

JOSÉ LÚCIO PÁDUA GEMEINDER

**Avaliação da eficácia da biomembrana de látex natural incorporada
com gentamicina na cicatrização de feridas experimentais em
ovinos.**

Tese apresentado ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti
Herculano
Coorientador: Dr. Breno F. M. de Almeida
Coorientadora: Dra. Isabela B. da Costa

Araraquara
2022

G322a Gemeinder, José Lúcio Pádua
Avaliação da eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com gentamicina na cicatrização de feridas experimentais em ovinos / José Lúcio Pádua Gemeinder. – Araraquara, 2022
113 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientador: Breno F. M. de Almeida; Isabela B. da Costa

1. Látex. 2. Cicatrização. 3. Testes de sensibilidade microbiana. 4. Materiais biomédicos. 5. Fármacos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avaliação da eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com gentamicina na cicatrização de feridas experimentais em ovinos."

AUTOR: JOSÉ LÚCIO PÁDUA GEMEINDER

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADOR: BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA

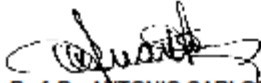
COORIENTADORA: ISABELA BAZZO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI (Participação Virtual)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. DÁRIO ABEL PALMIERI (Participação Virtual)

Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP - Assis



Prof. Dr. GABRIEL VITOR DA SILVA PINTO (Participação Virtual)

Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO - Ourinhos



Prof. Dr. ROSÂNGELA GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)

Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis

Araraquara, 13 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Jose Lucio Padua Gemeinder

Nome em citações bibliográficas: GEMEINDER, J. L. P.; Gemeinder, Jose Lucio Padua; GEMEINDER, JOSÉ LÚCIO PÁDUA; GEMEINDER, J

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Centro Universitário de Ourinhos - Curso de Farmácia.

Rodovia BR-153, Km 338+420m - Água do Cateto - 19909100 - Ourinhos, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- **2017-Atual** – Doutorado em Biotecnologias
Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Instituto de Química, Araraquara-SP, Brasil.
- **2014 - 2016** – Mestrado em Biociências
Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Assis-SP, Brasil.
- **2015 - 2017** - Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia.
Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (Unifio), Ourinhos-SP, Brasil.
- **1993 - 1996** - Graduação em Farmácia Industrial.
Universidade de Marília (UNIMAR), Marília-SP, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos**
2012 – Atual: Professor - **Disciplinas:** Estágio Supervisionado em Farmácia de Manipulação; Controle de Qualidade em Medicamentos e Cosméticos; Enzimologia e Tecnologia das Fermentações; Cálculos Farmacêuticos e Farmacotécnica I e II.
- **Universidade de Marília – UNIMAR**
2021 – Atual: Professor - **Disciplinas:** Estágio Supervisionado em Farmácia de Manipulação; Tecnologia Farmacêutica; Tecnologia Cosméticas e Fitoterápica e Farmacotécnica I e II.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. GEMEINDER, J.L.P., BARROS, N.R., PEGORIN, G.S., SINGULANI, J.L., BORGES, F.A., DEL ARCO, M.C.G., GIANNINI, M.J.S.M., ALMEIDA, A.M.F., SALVADOR, S.L.S., HERCULANO, R.D. Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers, **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p.1-19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1817667>
2. MORISE, B.T., CHAGAS, A.L.D., BARROS, N.R., MIRANDA, M.C.R., BORGES, F.A., GEMEINDER, J.L.P., SILVA, R.G., PAULINO, C.G., HERCULANO, R.D., NORBERTO, A.M.Q. Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhoea treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v.68, n.13, p.788-795, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1506984>
3. BARROS, N.R., MIRANDA, M.C.R., BORGES, F.A., GEMEINDER, J.L.P., MENDONÇA, R.J., CILLI, E.M. Natural rubber latex: development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v.66, n.17, p.871-876, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2017.1280795>
4. BORGES, F.A., BARROS, N.R., GARMS, B.C., MIRANDA, M.C.R., GEMEINDER, J.L.P., RIBEIRO-PAES, J.T., SILVA, R.F., TOLEDO, K.A., HERCULANO, R. D. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**. v.134, n.39, P.1-10 (45321), 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.45321> **Uma imagem do artigo foi selecionada como imagem de capa.**
5. GARMS, B.C., BORGES, F.A., SANTOS, R.E., NIGOGHOSSINA, K., MIRANDA M.C.R., MIRANDA, I.U., DALTRO, P., SCARPARI, S.L., GIAGIO, R.J., BARROS, N.R., ALARCON, K.M., DRAGO, B.C., GEMEINDER, J.L.P., OLIVEIRA, B.H., NASCIMENTO, V.M.G., HERCULANO, R.D. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**. v.15, n.1, p.1-10, 2017. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2017/31614>
6. BARROS, N.R., CHAGAS, P.A.M., BORGES, F.A., GEMEINDER, J.L.P., MIRANDA, M.C.R., GARMS, B.; HERCULANO, R.D. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier.

Journal of Materials, v.2015, p.1-7, 2015. DOI:
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/807948>

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. MANEA, R. R.; MANEA, R. R.; **Gemeinder, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Evaluation of industrialized capsules with enteretic coating available for magistral use. In: **XIX Congresso de Iniciação Científica**, 2020, Ourinhos. XIX Congresso de Iniciação Científica, 2020.
2. GONÇALVES, M.S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Avaliação da eficácia em saneantes domissanitários com ação antimicrobiana. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica**, 2019, Ourinhos. Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019. p. 106-105.
3. GONÇALVES, M.S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Efficacy evaluation in domissanitarian saneantes with antimicrobial action. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica**, 2019, Ourinhos. XVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019. p. 106.
4. BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. Natural rubber latex as Diclofenac Potassium carrier system. In: **9th Brazilian-German Workshop on Applied Surface Science**, 2016, São Sebastião. 9th Brazilian German Workshop on Applied Surface Science, 2016.
5. BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. O látex natural como sistema de liberação controlada de diclofenaco de potássio. In: **VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**, 2016, Araraquara. VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/School of Pharmaceutical Sciences, 2016. v. 37.
6. SANTOS, N. P.; PONTES, A.; **GEMEINDER, J. L. P.** GEMEINDER, A. C. S. Physico-chemical comparisons between tablets and effervescent powders. In: **XV Congresso de Iniciação Científica**, 2016, Ourinhos. XV CIC - Congresso de Iniciação Científica, 2016. v. 4. p. 1-162.
7. LUZ, D. P.; MARTINS, C. B.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.** Chemical physical evaluation tablets of captopril of 25mg: partial results. In: **XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos**, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.

8. HERAKI, B. S. R.; LIMA, E. C.; CARDOSO, F.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.** Evaluation of effectiveness in antimicrobial disinfectants products. In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
7. ELOI, A. C. G.; SILVA, L. B.; HAGGI, J. H. B.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Creams to urea based on pregnancy: hydration or risk? In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
8. FARIA, N. S.; LOPES, T. A.; VAZ, L. G.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Evaluation of the effect of antioxidant extracts Rosmarinus officinalis and Origanum vulgare front of hydroquinone. In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
9. SOARES, P. F. N.; SILVA, P. O.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Evaluation physical in capsules of omeprazole 20mg prepared masterfully. In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
10. SILVA, R. P. P.; SANTOS, R. B.; GIMENES, C.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.** Appraisal physical and chemical syrup herbal industrialized. In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
11. **GEMEINDER, J. L. P.**; GUARIDO, C. F. Pharmaceutical analysis of antimicrobial prescriptions in a popular drugstore facility from Brazil. In: **XV Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016, Ourinhos. XV Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos, 2016. v. 4. p. 1-162.
12. SANCHES, C. P.; OLIVEIRA, G. R.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.** Avaliação De Teste Físico-Químico Em Cápsulas Gastro-Resistentes Preparadas Em Farmácias De Manipulação. In: **XIII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2014, Ourinhos. XIII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2014. v. 6. p. 18-142.

13. RODRIGUES, M. P.; CONCEICAO, K. S.; GARGUERRA, T. J.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Estudo De Agentes Suspensores Em Formulações Magistrais De Hidróxido De Alumínio. In: **XIII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2014, Ourinhos. XIII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2014. v. 6. p. 18-142.
14. SILVA, G. D. B.; PAIVA, R.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Avaliação do controle de qualidade de cápsulas de atenolol manipuladas no município de Ourinhos - SP. In: **XII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013, Ourinhos, SP. Anais do XII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013. v. 5. p. 18-119.
15. BENATTO, M. S.; SILVA, G. D. B.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.** Comparação de diferentes técnicas de manipulação de cápsulas gelatinosas duras. In: **XII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013, Ourinhos. Anais do XII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013. v. 5. p. 18-119.
16. PAIVA, R.; SILVA, G. D. B.; **GEMEINDER, J. L. P.**; GEMEINDER, A. C. S. Emprego de diferentes métodos para a determinação do peso médio de cápsulas magistrais na cidade de Ourinhos/SP. In: **XII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013, Ourinhos. Anais do XII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013. v. 5. p. 18-119.
17. SILVA, C.; SILVA, G. L.; RIZZO, M. F. GATTI, L. L.; **GEMEINDER, J. L. P.**; CASTELO BRANCO Jr., A. Perfil Físico, Químico, Microbiológico e Ecológico de Três Cursos D'água Tributários da Bacia do Alto Paranapanema nos Estados de São Paulo e Paraná. In: **XII Congresso de Iniciação Científica** - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013, Ourinhos. XII Congresso de Iniciação Científica - Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), 2013. v. 5. p. 18-119.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

1. SILVA, R. D.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Renata Dias da Silva. **Uso de medicamentos potencialmente inapropriados para idosos**. 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.

2. ARAUJO, R. R.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Raquel Ribeiro de Araújo. **Interações medicamentosas potenciais em pacientes idosos internados em unidades de terapia intensiva.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
3. CARVALHO, L. A. M.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Letícia Angélica Monteiro de Carvalho. **Interações medicamentosas potenciais em pacientes com câncer.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
4. AGUERA, V. J.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Vitório José Aguera. **Comparação da ocorrência de hipoglicemia em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 usando insulina glargina versus insulina detemir.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
5. ROSA, R. M.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Raiane Manoela Rosa. **Fatores que interferem na adesão ao tratamento medicamentoso de pacientes com hipertensão arterial no Brasil.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
6. CALISTRO, A. C. P.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Ana Carolina Pagani Calistro. **Relevância clínica da interação entre clopidogrel e inibidores da bomba de prótons.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
7. MARTELINE, V. A. G.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Victor André Grandini Marteline. **Efetividade dos inibidores do co-transportador de sódio glicose tipo 2 versus demais antidiabéticos na redução da concentração sanguínea de glicose em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.
8. BATTILANI, B. M.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Bruna Marques Battilani. **Comparação da ocorrência de hipoglicemia noturna em pacientes com diabetes mellitus**

tipo 1 usando insulina glargina versus insulina neutral protamine hagedorn. 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.

9. FELICCETI, R. M.; GEMEINDER, A. C. S.; **GEMEINDER, J. L. P.**; OBRELI NETO, P. R. Participação em banca de Rafaela Marocolo Feliceti. **Benefícios da liraglutida no tratamento da obesidade.** 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia e Farmacoterapia) - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

1. IV Encontro Nacional de Patologia Clínica Veterinária – ENPC – Trabalho Apresentado: **“Teste de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de feridas cirúrgicas de pele em ovinos”**. 2020.
2. IV Encontro Nacional de Patologia Clínica Veterinária – ENPC – Trabalho Apresentado: **“Identificação de bactérias isoladas de feridas cirúrgicas de pele de ovinos”**. 2020.
3. Encontro Internacional de Farmácia - Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO – 2020. **Ouvinte.**
4. Congresso Biotecnologia Brasil – Movimento Biotecnologia Brasil – 2020. **Ouvinte.**
5. Simpósio de Pesquisa e Extensão NuPE/Unifio - Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO – 2019. **Ouvinte.**
6. Workshop de Órgãos, Biomateriais e Engenharia de Tecidos – OBI – Trabalho apresentado: **“Desenvolvimento de membranas de látex natural para liberação prolongada e aplicações na regeneração dérmica, reparo ósseo e periodontia”**.
7. Congresso da Saúde - Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO – 2019. **Ouvinte.**
8. CONIC-SEMESP – 18º Congresso Nacional de Iniciação Científica. Orientação: **“Avaliação Comparativa de Parâmetros Físico-Químicos de Comprimidos de hidroclorotiazida 25mg”**.
9. XVII – Congresso de iniciação Científica - Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO – 2018. **Comissão Científica de Avaliação.**

10.XVI – Congresso de iniciação Científica - Centro Universitário de Ourinhos - UNIFIO – 2017. **Comissão Científica de Avaliação.**

ORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO

1. Alison da Rosa Romano. **Avaliação das características físico-químicas de especialidades de ibuprofeno disponíveis em farmácias comerciais.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
2. Ana Barbara Silva Camargo. **A importância de uma central de mistura intravenosa em um hospital.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
3. Sthefani de Oliveira Gomes. **Benefícios da aromaterapia na qualidade de vida, relacionados ao estresse, ansiedade e autoestima.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
4. Leydiane Lima Leal. **Análise da atividade antibacteriana de spray bucal fitoterápico.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
5. Luiza De Assis Saad. **Avaliação da composição de cápsulas de maleato de enalapril 10mg preparadas magistralmente.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
6. Thais Aline De Azevedo. **Avaliação do medicamento paracetamol em diferentes marcas de especialidades farmacêuticas.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
7. Eloíse Cavalheiro Ovçar. **Quantificação de teor de ativo do medicamento industrializado atenolol 25mg antes e após o vencimento.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
8. Isabel Aparecida Gonçalves Mussato. **Análise de cápsulas de captopril 25mg preparadas magistralmente.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.
9. Vinicius Liyossei Figueiredo Arakaki. **Avaliação comparativa de parâmetros físico-químicos de comprimidos de hidroclorotiazida 25mg.** 2018. Trabalho

de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.

10. Patrícia Yukie Tao. **Avaliação físico-química da qualidade de comprimidos contendo sinvastatina 20mg na forma genérica e similar de uma mesma marca comercial.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário de Ourinhos – UNIFIO.

PRODUÇÃO TÉCNICA

- **09/2021 – Agência FAPESP – Ciência SP**

- _ Membranas de látex para feridas

- _ **Link:** <https://www.youtube.com/watch?v=-9YhJeEALAw>

- **09/2021 – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Araraquara**

- _ Membranas de látex com antibiótico são aplicadas em feridas de ovinos

- _ **Link:** <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/noticia/476/membranas-de-latex-para-feridas>

- **10/2021 - Entrevista TV Brasil**

- _ Curativo brasileiro tem látex e antibióticos para cicatrização

- _ **Link:** <https://tvbrasil.ebc.com.br/reporter-brasil/2021/10/curativo-brasileiro-tem-latex-e-antibioticos-para-cicatrizacao>

*“Dedico este trabalho aos meus eternos amores,
minha esposa Adriana e a meu filho Luís Antônio pelo apoio
incondicional, pela nossa união e cumplicidade”*

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Adriana e ao meu filho Luís Antônio pela paciência, compreensão dos momentos ausentes e incentivo ao longo deste trabalho.

Aos meus pais Jorge e Regina, meus irmãos Márcio e César, apesar de distantes, pelo apoio, conselho e orientações nas decisões de minha vida.

À minha sogra Rose Mary e meu sogro Dante “*in memoriam*”, que continue olhando por nós como sempre fez.

A todos meus familiares, cunhados, cunhadas, tios, tias, primos, primas que de alguma forma me apoiaram nesta tarefa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano pelos anos de compartilhamento de conhecimento, pelas orientações, pela paciência e sapiência das minhas dificuldades, pelo conhecimento adquirido e pelo novo amigo.

Ao amigo e coorientador Breno pela sua dedicação, ensinamentos e empenho no auxílio para o desenvolvimento prático e laboratorial deste estudo.

As alunas, agora médicas veterinárias, Giovana, Lidiana e Luana por todo trabalho, tempo e dedicação durante o manuseio dos animais e as práticas laboratoriais,

Aos colegas do grupo de Biomateriais, liderado pelo brilhante “Rondi”, sempre dispostos a ajudarem, sem questionamentos, uma perfeita equipe.

A coorientadora Isabela pelo aceite na colaboração deste trabalho.

À Prof^a. Cristiane, pois sem seu apoio não realizaria este feito, obrigado.

À CAPES e a FAPESP por participarem deste projeto.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho

EPÍGRAFE

“Aprenda o máximo que puder com aqueles que sabem mais do que você, que fazem melhor do que você, que veem mais claramente do que você”

(Dwight Eisenhower)

GEMEINDER, José Lúcio Pádua. **Avaliação da eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com gentamicina na cicatrização de feridas experimentais em ovinos**. 2022. 113f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

RESUMO

A antibioticoterapia visa reduzir ou eliminar o número de microrganismos presentes na ferida. Os sistemas de liberação de fármacos, como os transdérmicos, são fundamentais para promoção de ações terapêuticas, onde é possível controlar a liberação dos fármacos por um longo período. O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, um polímero natural, destaca-se por suas propriedades físicas e pela produção de biomembranas. Acerca disto, o objetivo deste estudo visou avaliar diferentes tratamentos de feridas induzidas em ovinos utilizando biomembrana de látex com e sem gentamicina quanto a melhora da cicatrização e redução da carga bacteriana, correlacionando a carga bacteriana e cicatrização, e verificar possíveis alterações dos marcadores bioquímicos de lesão hepatocelular e função renal causadas pelas biomembranas. Para isso, 10 ovinos receberam três ferimentos no hemitórax esquerdo e direito, os quais ficaram expostos por 24 h, a fim de promover contaminação microbiana. Após isso, os animais receberam tratamento, de forma aleatória (randomizada), com cobertura de biomembrana sem e com gentamicina ou não receberam cobertura alguma (grupo controle). Foi realizado a microscopia de força atômica nas biomembranas. As feridas foram avaliadas morfometricamente e quanto a carga bacteriana total, e além disso, foi testada a sensibilidade a diferentes antimicrobianos e às próprias biomembranas. Foi realizada avaliação hematológica e bioquímica para verificar alterações renais e hepáticas. Foi verificado o processo cicatricial por análises histológicas nos momentos dia zero (M0), dia treze (M13) e dia vinte e cinco (M25). As diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste de ANOVA com pós-teste de Tukey ou Friedman com pós-teste de Dunn, e as correlações foram realizadas pelos coeficientes de Pearson ou Spearman. Observou-se uma superfície uniforme com presença de grânulos nas biomembranas sem fármaco e nas incorporadas a dispersão homogênea do fármaco, não alterando a estrutura da superfície. As biomembranas com ou sem associação do antibiótico não aceleraram o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ovinos. O tamanho das feridas tratadas reduziu em 40% em 7 dias e o fechamento total ocorreu em 25 dias. Os testes hematológicos e bioquímicos não apresentaram alterações relevantes, nem renais e hepáticas. Não houve correlação entre o tamanho da ferida e a carga bacteriana. Das 121 colônias isoladas, as mais frequentes foram *Staphylococcus coagulase negativa* (50,41%). A biomembrana de látex com gentamicina promoveu redução da carga bacteriana sem indução de resistência antimicrobiana. Observou-se aumento da inflamação no M13 da ferida controle e no M13 e M25 dos tratamentos com a biomembrana de látex e de látex incorporado com gentamicina. A biomembrana incorporada com o antimicrobiano promoveu melhor aparência macroscópica da cicatrização sem evidência de cicatrizes hipertróficas e queloides.

Palavras-chave: Biomembrana de látex natural. Liberação sustentada. Atividade antimicrobiana. Biomaterial. Liberação de Fármaco.

