

Processamento e esterilização da pele de rã-touro utilizada como leito para curativo no tratamento de feridas infecciosas

Processing and sterilization of frog skin used as a bed for dressing in infectious wounds

Procesamiento y esterilización de la piel de rana utilizada como cama para vestirse en heridas infecciosas

Recebido: 20/07/2020 | Revisado: 29/07/2020 | Aceito: 07/08/2020 | Publicado: 14/08/2020

Cristiane Gonçalves Laranja dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0502-1794>

Centro Universitário Augusto Motta, Brasil

Empresa Informar Saúde, Brasil

E-mail: cristiane_laranja@hotmail.com

José Teixeira de Seixas Filho

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5021-1290>

Centro Universitário Augusto Motta, Brasil

E-mail: jseixas4@gmail.com

Eliane Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5378-5719>

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: eli_rodrigues@terra.com.br

Lucas Rangel Luquez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2490-2618>

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: lucasrangelluquez@gmail.com

Resumo

A incidência e a prevalência do tratamento de feridas agudas ou mesmo as crônicas demonstram que o impacto psíquico, social e econômico da cronificação de lesões, em especial as úlceras infectadas, representa à segunda causa de afastamento do trabalho, indicando a necessidade de desenvolver tecnologias mais simples e de menor custo de materiais utilizados como bases eficazes de curativos para torná-los acessíveis a maior número de pessoas, pois um dos desafios para o gestor público é o elevado custo operacional,

uma vez que a maioria dos componentes utilizados nas coberturas de ferimentos é importada e com tecnologia patenteada por empresas multinacionais. Neste sentido, o presente trabalho objetivou reduzir custos nas técnicas de preparo e assepsia da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) para viabilizar sua utilização como biomaterial em leito de curativo devido a presença de peptídeos com ação antibiótica. O método de processamento, de descontaminação e de esterilização da pele da rã-touro foi realizado pela autoclavagem. Os resultados das análises microbiológicas na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada permitiram verificar que este tipo de esterilização do material foi satisfatório, não registrando a presença de agentes microbianos que inviabilizasse sua utilização como leito de curativo.

Palavras-chave: Curativos; Pele de rã-touro; Coberturas eficazes; Inovação tecnológica; Biomateriais.

Abstract

The incidence and prevalence of the treatment of acute or even chronic wounds shows that the psychological, social and economic impact of the chronicity of injuries, especially infected ulcers, represents the second cause of absence from work, indicating the need to develop more advanced technologies. simple and lower cost materials used as effective dressing bases to make them accessible to a greater number of people, as one of the challenges for the public manager is the high operational cost, since most of the components used in wound coverings it is imported and with technology patented by multinational companies. In this sense, the present work aimed to reduce costs in the preparation techniques and asepsis of bullfrog skin (*Lithobates catesbeianus*) to enable its use as biomaterial in a dressing bed due to the presence of peptides with antibiotic action. The method of processing, decontamination and sterilizing the skin of the bullfrog was carried out by autoclaving. The results of the microbiological analyzes on the pulverized and autoclaved bullfrog skin allowed us to verify that this type of material sterilization was satisfactory, not registering the presence of microbial agents that would prevent its use as a dressing bed.

Keywords: Dressings; Bullfrog skin; Effective coverings; Technological innovation; Biomaterials.

Resumen

La incidencia y prevalencia del tratamiento de heridas agudas o incluso crónicas muestra que el impacto psicológico, social y económico de la cronicidad de las lesiones, especialmente las úlceras infectadas, representa la segunda causa de ausencia del trabajo, lo que indica la

necesidad de desarrollar tecnologías más avanzadas. Materiales simples y de menor costo utilizados como bases de vendaje efectivas para hacerlos accesibles a un mayor número de personas, ya que uno de los desafíos para el gerente público es el alto costo operativo, ya que la mayoría de los componentes utilizados en los revestimientos de heridas Es importado y con tecnología patentada por empresas multinacionales. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo reducir los costos en las técnicas de preparación y asepsia de la piel de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) para permitir su uso como biomaterial en un lecho debido a la presencia de péptidos con acción antibiótica. El método de procesamiento, descontaminación y esterilización de la piel de la rana toro se llevó a cabo en autoclave. Los resultados de los análisis microbiológicos en la piel de rana toro pulverizada y esterilizada en autoclave nos permitieron verificar que este tipo de material de esterilización fue satisfactorio, sin registrar la presencia de agentes microbianos que impidieran su uso como lecho de cama.

Palabras clave: Apósitos; Piel de rana toro; Revestimientos efectivos; Innovación tecnológica; Biomateriales.

1. Introdução

Existem doenças tropicais denominadas negligenciadas por não receber a devida atenção no atendimento médico, no desenvolvimento de medicamentos e métodos diagnósticos, sendo um conjunto de patologias causadas por agentes infecciosos ou parasitas em populações da África, da Ásia e da América Latina (Okamoto, 2020). Predominam nas regiões tropicais em desenvolvimento e acometem pessoas em situação de vulnerabilidade em extrema pobreza, incluindo acesso limitado à água limpa, condições precárias de higiene e de saneamento são alguns dos fatores associados (NHRBRASIL, 2016).

Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), este grupo diverso de doenças prevalece em 149 países tropicais e subtropicais, afetando mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, sendo que a úlcera crônica de membros inferiores (MMII) possui alta prevalência e que podem gerar altos custos para a saúde pública, com tratamentos prolongados e pouco eficientes quando praticados por sistemas de saúde não integrados, sem uma padronização de cuidados (OPAS, 2020).

