilidade de contaminação por micro-organismos. Em ambiente hospitalar, esta contaminação se torna potencialmente perigosa devido a presença da bactéria *Staphylococcus aureus*, mais comum em infecções nosocomiais. Desta forma, busca-se cada vez mais novos curativos ideais que sejam capazes de agir como barreira física e auxiliar no tratamento de feridas. (PHILLIPS TJ. 1998, NOROOZ H, KAZEMI A, FADAEE R, ALAVI S, MOHAMMADZADEH M. 2010)

3.3 LESÕES CUTÂNEAS

Qualquer descontinuidade cutânea pode ser definida como ferida, podendo ser causada por vários motivos, destacando-se trauma, pressão no local e até por

procedimentos cirúrgicos. Levando em consideração o processo de reparação, as feridas podem ser classificadas em agudas e crônicas, o que estabelece uma sistemática que facilita o processo de avaliação (STRODTBECK, F. 2001).

Feridas cutâneas são responsáveis por causar um número de morbidade e mortalidade significativas, apesar dos avanços no processo de cuidado de feridas. As lesões podem se iniciar por um pequeno corte ou até mesmo uma incisão cirúrgica, geralmente nessas lesões o tratamento ocorre como o esperado. Em contrapartida, nas feridas crônicas, o processo de cicatrização ocorre de forma bem lenta. A fase aguda de um trauma pode evoluir para uma ferida crônica de acordo com a associação de certas doenças tais como diabetes e doenças cardiovasculares. Atualmente a prevalência nos EUA chega a ser de até 6,0 milhões de pessoas com feridas crônicas é de até 18 milhões em todo o mundo (NOROOZ H, KAZEMI A, FADAEE R, 2010; OVINGTON L, 2010; BROUGHTON G, JANIS JE, 2006)

Os pacientes podem morrer por complicações de feridas crônicas, tais como infecções de feridas, sepse e choque séptico, até por eventos relacionados a trombose por imobilização prolongada. Ainda há uma grande necessidade de desenvolver, com urgência, agentes terapêuticos que possam promover a cicatrização de feridas evitando a contaminação e processos infeciosos mais graves (RICO RM, RIPAMONTI R, BURNS AL, GAMELLI RL, DIPIETRO LA. 2002; CARRICO TJ, MEHRHOF AI JR., COHEN IK. 1984)

O processo de cicatrização de lesões cutâneas é formado por um conjunto de alterações teciduais importantes para manter a integridade do organismo, que envolve a inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação. A resposta tecidual surge como resposta às lesões tanto que sejam induzidas por cirurgias ou até mesmo por traumatismo. No processo de reparação é necessário um conjunto de mecanismo para preparar o tecido lesionado para o processo de reconstrução, esta fase geralmente acontece de forma imediata a agressão do tecido. Entretanto, quando o estímulo inflamatório não consegue ser eliminado pelo organismo, desencadeia-se uma resposta mais complexa levando ao processo inflamatório crônico (CARRICO TJ, MEHRHOF AI JR., COHEN IK. 1984)

A cicatrização de feridas é um dos mais complexos processos biológicos, pois iniciam por meio da fase de proliferação e maturação, onde é requerida a interação entre os mediadores que são ambos residentes e aqueles que se infiltram (GILLITZER R, GOEBELER M. 2001). A fase de cicatrização das lesões se inicia após as primeiras respostas inflamatórias, onde irá gerar um novo estroma que consiste em fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos que constitui o tecido de granulação. Dentro desses tecidos, um grande número de fatores de crescimento e citocinas que são produzidas pelo organismo para induzir a cicatrização (HINZ B. 2007).

Os fibroblastos são ativados em resposta por vários fatores, onde o organismo induz a migração deles para o local lesionado (DESMOULIERE A, CHAPONNIER C, GABBIANI G. 2005). Os fibroblastos possuem uma capacidade contrátil de aderir e facilitar o processo de fechamento de feridas. As metaloproteinases irão desempenhar um crucial papel na remodelação da matriz celular levando a maturação da ferida (SINGER AJ, CLARK RA. 1999; SHEVCHENKO RV, JAMES SL, JAMES SE. 2010)

3.4 Enxertos

Enxerto cutâneo é um método que serve para prenchimento cirúrgico de uma falha tecidual, onde não há tecido suficiente para cobrir toda a parte exposta, sendo retirado um segmento de uma área doadora e transferido para o recepetor. Os enxertos devem ser classificados levando em consideração a relação entre doador e hospedeiro, podendo ser: autógenos, alógenos ou xenógenos; no que diz respeito a sua espessura pode ser parcial ou total (PAVLETIC, 2007).

Existe uma grande necessidade de produtos que possam substituir a pele, e inúmeros pesquisadores se dedicam ao desenvolvimento de biomateriais para essa substituição. Potenciais biomateriais substitutos de pele devem atender a quatro critérios da engenharia de tecido, sendo eles: ser seguro ao paciente; ser clinicamente eficaz; ser de fácil aplicação e ser de fácil manipulação (OVINGTON L.,

2010; CHAKRABARTY K, DAWSON R, HARRIS P, LAYTON C, BABU M, GOULD L,1999)

Há no mercado inúmeros produtos de pele artificial para várias aplicações. As peles artificiais ou substitutos de pele são importantes, pois podem aumentar as taxas de cura e até mesmo inibir complicações secundarias. Os produtos de pele artificial ou até mesmo substitutos de pele podem ser usados para enxertos de pele viva; em queimaduras parciais e até em pacientes com queimaduras de estado crítico onde pode haver necessidade de um enxerto, essas peles podem ser usadas em doenças dermatológicas raras com bolhas que afetam uma grande área de ruptura na pele (CRONIN H, GOLDSTEIN G, 2013; HORCH RE, KOPP J, KNESER U, BEIER J, BACH AD. 2005).

Existem vários tipos de enxertos, sendo os autógenos os mais utilizado atualmente. Nele o tecido do enxerto provém do mesmo animal doador. Tem-se ainda alguns outros tipos, chamados de alógenos, ou hemoenxertos, aqueles que o receptor e o doador são de animais da mesma espécie, ou seja, indivíduos distintos mas de mesma espécie. Existem também os xenógenos, ou heteroenxertos, onde os enxertos são provenientes de um doador do tecido que é de uma espécie diferente do receptor (PAVLETIC, 2007).

De acordo com uma análise clínica, a utilização dos enxertos autógenos possui um melhor resultado quando realizado uma comparação com os alógenos ou xenógenos. Isso acontece pois o processo de estimulação imunogênica é bem maior nesse tipo de enxerto, e os enxertos xenógenos e alógenos tendem a migrar para um processo de rejeição quando utilizado por um período longo. ((MIRALIAKBARI; MACKAY, 2006).

Para que seja realizada a aplicação do enxerto cutâneo, é necessário que o paciente seja previamente analisado e passe por exames, pois um paciente debilitado ou com processo anêmico, pode favorecer a rejeição do enxerto. Um outro critério a ser analisado é a vascularização do local onde será colocado o enxerto para manter a integridade do tecido. (MIRALIAKBARI; MACKAY, 2006).

A substituição de pele é um passo importante para o tratamento de várias etiologias. Esses produtos se destinam a ajudar no processo de cicatrização e até mesmo a cura de lesões cutâneas, dependendo do substituto usado. Atualmente os tipos de pele existentes apresentam vantagens e desvantagens associadas. Ainda são necessários mais estudos e avanços utilizando materiais sintéticos e biológicos, e até mesmo mais testes com os materiais que existem no mercado para melhorias e adequações no seu modo de uso (Lima-Junior, E.M.; Picollo,N.S.; Miranda,M.J.B.; Ribeiro, W. L. C.; Alves, A. P. B. N; , Ferreira, G. E.; Parente, E. A.; 2017)

3.5 RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeiana*)

Atualmente a *Lithobates catesbeiana* (rã-touro) visto do ponto comercial é uma das espécies ranárias mais importantes do mundo. O processo de criação de rãs no Brasil está em certa fase de crescimento, gerando assim um uma grande quantidade de resíduos que não são bem aproveitados e caem em desuso. A pele da rã chega a constituir 11 % de todo o animal, após passar por alguns processos de curtimento pode ser empregada para produzir diversos produtos como cintos, pulseiras, bolsas, entre outros artigos (VELLY, M. L. M, 2001; FERREIRA, D. S .; JÚNIOR, P. E. A .; MAIA, C. S .; SILVA, W. E .; FRANÇA, D. F .; MORAES, E. F .; TEIXEIRA, 2006)

Os anfíbios apesar de toda sua importância econômica ainda existem uma escassez de estudos mais aprofundados sobre toda a sua importância cientifica. Em comparação a outros animais sendo eles os vertebrados, podemos observar que a pele dos anfíbios possui uma certa sensibilidade apesar de estar presente em vários ambientes diferentes (FERREIRA, D. S .; JÚNIOR, P. E. A .; MAIA, C. S .; SILVA, W. E .; FRANÇA, D. F .; MORAES, E. F .; TEIXEIRA, 2006)

A pele da *Lithobates catesbeiana*, apresenta-se com um grande potencial para pesquisa por apresentar uma grande diversidade de toxinas através do seu sistema de defesa. Nas células que revestem a pele deste animal é possível encontrar diversos ativos como compreendem moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de uma diversificada gama de esteróides, de alcalóides, de aminas biogênicas, de derivados guanidínicos, de proteínas, peptídeos, e todo o

sistema enzimático envolvido na sua biossíntese (SEBBEN, A., SCHWARTZ, C. A. e CRUZ, J. S. 1993)

A Rã- Touro é um tipo de anfíbio que não apresenta ameaças com relação a doenças, podendo ser uma fonte de colágeno acessível. Como a maioria dos anfíbios, esta espécie apresenta uma grande variedade de substâncias química no muco secretado, o que vem despertando interesse na indústria farmacêutica (LI, H .; LIU, B. L .; GAO, L. Z .; CHEN, H. L, 2004.)