GEMEINDER, José Lúcio Pádua. **Evaluation of effectiveness of natural latex biomembranes incorporated to gentamicin in the healing of experimental wounds in ovine** 2022. 113f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

ABSTRACT

The antibiotic therapy aims to reduce or eliminate the number of microorganisms living in the wound. The releasing system of drugs, like transdermal ones, are fundamental for the promotion of therapeutical actions, which make it possible to control the release of drugs for a long period. The latex extract from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, a natural polymer, stands out for its physical features and for the production of biomembranes. Hereof, the objective of this study aims to evaluate different treatments of experimental wounds in ovine using latex biomembranes with or without gentamicin in relation to the improvement of healing and reduction of the of bacteria, correlating to the load of bacteria and wound healing, checking possible alterations of the biochemistry markers of hepatocellular injuries and renal functions caused by the biomembranes. To this end, 10 ovine received three wounds in their left and right hemithorax, which were exposed for 24 hours, aiming to promote macrobiotics contamination. After that, the animals received treatment, in a random way, with the coverage of the biomembrane with or without the gentamicin or didn't receive any coverage (control group). Atomic force microscopy was conducted in the biomembranas. The wounds were evaluated morphometrically in relation to the total load of bacteria, and besides that, the sensibility was tested to different antimicrobials and to the biomembranes themselves. Hematologic and biochemistry evaluation was made in order to check renal and liver changes. The healing process was verified through histological analyses in the moments day zero(M0), day thirteenth (M13) and day twenty-fifth(M25). The differences between the treatments were verified by the ANOVA test with post-test of Tukey or Friedman with post-test of Dunn, and the correlations were made by the coefficients of Pearson or Spearman. An even surface containing granules was seen in the biomembranes without drugs and in the incorporated ones a homogeneous dispersion of the drugs was observed, which didn't change the aspect of the surface. The biomambranes with or without the association of the antibiotics didn't accelerate the healing process of skin wounds in ovine. The size of the wounds treated was reduced by 40% in 7 days and the total healing of the wounds happened in 25 days. The hematological and biochemical tests didn't show significant changes, neither renal nor hepatic. There wasn't correlation between the size of the wound and the bacterial load. From the 121 isolated colonies, the more frequent ones were Staphylococcus with negative coagulases (50,41%). The latex biomembrane with gentamicin promoted the reduction of the bacterial load without the induction of antimicrobial resistance. It was observed an increase in the inflammation in M13 of the wound control and in M13 and M25 of the treatments using the latex biomembrane and with latex incorporated to gentamicin. The incorporated biomembrane with antimicrobials promoted better macroscopic aspect of the healing with no evidence of hypertrophic scars or keloids.

Keywords: Natural Latex Biomembrane. Sustained Release. Antimicrobial Activity. Biomaterial. Drugs Releasing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação de sistemas de entrega transdérmica de fármacos.....	24
Figura 2 -	Esquema do processo de cicatrização de feridas com células envolvidas em cada fase.....	26
Figura 3 -	a) Estrutura do sulfato de gentamicina; b) Estruturas que se diferem na posição 5' e 6' no anel I.....	27
Figura 4 -	Implante de biomembrana de látex – Angiogênese: a) Controle, b) Tratamento.....	29
Figura 5 -	Ovinos: a) Aprisco individual; b) Roupa protetora.....	33
Figura 6 -	Partícula de borracha de látex natural.....	35
Figura 7 -	Processo de confecção das biomembranas de látex por <i>casting</i> : a) Materiais utilizados na produção da biomembrana; b) Látex, c) Mistura látex com a gentamicina, d) Deposição do látex nos moldes, e) Secagem da biomembrana, f) Biomembrana seca.....	36
Figura 8 -	Funcionamento da técnica de AFM: a) Esquema do sistema de microscopia de força atômica, b) Topografia de “blend” látex natural com nanotubos de carbono.....	37
Figura 9 -	Confecção das feridas: a) Esquema para indução das feridas; b) Marcação para indução das feridas.....	38
Figura 10 -	a) <i>Punch</i> 30 mm utilizado para confecção das feridas cirúrgicas dos ovinos; b) Remoção do tampão de pele.....	39
Figura 11 -	Demonstração das feridas induzidas cirurgicamente em um dos ovinos selecionados para o experimento recebendo tratamento na seguinte sequência sorteada, da esquerda para direita: biomembrana de látex, controle, biomembrana de látex com gentamicina.....	40
Figura 12 -	As feridas cirúrgicas foram confeccionadas utilizando <i>punch</i> de fabricação própria medindo 30 mm de diâmetro no hemitórax direito na região do gradil costal do ovino. Decorridas 24 h abertas, as feridas receberam, da esquerda para direita, cobertura com biomembrana de látex, cobertura com biomembrana de látex com gentamicina e não recebeu cobertura alguma (controle). As feridas foram limpas e as biomembranas foram trocadas a cada 72h.....	41
Figura 13 -	Procedimento de coleta dos <i>swabs</i> para análise microbiológica nas feridas do gradil costal direito, padronizado por 10 passagens pela ferida, sempre rotacionando, sendo realizada sempre pelo mesmo indivíduo.....	43
Figura 14 -	Após preparação do inóculo bacteriano a partir do <i>swab</i> das feridas, exatos 10 µL foram semeados em placas de Petri com Ágar Sangue e Ágar MacConkey para isolamento e determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de inóculo.....	46
Figura 15 -	Antibiograma após isolamento e identificação bacteriana.....	47
Figura 16 -	Imagens de AFM biomembrana de látex puro: a) Imagem 2D (256 pixels); b) Imagem 3D (512 pixels).....	50
Figura 17 -	Imagens de AFM biomembrana de látex + gentamicina: a) Imagem 2D (256 pixels); b) Imagem 3D (512 pixels).....	50
Figura 18 -	Relação dos diâmetros horizontal (H) e vertical (V) determinados por paquímetro digital em feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. As barras indicam valores mínimos e máximos e o quadro representa o primeiro e terceiro quartis e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	52

- Figura 19 - Áreas determinadas por software digital (ImageJ®) de feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. As barras indicam valores mínimos e máximos e o quadro representa o primeiro e terceiro quartis e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001) 53
- Figura 20 - Tamanho das feridas determinado por paquímetro digital (**A**) ou por software digital (ImageJ®, **B**) de feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001) 54
- Figura 21 - Hemácias (**A**), hemoglobina (**B**), volume globular (VG, **C**) volume corpuscular médio (VCM, **D**) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM, **E**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo (Wood e Quiroz-Rocha (2010) 58
- Figura 22 - Leucócitos totais (**A**), neutrófilos segmentados (**B**), linfócitos (**C**), monócitos (**D**), eosinófilos (**E**) e basófilos (**F**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo (Wood e Quiroz-Rocha (2010) 59
- Figura 23 - Plaquetas (**A**), proteína plasmática total (PPT, **B**) e fibrinogênio plasmático (FP, **C**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo (Wood e Quiroz-Rocha (2010) 60
- Figura 24 - Albumina (**A**), alanina aminotransferase (ALT, **B**), aspartato aminotransferase (AST, **C**), cálcio (**D**), creatinina (**E**), colesterol total (**F**), fósforo (**G**), gama glutamiltransferase (GGT, **H**), glicose (**I**), globulina (**K**), proteína total (**L**), triglicerídeos (**M**) e ureia (**N**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo Kaneko *et al.* (2008) 61

Figura 25 -	Carga bacteriana determinada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 7, 13 e 19 dias de tratamento. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	66
Figura 26 -	Carga bacteriana determinada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 7, 13 e 19 dias de tratamento.....	67
Figura 27 -	Infiltrado inflamatório crônico presente em menos de 25% do campo (HE - 40x). Seta preta grossa: Vasos sanguíneos. Seta preta fina: Fibroblastos. Seta vermelha fina: célula mononuclear.....	76
Figura 28 -	Infiltrado inflamatório crônico presente de 25-50% do campo (HE - 40x). Seta preta grossa: Vasos sanguíneos. Seta vermelha fina: célula mononuclear.....	76
Figura 29 -	Infiltrado inflamatório agudo presente em mais de 50% do campo (HE 40x). Seta vermelha fina: célula polimorfonuclear.....	77
Figura 30 -	Infiltrado inflamatório crônico presente em mais de 50% do campo (HE 40x)	77
Figura 31	Avaliação do processo cicatricial nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 13 e 25 dias de tratamento. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	78
Figura 32	Avaliação da inflamação nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	79
Figura 33	Avaliação da angiogênese nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	80
Figura 34	Avaliação do número de fibroblastos nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001)	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados hematológicos e bioquímicos (média e desvio-padrão) dos ovinos selecionados para inclusão no estudo (n=10)	34
Tabela 2	Esquema para coleta das amostras para avaliação hematológica, bioquímica, microbiológica e histopatológica, além de avaliação da cicatrização nos ovinos submetidos à procedimento cirúrgico para indução de feridas de pele medindo 30 mm de diâmetro.....	42
Tabela 3	Grupos de bactérias isoladas das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 13 e 19 dias de tratamento.....	69
Tabela 4	Perfil do teste de sensibilidade antimicrobiana (média) de bactérias isoladas das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (Látex) e biomembrana de látex com gentamicina (Látex + Gentamicina) 24 h após a realização (M0) e aos 13 e 19 dias de tratamento.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Comitê de ética	33
3.2 Seleção dos animais	33
3.3 Confeção das biomembranas	34
3.4 Microscopia de força atômica – AFM	37
3.5 Protocolo de indução de tratamento das feridas	38
3.6 Coleta das amostras	42
3.7 Avaliação da cicatrização	43
3.7.1 Morfometria	43
3.8 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	44
3.9 Identificação bacteriana	45
3.10 Teste de sensibilidade antimicrobiana	46
3.11 Avaliação histopatológica	47
3.12 Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Microscopia de força atômica – AFM	49
4.2 Avaliação da cicatrização	51
4.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	57
4.4 Carga bacteriana das feridas	65
4.5 Identificação bacteriana e teste de sensibilidade antimicrobiana	69
4.6 Avaliação histopatológica	75
5. CONCLUSÃO	83

6. REFERÊNCIAS	84
Apêndice 1 - Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of Staphylococcus aureus and Escherichia coli infected skin ulcers	93
Anexo A - Parecer Do Comitê De Ética No Uso De Animais (CEUA)	113

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de antibióticos tópicos em um sistema de absorção percutânea originou-se em 1965, sendo um processo adotado por Stoughton (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

O emprego da terapia antimicrobiana tópica é comumente utilizado em feridas procedentes ou não de procedimentos cirúrgicos e tratamentos crônicos (LINEAWEAVER *et al.*, 1984) na finalidade de reduzir, eliminar (FOSSUM, 2013) e prevenir contaminação bacteriana (GERONEMUS; MERTZ; EAGLSTEIN, 1979). Ademais, a carga bacteriana presente no sítio da ferida pode ser considerada não somente um risco de infecção, mas também um fator de retardo cicatricial, má formação do tecido de granulação, exsudação excessiva e presença de dor (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006).

A classe dos aminoglicosídeos são bactericidas e agem contra microrganismos Gram-negativos aeróbicos, comumente encontrados em lesões expostas e são aplicados para prevenir infecções por estes (GARNER *et al.*, 2020).

A antibioticoterapia pretende reduzir ou eliminar o número de microrganismos presentes na ferida, sendo que no tratamento de feridas abertas, a antibioticoterapia tópica é preferível à sistêmica (WELCH FOSSUM, 2013), na medida em que a aplicação tópica propicia maiores concentrações de antibiótico na ferida independentemente da circulação sanguínea local (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006). Além dos riscos da infecção, a presença de microrganismos atrasa a cicatrização dos tecidos, ocasionando em má formação do tecido de granulação, exsudação excessiva e aumento da dor (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006).

O sistema de liberação do princípio ativo da forma farmacêutica, seja ela líquida ou sólida, é a principal etapa do desenvolvimento de um medicamento, pois o foco principal é conseguir com que o agente terapêutico chegue ao local específico com níveis de concentração suficiente para desenvolver o efeito terapêutico desejado (HERCULANO *et al.*, 2009).

Para uma melhor compreensão, quando é administrado um medicamento por via oral ele percorrer todo o trajeto do trato gastrointestinal para ser absorvido e chegar na corrente sanguínea para alcançar a região-alvo necessária para o efeito terapêutico. Nos últimos anos os materiais poliméricos tem se sobressaído no

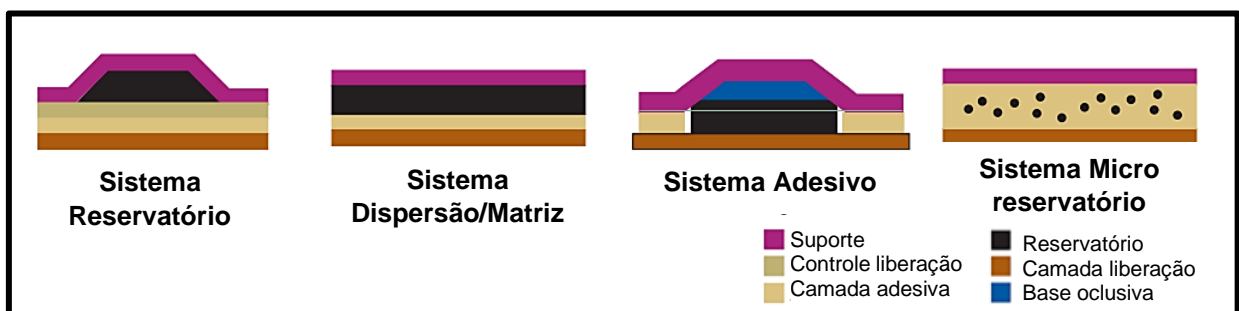
desenvolvimento de matrizes para liberação controlada de fármacos (HERCULANO; BRUNELLO; GRAEFF, 2007).

O desenvolvimento de um novo sistema de liberação de fármacos é fundamental na promoção das ações terapêuticas, contudo isto só é possível à medida que novas tecnologias são desenvolvidas, de forma a reduzir as limitações existentes nas terapias existentes (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Um método interessante para o transporte de fármacos são as formulações transdérmicas, que facilitam a passagem do fármaco através da pele, com a finalidade de atingir a circulação sanguínea e que representa uma alternativa em relação às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos (SILVA *et al.*, 2010).

Os polímeros são o principal suporte para o desenvolvimento de um sistema transdérmico para entrega de medicamentos, os quais funcionam como reservatório de fármacos ou formadores de matriz (Figura 1) (KANDAVILLI; NAIR; PANCHAGNULA, 2002).

Figura 1: Representação de sistemas de entrega transdérmica de fármacos.



Fonte: Adaptado de Kandavilli; Nair; Panchagnula, 2002.

A entrega transdérmica de fármacos podem ocorrer por diferentes sistemas, entre os quais, temos os sistemas reservatórios onde o fármaco encontra-se entre uma camada de suporte impermeável e uma membrana polimérica que controla a taxa de liberação, ou os fármacos podem estar dispersos em polímeros adesivos nos sistemas matriciais, e nos sistemas de dispersão-matriz, no qual o fármaco é disperso em uma matriz polimérica hidrofílica ou lipofílica, e os sistemas de micro reservatório que combina sistemas de reservatórios e dispersão em matriz (KANDAVILLI; NAIR; PANCHAGNULA, 2002).

Dentre estas aplicações, destacam-se o uso nas cicatrizações de feridas, que pode ocorrer por primeira intenção (as bordas das feridas estão justapostas sendo

possível uni-las), por segunda intenção (as bordas não estão próximas, não sendo possível a união e a ferida cicatriza-se de forma aberta) ou de terceira intenção (corrigidas cirurgicamente após formação de tecido de granulação) (MARIA DE FÁTIMA; ANDRADE; MORIYA, 2008).

O processo dinâmico para restauração da estrutura lesionada ocorre imediatamente com a liberação de grânulos de plaquetas, contendo citocinas e fatores de crescimento que permitem o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão (GURTNER *et al.*, 2008; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

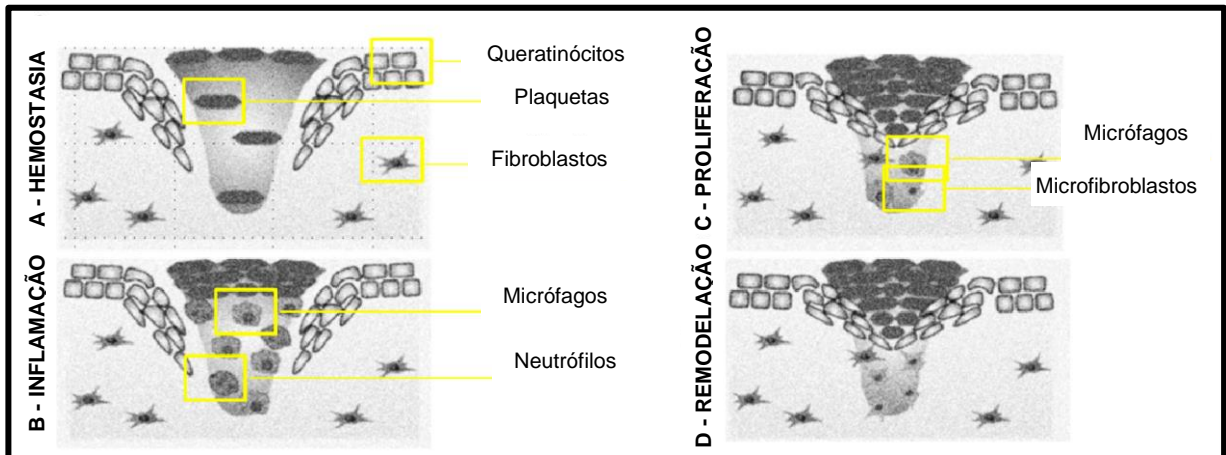
O processo de cicatrização de uma ferida não pode ocorrer sem a formação de novos vasos sanguíneos, processo denominado de angiogênese (DVORAK *et al.*, 1995; SINGER; CLARK, 1999).

A atividade angiogênica é fundamental para os organismos vivos em processos como o crescimento de órgãos, reprodução e reparação de feridas. Caracteriza-se pela formação de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente, envolvendo a proliferação, migração, regulação e diferenciação das células vasculares durante o processo de cicatrização, benéfica na recuperação de lesões, tais como acidente vascular cerebral isquêmico, quando bem regulada (MELO-REIS *et al.*, 2010).

Dessa forma, a sequência do processo cicatricial inicia-se com o desbridamento local (fase inflamatória), formação de tecido de granulação e angiogênese, seguido de proliferação de fibroblastos, formação de matriz extracelular e colágeno, reepitelização e remodelamento tecidual (GURTNER *et al.*, 2008; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

A Figura 2, representa o esquema do processo de cicatrização de feridas sem infecção, o que compreende a fase de hemostasia, onde ocorre a formação do coágulo sanguíneo evitando o sangramento e a contaminação microbiana. Posteriormente ocorre a fase inflamatória responsável pela liberação de plaquetas e queratinócitos, além de fatores de crescimento e citocinas precursores da formação de novos vasos. Na fase da proliferação ocorre a chegada das células epiteliais, na borda da ferida, em conjunto com a angiogênese e a produção de colágeno pelos fibroblastos, formando assim uma nova matriz extracelular. Desta forma a lesão é regenerada de forma contínua, onde os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, os quais apresentam um maior efeito contrátil favorecendo o fechamento da lesão (KARPPINEN *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019).

Figura 2: Esquema do processo de cicatrização de feridas com células envolvidas em cada fase.



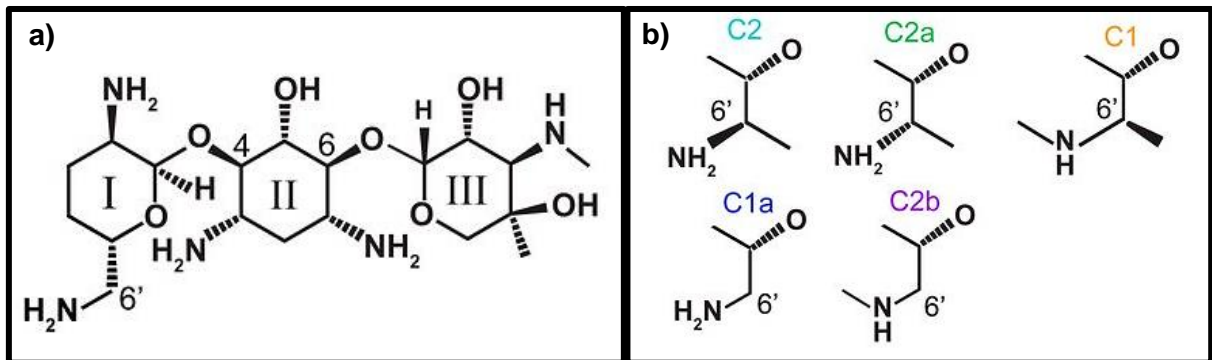
Fonte: Adaptado de Tottoli *et al.*, 2020.