Estima-se que nos Estados Unidos da América cerca de 6 milhões de pessoas apresentem feridas crônicas em membros inferiores (MMII) e que na população idosa a prevalência seja de 15%. Projetando-se esses dados para o futuro, estima-se que em 2050 cerca de 25% da população idosa vai apresentar essa lesão. Além disso, com o aumento dos

casos de obesidade, há um crescente número de casos de úlceras de pé por diabetes mellitus cuja incidência vem aumentando em cerca de 14% ao ano (Okamoto, 2020).

Estudos revelam que cerca de 10% da população com diabetes desenvolvem ferida crônica e 84% desses casos evoluem para amputação. Desses casos, o tempo médio de sobrevivência de três anos é de 50% após a amputação. Na Inglaterra, a estimativa é de que 1,5 a 3 indivíduos em cada 1000 habitantes apresentam úlcera na perna a cada ano (OPAS, 2020).

No Brasil não existem estudos epidemiológicos que nos permitam estabelecer esse percentual, porém, se extrapolarmos os dados encontrados na Inglaterra, podemos esperar que cerca de 570 mil brasileiros apresentem novas feridas crônicas a cada ano. Na população acima de 80 anos, essa prevalência é de 20 para cada 1000 indivíduos (OMS, 2010).

Mendes (2009) já relatava que ocorria uma crise dos sistemas de saúde contemporâneos que se explica pela incoerência entre uma situação de saúde com predomínio relativo forte de condições crônicas e uma resposta social através de sistemas fragmentados e voltados, principalmente, para as condições agudas e as agudizações das condições crônicas. Essa crise ainda se manifesta no Brasil, tanto no setor público quanto no setor privado

Na atualidade, tem-se verificado avanços na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular, resultado de investimentos em pesquisa, acarretando no desenvolvimento de novos produtos curativos indicados para o tratamento de feridas.

Embora não hajam dados precisos na literatura científica, a Organização Mundial de Saúde já se baseou em pesquisas que já demonstraram que o impacto psíquico, social e econômico da cronificação de lesões, em especial as úlceras infectadas, representa a segunda causa de afastamento do trabalho (OMS, 2005).

Estes fatos são indicativos de que muito há que se pesquisar nesse campo, não só para aperfeiçoar tais recursos, como para torná-los acessíveis a maior número de pessoas, mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples e de menor custo, porém igualmente eficazes, pois um dos desafios para o gestor público é o elevado custo operacional, uma vez que a maioria dos componentes utilizados nas coberturas de ferimentos é importada e com tecnologia patenteada por empresas multinacionais (Bajay et al., 2003).

Neste sentido, torna-se urgente o aprimoramento e obtenção de novos insumos de baixo custo para a confecção de coberturas eficazes no combate aos agentes infecciosos nas feridas, visando à redução da incidência e da prevalência de úlceras crônicas, melhorando a qualidade de vida e a redução do período de hospitalização do paciente, proporcionando profundas melhorias socioeconômicas na área da saúde.

Na cadeia produtiva da ranicultura, a pele destes anfíbios tem sido descartada, gerando resíduos. No entanto, pode ser usado para melhorar a qualidade de vida das pessoas, utilizando-se novos métodos de processamento deste subproduto (Blanco, 2009; Ide, 2017).

Como componente alternativo na confecção das coberturas dos ferimentos, vem sendo utilizada pele animal, como a da Tilápia (Viggiano, 2018) e da rã-touro (Blanco, 2009; Santos, 2019) visando nesta se beneficiar dos peptídeos naturais destes tecidos, que são evolutivamente barreiras contra agentes infecciosos. A literatura vem relatando procedimento cirúrgico para queimados utilizando pele de rãs, por meio de curativos biológicos. Apesar da utilização da pele de rã, gerar menor custo operacional e ser eficiente na proteção do corpo, esta técnica ainda não é popularizada no Brasil, devido a falta de pesquisas que promovam maior segurança na sua utilização.

Pelo exposto, o presente estudo teve por objetivo testar procedimentos de preparação do tecido e processos estruturais e de assepsias da pele de rã-touro no desenvolvimento de cobertura em curativos para feridas infectadas utilizando-se deste subproduto da cadeia da ranicultura, visando reduzir os custos hospitalares.

2. Metodologia

O presente trabalho se classifica como uma pesquisa laboratorial, de natureza qualitativa, conforme recomendado por Pereira et al. (2018), baseado nos achados de Blanco (2009) e de Santos (2019). Os experimentos foram executados no Laboratório de Pesquisas em Biologia Animal, Laboratório de Nutrição do Centro Universitário Augusto Motta (Unisuam), *Campus* Bonsucesso, na Cidade do Rio de Janeiro e no Centro Estadual de Pesquisa da Qualidade de Alimentos (CEPQA) da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) na Cidade de Niterói.

Obtenção e preparo da pele de rã-touro

O material fresco foi obtido de espécimes de rã-touro oriundos do Laboratório de Pesquisas em Biologia Animal da UNISUAM e do Setor de Ranicultura da Estação Experimental Almirante Paulo Moreira da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), localizada em Guaratiba, na Cidade do Rio de Janeiro.

Os animais foram acondicionados em recipiente contendo: 5L de água clorada, 5 kg de gelo e 500g de sal grosso, durante 10 minutos, até a redução do metabolismo e anestesiados

por Termonarcose, ou seja, por hipotermia com benzocaína e sacrificado pela seção da medula espinhal, recomendado pela IACUC (Fish, 2018), conforme CEUA-FIPERJ número 0006/2017. Posteriormente, a medula espinhal foi removida.

Depois de anestesiados, os exemplares sofreram desmedulação e, em seguida, foi executada pela retirada da parte cefálica, na altura do tímpano. Utilizando-se a técnica de abate procedeu-se a liberação do sangue (sangria), para clareamento da carcaça.