A pele de *Lithobates catesbeiana* possui uma membLithobates abaixo da derme que não causa reação em contato com a epiderme humana, sendo interessante para utilizar como banco de pele para tratar queimaduras graves (MORAES, J.H.C. 2004). A pele da Rã-touro foi utilizada como curativo temporário em caso de queimaduras, onde a pele era mantida congelada, não foram identificados casos de rejeição (GOMES, D.R., SERRA, M.C., PELLON, M.A. 1995)

Foram realizados estudos onde a pele da *Lithobates Catesbeiana* foi criopeservada em solução de NaCl e glicerol com a temperatura de -4 ºC, ao serem descongeladas foram aplicadas em cães como curativos oclusivos em feridas, onde constatou-se que houve rejeição do curativo (FALCAO, S C, LOPES, S L, COELHO, A R B, 2002). Já em outro estudo realizado utilizou-se curativos grupo em um grupo experimental com a pele de Rã-Touro e outro grupo padrão com curativos utilizando compressa de gases, verificou-se que o grupo experimental teve um processo de cicatrização bem mais efetivo (SAI, K. S .; BABU, M, 2001).

Em outro estudo realizado demonstra que a pele de anfíbios possui um grande potencial no auxílio à cicatrização, tanto em animais saudáveis quanto em animais diabéticos, o que irá auxiliar no encerramento da lesão, pois a pele com suas proteínas naturais impede qualquer resposta inflamatória excessiva, fator que impede que a mesma se torne crônica (FALCAO, S C, LOPES, S L, COELHO, A R B, 2002).

Nota-se uma necessidade de estudos mais aprofundados, até mesmo com técnicas mais avançadas de esterilização da pele da *Lithobates catesbeiana*, e com isso gerar protocolo da melhor maneira de utilizar a pele, como um meio viável de

curativo, onde possa ser utilizado com toda a segurança necessária visando a qualidade do tratamento que o paciente merece receber.

3.6 OZÔNIO

O ozônio é um gás que foi descoberto por meados do século XIX, pelo químico alemão Christian Friedrich Schonbein que notou um odor diferente no ar, após liberar descargas elétricas na atmosfera, passou a pesquisar e observou que esse odor também era característico na água, onde passou a acreditar que esse odor poderia evidenciar um gás atmosférico. É um gás derivado do grego “ozein”, que significa aroma ou cheiro, o que é uma característica marcante do ozônio o odor desagradável, podendo ocorrer de forma natural na atmosfera onde desempenha o papel de absorver a radiação ultravioleta, que são prejudiciais à saúde dos seres humanos (LOPES SRA. FERREIRA JR, DA SILVA KB, DE OLIVEIRA BACELAR, 2015; RUBEN, M.B, 2001).

O gás ozônio só foi descoberto como agente antimicrobiano no final do século XIX, onde a França foi o primeiro País a começar a utilizá-lo para tratar a água. A partir dessa utilização iniciaram-se vários estudos sobre o potencial do ozônio em diversos tratamentos não só através da água. A ozonioterapia vem sendo amplamente estudada e utilizada há diversas décadas, devido a seus efeitos serem comprovados e por apresentar efeitos colaterais mínimos. Há mais de 150 anos que o ozônio já vem sendo usado para desinfetar, tratar infecções, feridas e doenças múltiplas. Ele tem sido usado para desinfetar a água desde a virada do século passado (PASSOS M P, SILVA H M, MOREIRA L M, ZÂNGARO R A, SANTOS R S, FERNANDES F B, LIMA C J, FERNANDES,2014; GRAHAM, D. M.,1997; CARAVAGGI C, DE GIGLIO R, PRITELI C, ET AL. 2003)

A utilização do gás ozônio no Brasil iniciou-se como alternativa ao tratamento de água por volta de 1983. Até os dias atuais ainda não se tem uma legislação especifica sobre a ozonioterapia (GONÇALVES, R. F. 2003).

O ozônio apresenta-se na forma triatômica do oxigênio (O_3), é uma molécula instável que pode ser solúvel em água, pelo seu odor característico ele pode ser percebido mesmo em pequenas concentrações. Possui um alto poder de oxidação, sendo o segundo agente oxidante mais poderoso, perdendo apenas para o flúor. Em

pequenas concentrações ele pode apresentar-se na forma incolor, e com o aumento da concentração torna-se um gás de coloração azul. Apesar de ser solúvel em água o ozônio tem essa solubilidade reduzida em altas temperaturas, tornando-se menos instável, o que não vai alterar seu poder de desinfecção, o que demonstra que essa desinfecção é independente da temperatura (KHADRE, M. A .; YOUSEF, A. E .; KIM, J. G. 2001; LANGLAIS, B, 1991)

3.6.1 GERAÇÃO DO OZÔNIO

O ozônio forma-se naturalmente em pequenas quantidades na estratosfera pela radiação ultravioleta do sol sobre o oxigênio. Existe uma pequena quantidade de ozônio na troposfera decorrente das reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio que são lançados pela indústria, mas por ser um gás instável ele se decompõe no ar. Para gerar o ozônio ocorre a divisão de uma molécula de oxigênio diatômico, o oxigênio resultante da quebra irá reagir com outras moléculas de oxigênio e formar o ozônio. Entretanto para quebrar essa molécula de oxigênio requer uma grande quantidade de energia (LANGLAIS, B .; RECKHOW, D. A .; BRINK, D. R,1991)

O gás ozônio pode ser produzido por três maneiras sendo elas: por irradiação ultravioleta, eletrólise do ácido perclórico e através de descarga elétrica (de corona). O método de produzir o ozônio comercialmente é realizado por descarga elétrica, conhecido como processo de corona, convertendo de maneira simples o oxigênio em ozônio. Este método é constituído por dois eletrodos que são submetidos a uma elevada diferença de potencial, e o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio entre os eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente ocorre a dissociação da molécula do oxigênio, e essa dissociação vai gerar consequentemente o ozônio. É necessário que este gás seja gerado no próprio local onde será usado, pois quando é exposto ao ar decompõe-se facilmente (KUNZ A, FREIRE RS, ROHWEDDER JJR, DURAN N, MANSILA H, RODRIGUEZ J. 1999)

3.6.2 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO OZÔNIO

O ozônio é conhecido por seu alto poder antimicrobiano, ele é um agente oxidante eficaz para inativar vírus, bactérias, fungos, protozoários. A inativação ou redução desses microrganismos irá depender da concentração do ozônio, do tempo de exposição e do microrganismo envolvido (BOCCI V. 1996; SUK-NAM K, KUI-JIN K, JOUNG-HYUN 2013).

A ação antimicrobiana do ozônio deve-se a oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e gerando o processo de lise celular. O ozônio também pode agir alterando a atividade enzimática, já em outros casos o ozônio é capaz de destruir o RNA e assim irá alterar as cadeias de peptídeoglicanos e o capsídeo proteico. A ação do ozônio sobre as bactérias pode ser considerada pela oxidação de vários constituintes celulares. Essa oxidação ocorre de maneira rápida, as Gram-negativas se tornam mais sensíveis quando comparadas as Gram-positivas, pois possuem quantidade menor de peptidioglicano em sua parede celular (RUSSEL, A. D .; HUGO, W. B .; AVLIFFE, G. A. J. 1999; LAPOLLIFR, SANTOS LF, HÁSSEMERMEN, AISSE MM, PIVELIRP.2003).

As bactérias em forma esporulada tornam-se mais resistentes a ação do ozônio do que as vegetativas, uma das bactérias mais sensíveis ao ozônio é a *Escherichia coli,* sendo que as formas mais resistentes são *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que são formas gram-positivas (SUK-NAM K, KUI-JIN K, JOUNG-HYUN 2013; SALVADOR, R .; MULLER, E.E .; FREITAS, J.C. 2005)

Atualmente se buscam novas substâncias que apresentem atividade antimicrobiana, devido ao grande aumento da resistência adquirida por bactérias. O ozônio pode ser utilizado para esterilizar vários produtos e materiais desde embalagens e até mesmo água, a grande vantagem do ozônio é não liberar resíduos tóxicos, nem no produto e no meio ambiente (BOCCI V. 1996), e não gerar resistência medicamentosa como os antibióticos.

4 METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados somente após a aprovação do comitê de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Brasil (nº 1900032).

Esse trabalho foi realizado em duas etapas principais. A primeira etapa teve o intuito de analisar processo de desinfecção dos enxertos utilizando a técnica de ozonização e sua conservação em diferentes soluções, estabelecendo assim o melhor protocolo de desinfecção e conservação. Já a segunda etapa do estudo teve o intuito de avaliar o uso das peles de rã-touro como enxerto cutâneo em modelo animal. Nesta etapa foram utilizadas as peles de rã-touro processadas de acordo com o protocolo estabelecido na etapa anterior.

4.1 Obtenção das amostras de pele de Rã-touro (Lithobates Catesbeiana)

Atualmente no Brasil as peles de Rã-touro são tidas como um subproduto da produção de carne, e podem ser obtido facilmente em ranários particulares. Para realização deste trabalho as amostras de pele de rã-touro foram obtidas no Ranário Lithobateskan, em Juquitiba – SP.

As peles foram obtidas já separadas da carcaça dos animais e foram mantidas resfriadas em geladeira até o momento de seu processamento.

4.2 Processamento das Amostras de pele de rã-touro

O processamento das amostras, preparação dos enxertos e análise microbiológica das peles de rã-touro foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil.

As amostras de pele de rã-touro foram obtidas na forma *in natura*, ou seja, frescas, e foram mantidas refrigeradas até o momento da preparação dos enxertos (figura 1). O processo de preparação iniciou-se pela limpeza das amostras para remoção de

qualquer tipo de resíduos musculares. As peles foram raspadas com o auxilio de bisturi para remoção de resíduos musculares, deixando somente tecido cutâneo. A seguir as amostras foram lavadas em agua corrente e abundante para remoção de resíduos. Em seguida foram cortadas em um formato padrão de 1 x 1 cm para análise de desinfecção e estabilidade (primeira etapa), e em formato 3 x 5 cm para aplicação em modelo animal (segunda etapa). Para padronização durante os testes em animais, as amostras foram retiradas do dorso do animal, retângulo pontilhado em destaque na figura 1. As amostras foram mantidas em ambiente aquoso e sob refrigeração até o início do processo de esterilização.

Figura 1 Amostra da pele de Rã-touro *in natura*, sob a perspectiva frontal e posterior.

Fonte: O autor

4.3 Desinfecção através do ozônio

Para o processo de desinfecção das amostras de pele foi utilizado o gás ozônio, visto que é um gás que é facilmente solúvel em água, característica essa que o torna uma excelente alternativa para processos de esterilização.