O processo de cicatrização das feridas provenientes de traumatismos e cirurgias, também chamadas de feridas agudas, segue as etapas normais do processo cicatricial de forma previsível e organizada. As feridas classificadas como crônicas, como as úlceras de pressão, vasculares e diabéticas, se caracterizam pela reparação tecidual de forma desordenada devido a etapa de inflamação persistente, aparecimento de microrganismos e formação de biofilme (TOTTOLI *et al.*, 2020).

As feridas crônicas geralmente são infectadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, o que pode interferir no processo cicatricial. Uma vez instalada a infecção, os microrganismos podem chegar à corrente sanguínea e/ou levar a formação de biofilme, uma matriz rica em nutriente que protege os microrganismos aumentando sua proliferação e deixando-os mais resistentes aos tratamentos (GARMS *et al.*, 2019; TOTTOLI *et al.*, 2020).

Existem uma série de antibióticos comumente empregados para o tratamento de infecções dérmicas, tais como: ciprofloxacina, metronidazol, moxifloxacina, gentamicina, etc. O sulfato de gentamicina ($C_{21}H_{43}O_7$) é um complexo de aminoglicosídeo congêneres com as principais estruturas C1, C1a, C2, C2a e C2b, produzido por fermentação de *Micromonospora purpurea* ou *M. echinospora*, utilizado como o sal de sulfato (Figura 3) (FRIESEN *et al.*, 2018; GEMEINDER *et al.*, 2021).

Figura 3: a) Estrutura do sulfato de gentamicina; b) Estruturas que se diferem na posição 5' e 6' no anel I.



Fonte: Adaptado de O'Sullivan *et al.*, 2020.

Trata-se de um antibiótico de largo espectro e que apresenta sua ação por inibir o crescimento de uma vasta variedade de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo espécies resistentes à tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, e colistina, especialmente as *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* (KORZYBSKI; KOWSZYK-GINDIFER; KURYLOWICZ, 2013).

Os aminoglicosídeos apresentam características bactericida, são melhor absorvidos com a pele lesionada, queimada ou em processo de cicatrização, e mesmo com a descobertas de novas classes de antimicrobianos, seu uso persiste devido a frequentes problemas de resistência bacteriana (FERNANDES *et al.*, 2009)

O mecanismo de ação do fármaco ocorre na inibição da síntese protéica bacteriana por ligação à subunidade ribossomal 30S, levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, ocasionando a morte celular (AMSTERDAM, 2015).

A gentamicina pode ser aplicada topicamente para tratamento de infecções locais, como impetigo contagioso, dermatite eczematosa e dermatite seborreica, e infecções oculares superficiais (conjuntivites, ceratites, ceratoconjuntivites, úlceras na córnea, blefaroconjuntivites) (BRASIL, 2017).

Como desvantagem, o sulfato de gentamicina, quando utilizado em altas concentrações e por um longo período de tempo, promove sérios problemas de toxicidade (nefrotoxicidade e ototoxicidade) (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

As drogas nefrotóxicas levam a um desequilíbrio dos mecanismos fisiológicos da filtração glomerular e tubular, ocasionando o aumento dos níveis de creatinina sérica (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A ototoxicidade se dá pelo acúmulo do fármaco na endolinfa e perilinfa do ouvido interno e conseqüentemente leva à perda de audição (GARDNER *et al.*, 2016). Ademais, outros órgãos também parecem ser afetados, como o fígado, induzindo ao aumento da atividade sérica das enzimas hepáticas, além de ocorrer infiltração leucocitária, congestão e necrose hepáticas (GARDNER *et al.*, 2016; NAJAFI *et al.*, 2017).

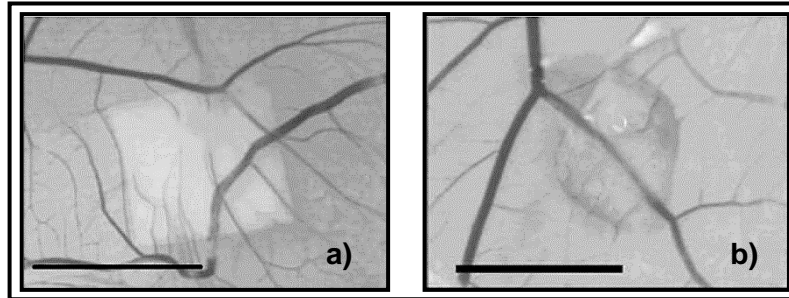
Todos esses efeitos adversos parecem ser reduzidos quando a gentamicina é aplicada topicamente, reduzindo a absorção sistêmica da mesma (WANG *et al.*, 2019). Todavia, seu uso se faz importante pelo amplo espectro de ação diante das bactérias Gram-negativas, além do baixo custo em relação a outras classes de antimicrobianos de igual efetividade (ALMEIDA; WAGNER, 2014).

A incorporação de antibióticos em dispositivos para liberação controlada tem se tornado uma prática comum no meio médico, pois proporcionam uma elevada concentração do fármaco no local infectado, sem que haja toxicidade sistêmica (FERNANDES *et al.*, 2009).

Os biopolímeros naturais têm sido uma alternativa interessante como suporte para liberação controlada, tais como a quitosana, alginato, celulose e o látex natural. O látex natural utilizado é extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, uma árvore extensivamente cultivada no sudeste da Ásia, no entanto é nativa da bacia do rio Amazonas, no Brasil (GEMEINDER *et al.*, 2021). Este suporte tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas, onde pesquisas demonstraram que o látex natural é um material biocompatível com inúmeras aplicações (FRADE *et al.*, 2001; HERCULANO *et al.*, 2010).

O biomaterial apresenta alta resistência mecânica e baixo custo. Outros estudos evidenciaram que o látex possui a propriedade de acelerar a angiogênese e que algumas moléculas angiogênicas, como fatores de crescimento, são conhecidos por estimular a proliferação celular (Figura 4) (ALVES, 2010; FERREIRA *et al.*, 2009).

Figura 4: Implante de biomembrana de látex – Angiogênese: a) Controle, b) Tratamento.



Fonte: (FERREIRA *et al.*, 2009).

A utilização do látex com o intuito de cicatrização já foi descrito em humanos em feridas de pacientes diabéticos (NUNES *et al.*, 2016), úlceras venosas crônicas (FRADE *et al.*, 2012), feridas e queimaduras (SILVA; ALENCAR, 2017) e em animais avaliando-se a reparação tecidual de bovinos (ZIMMERMANN *et al.*, 2018), de coelhos em transplante conjuntival (PINHO *et al.*, 2018), em estômago (FERREIRA *et al.*, 2014) e feridas cutâneas (ROSA, 2016); em ratos em lesão térmica corporal por escaldamento (BOLINA-MATOS *et al.*, 2013), neoformação tecidual (ANDRADE, 2007), lesões cutâneas agudas (BOLINA-MATOS *et al.*, 2013), regeneração de ossos longos (CARLOS *et al.*, 2019) e em cães em herniorrafia diafragmática (ZIMMERMANN *et al.*, 2008).

Contudo, apesar de seu potencial cicatricial, a biomembrana de látex não apresenta atividade antimicrobiana quando não impregnada a uma substância com essa finalidade (GARMS *et al.*, 2017).

Yonashiro Marcelino *et al.* (2018), ao analisarem biomembranas incorporadas com o antifúngico fluconazol observaram em ensaios *in vitro* a liberação do fármaco pela biomembrana por 48 h. Em ensaios baseados na metodologia de difusão em disco e diluição em caldo, verificaram de forma positiva a susceptibilidade do microrganismo *Candida albicans* frente a biomembrana com o fármaco em concentrações de 25 µg e 50 µg, sugerindo seu uso como curativo dermatológico.

Outro estudo com antifúngico incorporado ao látex natural foi apresentado por Silva *et al.* (2020), no qual o fármaco utilizado foi o voriconazol. Dentre os ensaios realizados neste estudo, relataram que a biomembrana liberou 13,23% do fármaco em 1 hora e 24,20% durante 48 horas, o que demonstra a liberação sustentada e em testes de macrodiluição a biomembrana incorporado com o voriconazol apresentaram

valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 4,37 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ frente ao microrganismo *Candida parapsilosis*.

Tanaka *et al.* (2021), incorporaram sulfadiazina de prata ao látex natural com o escopo de desenvolver um curativo dérmico para o tratamento de queimaduras infectadas com *Candida ssp.* . Em suas análises observaram que a biomembrana produzida com o fármaco liberou a 32,4% da sulfadiazina de prata ao longo de 192 horas e no ensaio de macrodiluição o curativo desenvolvido inibiu o crescimento dos microrganismos *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* em concentrações de 75,0 e 37,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

Em ensaios realizados em biomembranas de látex contendo o fármaco metronidazol incorporado, observou-se a entrega do fármaco, em ensaios *in vitro*, de 10,63mg (53,15%) por 29,9 horas e ainda quando o metronidazol foi incorporado ao látex, não houve interação química conforme resultados dos testes em espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (HERCULANO *et al.*, 2011).

Garms *et al.* (2017), apresentaram resultados satisfatórios ao analisarem biomembranas de látex incorporadas com ciprofloxacino, um antimicrobiano efetivo aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Nos ensaios realizados parametrizados com a metodologia de diluição em caldo, os resultados revelaram inibição bacteriana completa da biomembrana com o fármaco frente ao fungo *Burkholderia lata*.

Apesar de recentemente alguns trabalhos mostrarem a incorporação de antimicrobianos e antifúngicos nas biomembranas de látex, até o momento, não existem estudos avaliando o efeito da biomembrana de látex na cicatrização de feridas em ovinos, nem mesmo estudos avaliando sua toxicidade por meio da avaliação das alterações laboratoriais e dos parâmetros clínicos e padrão microbiológico decorrentes do uso da biomembrana de látex impregnada com gentamicina.

Em estudos com outras espécies, Fernandes *et al.* (2009) descreveram o uso de quitosana como dispositivo de liberação controlada de gentamicina e avaliaram *in vitro* a resistência de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Klebsiella pneumoniae*, tendo um crescimento bacteriano inibitório satisfatório.

Já Gemeinder *et al.*, (2021), ao avaliar as bactérias *S. aureus* e *Escherichia coli* (*E. coli*), observaram que a biomembrana de látex natural puro induziu halo inibitório de crescimento bacteriano para o *S. aureus* e não apresentou ação antimicrobiana

para *E. coli*, enquanto a mesma biomembrana incorporada com gentamicina desencadeou halos de inibição maiores que as referências em ambos os microrganismos testados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência do tratamento de feridas induzidas experimentalmente em ovinos utilizando biomembrana de látex com e sem gentamicina.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar os marcadores de lesão hepatocelular dos ovinos que receberam ferida cirúrgica antes e após a aplicação da biomembrana de látex incorporada com gentamicina, objetivando avaliar possível hepatotoxicidade.

Comparar os marcadores de séricos de função renal dos ovinos que receberam ferida cirúrgica antes e após a aplicação da biomembrana de látex incorporada com gentamicina, objetivando avaliar possível nefrotoxicidade.

Comparar a área de feridas em ovinos realizadas cirurgicamente sem tratamento algum (controle) com a área de feridas tratadas com biomembrana de látex e biomembrana de látex impregnada com gentamicina.

Comparar a carga bacteriana de feridas em ovinos realizadas cirurgicamente sem tratamento algum (controle) com a carga bacteriana de feridas tratadas com biomembrana de látex e biomembrana de látex impregnada com gentamicina.

Verificar se a aplicação de biomembrana de látex impregnada com gentamicina é capaz de selecionar bactérias resistentes a esse antibiótico no teste de sensibilidade a antimicrobianos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (Unifio) sob protocolo número 022/2018 (ANEXO A).

3.2 Seleção dos animais

Todos os ovinos incluídos no projeto foram provenientes da Fazenda Experimental da Unifio. Os animais foram mantidos em sistema intensivo em baias individuais medindo 2,0 x 1,5 m, cercadas de madeira, e receberam alimentação composta por volumoso e concentrado. O volumoso é silagem de milho à vontade e o concentrado é ração farelada composta por 63% milho, 34% soja e 3% sal mineral, sendo fornecido duas vezes ao dia na quantidade de 250 g/animal no período da manhã e da tarde.

Cada baia possui bebedouros individuais em seu interior com fornecimento à vontade. Todos os animais foram vermifugados e apresentam controle parasitário em dia (Figura 5).

Figura 5: Ovinos: a) Aprisco individual; b) Roupas protetora



Fonte: Arquivo pessoal.

Foram selecionados 10 ovinos, sendo cinco machos e cinco fêmeas com idade entre 1,5 e 3 anos, da raça Santa Inês, de pelagem curta, pesando entre 30 e 40 kg,

sem alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas (Tabela 1) uma semana antes da realização da ferida cirúrgica.

Tabela 1: Dados hematológicos e bioquímicos (média e desvio-padrão) dos ovinos selecionados para inclusão no estudo (n=10).

Parâmetro	Resultado	Referência
<i>Hematologia</i>		
Volume globular %	30,50 ± 2,27	27 – 45
Hemácias (x10 ¹² /L)	9,05 ± 0,74	9 – 15
Hemoglobina (g/dL)	10,19 ± 0,76	9 – 15
VCM (%)	31,70 ± 0,82	28 – 40
CHCM (%)	36,14 ± 3,01	31 – 34
Leucócitos totais (x10 ⁹ /L)	8,19 ± 2,35	4 – 12
Neutrófilos segmentados (x10 ⁶ /L)	2.959 ± 974	700 – 6.000
Linfócitos (x10 ⁶ /L)	4.529 ± 1.488	2.000 – 9.000
Monócitos (x10 ⁶ /L)	243 ± 157	0 – 750
Eosinófilos (x10 ⁶ /L)	428 ± 239	0 – 1.000
Basófilos (x10 ⁶ /L)	0 ± 0	0 – 300
PPT (g/dL)	6,68 ± 0,19	6,0 – 7,5
Fibrinogênio g/dL	0,24 ± 0,08	0,2 – 0,6
Plaquetas (10 ⁹ /L)	530,40 ± 152,34	300 – 600
<i>Bioquímica</i>		
Albumina (g/dL)	2,91 ± 0,61	2,4 – 3,0
AST (UI/L)	99,20 ± 23,59	60 – 280
Creatinina (mg/dL)	1,21 ± 0,18	1,2 – 1,9
Proteína total (g/dL)	6,78 ± 0,80	6,0 – 7,9
Ureia (mg/dL)	34,57 ± 9,65	17 – 42
GGT(UI/L)	34,92 ± 4,76	20 – 52

Valores de referência para a espécie ovina: Hematologia (WOOD, QUIROZ-ROCHA, 2010) e bioquímica (KANEKO *et al.*, 2008). **Abreviações:** AST, aspartato aminotransferase; CHCM, concentração hemoglobínica corpuscular média; GGT, gamaglutamil transferase; PPT, proteína plasmática total; VCM, volume corpuscular médio.

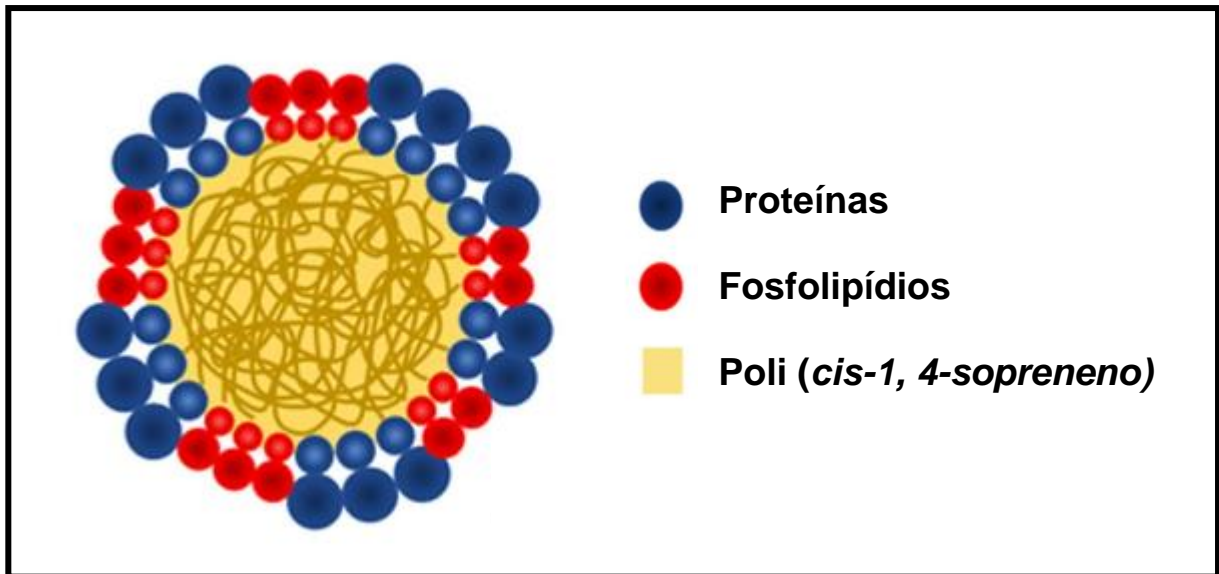
3.3 Confecção das biomembranas

A confecção das biomembranas seguiu o protocolo de Gemeinder *et al.* (2021). Resumidamente, o látex natural foi adquirido comercialmente (BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda., Guarantã, SP) e mantido em estado líquido pela adição de amônia com pH 10,0. O material foi centrifugado a 8000 g com a finalidade de reduzir proteínas presentes no látex que poderiam ocasionar reações alérgicas.

O látex natural, quando em forma líquida, é formado basicamente por uma suspensão de partículas de borracha envolvidas por moléculas fosfolipídicas e proteínas, que pela repulsão eletrostática de suas cargas, deixam a suspensão

estável (Figura 6). Desta forma, se o pH da suspensão diminuir, ou ocorrer a evaporação da água ou com a ação de bactérias que secretam ácido graxo, ela se tornará instável, o que resultará na coalescência das partículas de borracha formando um coágulo de látex ou o látex sólido (NAWAMAWAT *et al.*, 2011).