A obtenção da pele para a confecção do leito do curativo foi obtida separando-a da carcaça da rã-touro por meio de manejo manual, tomando-se o cuidado para não houvesse aderência da musculatura do animal na mesma (Figura 1 A, B, C e D).

Figura 1. (A) Termonarcose: os animais foram anestesiados pelo acondicionamento em balde contendo: água, gelo, cloro e sal grosso durante 10 minutos, até a redução do metabolismo; (B) após desmedulação, executou-se a retirada da parte cefálica, na altura do tímpano; (C) liberação do sangue (sangria), para clareamento da carcaça; (D) separando a pele da carcaça da rã-touro.



Fonte: Os autores.

Ressalta-se a observância da sequência do protocolo de retirada da pele da rã-touro, ilustrado na Figura 1, com o cumprimento das técnicas humanitárias, para que não fosse causado sofrimento ao animal e a execução do procedimento dentro de um ambiente com

padrões de segurança ao alimento, com utilização de equipamentos de proteção individual e instalações adequadas, mesmo na retirada e utilização na pesquisa de um subproduto do abate animal, no caso a pele.

Procederam-se ao beneficiamento da pele após a separação da carcaça do animal, submetendo-a a lavagem, e posterior imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,01%, a fim de promover sua desinfecção e, em seguida efetuada a limpeza dos resíduos de tecidos (aponeurose) aderidos e ao estiramento da pele, para evitar áreas de enrugamento (Figura 2 A, B, C, D e F). Após este procedimento a pele do animal foi submetida à secagem prévia por meio de papel absorvente, sobre bancada desinfectada.

Figura 2. Obtenção da pele de rã-touro para confecção do curativo: (A) lavagem e retirada da aponeurose; (B) corte em sentido longitudinal da pele; (C) secagem; (D) distensão da pele; (E) acondicionamento em saco plástico, (F) pele distendida e embalada.





Fonte: Os autores.

Nesta sequência da Figura 2 registra-se o procedimento de assepsia na pele da rã-touro com a retirada de tecidos de outras regiões da carcaça para manter a estrutura do biomaterial a ser utilizado no leito de curativo isento de estruturas da carcaça alheia a pele. Este procedimento manterá o biomaterial o mais uniforme possível para futuras avaliações na sua eficiência como componente do curativo.

Preparo da pulverização da pele de rã-touro

A pele da rã-touro congelada, para ser utilizada como leito de curativo, foi seca em estufa de ventilação forçada, mantida em uma temperatura a 55°C, durante 24 horas (Figura 3 A e B).

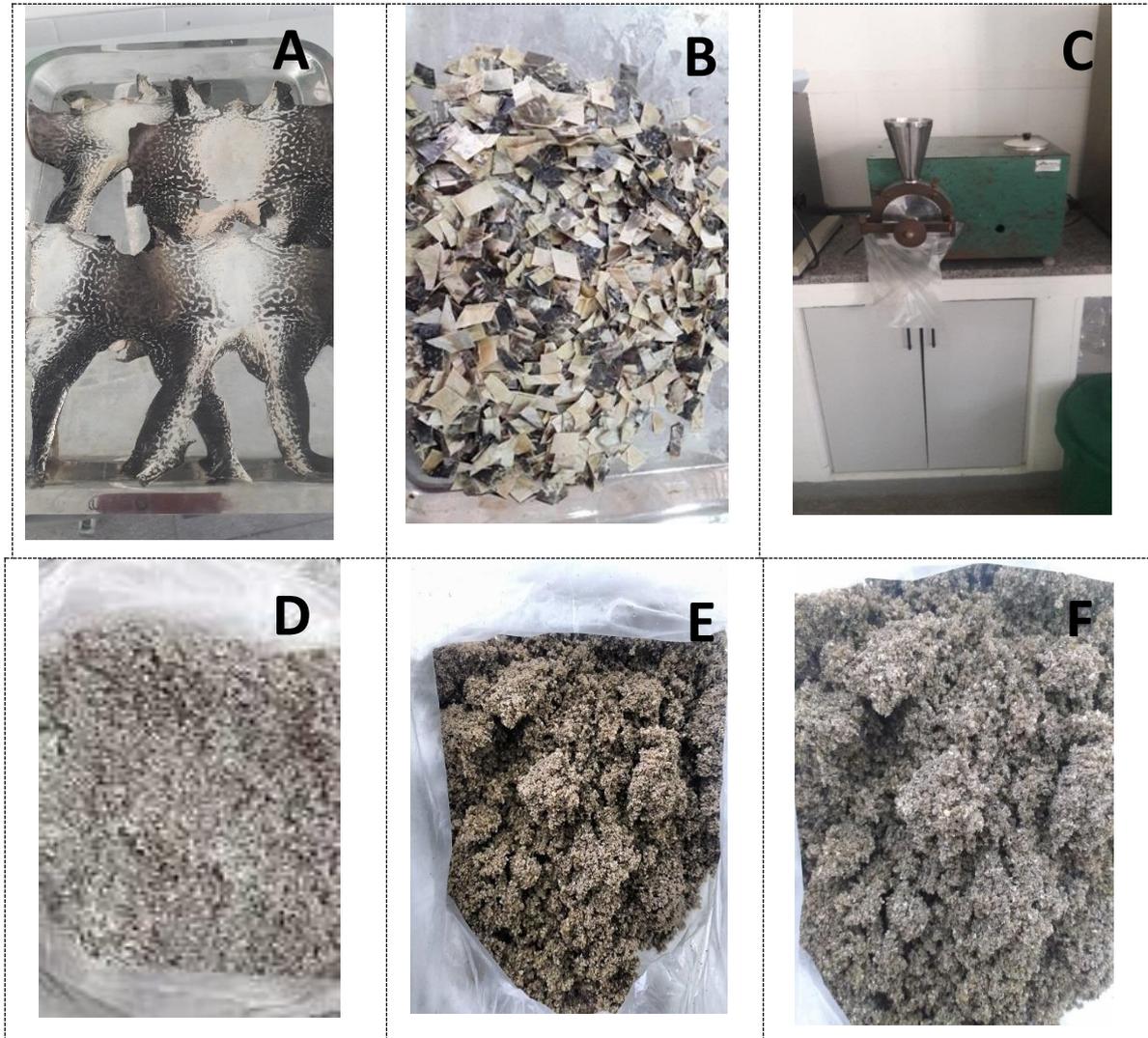
Após este processo, utilizando-se de tesoura procedeu-se a cortes quadrangulares, de diâmetro com cerca de 2 cm, com a finalidade de facilitar a redução da granulometria da pele, por meio de moinho de faca, Modelo: MR 340, (Figura 3C).