Nessa pesquisa utilizamos o gás ozônio gerado pelo equipamento Ozone Life (São Paulo, Brasil), conectado ao cilindro de oxigênio medicinal, foi disperso na água por 20 minutos, totalizando uma dosagem de ozônio de 700 L / min-1, onde as amostras de pele ficaram imersas em um recipiente de 1000 Ml, preenchido com água

deionizada estéril, esse recipiente foi mantido fechado com papel alumínio para que não houvesse dispersão do gás no momento do processo de ozonização. Após esse processo de 20 minutos, uma parte das amostras foram separadas para a realização da análise microbiológica, e a outra parte foi mantida em um tubo contendo 10 ml de agente conservante (de acordo com o grupo experimental), onde ficou imerso por um período total de 12 meses, para a realização do teste estabilidade (*self-life*), onde mensalmente eram abertos 5 frascos para a realização da análise microbiológica para a avaliar se ainda permanecia inerte de qualquer tipo de contaminação.

Nessa parte do estudo foram preparados 60 tubos Falcon por grupo, cada um contendo 5 amostras de pele imersa em óleo de copaíba, todos os meses um tubo foi aberto e realizado o teste microbiológico por um período de 12 meses.

4.4 Etapa 1 – Desinfecção e Estabilidade

Para a realização de todo o processo experimental de análise da desinfeção e conservação/estabilidade foram preparadas 120 amostras mantidas sob refrigeração, divididas em 4 grupos experimentais.

As amostras foram preparadas, passaram pelo processo de ozonização e foram posteriormente mantidas em 4 diferentes meios com potencial ação conservante. Quatro agentes conservantes foram utilizados neste trabalho, solução salina ozonizada, óleo de copaíba, óleo de chá-verde e solução de quitosana. O processo utilizado em cada grupo está descrito a seguir. Todos esses grupos a seguir passaram por análises microbiológicas antes e após cada procedimento realizado.

4.4.1 Grupo 1: Pele ozonizada + solução salina

Nesse estudo foi realizado um grupo de ozônio + solução salina, foi realizado com o intuito de manter um grupo padrão para verificar a eficiência dos outros testes realizados, sendo assim foram preparados 60 tubos Falcon contendo 5 amostras de pele, onde essas amostras estavam imersas em solução salina estéril a 10%, foram

realizadas a análise microbiológica dessa pele no início do experimento, e sequencialmente por um período de 12 meses.

4.4.2 Grupo 2: Pele ozonizada + óleo de copaíba

O óleo utilizado no experimento é de Copaifera officinalis, esse óleo possui características desse óleo podemos dizer que é transparente, viscoso e fluido. É um óleo que possui um cheiro forte, e mantem sem qualquer alteração em suas propriedades por até dois anos. O óleo utilizado no experimento foi adquirido na Empresa Mundo dos Óleos, aonde veio acompanhado de um prospecto completo onde contém todas as informações técnicas relativas às análises físico-químicas a que os óleos são submetidos, bem como todas as suas características organolépticas (Tabela 1).

Tabela 1 Características físicas do óleo de Copaifera officinalis.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS		
TESTES	**ESPECIFICAÇÕES**	
INCI:	Copaifera Officinalis (Copaíba) Oil	
CAS:	8001-61-4	
Aparência:	Líquido transparente e de baixa viscosidade	
Cor:	Amarelo a Castanho	
Odor:	Característico	
Densidade 25°C:	0,890 – 0,950	0,916
Índice Acidez:	>9,0% (mgKOH/g)	9,8
Índice Refração 20°C:	(1,500 +/- 0,020)	1,479
Índice Acetileno:	10,5	Ok
Ìndice Saponificação:	0,8	Ok
Fração Insaponificavél (%)	64,9	Ok
Ìndice de Iodo:	140,3	Ok
Solubilidade:	Insolúvel em água. Solúvel em solventes orgânicos, etanol absoluto e parcialmente solúvel em álcool 95%	
Procedência:	Nacional	
Data da Extração:	03/2018	
Beneficiamento:	03/2020	
Validade:	24 meses	
Lote:	CO007/18	
Quantidade:	2,000 L	
Invoice:		

O óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*), foi utilizado como agente conservante para manter as peles estáveis por um período maior de tempo, devido suas diversas propriedades. As indicações etnofarmacologicas mais usuais do óleo de copaíba vão desde antiinflamatório, antisseptico, pneumonia, infecções na pele, entre outros. Dessa forma o óleo foi utilizado como agente conservante, para assim realizar o teste estabilidade.

4.4.3 Grupo 3: Pele ozonizada + óleo de Melaleuca

O óleo de Melaleuca é um óleo essencial obtido através de destilação à vapor das folhagens da Melaleuca alternifolia. Este óleo possui amplo espectro anti-microbiano, é antisséptico, analgésico local suave, preservativo natural e anti-manchas. Cicatrizante, Antifúngico, Antiséptico, Bactericida e foi utilizado como agente conservante para manter as peles estáveis por um período maior de tempo, devido suas diversas propriedades. Dessa forma o óleo foi utilizado como agente conservante, para assim realizar o teste estabilidade.

4.4.4 Grupo 3: Pele ozonizada + Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina. Constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos. Depois da celulose, é o composto orgânico mais importante da natureza. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Por se tratar de um polímero natural biodegradável extremamente abundante e atóxico a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos e foi utilizado como agente conservante para manter as peles estáveis por um período maior de tempo, devido suas diversas propriedades. Dessa forma o óleo foi utilizado como agente conservante, para assim realizar o teste estabilidade.

4.5 Etapa 1 – Avaliação de estabilidade e análise microbiológica

Na primeira etapa deste trabalho, foi realizada uma avaliação microbiológica qualitativa, para verificar a estabilidade da descontaminação, preocupando-se em obter o processo que mantem a descontaminação pelo período mais longo possível. Assim, não foi determinado o tipo de contaminante nos grupos motivados, mas sua presença ou ausência. Nesse sentido, ao longo do processo de análise, não foram quantificados como bactérias, mas sim contaminantes.

Mensalmente, durante 12 meses, 5 amostras de cada grupo foram submetidas a avaliação microbiológica. O procedimento experimental foi realizado em fluxo laminar, seguindo as normas de biossegurança. Com um cotonete, toda a superfície da pele da rã-touro foi esfregada para coleta de material biológico para análise microbiológica.

O material coletado foi diluído em 10 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,5%) e homogeneizado, onde 1000 mL da solução homogeneizada foram transferidos para tubos contendo 9 mL de solução salina estéril, obtendo-se diluições 10-1. Seguindo o mesmo processo, foram obtidas diluições em série (10-2, 10-3 10n).

A solução diluída foi cultivada, inoculando-se 100 mL das diluições em placas de Petri de 100 mm contendo meio agarizado TSA e Sabouraud-dextrose (Oxoid®). O inóculo foi semeado em toda a superfície do meio, usando laços de Drigalski, até que o excesso de líquido fosse absorvido.

Este procedimento foi repetido 3 vezes, as placas semeadas e incubadas foram mantidas em estufa por 24 horas (1ª leitura) e 48 horas (2ª leitura).

4.6 Etapa 2 – Animais de experimentação

Para a execução do estudo proposto, foram utilizados 20 animais no total, sendo 10 para o grupo Pele ozonizada + óleo de copaíba e 10 para o grupo controle (Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e massa corpórea média de 300 g. Durante todo o procedimento experimental permanecerão em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22º-27ºC e ambiente higienizado), recebendo ração própria

comum e água ad libitum. Trocas de ar de 15 a 25 vezes, umidade do ar 70 %. Ficaram em ambientes onde os ruídos de menores que 50 dB.

4.7 Etapa 2 – Aplicação do enxerto cutâneo em modelo animal

Para realização do procedimento de enxertia cutânea, 20 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com massa corpórea média de aproximadamente 250 g, foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: Controle auto-enxerto (AE) e Xenoenxerto (XE) que utilizou as peles de rã-touro. Os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana em decúbito ventral e foi realizada uma tricotomia digital na região dorsal.

A seguir, foi realizado procedimento cirúrgico em cada animal para a retirada de um fragmento de pele da região dorsal, medindo 3 cm de largura e 5 cm de comprimento (RICHTER et al., 2006). Para padronização, um molde foi posicionado abaixo do ângulo inferior da escápula, de modo que a linha mediana traçada se encontre com a linha mediana do molde. O fragmento de pele foi retirado a partir da fáscia profunda dos músculos, utilizando bisturi lâmina 23, incluído a fáscia superficial e pele sendo delineado por meio de um molde recortado nas medidas padrão (3x5cm).

No grupo AE, o fragmento de pele foi raspado para retirada dos tecidos não cutâneos (gordura e músculo) e panículo carnoso aderidos à derme, com auxílio de bisturi, até o fragmento adquirir um aspecto esbranquiçado e homogêneo. Após esse procedimento, o tecido cutâneo foi recolocado em seu próprio leito com rotação de 180º e suturado.

No grupo XE, as peles de 3 x 5 cm rã-touro, esterilizadas e conservadas, foram retiradas da solução conservante, tiveram o excesso de solução removida com auxílio de gaze estéril e foram finalmente aplicadas e suturadas sobre o dorso dos animais.

A sutura foi realizada com pontos de náilon monofilamentar 4-0, sendo iniciada pelos quatro vértices e posteriormente aplicando-se pontos nas laterais do enxerto com 1 cm de distância entre os pontos. Após a sutura, o enxerto foi limpo e comprimido adequadamente para evitar possíveis bolhas de ar sob o mesmo, com auxílio de gaze estéril e solução fisiológica.

Logo após e 24 h após o procedimento cirúrgico, os animais receberam antibiótico (cefalotina 60 mg/kg) para evitar o surgimento de infecções e perda do enxerto. Os animais receberam analgésico subcutâneo (Tramadol – 5 mg/kg) por 5 dias de 12 em 12 h para diminuição de desconforto pós-cirúrgico.

Os animais foram mantidos no Biotério da ANILAB. Durante todo o procedimento experimental permanecerão em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22º-24ºC e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*. Trocas de ar de 15 a 25 vezes, umidade do ar 70%. Ficaram em ambientes onde os ruídos de menores que 50 decibéis. Os enxertos foram avaliados diariamente para controle de possíveis infecções seguindo boas práticas de uso em animais.