Figura 6: Partícula de borracha de látex natural

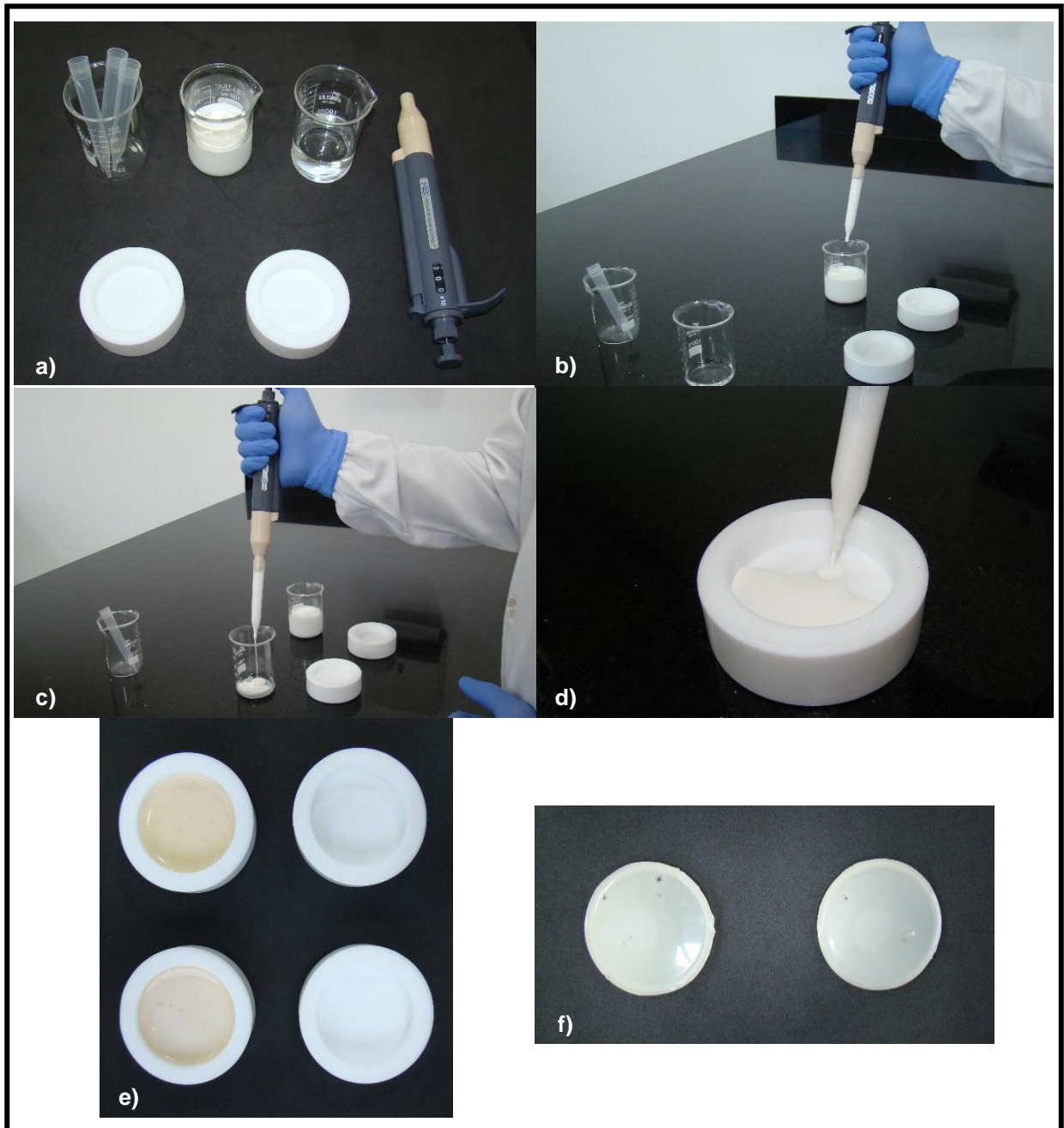


Fonte: Adaptado de Pegorin *et al.*, 2021.

A biomembrana foi confeccionada por *casting*, depositando-se 3 mL de látex sobre placa circular por no mínimo 24 horas para a obtenção da biomembrana em sua consistência padrão.

Para a confecção das biomembranas de látex natural com sulfato de gentamicina (Fagron, Fuan Pharm. Group Yantai Justaware Pharm. Co., Ltd, China) uma solução estoque do fármaco foi preparada diluindo a gentamicina em água destilada, obtendo uma concentração de 30 mg/mL. Para uma melhor homogeneidade da solução, o vórtex foi utilizado por 5 min. Depois disso, as biomembranas foram fabricadas depositando 3 mL de látex natural acrescidos de 3 mL de solução de gentamicina, seguindo o mesmo procedimento de secagem da biomembrana sem fármaco (Figura 7).

Figura 7: Processo de confecção das biomembranas de látex por *casting*: a) Materiais utilizados na produção da biomembrana; b) Látex, c) Mistura látex com a gentamicina, d) Deposição do látex nos moldes, e) Secagem da biomembrana, f) Biomembrana seca.



Fonte: Arquivo pessoal.

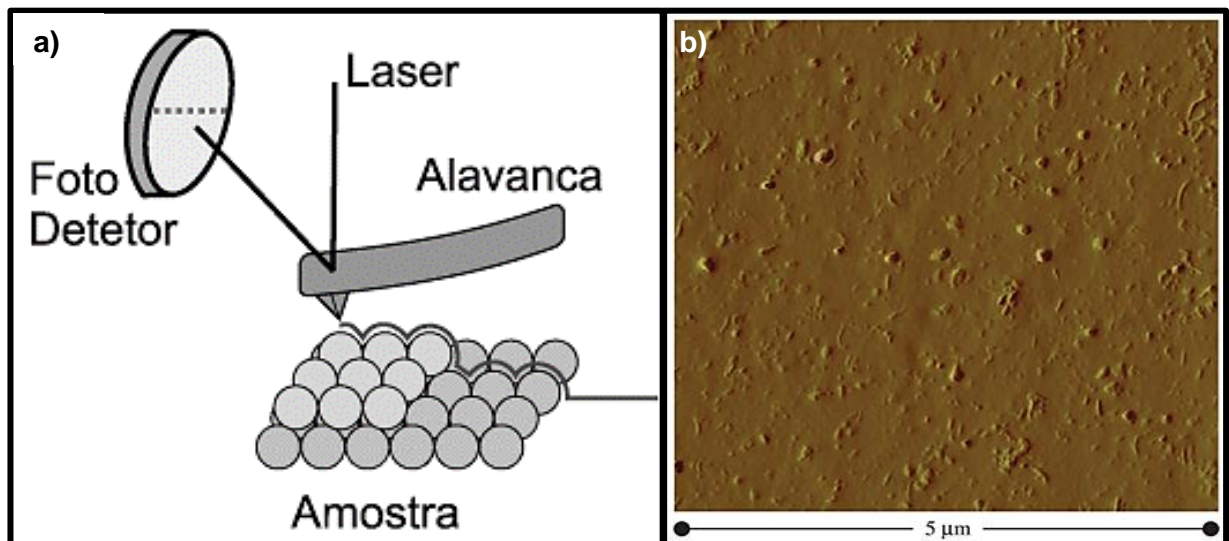
O desenvolvimento e caracterização das biomembranas de látex puro e incorporadas com gentamicina foi evidenciado em pesquisa anterior. Os ensaios de caracterização das biomembranas como resistência mecânica, taxa de liberação, atividade antimicrobiana e hemolítica estão descritas no Apêndice 1.

3.4 Microscopia de força atômica – AFM

A microscopia de força atômica (AFM) tem como princípio medir as forças ou as interações entre uma ponteira e a superfície da amostra para produzir imagens a partir de um material isolante ou não (PINTO; RAMOS; DA FONSECA FILHO, 2015).

A leitura das interações é realizada por uma sonda composta por uma ponteira acoplada à uma haste flexível (cantilever), a qual incide um feixe de laser que é refletido através de uma lente em um fotodetector onde é medido às variações de posição e intensidade produzidas pelas deflexões do cantilever quando a ponteira entra em contato com a superfície da amostra (Figura 8). Estas variações são armazenadas e transformadas em imagens topográficas da superfície da amostra (FERREIRA; YAMANAKA, 2006)

Figura 8: Funcionamento da técnica de AFM: a) Esquema do sistema de microscopia de força atômica, b) Topografia de “blend” látex natural com nanotubos de carbono.



Fonte: (NEVES; VILELA; ANDRADE, 1998; SOUSA; SCURACCHIO, 2014).

Apresenta vantagens como imagem tridimensional, alta resolução, a amostra em análise não precisa ser recoberta com material condutivo, análise do material em escala nanométrica e menor custo em relação aos microscópios eletrônicos (HERRMANN *et al.*, 1997).

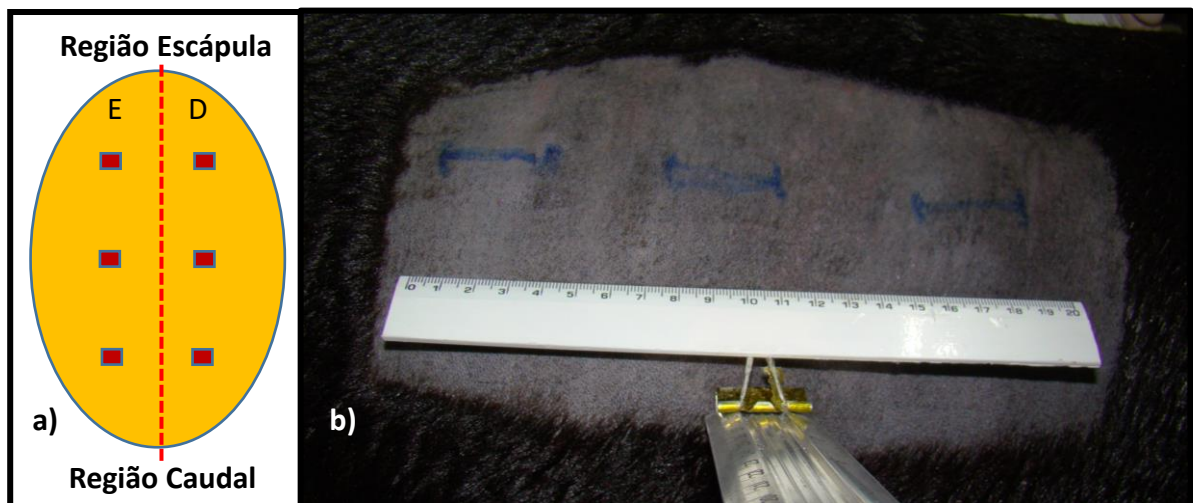
Para a leitura topográfica das biomembranas foi utilizado o equipamento NaioAFM, Modelo NanoSurf (Suíça) acoplado a um cantilever “CONTR” em modo contato, com frequência de ressonância 15-350kHz, obtendo imagens em duas e três

dimensões (2D e 3D) com resolução de 256 x 256 ou 515 x 512 pixels em frequência de 1 linha por segundo.

3.5 Protocolo de indução e tratamento das feridas

Cada animal recebeu seis feridas cutâneas na região do gradil costal, sendo três do lado esquerdo (E) e três do lado direito (D) com distância de pelo menos 3 cm entre os ferimentos (Figura 9).

Figura 9: Confeção das feridas: a) Esquema para indução das feridas; b) Marcação para indução das feridas.



Fonte: Arquivo pessoal.

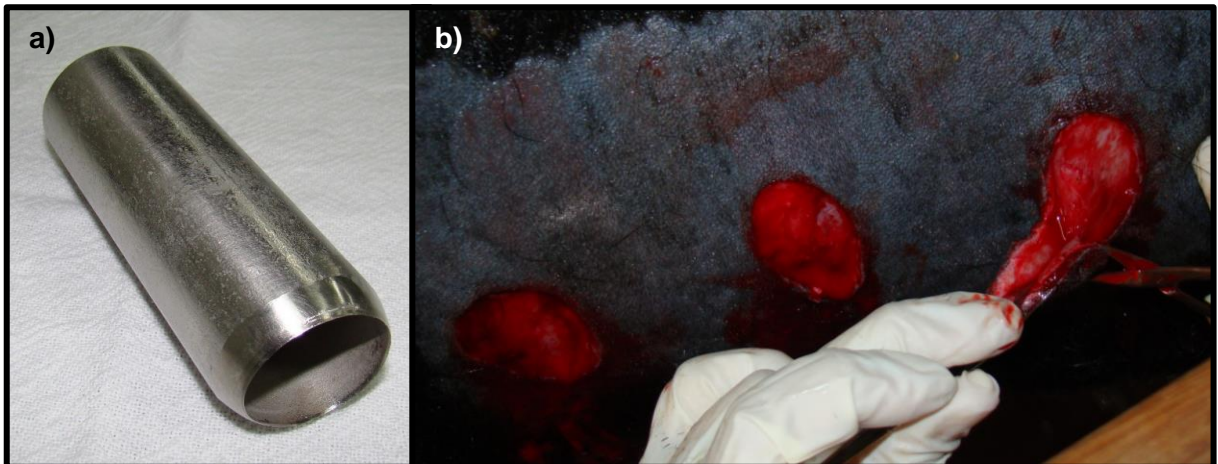
As feridas receberam como tratamento cobertura de biomembrana de látex, cobertura com biomembrana de látex impregnada com gentamicina ou como controle, ausência de cobertura direta da ferida.

A disposição dos tratamentos em cada animal foi realizada por sorteio no dia da aplicação do tratamento, sendo que cada ferida dos diferentes animais teve a mesma chance de receber qualquer tratamento e o tratamento realizado do lado esquerdo foi repetido no lado direito do mesmo animal.

Para confecção da ferida cirúrgica, foi realizada tricotomia, limpeza da região com água e sabão, seguido de antissepsia com clorexidina a 3% e clorexidina alcoólico 0,5% em cada hemitórax do animal. A analgesia local foi realizada utilizando lidocaína 5% sem vasoconstritor (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e as três feridas em cada hemitórax foram confeccionadas com um *punch* (Figura 10) de

fabricação própria estéril medindo 30 mm de diâmetro, sendo a profundidade suficiente apenas para passar as três camadas da pele do animal. Então o tampão de pele foi removido com auxílio de pinça e tesouras cirúrgicas estéreis.

Figura 10: a) *Punch* 30 mm utilizado para confecção das feridas cirúrgicas dos ovinos; b) Remoção do tampão de pele.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após realização das feridas, as mesmas ficaram abertas e expostas por um período de 24 h com o intuito de obterem-se feridas contaminadas. Os animais foram mantidos em baias individuais, recebendo normalmente água e alimentação normais. Decorridas as 24 h, foi coletado material para avaliação microbiológica e determinação da carga microbiana inicial, posteriormente as feridas foram limpas com gaze e solução fisiológica estéreis, secas e receberam os tratamentos definidos por sorteio (controle, biomembrana de látex ou biomembrana de látex com gentamicina). As biomembranas foram fixadas à ferida com adesivo à base de etil cianoacrilato (TEK BOND, Saint-Gobain, Embu das Artes, Brasil) (Figura 11).

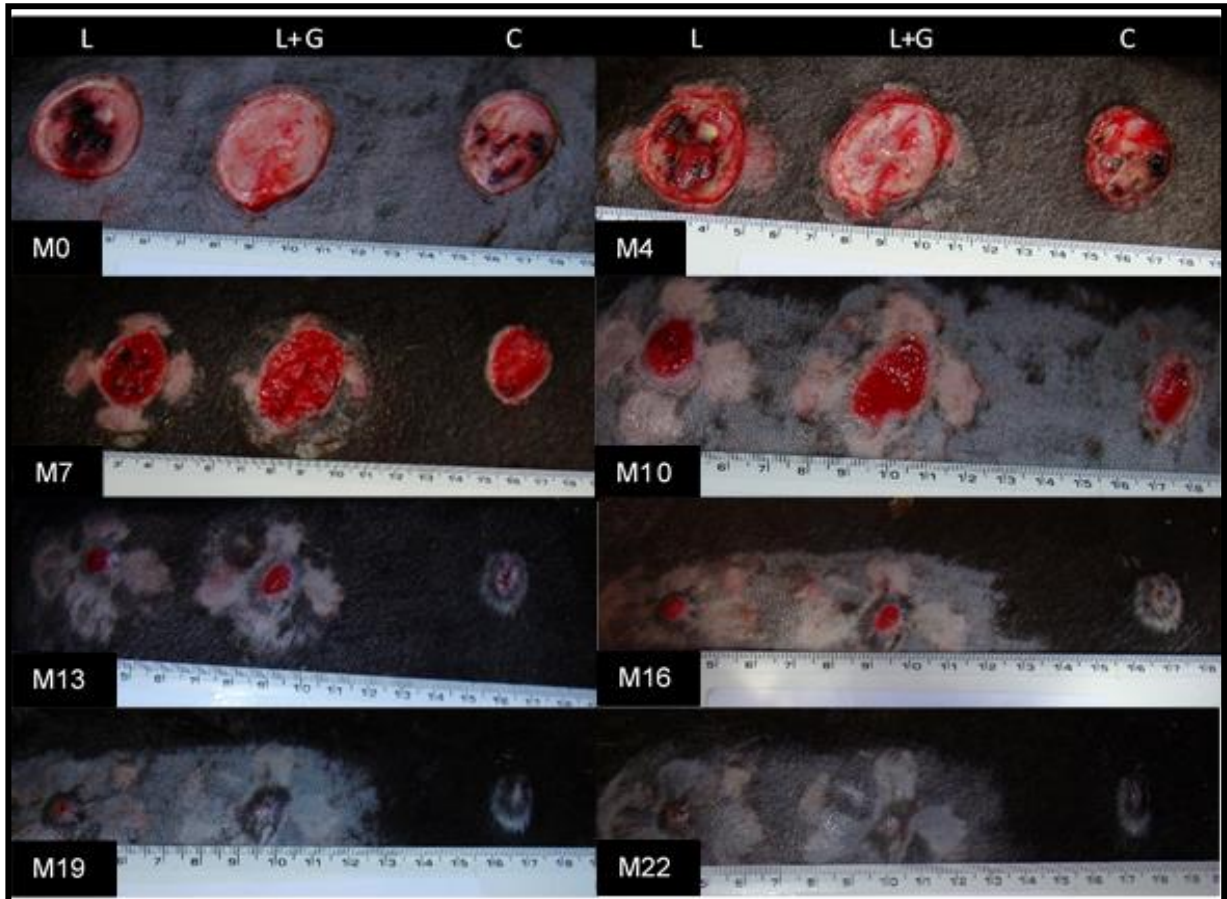
Figura 11: Demonstração das feridas induzidas cirurgicamente em um dos ovinos selecionados para o experimento recebendo tratamento na seguinte sequência sorteada, da esquerda para direita: biomembrana de látex, controle, biomembrana de látex com gentamicina.



Fonte: Arquivo pessoal.

A cada 72 h, período máximo de liberação de gentamicina *in vitro* (GEMEINDER *et al.*, 2021; MARINHO *et al.*, 2013; SILVA, 2015), as biomembranas foram removidas, as feridas foram limpas com gaze e solução fisiológica estéreis e novas biomembranas foram aplicadas. A troca das biomembranas e a limpeza das feridas ocorreram até que a ferida estivesse completamente fechada, que segundo nosso estudo piloto ocorreu entre o 22^o e 25^o dia (Figura 12).

Figura 12: As feridas cirúrgicas foram confeccionadas utilizando *punch* de fabricação própria medindo 30 mm de diâmetro no hemitórax direito na região do gradil costal do ovino. Decorridas 24 h abertas, as feridas receberam, da esquerda para direita, cobertura com biomembrana de látex, cobertura com biomembrana de látex com gentamicina e não recebeu cobertura alguma (controle). As feridas foram limpas e as biomembranas foram trocadas a cada 72h.



Fonte: Arquivo pessoal.

O hemitórax direito foi utilizado para avaliação da cicatrização e coleta do *swab* para exame microbiológico, enquanto o hemitórax esquerdo foi utilizado para coleta de tecido para biópsia e avaliação histopatológica.

A analgesia foi realizada utilizando dipirona sódica 500 mg/mL (Pironal, Vetoquinol, São Paulo, Brasil) na dose de 5 mL/animal duas vezes ao dia (BID) durante 3 dias. Não foi utilizado antibiótico e anti-inflamatório para que não houvesse interferência com os tratamentos e com o processo de cicatrização.

3.6 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras para avaliação hematológica e bioquímica dos animais, biópsia da ferida para avaliação histológica do processo de cicatrização e *swab* para avaliação da carga bacteriana e realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma), conforme resumo descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Esquema para coleta das amostras para avaliação hematológica, bioquímica, microbiológica e histopatológica, além de avaliação da cicatrização nos ovinos submetidos à procedimento cirúrgico para indução de feridas de pele medindo 30 mm de diâmetro.

Procedimento	Dia após aplicação do tratamento										
	Basal (0)	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Hemograma	X		X		X		X		X		X
Bioquímico	X		X		X		X		X		X
Carga bacteriana	X		X		X		X		X*		X*
Antibiograma	X				X			X			
Biópsia para histopatológico					X				X		
Avaliação morfométrica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

*Caso a ferida ainda esteja aberta. Se ao final de 30 dias ainda houver feridas abertas, a avaliação persistirá até o completo fechamento.

Para realização do hemograma e obtenção de soro para as análises bioquímicas, o sangue foi colhido por punção jugular e acondicionado, respectivamente, em tubo com K₂EDTA (BD Vacutainer[®], Becton-Dickson, New Jersey, USA) e com ativador de coágulo (BD Vacutainer[®], Becton-Dickson, New Jersey, USA). O soro foi obtido após o tubo permanecer em repouso por 20 min em temperatura ambiente seguido de centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos.