A continuação da formação do leito do curativo após estes processos foi através de moagem com a peneira de 0,2 mm de diâmetro, obtendo-se uma estrutura pulverulenta (Figura 3D) que foi mantida em temperatura ambiente, sendo em seguida acondicionada em freezer a -15°C, posteriormente esterilizada por autoclavagem (Figura 3 E), por meio de calor úmido sob pressão, a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos, utilizando-se um autoclave vertical (Phoenix), tomando estrutura mais tênue (Figura 3 F).

A sequência de procedimentos observados na Figura 3 objetivou ampliar a área de contato da pele da rã-touro, formando pequenos pedaços, para aumentar a eficiência de moagem e obter-se um material pulverizando, visando ampliar sua desinfecção por meio de autoclavagem, tornando o material estéril.

Após a esterilização por autoclavagem da pele de rã pulverizada, a confirmação da qualidade microbiológica do material pulverizado foi executada em ambiente asséptico, criado pela execução das técnicas de laboratório apropriadas ao propósito experimental. Para a utilização da bancada foi necessária realização de sua desinfecção com álcool a 70%. Todo material de laboratório, como vidrarias, pipetas, estantes, entre outros, foram previamente esterilizados, para a realização dos procedimentos microbiológicos, sob a área de proteção do bico de Bunsen, que pelo aquecimento do ar impediu a impregnação de microrganismos do meio, interferindo na veracidade dos resultados.

Figura 3. Detalhes da metodologia de obtenção do leite de curativo a base de pele de rã-touro: (A) pele da rã-touro seca em estufa; (B) redução de tamanho das peles secas; (C) aspecto do moinho de faca; (D) redução da granulometria da pele de rã-touro em moinho de faca (E); pele de rã-touro autoclavada; (F) detalhe da estrutura da pele da rã-touro após autoclavagem.



Fonte: Os autores.

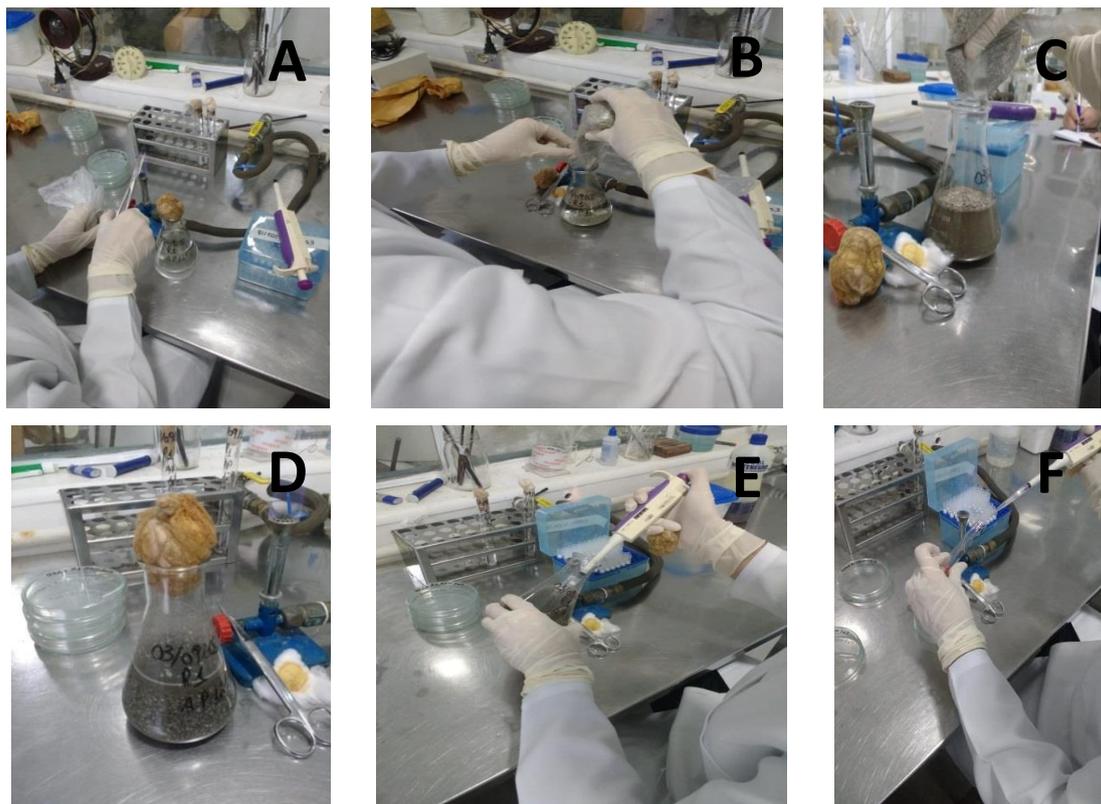
Com a finalidade de manter um alto pH durante o período de pré-enriquecimento, permitindo a reparação de células microbianas danificadas que podem ser sensíveis a um baixo pH, o material foi submetido a Água Peptonada Tamponada, de acordo com a fórmula especificada pela Organização Internacional para Padronização (ISO, 2003).