Após 7 dias da realização da cirurgia os animais foram anestesiados para remoção amostra para análise histológica. Foram retiradas amostras na região central da interface entre o enxerto e pele hígida. As amostras foram mantidas em formol 10 % por 24 h, a seguir foram lavados em água corrente por mais 24 h, finalmente foram fixadas em álcool 70 % até o momento do processamento.

Após a realização dos experimentos, os animais foram eutanasiados com overdose de Ketamina e Xilazina.

4.8 IMAGEAMENTO OCT

Imagens de tomografia por coerência óptica (OCT) foram adquiridas no dia do procedimento cirúrgico (antes e após a aplicação do enxerto), 3 e 7 dias após a realização da cirurgia. As imagens foram adquiridas utilizando um sistema OCT OQLabScope XR/2.0 (Lumedica – EUA) operando em 840 nm de comprimento de

onda central, 100 nm de largura de banda, com resolução de 15 x 4 μm (lateral x axial), 750 μW de potência, 100 dB de sensibilidade, 40 kHz de taxa de aquisição de A-scan e 20 imagens por segundo, fornecendo imagens de 512 x 512 pixels. As imagens foram adquiridas na mesma região de onde foram retirados os cortes histológicos, na região de interface entre pele hígida e enxerto.

4.9 Avaliação histológica descritiva e semi-quantitativa

A análise histológica qualitativa e semi-quantitativa do enxerto foi realizada em lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE), (Merck, Darmstadt, Alemanha), em microscópio óptico (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 400 × por dois avaliadores cegos para os grupos. Essas análises foram realizadas conforme proposto por Basaran *et al*. modificado, constituída da avaliação de 5 itens: junção dermo-epidérmica, organização do colágeno, adesão do enxerto e infiltrado inflamatório.

Cada um desses itens foi pontuado de 0 a 2 (0 quando o item não tinha características, 1 tinha presença significativa da característica e 2 tinham características semelhantes ao normal); foram somados os resultados apresentados em cada item e quanto maior a pontuação, melhor o prognóstico do enxerto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Etapa 1 – Análise de desinfecção e estabilidade

O resultado da análise de estabilidade no período de 12 meses está apresentado na tabela 1. A Tabela 2 apresenta a presença (+) ou ausência (-) de bactérias observada em cada um dos grupos estudados em função do tempo em meses após o procedimento de descontaminação. Cada grupo estudado apresentou descontaminação bacteriana após o processamento com ozônio (tempo 0). É possível observar que somente o grupo Ozonio + óleo de copaíba manteve a descontaminação ao longo de todo o período estudado. Os demais grupos, apresentaram contaminação logo no primeiro mês após o processo de ozonização, indicando que solução salina ozonizada, óleo de chá verde e solução de quitosana não podem ser utilizados como agentes conservantes para a pele de rã-touro, nas condições testadas neste trabalho.

Tabela 2 Resultado dos grupos testados

Mês	Ozônio + solução salina	Ozônio + óleo de copaíba	Ozônio + óleo de Melaleuca	Ozônio + quitosana
0	-	-	-	-
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+
5	+	-	+	+
6	+	-	+	+
7	+	-	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	-	+	+

Com base nos resultados obtidos pode-se constatar que o óleo de copaíba é um agente potencial para manter as peles armazenadas por um período de um ano sem causar nenhum tipo de contaminação microbiológica, como podemos observar na tabela 1. Esses quatro grupos foram mantidos por um período de 12 meses, onde todo mês foram realizadas as análises microbiológicas de uma parte de cada grupo.

O grupo composto por ozônio + óleo de copaiba não apresentam crescimento microbiológico mesmo após 12 meses de armazenamento. Este resultado mostra a importância do método armazenado na estabilidade do curativo biológico.

Em um estudo realizado já relatava a utilização do ozônio para inativar bactérias, visto que o ozônio vai agir oxidando a parede celular das bactérias, podendo agir também sobre toda a atividade enzimática das bactérias, sendo a sua ação antibacteriana observada tanto em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dados esses que estão relacionados aos obtidos nesse estudo pois as peles passaram por um processo de ozonização antes de serem submersas no óleo de copaíba, e o ozônio conseguiu deixar a pele inerte de qualquer microrganismo (LAPOLLI, F. R. et al. 2003).

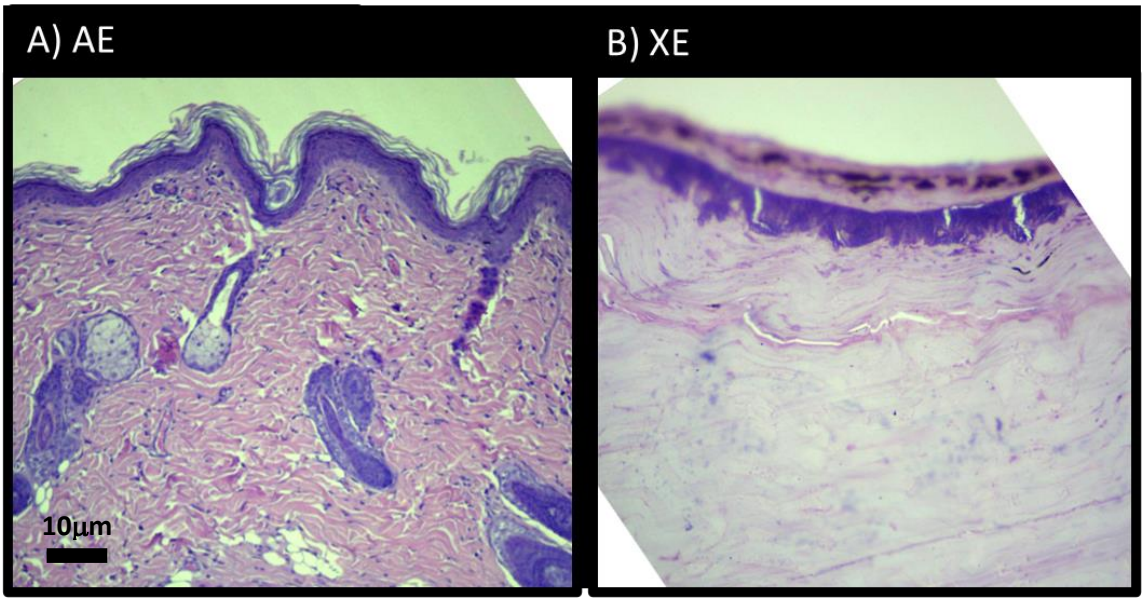
Nesse estudo foi utilizado umas combinação de dois agentes, sendo eles: o ozônio e o óleo de copaíba ambos com efeitos antibactericida e antimicrobiano já descritos em trabalhos anteriores, como no estudo realizado onde foi analisado a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba para cepas das seguintes bactérias: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosas*, nesse estudo o óleo de copaíba se mostrou eficaz como agente antimicrobiano no combate a essas três cepas de bactérias testadas. O óleo de copaíba foi utilizando com o intuito de manter as peles inertes de contaminação, já que possui esse efeito antimicrobiano. (FERREIRA, D. S .; JÚNIOR, P. E. A .; MAIA, C. S .; SILVA, W. E .; FRANÇA, D. F .; MORAES, E. F .; TEIXEIRA, A. A. C,2006).

Ao comparar a metodologia do processo de desinfeção realizada no presente trabalho com a metodologia utilizada para preparar o curativo da pele de tilápia, temos um aqui um método tanto mais eficaz quanto de preparação mais rápida. Na pesquisa realizada foi realizado o processo e preparação das amostras de pele de tilápia em sete etapas, que demoram em torno de 6 horas para serem realizadas (Russel Ad, Hugo Wb, AvliffeGaj, 1999). Além dos processos realizados as amostras ainda passam por um processo de irradiação com radiação ionizante por cinco horas no reator do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) para eliminar microrganismos, e somente após isso a pele está pronta para uso. Este método é mais demorado e possui custo mais elevado. A utilização do gás ozônio para o processo de desinfecção associado ao óleo de copaíba para conservação e armazenagem, leva em torno de 60 minutos, para a pele estar pronta para o uso como curativo biológico, mantendo se estéril por 12 meses.

5.2 Etapa 2 – Aplicação do enxerto cutâneo em modelo animal

A figura 2 apresenta corte histológico dos tecidos enxertados no grupo AE (figura 02 A) e no XE (figura 02 B). É possível identificar as estruturas da pele do autoenxerto (figura 02A), estrato córneo, epiderme e derme com estruturas normais. A morfologia da pele de rã-touro é completamente distinta (figura 02B), é possível identificar que histologicamente a epiderme de *Lithobates Catesbeianus* possui pouca queratinização o que é compatível com as características dos anfíbios, já na derme podemos observar várias fibras de colágeno. (D.S. Ferreira, P.E.A. Júnior, C.S. Maia, W.E. Silva, D.F. França, E.F. Moraes, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira.2006).