O *swab* para avaliação microbiológica foi colhido de forma padronizada sempre pelo mesmo indivíduo, por meio de 10 passagens por toda a extensão da ferida, sempre rotacionando-o, seguido de acondicionamento em um tubo de vidro com tampa contendo 1 mL de solução fisiológica, ambos estéreis, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação (Figura 13).

Figura 13: Procedimento de coleta dos swabs para análise microbiológica nas feridas do gradil costal direito, padronizado por 10 passagens pela ferida, sempre rotacionando, sendo realizada sempre pelo mesmo indivíduo.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.7 Avaliação da cicatrização

3.7.1 Morfometria

A medida das áreas das feridas foi realizada por meio de um paquímetro digital (DISMA, DISMA Ferramentas, Brasil), conforme método preconizado por Marinho *et al.*, (2013). A partir da mensuração e multiplicação do maior comprimento e da maior largura com paquímetro digital, a área da ferida foi estabelecida.

Paralelamente, foi realizada análise da área da ferida utilizando programa computacional ImageJ (versão 1.47v, 2012). As imagens foram obtidas por câmera fotográfica semiprofissional (Sony® Cyber-Shot DSC-H50, Carl Zeiss® - 31- 465 mm) com resolução de 9.1 megapixels no formato JPEG (*Joint Photographic Experts Group*).

O registro fotográfico ocorreu com iluminação de luz solar para obtenção de melhor qualidade de coloração e a câmera foi posicionada com eixo perpendicular ao leito da ferida com distância de 30 cm da ferida, sempre se utilizando uma régua para controle da distância e outra régua junto à ferida para utilização como calibração pelo programa. Sempre o mesmo operador, sem conhecimento acerca do tratamento utilizado, realizou a demarcação manual da área/perímetro da ferida, sendo considerado como borda o limite do tecido róseo de cicatrização ou da pele íntegra.

A área da ferida foi calculada após calibração com a régua fotografada junto à ferida, sendo a área fornecida em cm². O percentual de contração (%C) das feridas

foi mensurado segundo Coelho, Rezende e Tenório (1999) pela fórmula $\%Co = (Ai - Af / Ai) \times 100$, em que Ai é a área no período inicial (primeiro dia pós-operatório) e Af é a área mensurada no dia pós-operatório correspondente. Os momentos em que foram realizadas as avaliações morfométricas estão descritos na Tabela 2.

3.8 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para realização do hemograma, as contagens de hemácias, leucócitos, plaquetas e determinação de hemoglobina foram realizadas em contador automatizado de células sanguíneas para uso veterinário (ABX Micros ESV 60, Paris, França).

O volume globular foi determinado pelo método do microcapilar de Strumia (11.400 rpm por 5 minutos) e a contagem diferencial de leucócitos juntamente com avaliação morfológica de hemácias, leucócitos e plaquetas, foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com corante hematológico comercial (Instant-Prov, Newprov, Pinhais, PR, Brasil), seguindo-se recomendações de Jain (1986). A determinação de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio plasmático (FP), foram determinadas seguindo as recomendações de Allison (2015), respectivamente por refratometria e precipitação pelo calor a 56°C por 3 minutos.

As determinações bioquímicas foram realizadas em fotolorímetro semiautomatizado (BIO 2000, BioPlus, Barueri, SP, Brasil) utilizando conjunto de reativos comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante.

As determinações bioquímicas foram realizadas em duplicata a 37°C após calibração com calibrador (Calibra H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e verificação com controles comerciais níveis I (Qualitrol 1H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e II (Qualitrol 2H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os teores de colesterol total e triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático-Trinder, glicose pelo método glicose oxidase-Trinder e as atividades de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi determinada por metodologia cinética ultravioleta (UV), albumina por método colorimétrico com verde de bromocresol, cálcio total pelo método colorimétrico cresolftaleína, creatinina por método colorimétrico do picrato alcalino – Jaffé, fosfatase alcalina (FA) pelo

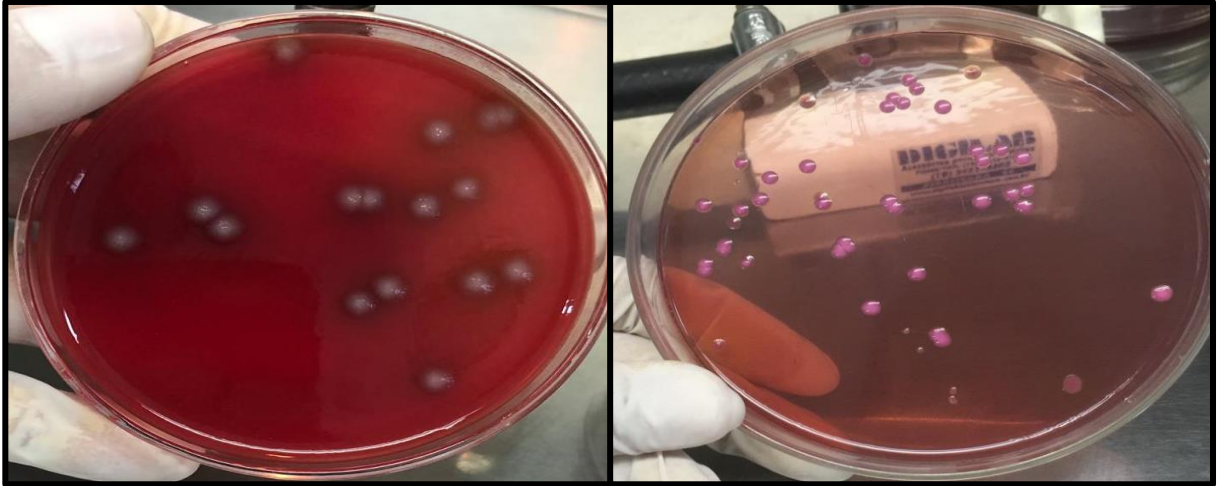
método cinético de Bowers e McComb modificado, fósforo por determinação UV segundo método de Daly e Ertingshausen modificado, gama GT (GGT) pelo método de Szasz modificado, proteínas totais pelo método colorimétrico do biureto e ureia segundo metodologia enzimática UV. O teor de globulinas foi obtido a partir da subtração de albumina das proteínas totais. Os valores de referências utilizados foram os descritos por Kaneko *et al.* (2008).

3.9 Identificação bacteriana

Para avaliação da carga bacteriana das feridas, o *swab* colhido conforme metodologia especificada anteriormente foi vortexado por 60 segundos e a quantidade de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) dessa solução foi quantificada seguindo-se protocolo da NCCLS (2003). Resumidamente, 10 µL da solução inicial e de suas diluições (10^{-1} a 10^{-5}) foram inoculadas na superfície dos ágaros MacConkey e sangue de ovino desfibrinado a 5% (Himedia Laboratories, Índia), utilizando alça de platina calibrada. O material foi distribuído em linha reta de uma extremidade a outra da placa e perpendicularmente foram realizadas estrias com a alça por toda a superfície do ágar de maneira uniforme. O procedimento foi repetido até que a superfície da placa estivesse completamente seca.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (ECB Linea, Olidef CZ) a 37°C por 18 a 24 horas para determinação do número de UFC/mL (Figura 14). Os isolados bacterianos foram inicialmente identificados pela morfologia da colônia e coloração de Gram (Conjunto para coloração de Gram, Labcenter, Campinas, SP, Brasil). Após isolamento bacteriano, as bactérias Gram-positivas foram submetidas às reações de catalase e coagulase, enquanto as Gram-negativas foram identificadas utilizando reagente comercial (Enterobactérias, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) segundo as instruções do fabricante.

Figura 14: Após preparação do inóculo bacteriano a partir do swab das feridas, exatos 10 µL foram semeados em placas de Petri com Ágar Sangue e Ágar MacConkey para isolamento e determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de inóculo.

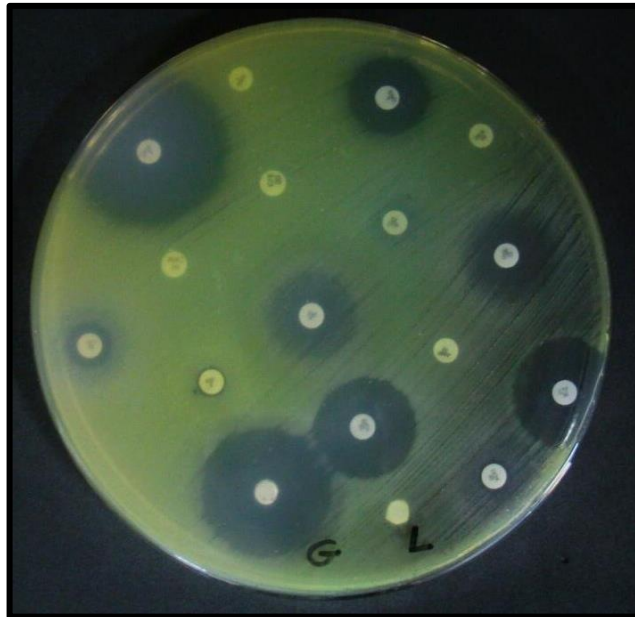


Fonte: Arquivo pessoal.

3.10 Teste de sensibilidade antimicrobiana

O teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado das colônias isoladas das feridas seguindo a metodologia de disco-difusão em ágar Müller-Hinton (Himedia Laboratories, Índia), segundo método de Bauer *et al.* (1966). A densidade do inóculo foi padronizada segundo solução padrão de MacFarland 0,5 ($1,8 \times 10^8$ UFC/mL) (Nefelobac, Probac do Brasil, São Paulo, Brasil) e foram testados os seguintes antibióticos: amoxicilina e ácido clavulânico 20/10 µg, ampicilina 10 µg, azitromicina 15 µg, cefalexina 30 µg, ceftiofur 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, doxiciclina 30 µg, enrofloxacin 5 µg, gentamicina 10 µg, oxacilina 1 µg, penicilina G 10 µg, sulfazotrim 25 µg, rifampicina 5 µg e tetraciclina 30 µg (Laborclin Produtos para Laboratório, Pinhais, PR, Brasil). Adicionalmente, também foi avaliado o halo inibitório dos discos de 5 mm da biomembrana de látex e biomembrana de látex impregnada com gentamicina, com objetivo de verificar se as biomembranas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias presentes nas feridas de pele de ovinos (Figura 15).

Figura 15: Antibiograma após isolamento e identificação bacteriana.



Fonte: Arquivo pessoal.

A interpretação do diâmetro dos halos de inibição dos antibióticos foi realizada conforme critérios previamente estabelecidos (CLSI, 2013). Os halos da biomembrana de látex e biomembrana de látex incorporada com gentamicina foram interpretados de acordo com o halo de inibição da gentamicina, sendo classificado como resistente (R) <12 mm, intermediário (I) de 13-14 mm, sensível (S) >15 mm.

3.11 Avaliação Histopatológica

Para avaliação histológica do processo cicatricial, foram realizadas biópsias das feridas abrangendo o leito e a borda da ferida, alternando o local da punção entre os limites dorsal e ventral da ferida nos momentos de coleta.

Foi realizada antissepsia, bloqueio anestésico local e com auxílio de um *punch* de 5 mm a pele foi incisionada, sendo o tampão retirado com auxílio de pinça e tesoura estéreis.

Os fragmentos de pele foram conservados em formol a 10%, sendo posteriormente fixados, clivados, diafanizados e incluídos em parafina. Cortes foram realizados no em micrótomo com 5 μ m e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibroblastos.

As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico Opton com a câmera Opticam microscopia ligada ao notebook com o software OPTHD para captura das imagens. Foram escolhidos 10 campos aleatórios de cada lâmina com a objetiva de 40x.

A análise histológica compreendeu uma descrição dos infiltrados inflamatórios, realizada às cegas, que classificou a inflamação como crônica (predomínio de leucócitos mononucleares), aguda (predomínio de leucócitos polimorfonucleares), crônico-aguda (sem predomínio, presença de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares); e quanto à quantidade, classificando-os como 1 (infiltrado inflamatório que ocupa até 25% do campo em aumento 40x), 2 (entre 25% e 50%) e 3 (acima de 50%) (GARCIA *et al.*, 2010; ZIMMERMANN *et al.*, 2018).

A angiogênese foi classificada em 0 (ausente), 1 (menor do que no tecido normal), 2 (igual ao tecido normal), 3 (maior que no tecido normal) (GARCIA *et al.*, 2010).

Os fibroblastos foram avaliados como descrito em Prabhu *et al.* (2012) 0 (ausente), 1 (presente apenas perivascular), 2 (presente em menos de 50% do tecido) e 3 (presente em mais de 50% do tecido).

3.12 Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto a normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e as diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste de ANOVA com medidas repetidas e pós-teste de Tukey ou Friedman com pós-teste de Dunn. As correlações foram realizadas pelos coeficientes de Pearson ou Spearman.

Todas as análises estatísticas foram efetuadas em programa computacional (GraphPad Prism, v.6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com), sendo considerados significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia de força atômica – AFM

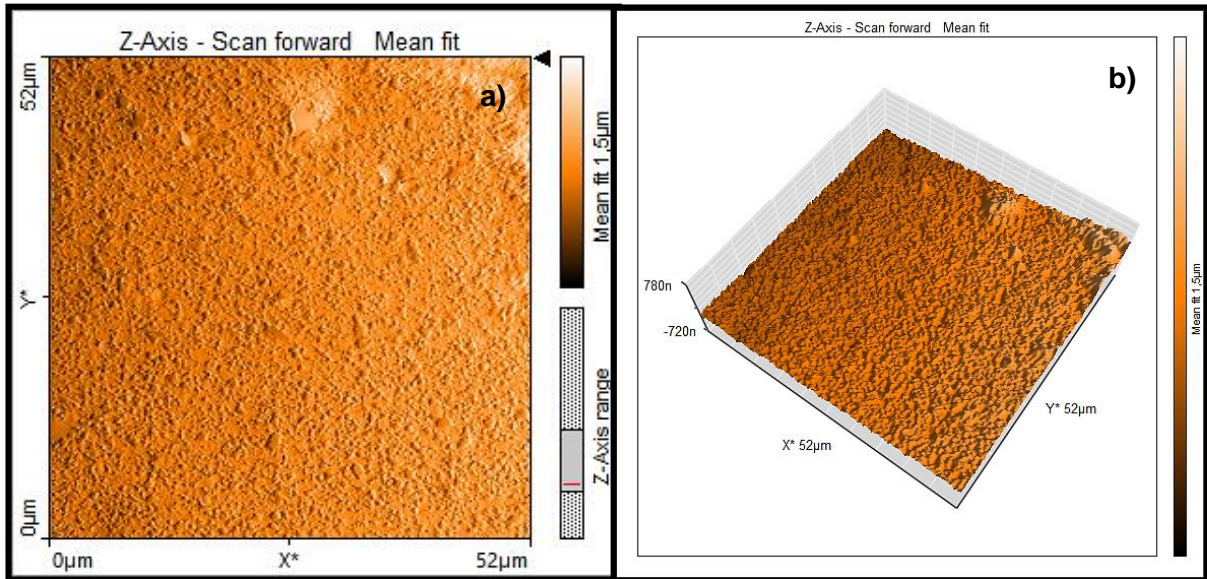
A técnica de AFM é frequentemente utilizada nos ensaios de polímeros, uma vez que sua topografia microscópica apresenta imperfeições que podem prejudicar algumas de suas propriedades como a molhabilidade e adesão superficial. Ademais, esta técnica não requer tratamento prévio da amostra, pode ser aplicada a qualquer material, pois as leituras advêm de interações atrativas e repulsivas entre a ponta e a superfície, desta forma facilitando a elucidação da morfologia, microestruturas e cristalinidade da superfície dos diferentes polímeros (SOUSA; SCURACCHIO, 2014).

As imagens obtidas pela microscopia de força atômica são formadas de acordo com o modo de operação, o que envolve a distância entre a ponteira e a amostra durante a varredura, bem como a forma de movimentá-la sobre a superfície (PINTO; RAMOS; DA FONSECA FILHO, 2015).

Os modos de operação são divididos em três: modo contato onde ocorre um leve contato físico da ponteira com a amostra, no modo de não-contato a ponteira fica à nanômetros de distância da superfície da amostra, e no modo intermitente a ponteira mantém um contato periódico com a amostra (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; PINTO; RAMOS; DA FONSECA FILHO, 2015).

A caracterização topográfica da biomembrana de látex puro produziu imagens em 2D e 3D com dimensões de 52 μm x 52 μm , as quais foram ideais para observar sua superfície (Figura 16). Na Figura 16a é possível observar uma superfície uniforme com presença de grânulos, sugerindo esta ocorrência à coalescência das partículas de borracha que acontece durante o preparo das biomembranas. A imagem em 3D (Figura 16b), revela a superfície com formações de depressões (poros) e elevações que podem facilitar a troca de fluidos entre os meios.

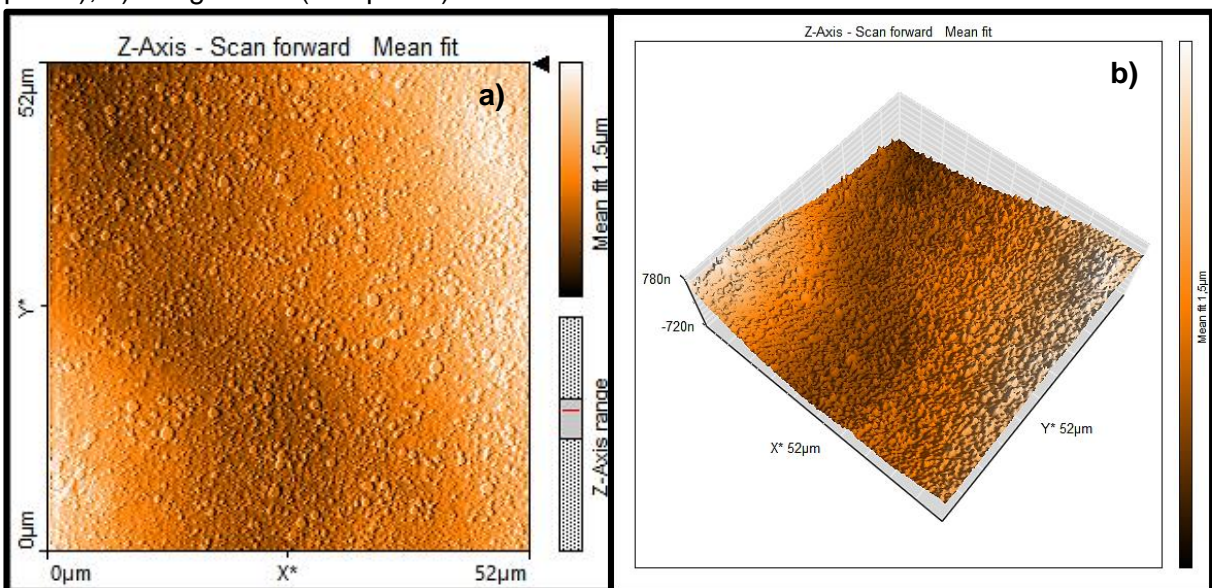
Figura 16: Imagens de AFM biomembrana de látex puro: a) Imagem 2D (256 pixels); b) Imagem 3D (512 pixels).



Fonte: Arquivo pessoal.

Nas imagens produzidas pelas biomembranas de látex incorporadas com gentamicina (Figura 17), com dimensões de $52\ \mu\text{m} \times 52\ \mu\text{m}$, as quais foram ideais para observar a dispersão do fármaco de forma homogênea não alterando a forma da estrutura da superfície da biomembrana, o que sugere que a interação entre látex-fármaco não modificou a estrutura da gentamicina.

Figura 17: Imagens de AFM biomembrana de látex + gentamicina: a) Imagem 2D (256 pixels); b) Imagem 3D (512 pixels).



Fonte: Arquivo pessoal.