Foi adicionado 25g da pele de rã-touro pulverizada e autoclavada a 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Homogeneizada por 60 segundos em “stomacher” e acondicionada em Erlenmeyer, levados em estufa por 48h em temperatura de 35°C. Esta é a diluição 10^{-1} . Desta,

foi retirado 1mL e diluída em 9mL de água peptonada em tubo de ensaio, diluição 10^{-2} . A partir de 1mL desta diluição e 9mL de água peptonada em tubo de ensaio, originou se a diluição 10^{-3} (Figura 4 A, B, C, D e E).

A fim de estabelecer procedimento para a contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, na amostra foi semeado 1mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis de 90 mm. Adicionado 15mL de ágar padrão contagem (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. Foi homogeneizado adequadamente o ágar com o inoculo e deixado solidificar em superfície plana. Após solidificação foi levado à estufa por 48h em temperatura de 35°C (Figura 5 A, B, C e D).

Figura 4. Pré enriquecimento em água peptonada 0,1%: (A) inoculação da pele de rã-touro pulverizada à água peptonada; (B) calculando o volume da água peptonada, detalhe; (C) água peptonada após diluição, 10^{-1} ; (E) Inoculando a pele pulverizada na água peptonada; (D e E) Preparo das diluições 10^{-2} e 10^{-3} ;

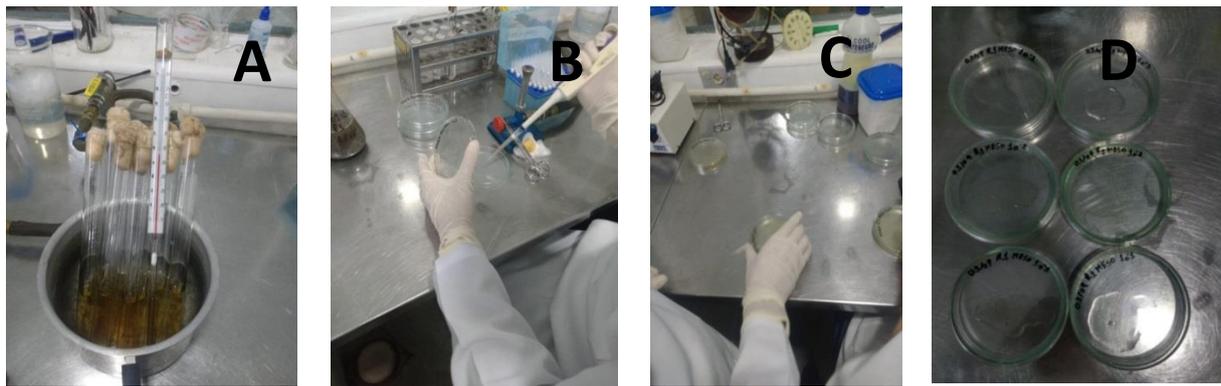


Fonte: Os autores.

Os procedimentos de ajuste do pH da amostra, ou seja, manter um padrão de acidez para que não interfira nas próximas análises da pele de rã-touro, sequenciados na Figura 4,

foram executados dentro dos padrões de segurança laboratorial, para que não houvesse contaminação e comprometimento dos resultados das próximas análises.

Figura 5. Análise Microbiológica para Mesófilos: (A) Acondicionamento de tubos de ensaio com meio de cultura PCA em banho-maria a 55°C; (B) Adição do inoculo da pele de rã-touro diluída na placa de Petri e do meio PCA; (C) homogeneização de inoculo e meio de cultura; (D) conjunto de placas de Petri com as peles de rã-touro inoculadas em três diluições no meio de cultura. .



Fonte: Os autores.

Esta sequência de procedimentos foi registrada (Figura 5) para demonstrar as técnicas utilizadas para se verificar quais e quantos microrganismos estão presentes na pele de rã-touro, sendo fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o biomaterial foi preparado, visando assegurar a eficiência da autoclavagem na assepsia do material, verificando a presença de *mesófilos*, coliformes e *Salmonella* sp, evitando a utilização de material contaminado como leito de curativo.

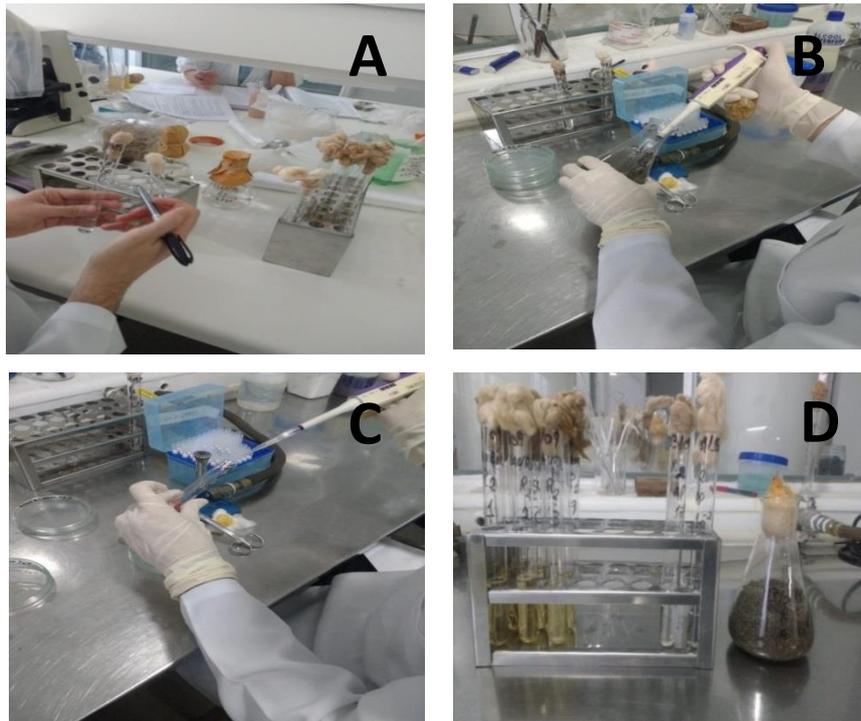
Para a verificação do crescimento das colônias de mesófilos em pele de rã-touro pulverizada e autoclavada foi utilizado o contador de colônia, onde foi realizada a contagem de microrganismos presentes em cada uma das diluições trabalhadas