Figura 2Histologia de tecido utilizado no grupo AE (pele do rato) e no grupo XE (pele de rã-touro)



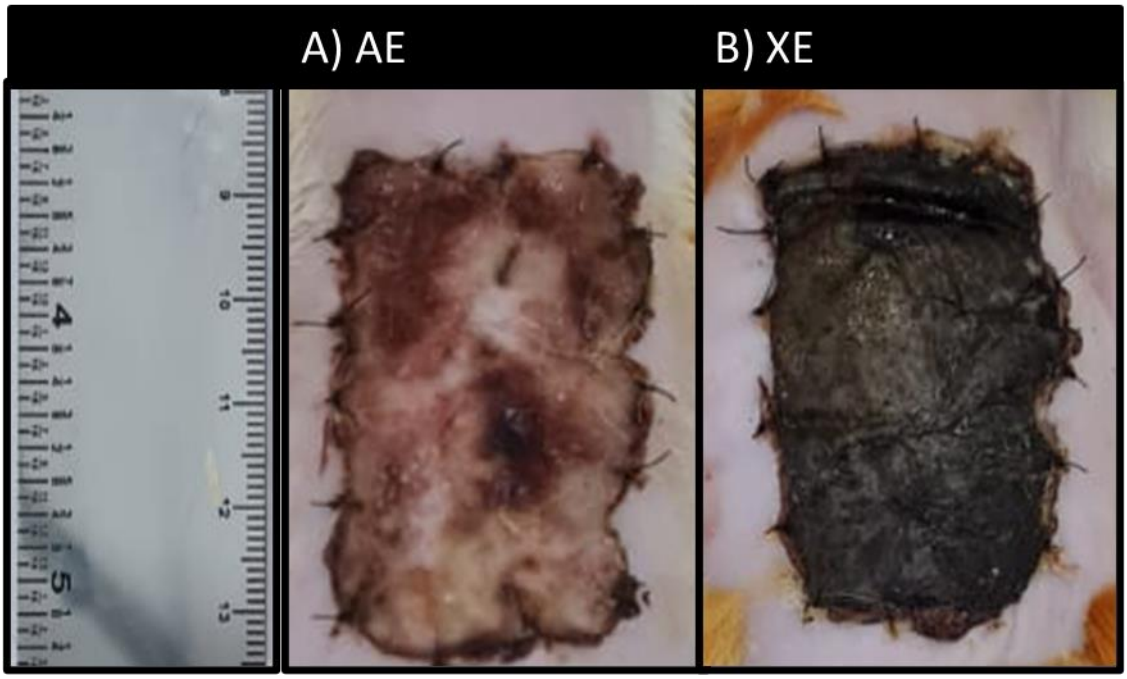
Fonte: O autor

Análise macroscópica

Os enxertos nos animais foram avaliados em todos os dias do experimento. Foi identificado presença de leve exsudato nos 3 primeiros dias de experimento em ambos os grupos experimentais. Nos demais dias do experimento não houve

formação de edema, infecções, havendo boa coaptação das bordas em ambos os grupos experimentais. A figura 3 apresenta uma imagem representativa macroscópica dos tecidos enxertados no grupo AE e XE após 7 dias.

Figura 3 Imagem representativa do AE e XE após 7 dias.

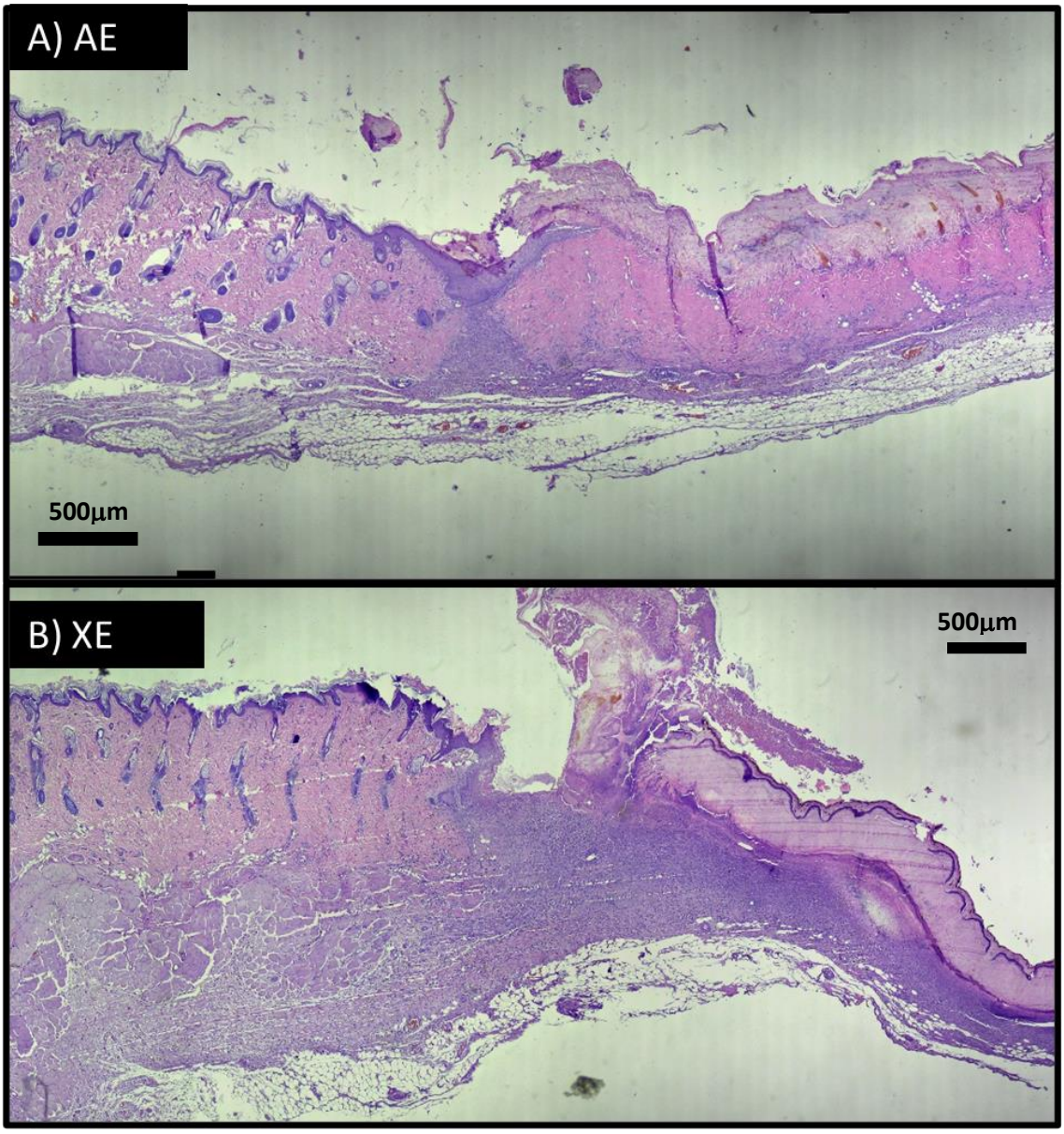


Fonte: O autor

Análises histológicas descritivas

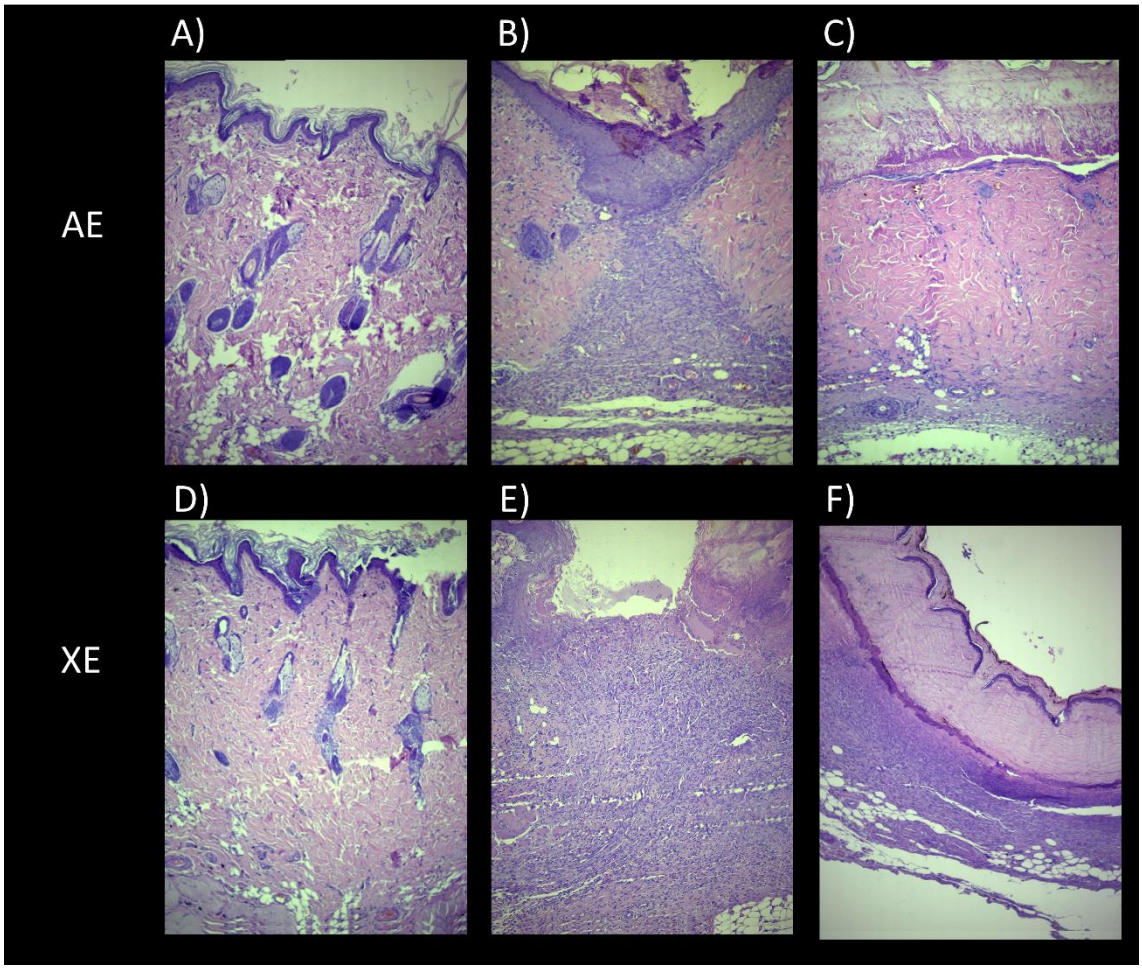
Imagens representativas dos cotes histológicos corados com HE da seções da interface entre o tecido hígido e enxertado do grupo XA e XE estão mostradas na Figura 04 A e B, respectivamente. A figura 5 apresenta detalhes em maior ampliação do mesmo corte histológico mostrado na figura 4. A figura 5 A, B e C correspondendo ao grupo AE e a figura 5 D, E e F correspondente ao grupo XE, nas regiões de pele hígida, interface e enxerto, respectivamente.

Figura 4 Corte histológico corado com HE representativo dos achados nos grupos XA e XE.



Fonte: O autor

Figura 5 Corte histológico corado com HE na região de pele hígida, interface e enxerto dos grupos dos grupos AE (A, B e C) e XE (C,D e E)



Fonte: O autor

A análise histopatológica descritiva revelou que, 7 dias após o enxerto, o grupo AE demonstrou modificações morfológicas caracterizada por junção dermo-epidérmica e organização do colágeno parcial, moderada adesão do enxerto e moderado infiltrado inflamatório associado a formação de novos vasos(figuras 4 e 5).