Wei *et al.* (2020), observaram que a rugosidade em filmes de látex diminui com o passar do tempo, onde comparou os filmes de látex natural (FLN), filmes de látex desproteinizado (FLND) e sem fosfolipídios (PF-FLND). Os autores observaram que as proteínas e os fosfolipídios presentes no látex natural retardam o início imediato de coalescência de suas partículas, o que demonstra uma maior rugosidade da superfície em comparação aos filmes de FLND e PF-FLND.

Comparando as imagens 3D das biomembranas (Figura 16b e 17b) observa-se picos mais elevados na superfície das biomembranas com gentamicina sugerindo que o fármaco presente nestas elevações, por apresentar características hidrofílicas, sejam liberados mais rapidamente e posteriormente as partículas mais internas seriam liberadas de forma sustentadas.

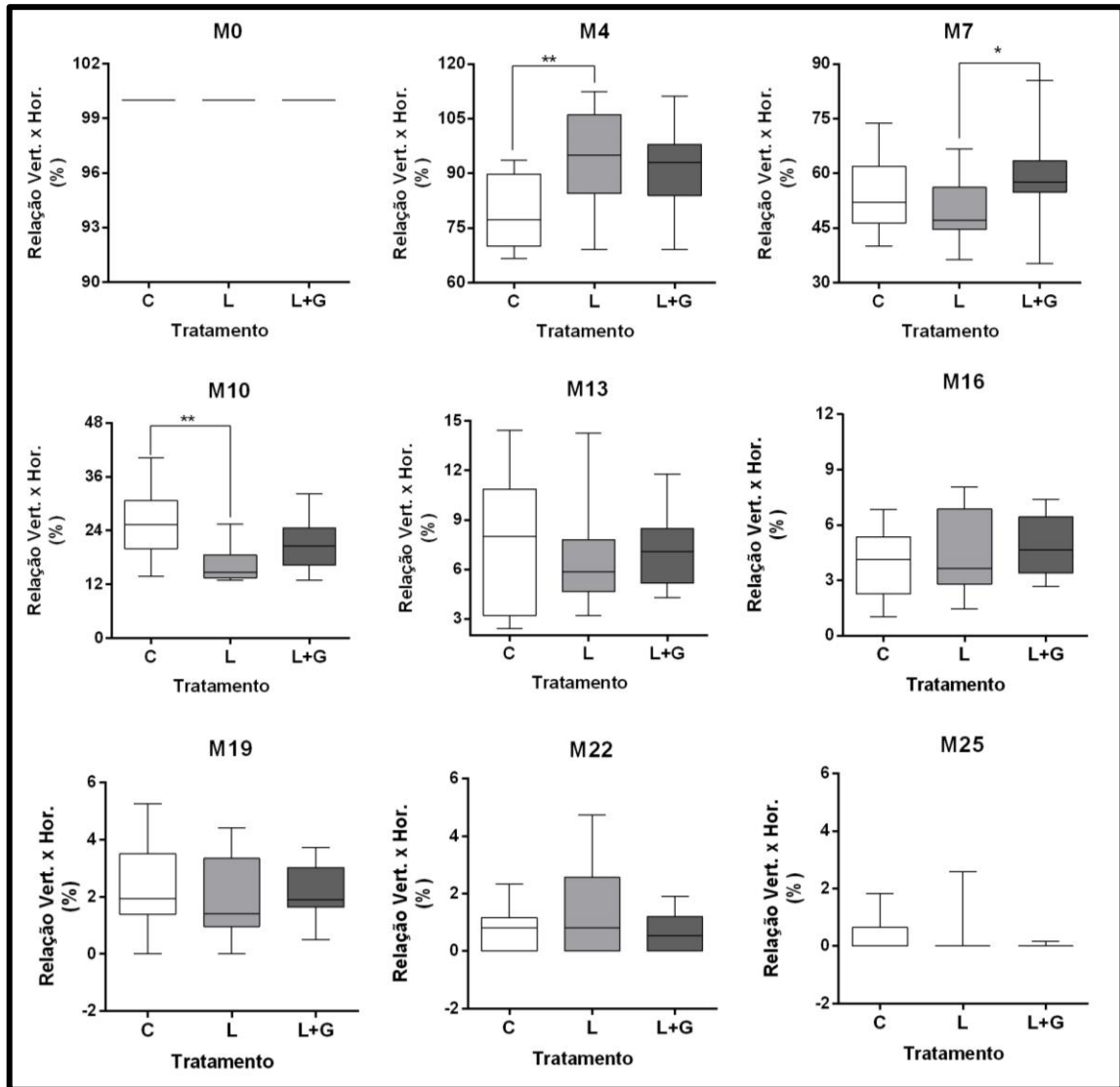
4.2 Avaliação da cicatrização

A avaliação morfométrica foi o parâmetro utilizado para verificar o percentual de contração das feridas e os momentos em que foram realizadas as medidas receberam denominação de momento basal (M0), quarto dia (M4), sétimo dia (M7), décimo dia (M10), décimo terceiro dia (M13), décimo sexto dia (M16), décimo nono dia (M19), vigésimo segundo dia (M22) e vigésimo quinto dia (M25).

Nas Figuras 18 e 19 é possível comparar a evolução da cicatrização analisada nos métodos utilizados para mensuração das feridas, pela paquimetria e software digital (ImageJ), respectivamente. Observa-se, em ambas as Figuras, a diminuição do tamanho das feridas em 40% até o M7 e o fechamento total das feridas tratadas com látex sem e com gentamicina no M25.

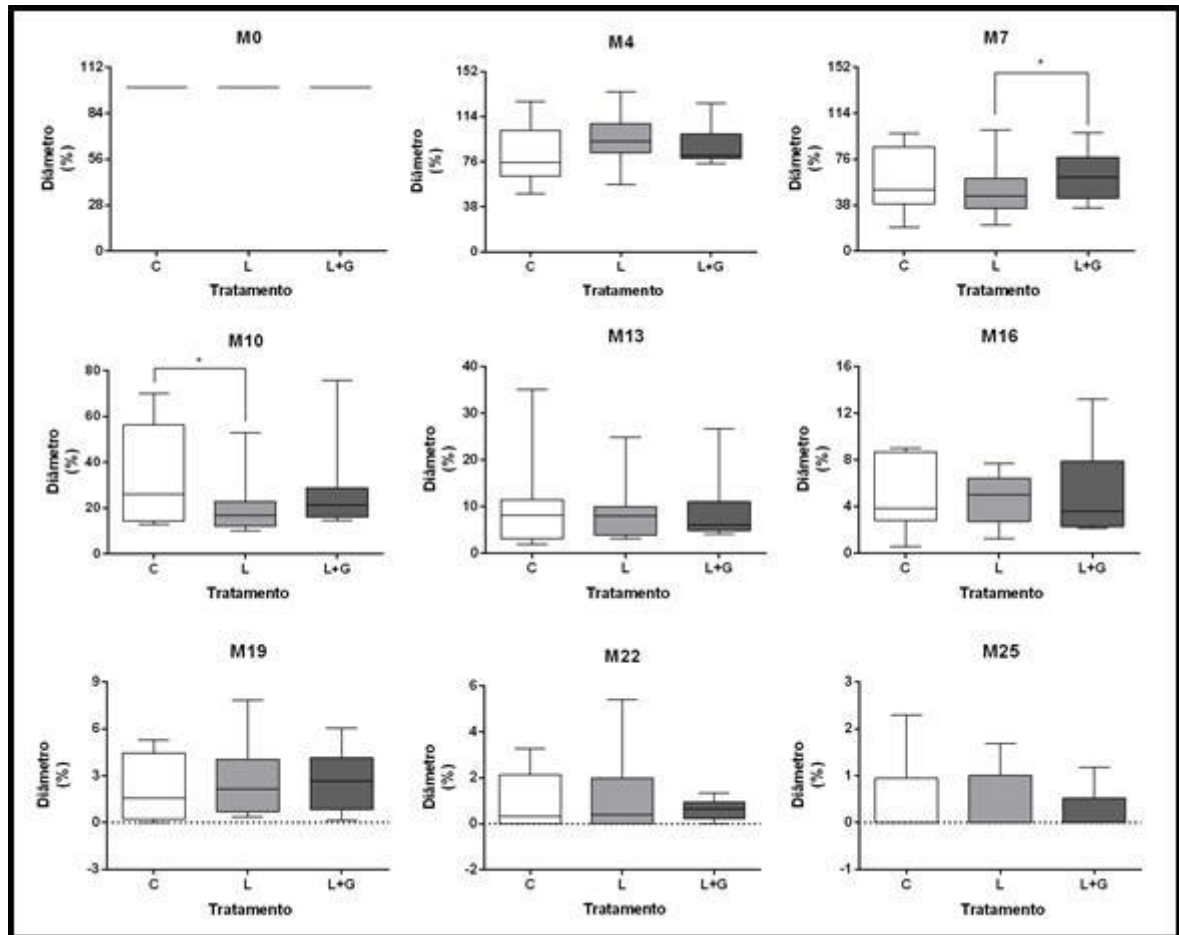
O tratamento da ferida com a biomembrana de látex promoveu aumento significativo do tamanho da ferida no M4 em relação ao controle em ambos os métodos de mensuração, já no M10 levou à redução significativa em relação ao controle, não havendo diferença entre os tratamentos nos demais momentos analisados. O tamanho da ferida tratada com a biomembrana de látex com gentamicina foi maior que o da ferida tratada com látex em ambos os métodos de mensuração no M7.

Figura 18: Relação dos diâmetros horizontal (H) e vertical (V) determinados por paquímetro digital em feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. As barras indicam valores mínimos e máximos e o quadro representa o primeiro e terceiro quartis e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).



Fonte: Arquivo pessoal.

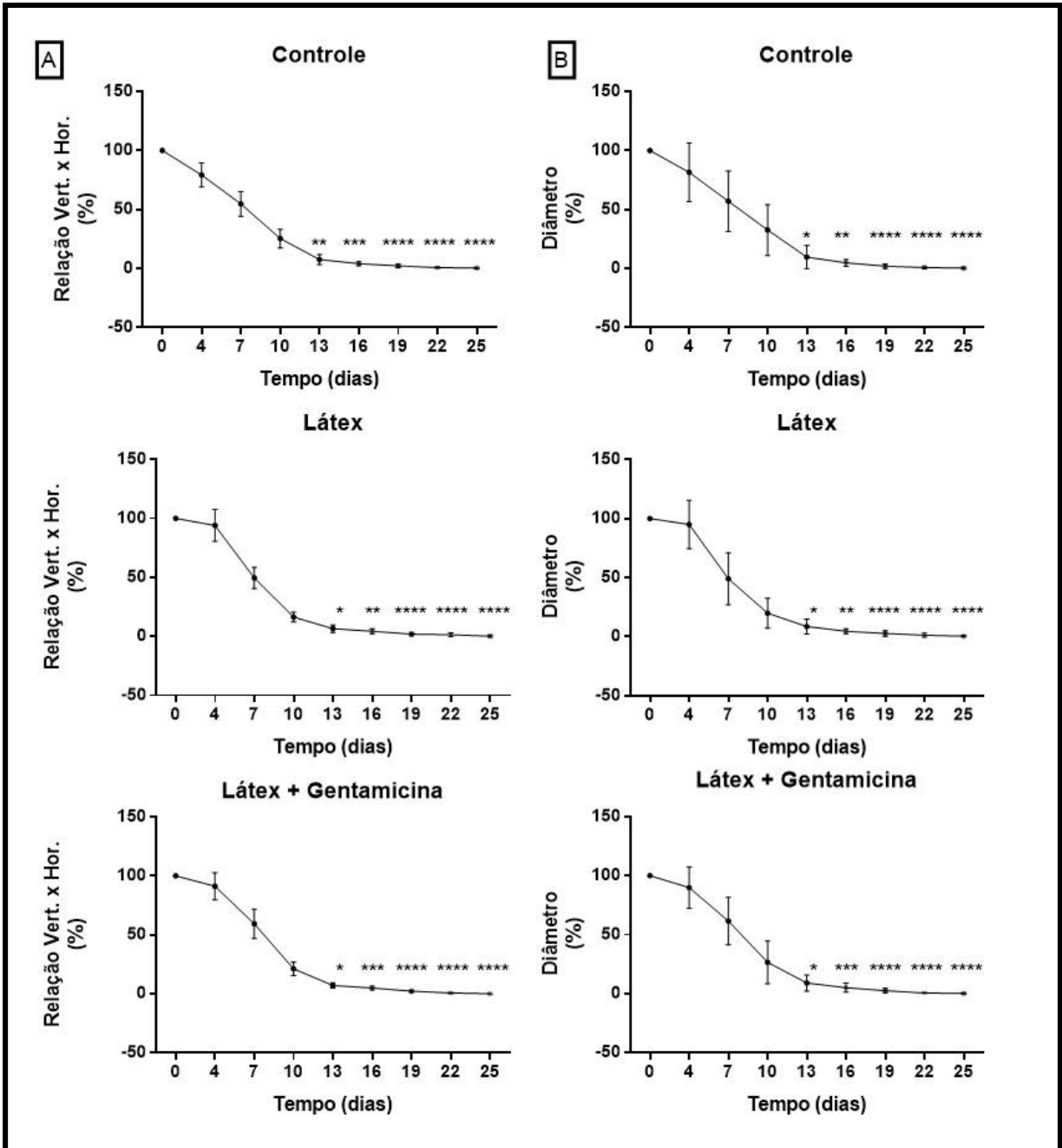
Figura 19: Áreas determinadas por software digital (ImageJ) de feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. As barras indicam valores mínimos e máximos e o quadro representa o primeiro e terceiro quartis e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001).



Fonte: Arquivo pessoal.

Ao determinar o tamanho das feridas ao longo do tempo em cada tratamento, observou-se redução estatisticamente significativa das feridas a partir do M13 em todos os tratamentos (Figura 20).

Figura 20: Tamanho das feridas determinado por paquímetro digital (**A**) ou por software digital (ImageJ, **B**) de feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 dias. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao M0. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).



Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação ao tamanho da ferida avaliada por duas diferentes metodologias, as biomembranas de látex não promoveram aumento significativo da velocidade de cicatrização. Entretanto, embora a biomembrana de látex no início da avaliação tenha

promovido menor retração da ferida, no meio do processo de cicatrização foi verificada maior retração da ferida.

Brandão *et al.* (2016), também verificaram menor retração da ferida no sétimo dia de avaliação em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos tratadas com gel de látex uma vez ao dia. Já no décimo dia essa redução foi inversa e a ferida tratada com o gel de látex se apresentou menor do que a ferida controle. Ainda nesse mesmo estudo, a ferida tratada com o gel de látex também apresentou uma redução no sétimo dia em relação à ferida tratada com o gel de látex incorporado com gentamicina.

Penhavel *et al.* (2016), relatam que aos 14 dias pós-cirúrgico de feridas cutâneas em ratos, não houve diferença entre os diâmetros das feridas tratadas com látex e controle.

Avaliando-se a cicatrização sob o efeito do tempo, observou-se que em todos os tratamentos as feridas apresentaram redução significativa a partir do décimo terceiro dia.

As biomembranas de látex e látex com gentamicina não induziram uma cicatrização mais rápida quando comparadas à ferida controle em ovinos, assim como descrito por Frade *et al.* (2012) em feridas de humanos diabéticos que não houve significância estatística entre o tamanho da ferida nos grupos látex quando comparados com controle.

Masud *et al.* (2020), demonstraram o potencial de cicatrização comparando biomembranas compostas por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco e as mesmas impregnadas com sulfato de gentamicina. Esses autores utilizaram ratos em seu estudo, nos quais foram induzidas feridas, e conseqüentemente foram tratadas com as biomembranas. Observaram que a partir do quinto dia as feridas tratadas com as biomembranas apresentaram contração da ferida e formação de tecido de granulação, enquanto na ferida controle houve uma pequena formação de tecido de granulação e pouca inflamação. Após 10 dias foi observado o fechamento completo das feridas tratadas com o composto impregnado com gentamicina, apresentaram menor formação de crosta do que a ferida do tratamento controle, demonstrando que as propriedades antibacterianas da gentamicina e as nanopartículas de óxido de zinco, e o estímulo das propriedades cicatrizantes da quitosana melhoraram o desempenho de cicatrização das feridas.

As crostas formadas, geralmente em lesões cutâneas, advém dos exsudatos formados pelos leucócitos e eritrócitos que migram para o sítio inflamatório desempenham a função de barreira física frente aos microrganismos, porém podem proporcionar cicatrizes inestéticas quando formada desordenadamente (KRUPP *et al.*, 2019).

Yu *et al.* (2020), para avaliar a cicatrização em feridas infectadas com *S. aureus*, realizadas experimentalmente em ratos, compararam nanocarreadores com nanopartículas de prata associado ou não à gentamicina. Os autores observaram as feridas tratadas com o nanocarreador de prata com gentamicina não apresentaram reação inflamatória, ulceração ou edema demonstrando uma melhor capacidade na prevenção de infecção e aceleração da cicatrização, diferente dos outros grupos. Os tamanhos das feridas tratadas com o nanocarreador de prata com gentamicina diminuíram consideravelmente e apresentaram no 14º dia de tratamento uma completa cicatrização. Enquanto o grupo controle e o grupo tratado apenas com a nanopartícula de prata foi observado formação de crostas.

No presente trabalho, as biomembranas de látex e látex com gentamicina não demonstraram, estatisticamente, uma cicatrização mais rápida, contudo após a completa regeneração, as feridas tratadas com a biomembrana de gentamicina apresentaram características estéticas, sem marcas no tecido lesionado, indicando um grande potencial em aplicações na regeneração tecidual de feridas agudas e crônicas.

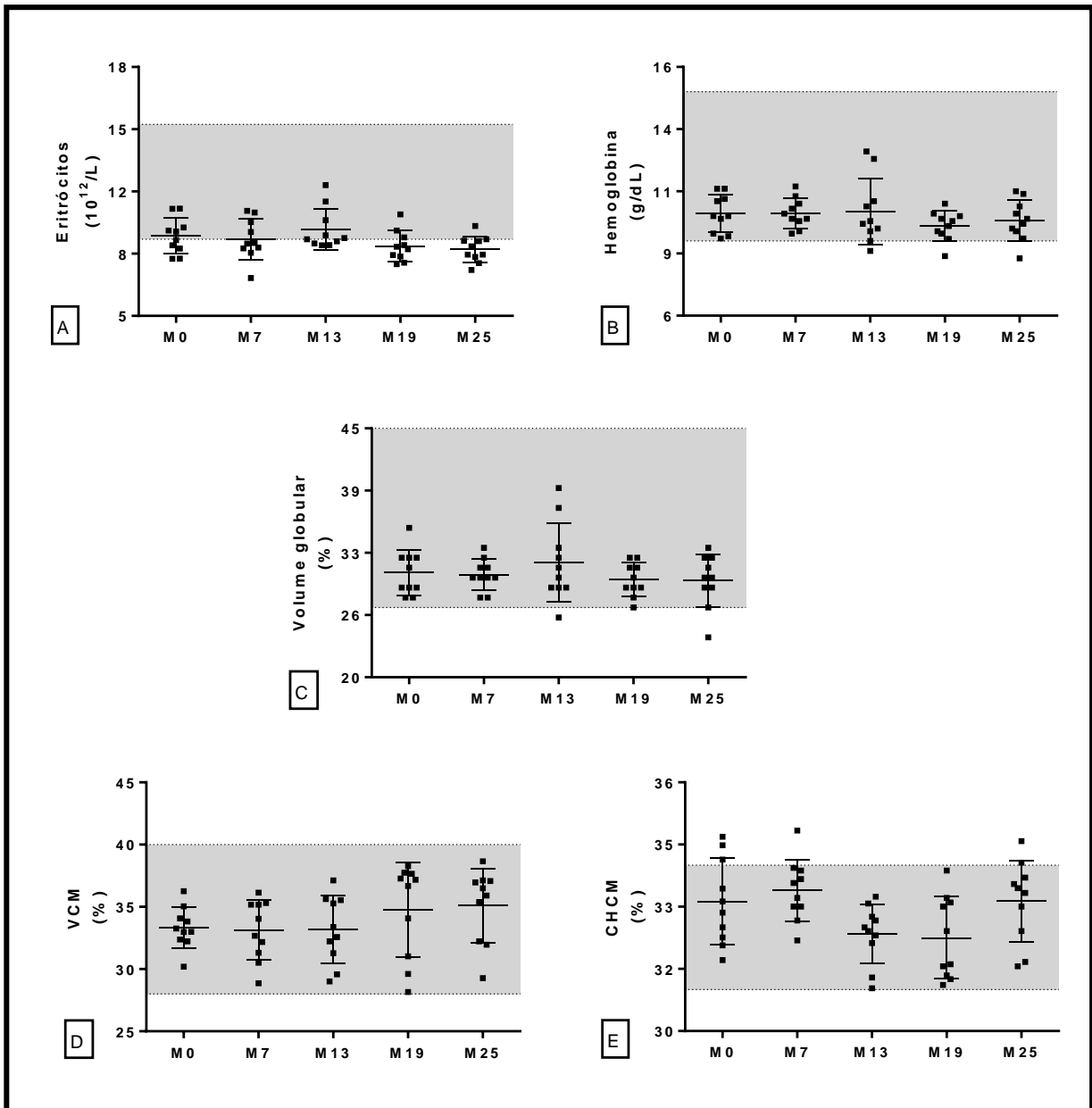
Resultados apresentados por Wali *et al.* (2019), corroboram parcialmente com os nossos resultados. Ao testar diferentes matrizes em ratos Wistar por 21 dias, observaram que a taxa de fechamento das feridas tratadas com argila “Halloysite” e com argila incorporada com gentamicina foram de 95% e 100%, respectivamente, no 14º dia. Na ferida tratada com a matriz incorporada com a gentamicina apresentou formação de uma nova pele sem nenhuma cicatriz.