Os coliformes apresentam o grupo de coliformes totais que incluem as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, presentes na água, vegetação e no solo.

O protocolo para esta análise consistiu na diluição no meio Lauril sulfato, acondicionados em nove tubos de ensaios com 9 mL da solução e organizados em estante, da seguinte forma: 03 tubos com 1mL da amostra fazendo a diluição 10^{-1} , na primeira fileira. Da primeira diluição retirou-se 1 mL que foi transferido para segunda fileira (diluição 10^{-2}) e

desta para terceira fileira fazendo a diluição 10^{-3} . Os tubos contendo o meio e a amostra foram levados a estufa permanecendo por 24/48h em temperatura de 35°C (Figura 6 A, B, C e D).

Figura 6. Aspectos da metodologia da análise microbiológica para Coliformes Totais: (A) identificação dos tubos de ensaio; (B) coleta do inoculo diluído; (C) inoculação da pele de rã-touro diluída; (D) aspectos dos tubos de ensaio com as três diluições de pele de rã-touro em água peptonada.



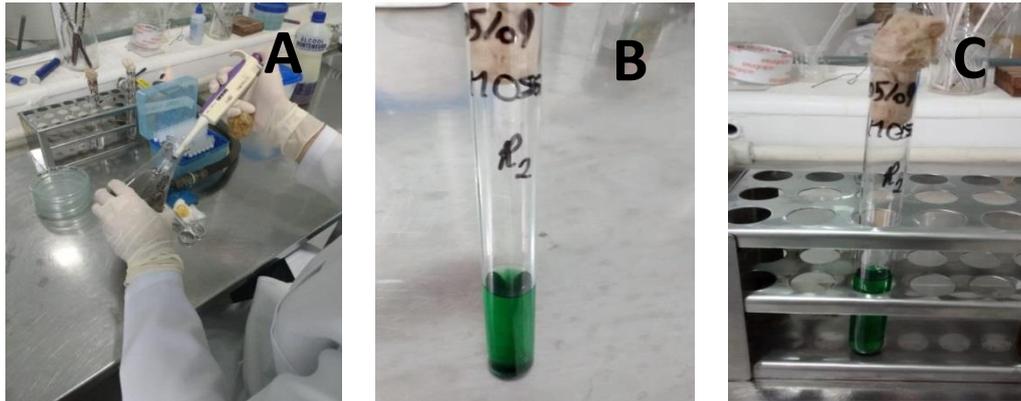
Fonte: Os autores.

Esta sequência de procedimentos foi registrada (Figura 6) para demonstrar os aspectos da metodologia da análise microbiológica para Coliformes Totais que poderiam estar presentes na pele de rã-touro, sendo fundamental verificar se ocorre a presença destes grupos de bactérias gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias, associadas à decomposição de matéria orgânica em geral, para se conhecer as condições de higiene em que o biomaterial foi preparado, visando assegurar a eficiência da autoclavagem na assepsia do biomaterial como leito de curativo.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp., foi retirado 1mL da diluição 10^{-1} de água peptonada e transferida para 9mL de caldo Mossel (Figura 7 A, B e C). Este inóculo foi mantido em estufa, na temperatura de 35°C por 24h. O tubo com o caldo de enriquecimento

seletivo após ser homogeneizado em agitador de tubo Vortex foi estriado em placa com Agar *Salmonella-shigella* (SS) sendo encubada em temperatura de 35°C por 24h.

Figura 7. Etapas da análise microbiológica para *Salmonella* sp: (A) coleta da diluição em 10^{-1} da pele de rã-touro pulverizada e imersa em meio Mossel; (B) aspecto do volume de 10 mL do meio de cultura com a pele de rã-touro pulverizada; (C) acondicionamento do tubo de ensaio em estante para sofrer incubação por 24 horas.



Fonte: Os autores.

Esta sequência de procedimentos foi registrada (Figura 7) para demonstrar os aspectos da metodologia da análise microbiológica para a bactéria *Salmonella* que poderia estar presente na pele de rã-touro, visando assegurar a eficiência da autoclavagem na assepsia do biomaterial como leito de curativo. Este microrganismo é responsável pela febre tifoide, infecção que pode agravar e provocar septicemia, entre outras graves sintomatologias.