No grupo XE observou-se as mesmas características, entretanto com intenso infiltrado inflamatório, características essas que corroboram com os evidenciados no estudo da pele da tilápia, onde observaram que o processo inflamatório agudo induzido pela própria lesão, seguido da regeneração das células parenquimatosas, migração, proliferação e remodelação de tecido conjuntivo, síntese proteica, colagenização e aquisição de força tensil (Lima-Junior, E.M.; Picollo,N.S.;

Miranda,M.J.B.; Ribeiro, W. L. C.; Alves, A. P. B. N; , Ferreira, G. E.; Parente, E. A.; 2017).

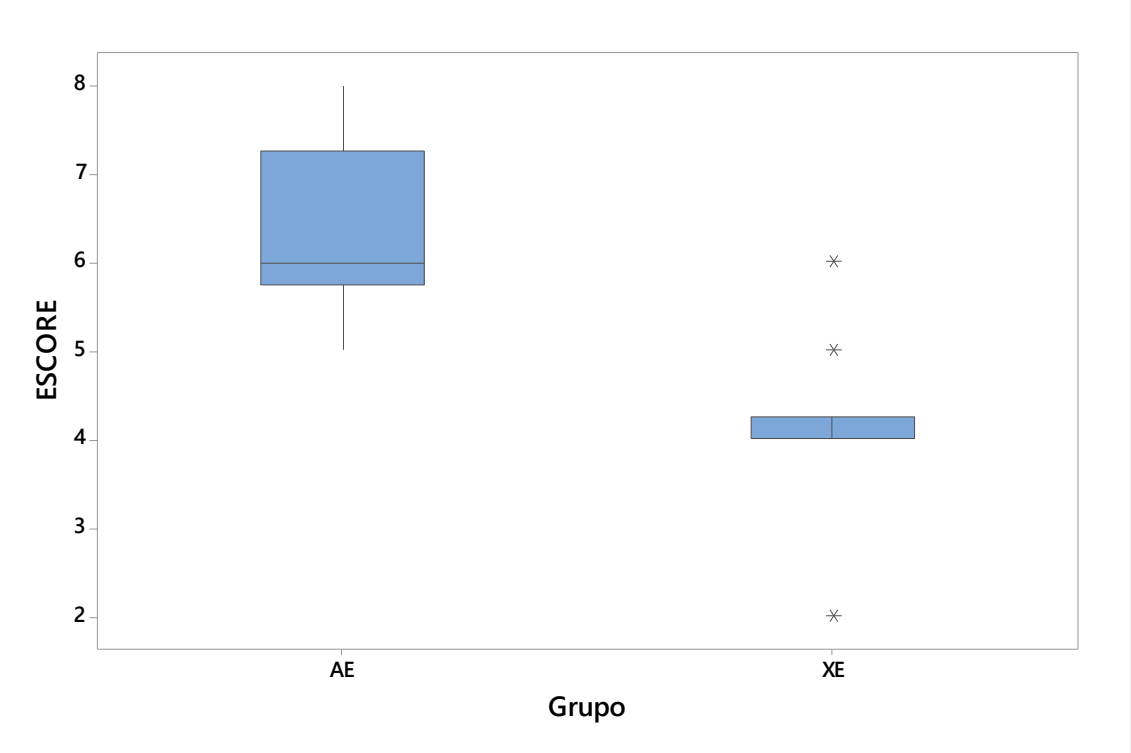
Análises histológicas semi-quantitativa

Tabela 3 apresenta o resultado da classificação das lâminas no escore proposto por Basaran et al. [22] modificado.

Grupo	Amostra	Junção derme-epiderme	organização do colágeno	presença de fibroblastos	adesão do enxerto	infiltrado inflamatório	ESCORE
XE	1ª	1	1	1	1	0	4
XE	2ª	1	1	1	1	0	4
XE	3ª	1	1	1	1	0	4
XE	4ª	1	1	1	2	0	5
XE	5ª	1	1	1	1	0	4
XE	6ª	1	1	1	1	0	4
XE	7ª	1	1	1	1	0	4
XE	8ª	1	1	1	1	0	4
XE	9ª	0	1	1	0	0	2
XE	10ª	2	1	1	2	0	6
AE	11ª	1	1	2	1	0	5
AE	12ª	1	1	2	1	1	6
AE	13ª	1	1	2	2	1	7
AE	14ª	1	1	2	2	1	7
AE	15ª	2	1	2	2	1	8
AE	16ª	1	1	2	0	1	5
AE	17ª	1	1	2	1	1	6
AE	18ª	1	1	2	1	1	6
AE	19ª	1	1	2	1	1	6
AE	20ª	2	1	2	2	1	8

A figura 06 apresenta o *boxplot* do escore para cada um dos grupos estudados. É possível observar que o grupo AE apresentou pontuação de escore maior que o grupo XE, característico de um melhor reparo tecidual.

Figura 6 Boxplot do escore para cada um dos grupos estudados



No entanto, não foi observada (tabela 3) diferença estatística entre os parâmetros de junção dermo-epiderme (AE = 1,2 ± 0,42; XE = 1,0 ± 0,47), organização do colágeno (AE = XE = 1,0 ± 0,0) e adesão do enxerto (AE = 1,3 ± 0,67; XE = 1,1 ± 0,57).

O grupo XE apresentou menor presença de fibroblastos (figura 07) e infiltrados inflamatórios (figura 08).

Figura 7 Presença de fibroblastos.

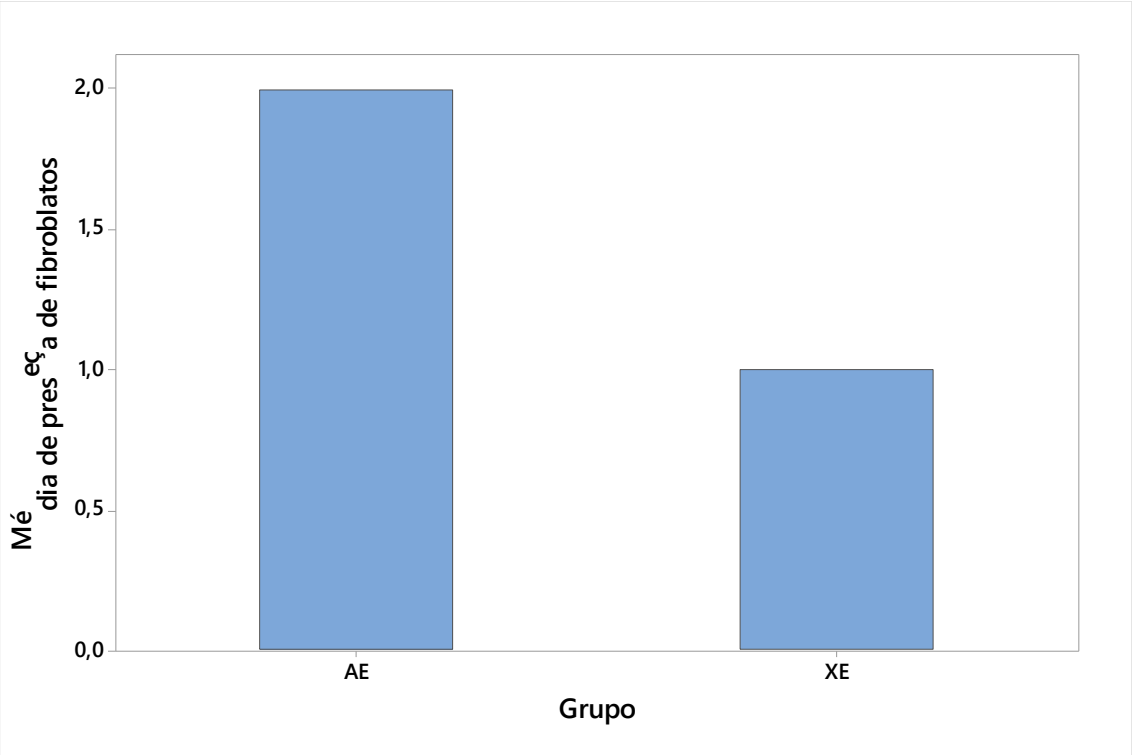
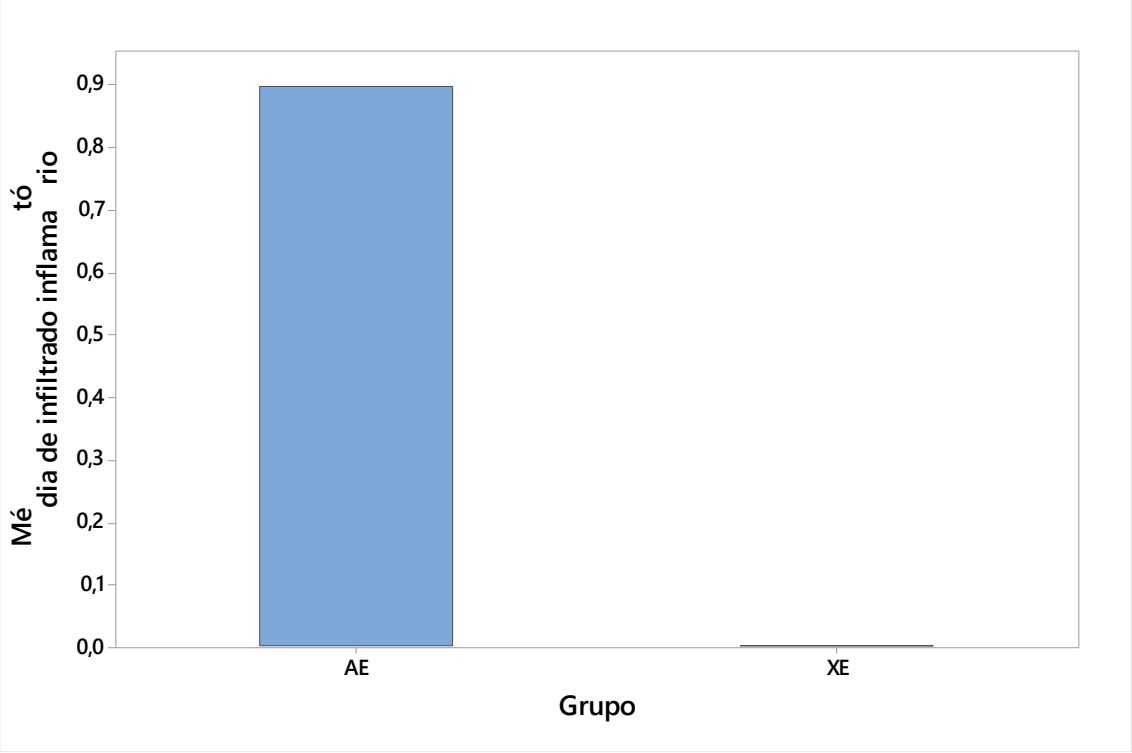