Outro estudo observou o desenvolvimento de eritema pruriginoso e vesículas em um dos cinco pacientes que testaram por 2 semanas pomada de gentamicina. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) esse evento é previsto como evento adverso, desta forma foi considerado um evento relativamente leve neste estudo (PASMUIJ, A.M., 2018).

4.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

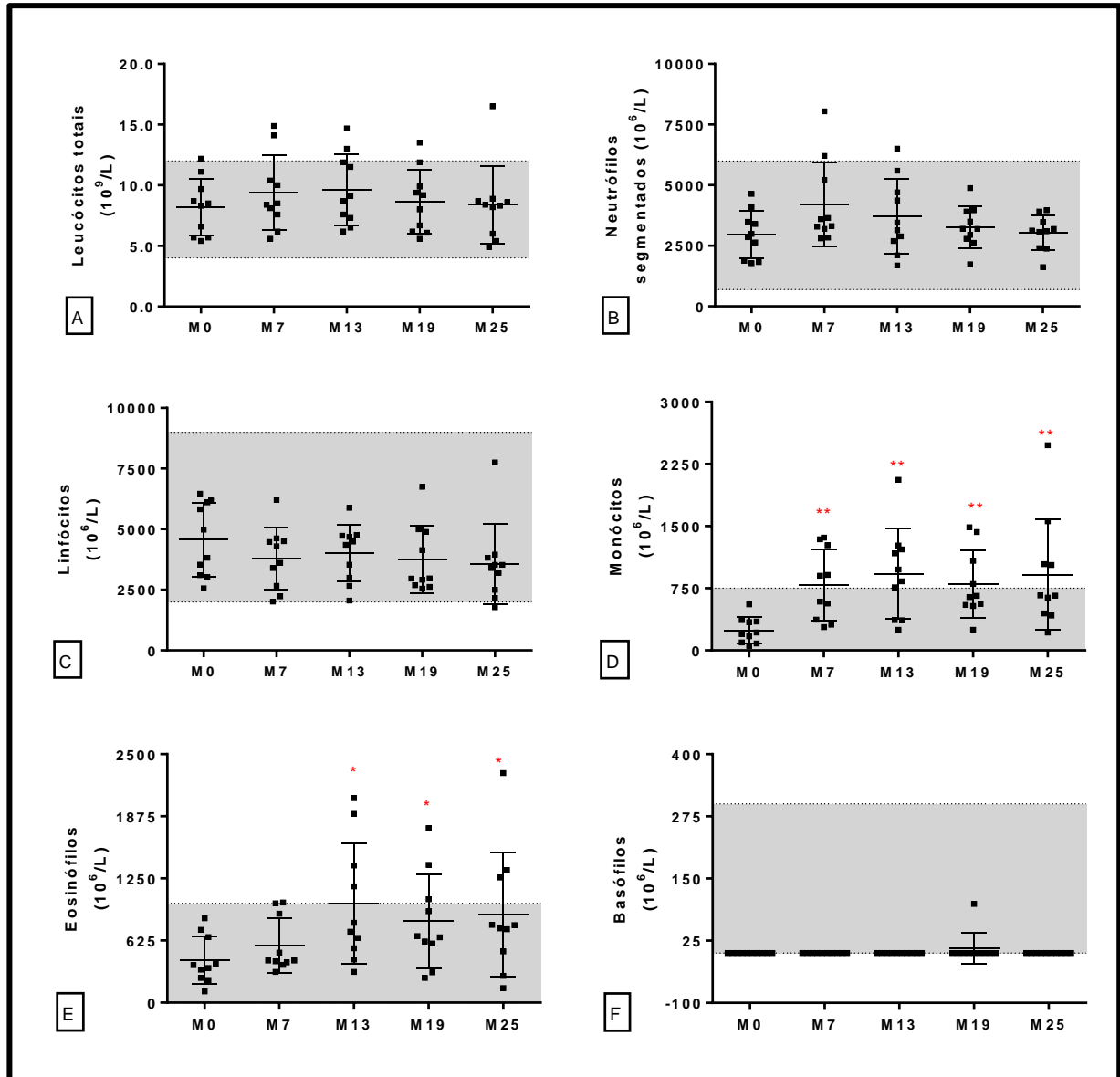
Em relação ao eritrograma, não houve diferença significativa nos valores de eritrócitos, hemoglobina, VG, VCM e CHCM (Figura 21) entre os momentos avaliados. Já em relação ao leucograma, foi observado aumento da quantidade de monócitos a partir de M7 e eosinófilos a partir de M13, que persistiram até o último momento avaliado e não houve diferença significativa nos demais parâmetros (Figura 22). Também não houve diferença quanto aos valores e plaquetas e observou-se aumento significativo de FP em M7 e PPT em M13 (Figura 23).

Figura 21: Hemácias (**A**), hemoglobina (**B**), volume globular (VG, **C**) volume corpuscular médio (VCM, **D**) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM, **E**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo Wood e Quiroz-Rocha (2010).



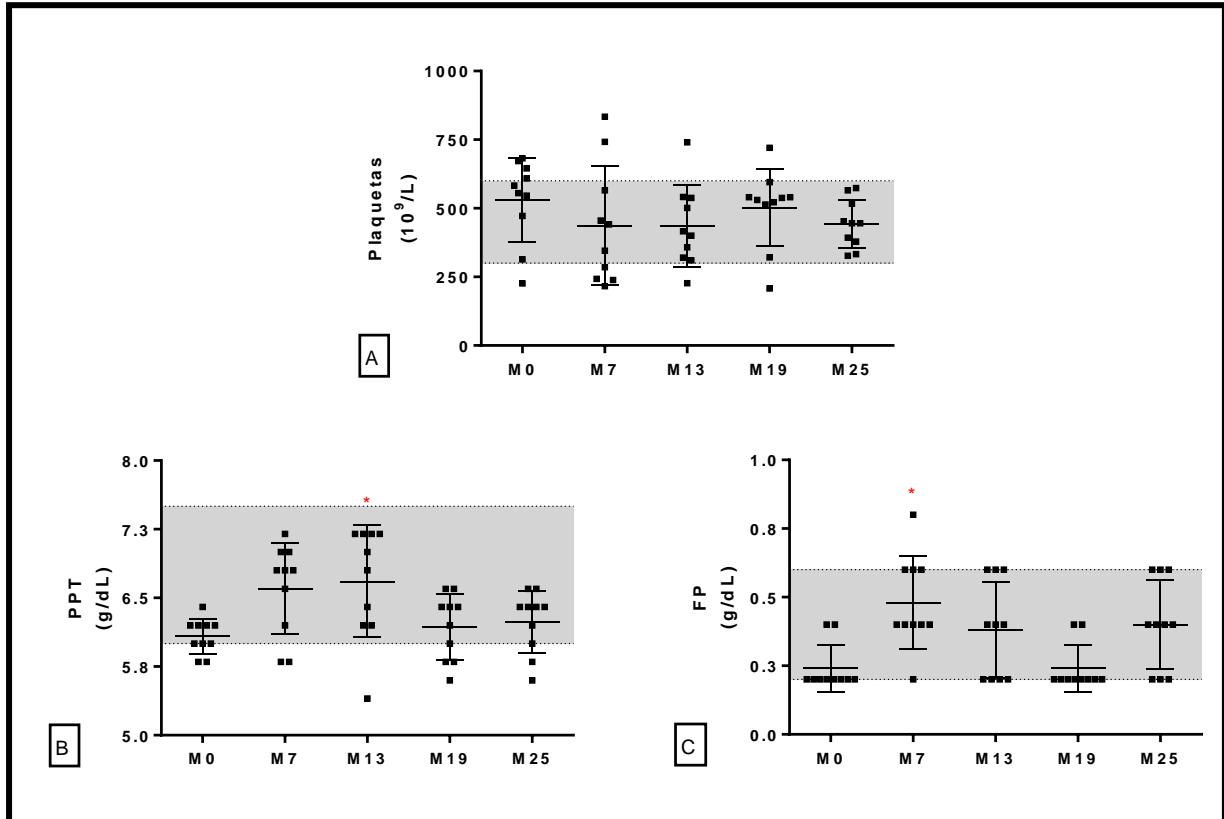
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22: Leucócitos totais (A), neutrófilos segmentados (B), linfócitos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e basófilos (F) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo Wood e Quiroz-Rocha (2010).



Fonte: Arquivo pessoal.

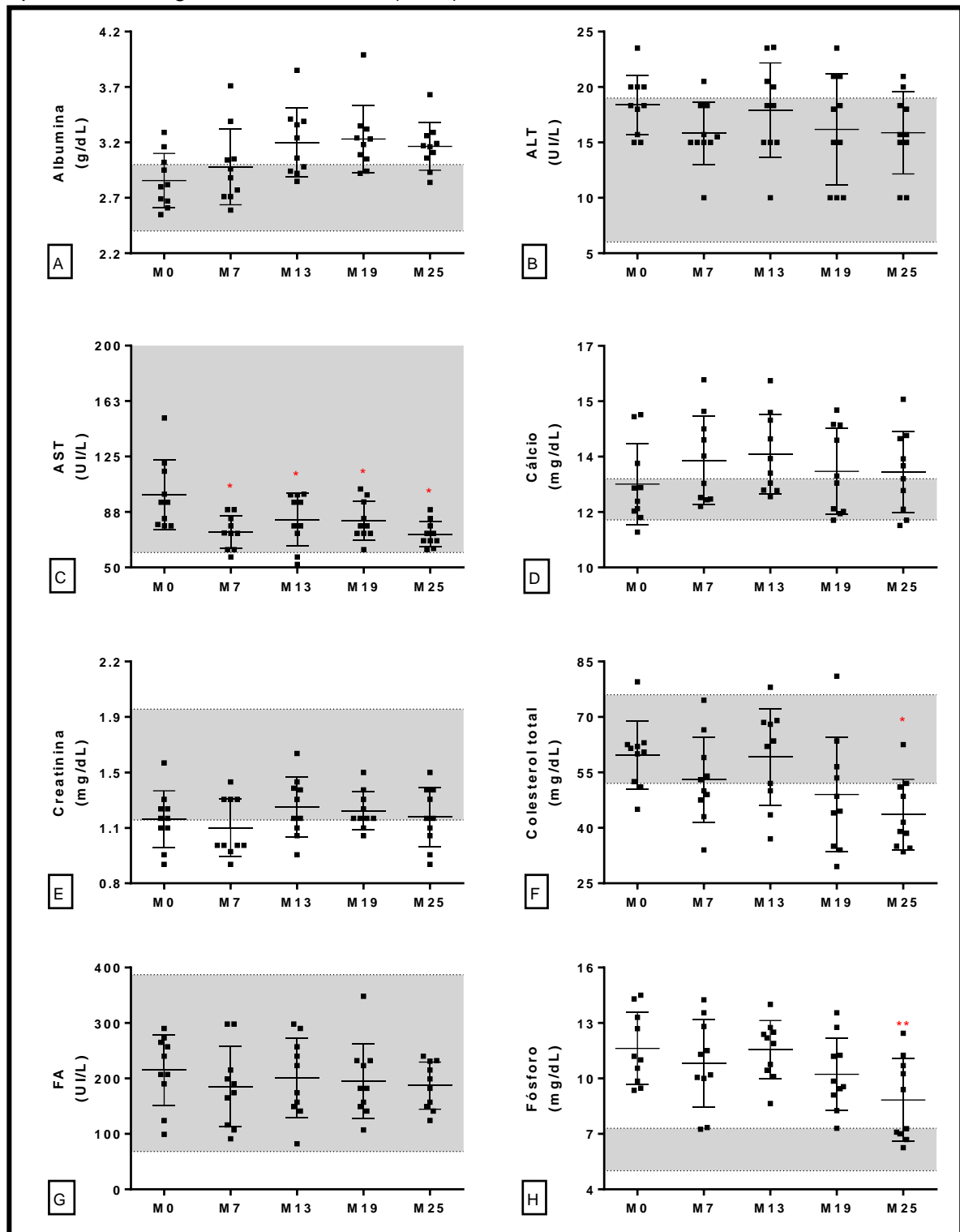
Figura 23: Plaquetas (**A**), proteína plasmática total (PPT, **B**) e fibrinogênio plasmático (FP, **C**) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo Wood e Quiroz-Rocha (2010).

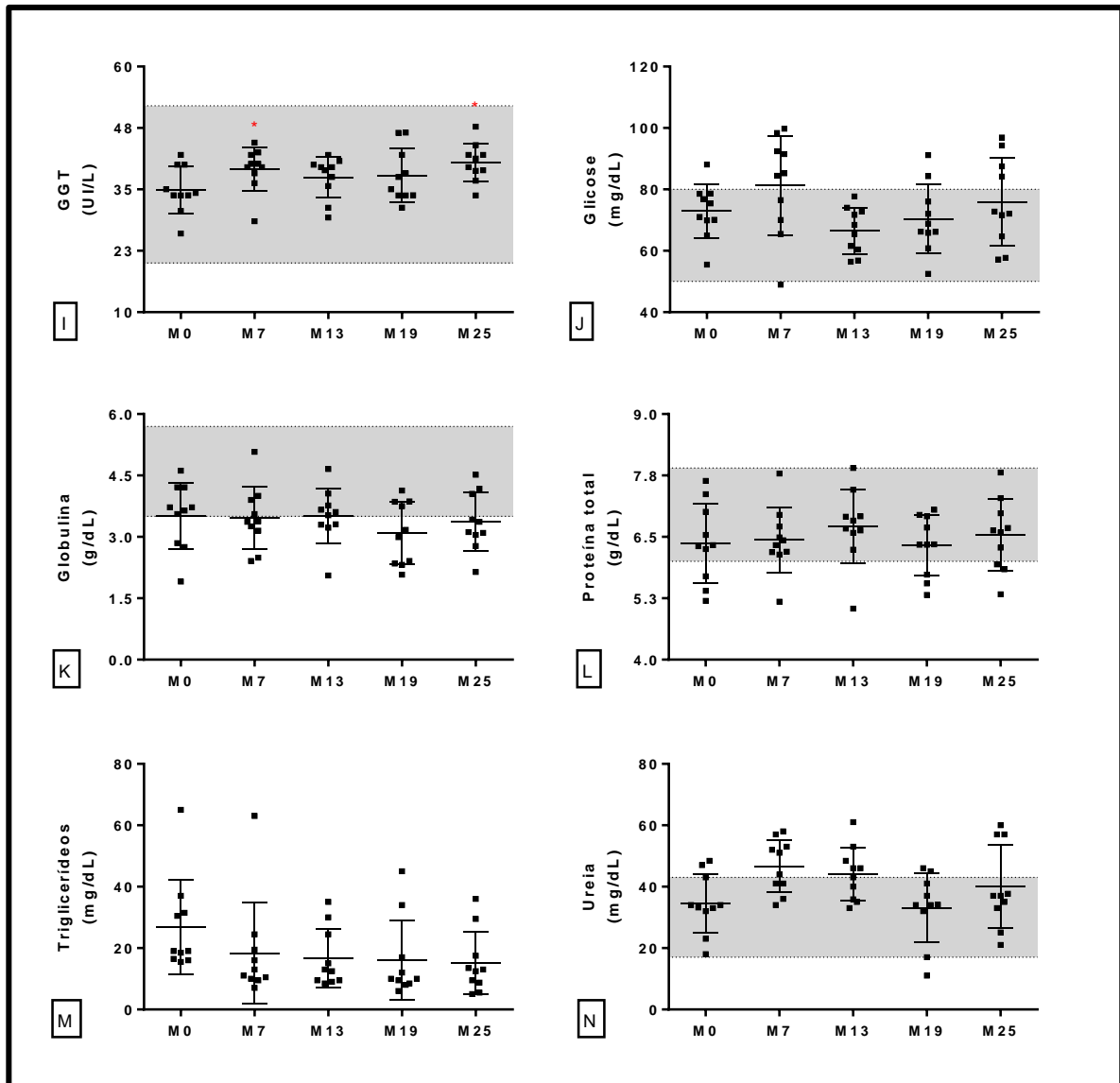


Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, não houve diferença significativa entre os momentos para os parâmetros albumina, ALT, cálcio, creatinina, FA, glicose, globulina, proteína total, triglicerídeos e ureia. Já para os parâmetros AST, houve redução significativa de M7 a M25, colesterol total e fósforo houve redução no M28. GGT apresentou aumento significativo no M7 e M25 (Figura 24).

Figura 24: Albumina (A), alanina aminotransferase (ALT, B), aspartato aminotransferase (AST, C), cálcio (D), creatinina (E), colesterol total (F), fósforo (G), gama glutamiltransferase (GGT, H), glicose (I), globulina (K), proteína total (L), triglicerídeos (M) e ureia (N) em ovinos saudáveis (n=10) antes (M0) e 7 (M7), 13 (M13), 19 (M19) e 25 (M25) dias após realização de ferida cirúrgica e tratamento com biomembrana de látex com e sem incorporação de gentamicina. As barras indicam valores médios e desvios-padrão e a diferença estatisticamente significativa em relação a M0 é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$). A linha tracejada indica os valores de referência para a espécie ovina segundo Kaneko *et al.* (2008).





Fonte: Arquivo pessoal.

Após a indução das feridas, os animais não apresentaram alterações hematológicas relacionadas ao eritrograma e plaquetograma considerando os valores de referência para a espécie ovina segundo Wood e Quiroz-Rocha (2010). Ademais, houve aumento de fibrinogênio plasmático (FP) no início do tratamento e proteína plasmática total (PPT) na segunda semana de tratamento, mas estes parâmetros retornaram aos valores de referência nos momentos posteriores (WEISS; WARDROP, 2010).

O FP é uma proteína inflamatória de fase aguda, que constitui aproximadamente 5,0% do total de proteínas plasmáticas, e está ligado à hemostasia, participando do processo de coagulação até o reparo tecidual (JAIN, 1993; KANEKO, *et al.*, 2008; WEISS; WARDROP, 2010).

O aumento do FP, denominado hiperfibrinogenemia, ocorre pelo aumento da síntese de FP pelos hepatócitos, resultante do estímulo de interleucinas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral, sendo liberados após eventos inflamatórios e/ou traumáticos (JAIN, 1993). Por isso é utilizado como indicador de inflamação aguda (PFEFFER *et al.*, 1993). Sua dosagem em ruminantes é muito importante para diagnóstico de inflamação, uma vez que esses animais não apresentam leucograma inflamatório com alta frequência (COLE; ROUSSEL; WHITNEY, 1997), assim como no presente estudo.