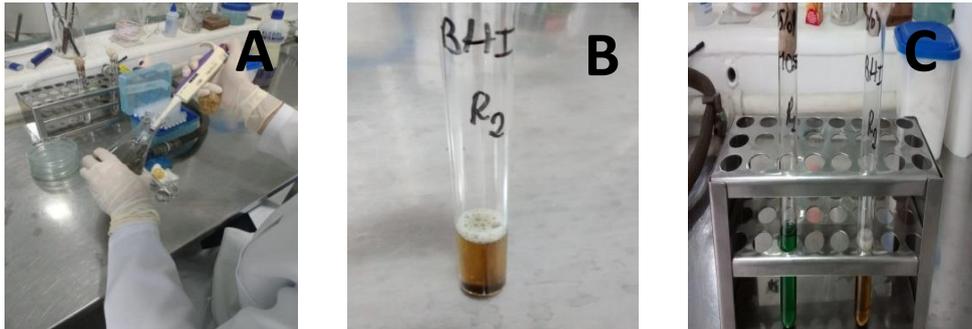
Análise Microbiológica para *Staphylococcus aureus*

Na análise para *Staphylococcus aureus*, foi retirado 1mL da diluição 10^{-1} de água peptonada para 9mL de caldo BHI, incubado em temperatura de 35°C por 24h (Figura 8 A, B e C). O tubo com o caldo de enriquecimento seletivo foi agitado em agitador Vortex e então, estriado em placa Agar Baird Parker, sendo incubada em temperatura de 35°C por 24h.

O registro da Figura 8 visou demonstrar os aspectos da metodologia da análise microbiológica para a bactéria *Staphylococcus aureus* que poderia estar presente na pele de rã-touro, o que inviabilizaria a eficiência da autoclavagem na assepsia do biomaterial como leito de curativo. Esta bactéria é do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente

encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção até infecções graves.

Figura 8. Etapas da análise microbiológica para *Staphylococcus aureus*: (A) coleta da diluição em 10^{-1} da pele de rã-touro pulverizada e dissolução em meio BHI; (B) aspecto do volume de 10 mL do meio de cultura com a pele de rã-touro pulverizada; (C) acondicionamento do tubo de ensaio em estande para sofrer incubação em 48 horas.



Fonte: Os autores.

3. Resultados e Discussão

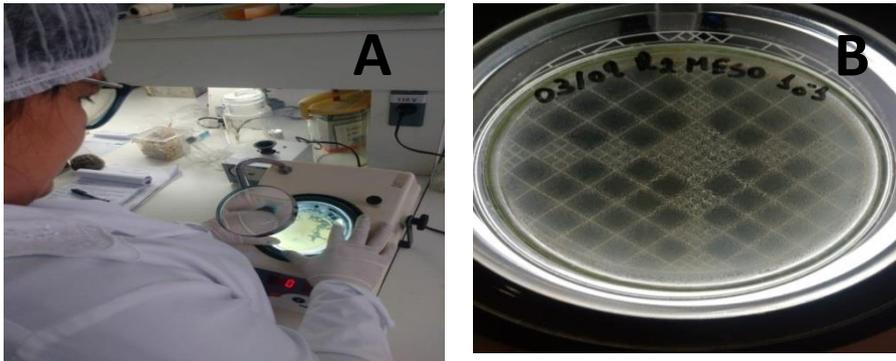
Análise microbiológica para mesófilos na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada

A utilização da técnica de análise microbiológica para mesófilo em pele de rã-touro pulverizada e autoclavada, permitiu verificar (Figura 9) que este tipo de esterilização do material foi satisfatório, viabilizando sua utilização como leito de curativo para feridas infectadas, uma vez que não foi detectada a presença de mesófilo na diluição da pele de rã-touro em água peptonada a 10^{-1} .

O procedimento registrado na Figura 9 demonstrou não ter havido nenhum crescimento de agente patológico, no caso mesófilos, no meio de cultura sólido (ágar) que encontra-se límpido, sem nenhuma colônia de microrganismos.

Este resultado demonstrou a eficiência de esterilização, viabilizando a utilização deste método de esterilização deste biomaterial para ser utilizado como leito de curativo, acarretando em redução de custos no produto final, possibilitando a sua utilização para o desenvolvimento da cobertura de feridas.

Figura 9. Resultado da autoclavagem da pele de rã-touro pulverizada e autoclavada: (A) precisão do método; (B) ausência de mesófilo na diluição de 10^{-1}



Fonte: Os autores.

Análise microbiológica para coliformes totais na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada

Os resultados obtidos pela utilização da técnica de colimetria, onde foram analisadas a presença de coliformes totais e fecais na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada, < 2 NMP/100 mL e < 2 NMP/ 100 mL, respectivamente, demonstraram não haver contaminação destes microrganismos no material (Figura 10).

Figura 10. Aspecto do meio de cultura Lauril, no interior do tubo de ensaio, com as três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) da pele de rã-touro pulverizada e autoclavada, demonstrando não haver contaminação por coliformes totais e fecais no material.



Fonte: Os autores.

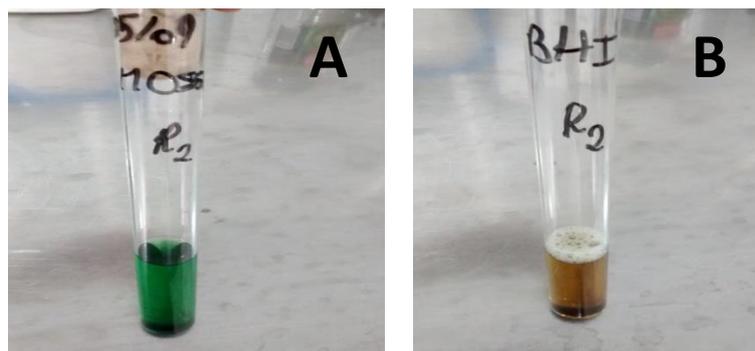
A confirmação visual destes resultados, apresentada na Figura 10, se deu pela transparência do meio e ausência de gases, demonstrando, para estes microrganismos, esterilidade do material. Este resultado possui relevância para a viabilidade da pele de rã-

toiro pulverizada e autoclavada fazer parte da base do leito do curativo, uma vez que se houvesse a presença de agente infeccioso, a ferida que não cicatrizaria, conforme comentado por Potter e Perry (1999) não permitindo a sua utilização como fator de barateamento deste tratamento.