Figura 8 Presença de infiltrado inflamatório

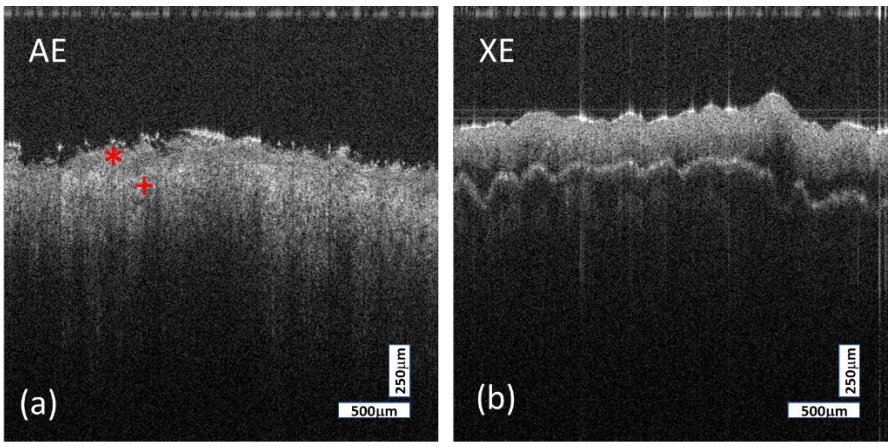


O intenso infiltrado inflamatório e a baixa presença de fibroblastos, em combinação com a avaliação histológica descritiva, no grupo XE indica que este grupo se encontra na fase inflamatória do reparo tecidual o que pode levará a ao surgimento de tecido de granulação (tecido semelhante à derme) e re-epitelização da região enxertada. A camada de tecido semelhante à derme é muito mais espessada no XE em comparação com o AE (Figura 07 e 08).

Imageamento OCT

A figura 9 apresenta a imagem em secção transversal OCT das peles utilizadas nos grupos AE (figura 9a) e XE (figura 9b), antes de aplicação nas costas dos animais. É possível observar estrutura da pele do rato, com a epiderme(*) e derme (+).

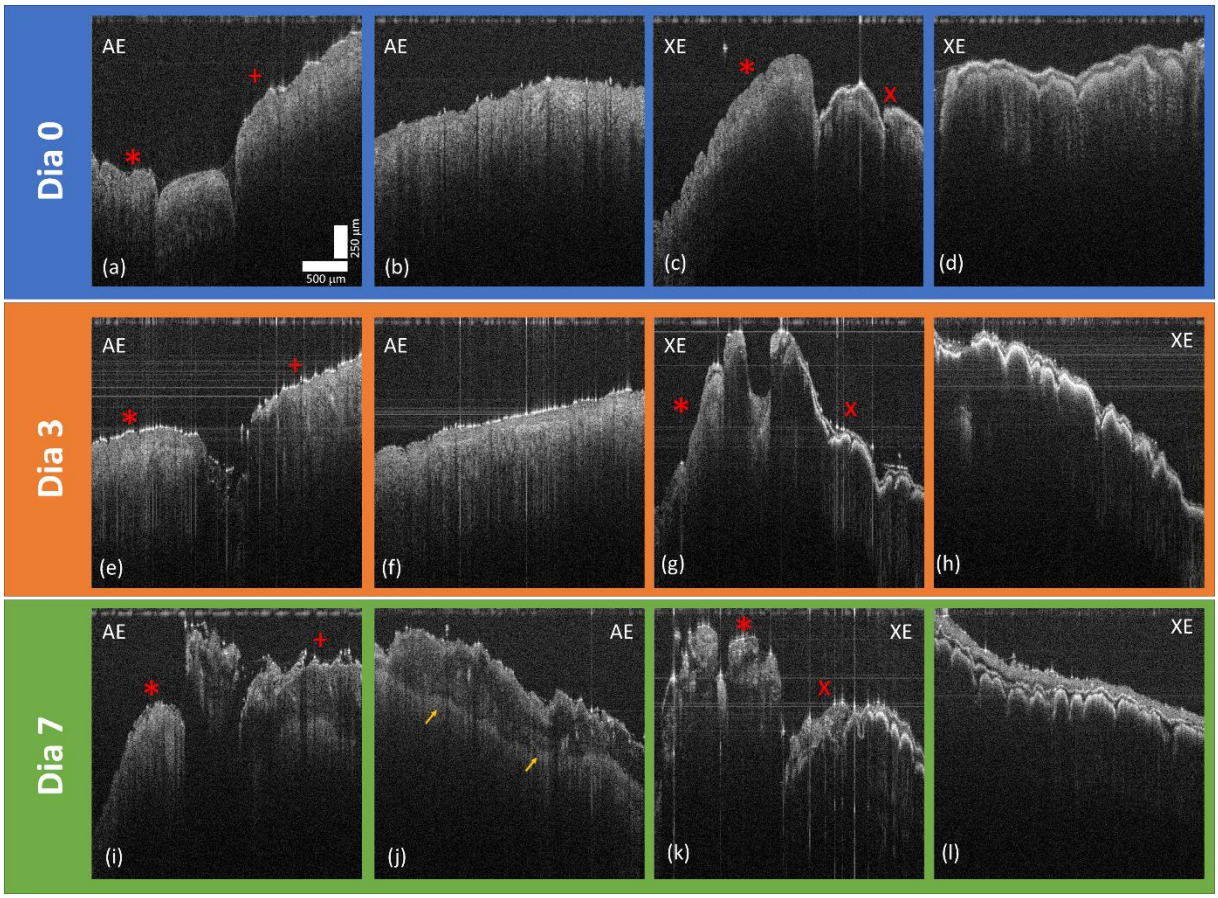
Figura 9Imagem OCT das peles antes da aplicação cirúrgica.



Fonte: O autor.

A figura 10 apresenta imagens de seção transversal OCT do acompanhamento dos enxertos. As linhas correspondem ao tempo experimental, 0, 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico. As imagens (a), (e) e (i) correspondem à interface entre a pele hígida (* na figura 10) e o autoenxerto (+ na figura 10). E as imagens (c), (g), e (k) correspondem a interface entre a pele hígida (* na figura 10) e o xenoenxerto (x na figura 10). As figuras 10 (b), (f) e (j) são imagens OCT da região do enxerto no grupo AE, e as figuras 10 (d), (h) e (l) são imagens OCT da região do enxerto o grupo XE.

Figura 10 Imagens OCT para 0, 3 e 7 dias após procedimento cirúrgico.



Legenda: (a), (c), (e), (g), (i), (k) interface entre pele hígida (*) e enxerto (+ para AE e x para XE). (b), (d), (f), (h), (j) e (l) região do enxerto.

Fonte: O autor.

Assim como na histologia, foi possível observar uma boa integração na interface entre a pele hígida e o enxerto, tanto para o grupo AE quanto para o grupo XE, em todo o período observado. Quando se avalia a evolução temporal da lesão, para os grupos XE, observou-se que a morfologia do enxerto sofreu pequena alteração em sua estrutura, tornando-se mais rugosa, e com menor uniformidade da transição entre a pele hígida e o enxerto de pele de rã-touro (formação de um degrau na transição). Isso se deve ao maior ressecamento da pele de rã-touro, comparado ao AE.

No grupo AE, após 7 dias, foi possível observar o aparecimento de derme neoformada na base do enxerto, indicada pela seta na figura 10(j), assim como observado na análise histológica. Este é um indicativo, utilizando técnica não invasiva, de que ocorreu a integração do enxerto.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo foi dividido em duas etapas, na primeira etapa foi desenvolvido um protocolo de esterilização e conservação das peles de Rã-touro (*Lithobates Catesbeianus*) para aplicação e avaliação de sua eficácia como enxerto cutaneo em modelo animal na segunda etapa. Assim, foi desenvolvido um protocolo de desinfecção e conservação, utilizando ozônio e óleo de copaíba ozonizado, que manteve as peles inertes de microrganismos por um período de 12 meses. Na segunda fase, a avaliação do enxerto em modelo animal *in vivo*, demonstrou um resultado satisfatório para o uso da pele de rã-touro como xenoenxerto, comparado ao grupo autoenxerto (controle neste trabalho). Foi observado boa adesão do enxerto, presença de fibroblastos e derme neoformada, e maior presença de infiltrados inflamatório, que indica a fase inicial do processo tecidual, podendo caminhar para a formação do tecido de granulação. Desta forma o uso da pele de rã-touro como xenoenxerto possui grande potencial de aplicação clínica. Futuros estudos deste biomaterial em protocolos de maior tempo experimental poderiam ser úteis para determinar a qualidade do tecido formado após todas as fases do reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

Bocci V. Efeitos biológicos e clínicos do ozônio: a terapia com ozônio é um futuro na medicina? Br J Biomed Sci. 1999; 56: 270-9.

Broughton G, Janis Je, AttingerCe.Wound healing: uma visão geral.PlastReconstr Surg.2006; 117: 1e-S-32e-S.

Caravaggi C, De Giglio R, Priteli C, Et Al. Enxertos dérmicos e epidérmicos autólogos com base em Hyaff 11, no tratamento de úlceras diabéticas não-infectadas de pés e dorsais: um ensaio clínico prospectivo, multicêntrico, controlado e randomizado. Diabetes Care. 2003; 26 (10): 2853-2859.

Carrico TJ, Mehrhof AI Jr., Cohen IK. Biology of wound healing. Surg Clin North Am. 1984; 4(4):721-33.

Chakrabarty K, Dawson R, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L. Desenvolvimento de compósitos dérmico-epidérmicos humanos autólogos baseados em aloderes humanas esterilizadas para uso clínico. Br J Dermatol. 1999; 141: 811-823.

Cronin H, Goldstein G. Substitutos biológicos da pele e suas aplicações em dermatologia. Derm Surg.2013; 39: 30-34.

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005; 13:7–12, 15659031.