Análise microbiológica para *Salmonella* sp e *Stafilococcus aureus* na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada.

Os resultados das análises microbiológicas demonstraram ausências dos microrganismos pesquisados (Figura 11), não havendo produção de gás e crescimento nos meios seletivos utilizados para ambos agentes microbianos. Os resultados obtidos pela utilização da técnica de estriamento em placa, onde foram analisadas a presença de *Salmonella* e *Stafilococcus* na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada, de < 2 NMP/100 mL e < 2 NMP/ 100 mL, respectivamente, demonstraram não haver contaminação destes microrganismos no material. Estes achados comprovam que a técnica de esterilização da pele de rã-touro pulverizada em autoclavagem foi eficiente para permitir a sua utilização com ausência destes agentes patológicos.

Figura 11. Aspecto dos meios de cultura Mossel e BHI, respectivamente, sem reação para presença de *Salmonella* sp (A) e *Stafilococcus aureus* (B) na pele de rã-touro pulverizada e autoclavada.



Fonte: Os autores.

Estes achados permitirão iniciar pesquisas que possibilitem a utilização de mais um biomaterial de baixo custo como leito de curativos, promovendo independência de industrialização, em relação aos insumos importados, associado ao barateando dos custos de produção, podendo alcançar um alto índice de pessoas com alterações na integridade da pele,

sério problema de saúde pública, o que onera os gastos públicos e prejudica a qualidade de vida da população, principalmente as de menor poder aquisitivo, atingindo de forma mais intensa as populações com vulnerabilidade, acarretando progressão até para óbito, conforme afirmação de Moraes et al (2008) corroborando Blanco (2009) e Viggiano (2018).

4. Considerações Finais

É viável a esterilização da pele de rã-touro pulverizada pelo método de autoclavagem, barateando o processo de assepsia do biomaterial para a base de curativos, com ampliação da sua confecção pela simplicidade do método, uma vez que não foram observadas contaminações por microrganismos, após este processo, que inviabilizasse sua utilização como leito de curativo, reduzindo os custos dos tratamentos das feridas infecciosas.

Com a obtenção do biomaterial estéril para utilização como base de curativo, estudos futuros são necessários para verificação de sua atividade antimicrobiana, por meio de antibiograma com os antibióticos industrializados, que são normalmente utilizados em base de curativos e possuem alto custo.

Referências

Bajay, H. M., Jorge, S. A., & Dantas, S. R. P. E. (2003) *Curativos e coberturas para o tratamento de feridas*. In: Jorge, A. S., & Dantas, S. R. P. E. *Abordagem Multiprofissional do tratamento de Feridas*. São Paulo: Atheneu.

Blanco, S. C. G. (2009) Efeito antimicrobiano do extrato bruto da pele de rã-touro (*Rana Catesbeiana* Shaw, 1802) sobre a acne vulgar: uma alternativa para o desenvolvimento local. 192p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local). Centro Universitário Augusto Motta, Rio de Janeiro. 2009.

Fish and Amphibian Euthanasia (CARE 306.02-revision). Institutional Animal Care and use Committee. Cornell University, 2018. Retrieved from <https://ras.research.coenell.edu/care/documents/ACUPs/ACUP306.pdf>.

Ide, L. K. (2017) Ampliação da utilização da carcaça de rã-touro com introdução na culinária asiática. 104p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local). Centro Universitário Augusto Motta, Rio de Janeiro, 2017.

ISO. International Organization for Standardization. 2003. ISO/TS 11133-2:2003, ICS: 07.100.30, Food Microbiology, 1211 Geneva 20, Switzerland. 5. British Standards Institute (BSI). 2002. BS EN ISO 6579: incorporating Corrigendum No. 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. London: BSI.

Mendes, E. V. (2009) *As redes de atenção à saúde*. Belo Horizonte, Escola de Saúde Pública de Minas Gerais.

NHRBRASIL. (2016) Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN): Conheça mais sobre a doença. Recuperado de <https://www.nhrbrasil.org.br/nossas-causas/doencas-tropicais-negligenciadas.html>.

Okamoto, R. *Caso complexo Ilha das Flores: feridas*. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo. Recuperado de https://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/esf/2/unidades_casos_complexos/unidade08/unidade08_FT_feridas.pdf.

OMS. Organização Mundial da Saúde. *Prevenção de doenças crônicas: um investimento vital*. Brasília, 2005.

OMS. Organização Pan-Americana da Saúde. (2010) *Linhas de cuidado: hipertensão arterial e diabetes*. / Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde. 232 p.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. (2020) *Doenças Tropicais*. Recuperado de https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=57.

Pereira, A. S., et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Potter, P. A., & Perry, A. G. (1999) *Fundamentos de enfermagem: conceitos, processo e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Santos, C. G. L. (2019) Desenvolvimento de cobertura para curativo em feridas infectadas utilizando pele de rã-touro autoclavada. 66p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local). Centro Universitário Augusto Motta, 2019.

Viggiano, G. (2018) Tratamento criado no Ceará usa couro de tilápia para curar queimaduras. Revista Galileu. n. 201. 2018. Recuperado de [https:// revista galileu.globo.com/Revista /noticia/2018/ 02tratamento-criado-noceara-usa-courode- tilapia-para-curar-queimaduras .html](https://revista.galileu.globo.com/Revista/noticia/2018/02tratamento-criado-noceara-usa-courode-tilapia-para-curar-queimaduras.html).

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Cristiane Gonçalves Laranja dos Santos – 40 %

José Teixeira de Seixas Filho – 30 %

Eliane Rodrigues – 20 %

Lucas Rangel Luquez – 10 %