D.S. Ferreira, P.E.A. Júnior, C.S. Maia, W.E. Silva, D.F. França, E.F. Moraes, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE DA RÃ-TOURO (RANA CATESBEIANA, SHAW 1802) Biológico, São Paulo, v.68, Suplemento, p.239-243, 2006

FALCAO, S C, LOPES, S L, COELHO, A R B et al. Pele de Lithobates Catesbeiana como curativo biológico oclusivo sem tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães: Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação dos tecidos. Estudo preliminar. Acta Cir. Bras., 2002, vol.17, no.3, p.151-159.

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

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol. 2001; 69:513–513.

GOMES, D.R., SERRA, M.C., PELLON, M.A. Queimaduras. Rio de Janeiro, 1995. Reinventer, 305p.

Gonçalves, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patógenos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aqüicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208

Graham, D. M. Uso de ozônio para processamento de alimentos. Food Technology, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. 2007; 127:526–537, 17299435.

Horch Re, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach Ad. Engenharia de tecido de substitutos de pele cultivados. J Cell Mol Med. 2005; 9: 592-608

Khadre, M. A .; Yousef, A. E .; Kim, J. G. Aspectos microbiológicos das aplicações de ozônio nos alimentos: uma revisão. Journal of Food Science, Malden, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

Kunz A, Freire Rs, Rohwedder Jjr, Duran N, Mansila H, Rodriguez J. Construção Otimização Um Sistema Produção Aplicação Ozônio Em Escala Laboratorial. Quimica Nova. 1999; 425-8.

Langlais, B .; Reckhow, D. A .; Brink, D. R. Ozone no tratamento de água: aplicação e engenharia. Chelsea: AWWARF e Lewis Publishers, 1991. 568 p.

LapolliFr, Santos Lf, HássemerMen, Aisse Mm, PiveliRp. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. Dentro. Gonçalves RF. Vitória: PROSAB, 2003; 169-208.

LI, H .; LIU, B. L .; GAO, L. Z .; CHEN, H. L. Estudos sobre colágeno de pele de rã-touro. Food Chemistry, v. 84, n. 1, p. 65-69, 2004.

Lima-Junior, E.M.; Picollo,N.S.; Miranda,M.J.B.; Ribeiro, W. L. C.; Alves, A. P. B. 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. Rev Bras Queimaduras. 2017;16(1):10-7

Lopes Sra. Ferreira Jr, Da Silva Kb, De Oliveira Bacelar Simplício I, De Lima Cj, Fernandes Ab. Desinfecção de tubagens onduladas por ozônio e ultra-som em pacientes traqueostomizados ventilados mecanicamente.J Hosp Infect. 2015 Ago; 90 (4): 304-9. doi: 10.1016 / j.jhin.2015.03.004. Epub 2015 27 de março.

Miraliakbari R. & Mackay D.R. 2006. Skin Grafts. Operative Techniques in General Surgery. 8 (4):197-206.

MORAES, J.H.C. RANICULTURA (Informações Básicas para uma Criação). 1ªEdição. 2004.

Norooz H, Kazemi A, Fadaee R, Alavi S, Mohammadzadeh M. Avaliação microbiológica de infecções de feridas traumáticas não cirúrgicas e infecções do local cirúrgico em pacientes hospitalizados. Arch clin infecte esta. 2010; 5 (2): 80-3.

Passos M P, Silva H M, Moreira L M, Zângaro R A, Santos R S, Fernandes F B, Lima C J, Fernandes Uma análise BComparative do ozônio e efeito ultra-som na eliminação de cotas de águas residuais. Ozônio: Ciência e Engenharia, páginas 138-14; 2014.

Pavletic M.M. Tegumento. 2007. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3rd ed. Barueri. 20: 250-258.

Phillips TJ. Nova pele para idosos: desenvolvimentos em substitutos biológicos da pele. Arch Dermatol.1998; 134: 344-349.

Razumovskii Z. New York: Elsevier; 1984. Ozônio e suas reações com compostos orgânicos.

Rico RM, Ripamonti R, Burns Al, Gamelli Rl, Dipietro La. The effect of sepsis on wound healing. J Surg Res. 2002; 102:193–197.

Ruben, M.B. A história do ozônio: o período de Schobein. Touro. Hist. Chem. 26 (1): 40-56, 2001.

SAI KP, REDDY PN, BABU M. Investigations on wound healing by using amphibian skin. Indian journal of experimental biology, v. 33, n. 9, p. 673-676, 1995.

Russel Ad, Hugo Wb, AvliffeGaj. Princípios e práticas de desinfecção, preservação e esterilização. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SAI, K. S .; BABU, M. Estudos sobre colágeno de pele Lithobates tigerina Comparativo Bioquímica e Fisiologia Parte B: Bioquímica e Biologia Molecular v.128, n.1, p. 81-90, 2001.

Salvador, R .; Muller, E.E .; Freitas, J.C. Isolamento e caracterização de Streptococcus spp. grupo B em Nil tilápias (Oreochromisniloticus) criados em redes de hapas e viveiros de terra na região norte do estado de Paraná, no Brasil. Cienc. Rural, v.35, p.1374-1378, 2005.

SEBBEN, A., SCHWARTZ, C. A. e CRUZ, J. S. (1993) Ciência Hoje, 15 (87): 25-33.

Shevchenko RV, James Sl, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. J R Soc Interface. 2010; 7:229– 25.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999; 341:738– 746, 10471461.

Strodtbeck, F. Physiology of wound healing. Newborn and Infant Nursing Reviews. 2001; 1(1):43-52.

Suk-Nam K, Kui-Jin K, Joung-Hyun P. Efeito de uma combinação de ozônio de baixo nível e íons metálicos na redução de Escherichia coli O157: H7 e Listeria monocytogenes, Moléculas. 2013; 18 (4): 4018-4025.

VELLY, M. L. M. Um animal de pele e os comportamentos mercadológicos para o novo milênio. I Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, v. 31, p. 49, 2001.

CHEN, H. L. Estudos sobre colágeno de pele de rã-touro. Food Chemistry, v. 84, n. 1, p. 65-69, 2004.

Lima-Junior, E.M.; Picollo,N.S.; Miranda,M.J.B.; Ribeiro, W. L. C.; Alves, A. P. B. 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. Rev Bras Queimaduras. 2017;16(1):10-7

Lopes Sra. Ferreira Jr, Da Silva Kb, De Oliveira Bacelar Simplício I, De Lima Cj, Fernandes Ab. Desinfecção de tubagens onduladas por ozônio e ultra-som em pacientes traqueostomizados ventilados mecanicamente.J Hosp Infect. 2015 Ago; 90 (4): 304-9. doi: 10.1016 / j.jhin.2015.03.004. Epub 2015 27 de março.

Miraliakbari R. & Mackay D.R. 2006. Skin Grafts. Operative Techniques in General Surgery. 8 (4):197-206.

MORAES, J.H.C. RANICULTURA (Informações Básicas para uma Criação). 1ªEdição. 2004.

Norooz H, Kazemi A, Fadaee R, Alavi S, Mohammadzadeh M. Avaliação microbiológica de infecções de feridas traumáticas não cirúrgicas e infecções do local cirúrgico em pacientes hospitalizados. Arch clin infecte esta. 2010; 5 (2): 80-3.

Passos M P, Silva H M, Moreira L M, Zângaro R A, Santos R S, Fernandes F B, Lima C J, Fernandes Uma análise BComparative do ozônio e efeito ultra-som na eliminação de cotas de águas residuais. Ozônio: Ciência e Engenharia, páginas 138-14; 2014.

Pavletic M.M. Tegumento. 2007. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3rd ed. Barueri. 20: 250-258.

Phillips TJ. Nova pele para idosos: desenvolvimentos em substitutos biológicos da pele. Arch Dermatol.1998; 134: 344-349.

Razumovskii Z. New York: Elsevier; 1984. Ozônio e suas reações com compostos orgânicos.

Rico RM, Ripamonti R, Burns Al, Gamelli Rl, Dipietro La. The effect of sepsis on wound healing. J Surg Res. 2002; 102:193–197.

Ruben, M.B. A história do ozônio: o período de Schobein. Touro. Hist. Chem. 26 (1): 40-56, 2001.

SAI KP, REDDY PN, BABU M. Investigations on wound healing by using amphibian skin. Indian journal of experimental biology, v. 33, n. 9, p. 673-676, 1995.

Russel Ad, Hugo Wb, AvliffeGaj. Princípios e práticas de desinfecção, preservação e esterilização. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SAI, K. S .; BABU, M. Estudos sobre colágeno de pele Lithobates tigerina Comparativo Bioquímica e Fisiologia Parte B: Bioquímica e Biologia Molecular v.128, n.1, p. 81-90, 2001.

Salvador, R .; Muller, E.E .; Freitas, J.C. Isolamento e caracterização de Streptococcus spp. grupo B em Nil tilápias (Oreochromisniloticus) criados em redes de hapas e viveiros de terra na região norte do estado de Paraná, no Brasil. Cienc. Rural, v.35, p.1374-1378, 2005.

SEBBEN, A., SCHWARTZ, C. A. e CRUZ, J. S. (1993) Ciência Hoje, 15 (87): 25-33.

Shevchenko RV, James Sl, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. J R Soc Interface. 2010; 7:229– 25.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999; 341:738– 746, 10471461.

Strodtbeck, F. Physiology of wound healing. Newborn and Infant Nursing Reviews. 2001; 1(1):43-52.

Suk-Nam K, Kui-Jin K, Joung-Hyun P. Efeito de uma combinação de ozônio de baixo nível e íons metálicos na redução de Escherichia coli O157: H7 e Listeria monocytogenes, Moléculas. 2013; 18 (4): 4018-4025.

VELLY, M. L. M. Um animal de pele e os comportamentos mercadológicos para o novo milênio. I Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, v. 31, p. 49, 2001.

ANEXO A – PROTOCOLO DO CEUA

UNIVERSIDADE BRASIL

RESOLUÇÃO - PARECER

COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO Nº - 1900032

TÍTULO DO PROJETO

Desenvolvimento de heteroenxertos cutâneos e método para avaliação de angiogênese utilizando Tomografia por Coerência Óptica

RESPONSÁVEL

Nome completo	Marcello Magri Amaral
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	Itaquera
Departamento	Engenharia Biomédica

RESOLUÇÃO – PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 12/09/2019

, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão

Cássia Maria Barroso Orlandi