Schalm, Jain e Carroll (1975) também afirmam que a concentração plasmática de FP atinge um pico principalmente entre o quinto e sétimo dia, assim como visto no presente estudo. Costa *et al.* (2010), também observaram o aumento de FP após 36 horas em seu estudo com ovelhas Santa Inês submetidas à indução de mastite experimental por *S. aureus*, e se manteve elevado até cessar os sinais clínicos de infecção/inflamação.

Em relação ao leucograma, houve aumento de monócitos a partir do sétimo dia da indução das feridas que se manteve até o final das avaliações em aproximadamente 25% dos animais. No início do processo de cicatrização da ferida, ocorre infiltração de neutrófilos, e em seguida os macrófagos tendem a aumentar e tornam-se ativados. Conseqüentemente, o número de monócitos sanguíneos aumenta para que migrem para o espaço extravascular (MARTINEZ *et al.*, 2006).

Esse aumento acontece pela migração dos monócitos do sangue periférico infiltrando-se na região da ferida, sendo resultante das respostas aos agentes quimiotáticos para monócitos, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e a liberação de fatores provenientes de plaquetas, fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, que também contribuem para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo e cicatrização (SINGER; CLARK, 1999).

Além disso, outra alteração apresentada no leucograma, foi o aumento de eosinófilos a partir do décimo terceiro dia da indução da ferida, que também se manteve elevado até o último momento avaliado em cerca de 20% dos animais.

Os eosinófilos fazem parte de uma das fases do processo cicatricial de feridas, que está associada à produção da proteína básica principal (MBP), a qual tem ação sobre a degradação do tecido (MENCIA-HUERTA, 1993).

Associando-se o aumento de eosinófilos e monócitos no leucograma, tais alterações podem ser justificadas pela fase cicatricial da ferida, em que na fase de desbridamento esses tipos celulares são predominantes no processo cicatricial.

O FP associado ao leucograma, são considerados os recursos laboratoriais mais sensíveis frente à avaliação da inflamação na medicina veterinária (EK, 1972; MCSHERRY; HORNEY; DEGROOT, 1970).

Outro parâmetro relacionado à inflamação é a proteína plasmática total (PPT). Segundo Ramírez (2001) o aumento de PPT está relacionado à resposta imune do organismo animal em quadros infecciosos e inflamatórios. A PPT esteve elevada apenas no décimo terceiro dia de tratamento e se restabeleceu nos momentos posteriores. Logo o aumento de FP e PPT associado aos achados de leucograma durante o presente estudo estão associados à inflamação presente no processo cicatricial das feridas.

Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, assim como a gentamicina, podem causar efeitos tóxicos, mesmo quando aplicados topicamente em grandes feridas, queimaduras ou úlceras cutâneas por longos períodos (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2012).

No presente estudo, os marcadores renais, como creatinina e ureia, não tiveram alteração e por meio do acompanhamento clínico, os animais não apresentaram nenhuma alteração relacionada à toxicidade. Portanto, a utilização de gentamicina incorporada à biomembrana de látex natural não induziu nefrotoxicidade, sendo considerada segura para ovinos em tratamento transdermal no tempo estudado.

As formulações compostas por nanopartículas de fármacos demonstram inúmeras vantagens sobre as apresentações em dosagens convencionais pois são capazes de liberar o fármaco em local específico, e podem auxiliar na liberação sustentada, o que reduz a frequência de administração. Ao estudar duas nanoformulações incorporadas com gentamicina, uma para administração oral e outra um adesivo transdérmico que foram utilizadas em coelhos, não houve diferença significativa entre os parâmetros hematológicos e os bioquímicos (ALT, AST e creatinina) indicando que as nanoformulações não apresentavam toxicidade (AKHTAR *et al.*, 2020).

A gentamicina pode induzir o fígado ao aumento da atividade sérica das enzimas hepáticas, além de ocorrer infiltração leucocitária, congestão e necrose

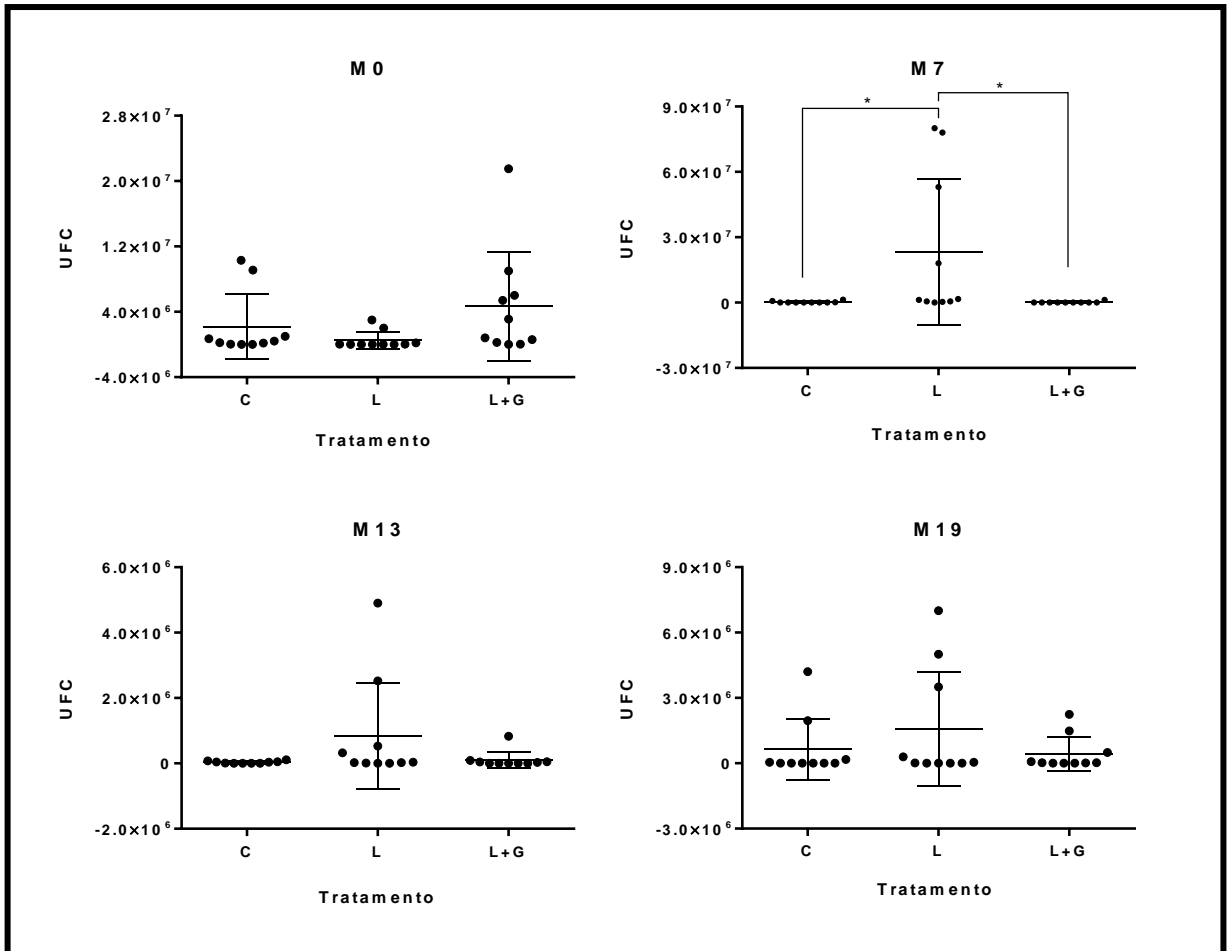
hepáticas (GARDNER *et al.*, 2016; NAJAFI *et al.*, 2017). A partir da mensuração da atividade sérica dos marcadores hepatocelulares, houve aumento estatístico de GGT no sétimo e vigésimo quinto dias de tratamento, entretanto, todos os animais permaneceram dentro do intervalo de referência para a espécie ovina (JERRY KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Desse modo, o possível efeito do tratamento das feridas com biomembrana de látex impregnada com gentamicina ou mesmo o efeito de indução das feridas sobre os marcadores hepáticos de colestase precisam ser melhor determinados.

4.4 Carga bacteriana das feridas

Ao avaliar a carga bacteriana de forma geral, a ferida coberta com biomembrana de látex apresentou maior carga bacteriana ($222,13 \times 10^3$ UFC) que os demais tratamentos em M7, em que o controle apresentou $222,19 \times 10^3$ UFC e a ferida tratada com a biomembrana incorporada com gentamicina apresentou $136,32 \times 10^3$ UFC. Não foi observada diferença entre os tratamentos nos demais momentos (Figura 25).

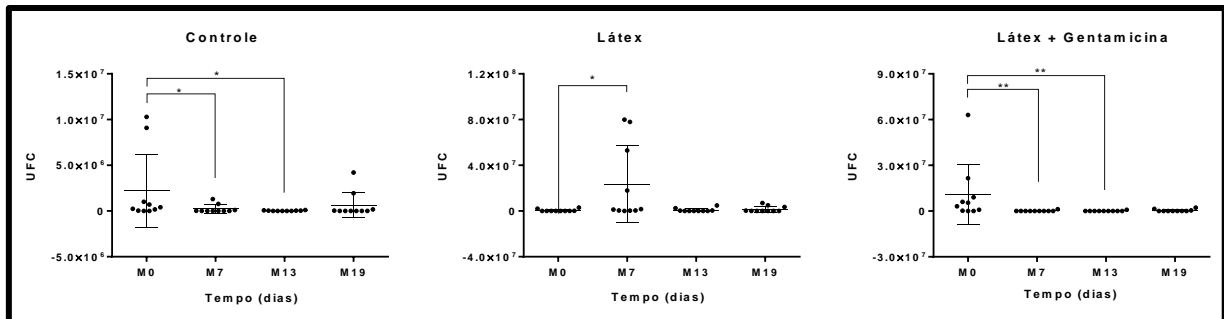
Figura 25: Carga bacteriana determinada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 7, 13 e 19 dias de tratamento. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).



Fonte: Arquivo pessoal.

Ao se avaliar o efeito do tempo em cada tratamento, as feridas do grupo controle e tratadas com biomembrana de látex com gentamicina apresentaram redução significativa da carga bacteriana em M7 e M13 em relação ao momento basal. O grupo controle apresentou 2197 x 10³ UFC (M0), 222,19 x 10³ UFC (M7) e 32,83 x 10³ UFC (M13), enquanto o grupo tratado com a biomembrana com gentamicina apresentou 10910 x 10³ UFC (M0), 136,32 x 10³ UFC (M7) e 104,75 x 10³ UFC (M13). Já a ferida tratada com biomembrana de látex apresentou aumento da carga bacteriana em M7, foi de 531,98 x 10³ UFC para 23310 x 10³ UFC, retornando a valores similares aos basais nos demais momentos (Figura 26).

Figura 26: Carga bacteriana determinada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 7, 13 e 19 dias de tratamento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Ao se tentar correlacionar o tamanho da ferida com a carga bacteriana, não houve correlação significativa entre o diâmetro da ferida avaliado pelos dois métodos (paquímetro e ImageJ®) com a carga bacteriana da ferida no tratamento controle, látex e látex incorporado com gentamicina nos diversos momentos. O tratamento da ferida com biomembrana de látex foi o único que promoveu aumento da carga bacteriana.

Ao se avaliar o efeito do tempo, nota-se que as feridas do grupo controle e tratadas com biomembrana látex com gentamicina apresentaram menor carga bacteriana no sétimo e décimo terceiro dias, enquanto a ferida tratada com biomembrana de látex apresentou aumento da carga bacteriana ao sétimo dia de tratamento, coincidindo com o momento de maior diâmetro da ferida em relação aos demais tratamentos.

Esse grande número de bactérias na ferida com a biomembrana de látex pode ter ocorrido devido à presença de um coágulo com aparência semelhante à fibrina que foi notado durante todo o processo de cicatrização nesse tratamento, que poderia facilitar a formação de biofilme.

Segundo Rhoads *et al.* (2008), o biofilme atrasa a cicatrização principalmente pelo seu efeito inflamatório crônico e por desencadear uma incapacidade funcional dos fibroblastos, queratinócitos e das células endoteliais que iniciam a angiogênese. Também é reconhecido como um fator na patogênese de feridas crônicas e cirúrgicas com infecções locais associadas a materiais estranhos ou implantes e dispositivos médicos (BRUYETTE, 2020).

No presente estudo, a presença do biofilme pode estar associada à presença da biomembrana junto ao alto número de *Staphylococcus coagulase* negativa, visto

que esse microrganismo é capaz de formar biofilme sobre superfícies de dispositivos médicos (PEREIRA; SOUZA, 2018). Durante o procedimento de limpeza das feridas e troca da biomembrana, o coágulo de fibrina foi retirado a cada três dias.

Brandão *et al.* (2016) também descrevem a presença de fibrina hemorrágica nas feridas tratadas com gel de látex, que foi removida diariamente para facilitar a formação de tecido de granulação. Tais achados poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o porquê de no início do processo de cicatrização, a ferida tratada com biomembrana de látex apresentou menor retração. Os autores ainda relatam que após a retirada da crosta fibrinosa da ferida tratada com látex, verificou-se a presença de bordas irregulares.

Diferentemente, no presente estudo foram observadas bordas uniformes das feridas que receberam tratamento com biomembrana de látex. Brandão *et al.* (2016) também relatam que no vigésimo primeiro dia da ferida tratada com látex foi observada região central de coloração vermelha intensa, o que descreveram como aparente exposição dermal, enquanto a ferida controle apresentou superfície rósea.

No presente estudo, tal coloração no centro da ferida também foi observada no tratamento com biomembrana de látex a partir do décimo terceiro dia, permanecendo até o vigésimo segundo dia. Mesmo não apresentando um processo de cicatrização mais rápido que o da ferida controle, as feridas tratadas com as biomembranas apresentaram uma cicatrização mais uniforme, com menos tecido de granulação, podendo ser recomendada para animais de exposição de grande valor que buscam a estética dos animais.

Em humanos, Frade *et al.* (2006) descreveram que a biomembrana de látex propiciou o rápido desbridamento de feridas em úlceras de pressão, produzindo cicatrizes planas e estéticas.

Esperava-se que quanto maior a carga bacteriana, maior o tempo de cicatrização, pois a presença de bactérias afetaria todo o processo de cicatrização, comprometendo a síntese de colágeno e promovendo a liberação de enzimas proteolíticas (AHRENDT; TANTRY; BARBUL, 1996). Entretanto, não houve correlação significativa entre o tamanho das feridas e a carga bacteriana em nosso estudo. Observamos apenas que o momento com maior carga bacteriana coincidiu com o de maior tamanho da ferida tratada com biomembrana de látex, que ocorreu aos 7 dias de tratamento. É possível que a ausência de correlação estatisticamente significativa seja explicada pelas grandes variações da carga bacteriana e pela

presença de bactérias já existentes na pele, o que não necessariamente indicaria infecção.

4.5 Identificação bacteriana e teste de sensibilidade antimicrobiana

Foram isoladas 121 colônias bacterianas nas feridas cirúrgicas dos três tratamentos. As bactérias mais frequentemente isoladas foram *Staphylococcus* coagulase negativa, bacilos Gram-positivos não identificados, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *S. aureus*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) e *E. coli* (Tabela 3).

Tabela 3: Grupos de bactérias isoladas das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 24 h após a realização (M0) e aos 13 e 19 dias de tratamento.

Bactérias	M0			M13			M19			TOTAL
	C	L	L+G	C	L	L+G	C	L	L+G	
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	13	14	12	8	3	2	6	2	1	61
Bacilo Gram Positivo	6	2	4	5	1	7	5	5	4	39
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	2	2	0	3	1	0	2	1	11
<i>Streptococcus</i> spp.	0	0	2	1	1	0	0	0	0	4
<i>S. aureus</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Serratia</i> spp.	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>P. mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	21	19	20	15	10	10	11	9	6	121

As colônias isoladas nos diferentes momentos (Tabela 3), foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana, as quais foram classificadas em sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) e a porcentagem média do perfil de resistência e sensibilidade aos antibióticos testados está descrito na Tabela 4. Estes resultados podem indicar uma possível resistência do microrganismo frente aos antibióticos testados durante um período.

Tabela 4: Perfil do teste de sensibilidade antimicrobiana (média) de bactérias isoladas das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle) ou cobertas com biomembrana de látex (Látex) e biomembrana de látex com gentamicina (Látex + Gentamicina) 24 h após a realização (M0) e aos 13 e 19 dias de tratamento.

CONTROLE									
	M0 (%) - (n = 21)			M13 (%) - (n = 15)			M19 (%) - (n = 11)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Amoxicilina+ Clavulanato	66,89	0	33,11	93,75	0	6,25	100	0	0
Ampicilina	66,33	2,78	30,89	62,50	0	37,50	58,33	0	41,67
Azitromicina	90,63	3,13	6,25	59,57	7,14	33,29	100	0	0
Cefalexina	69,67	0	30,33	93,75	0	6,25	100	0	0
Ceftiofur	63,56	11,11	25,33	89,63	4,13	6,25	95,83	4,17	0
Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cloranfenicol	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Doxiciclina	97,78	2,22	0	100	0	0	100	0	0
Enrofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxacilina	49,78	0	50,22	56,25	4,13	39,63	66,67	8,33	25,00
Penicilina	53,00	11,11	35,89	68,75	20,88	10,38	66,67	20,83	12,50
Rifampicina	69,67	13,33	17,00	66,75	4,13	29,13	91,67	4,17	4,17
Sulfazotrim	92,22	0	7,78	93,75	6,25	0	91,67	0	8,33
Tetraciclina	95,00	5,00	0	100	0	0	87,50	0	12,50
Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Biomembrana Látex	2,22	0	97,78	8,38	6,25	85,38	16,67	0	83,33
Biomembrana Látex-Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0

LÁTEX									
	M0 (%) - (n = 19)			M13 (%) - (n = 10)			M19 (%) - (n = 09)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Amoxicilina+ Clavulanato	68,56	0	31,44	47,17	8,33	44,50	62,50	0	37,50
Ampicilina	63,00	0	37,00	41,67	0	58,33	45,83	0	54,17
Azitromicina	93,75	6,25	0	94,50	0	5,50	83,33	16,67	0
Cefalexina	68,56	0	31,44	41,67	0	58,33	66,67	0	33,33
Ceftiofur	90,78	0	9,22	77,83	5,50	16,67	95,83	0	4,17
Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cloranfenicol	77,78	11,11	11,11	72,17	0	27,83	62,50	4,17	33,33
Doxiciclina	88,89	11,11	0	55,50	33,33	11,17	66,67	16,67	16,67
Enrofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxacilina	53,78	0	46,22	25,00	0	75,00	33,33	0	66,67
Penicilina	63,00	0	37,00	41,67	0	58,33	45,83	0	54,17
Rifampicina	63,00	0	37,00	47,17	0	52,83	62,50	4,17	33,33
Sulfazotrim	90,78	0	9,22	61,17	0	38,83	45,83	0	54,17
Tetraciclina	90,78	0	9,22	94,50	5,50	0	83,33	0	16,67

Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Biomembrana Látex	5,56	0	94,44	5,50	0	94,50	8,33	0	91,67
Biomembrana Látex-Gentamicina	88,89	11,11	0	100	0	0	100	0	0
LÁTEX + GENTAMICINA									
	M0 (%) - (n = 20)			M13 (%) - (n = 10)			M19 (%) - (n = 06)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Amoxicilina+ Clavulanato	63,00	0	37,00	41,67	0	58,33	87,50	0	12,50
Ampicilina	55,56	0	44,44	41,67	0	58,33	37,50	0	62,50
Azitromicina	87,50	0	12,50	73,40	20,00	6,60	87,50	12,50	0
Cefalexina	63,00	0	37,00	50,00	0	50,00	87,50	0	12,50
Ceftiofur	68,56	0	31,44	66,67	16,67	16,67	75,00	12,50	12,50
Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cloranfenicol	77,78	22,22	0	83,33	16,67	0	87,50	0	12,50
Doxiciclina	87,00	11,11	1,89	66,67	16,67	16,67	87,50	0	12,50
Enrofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxacilina	57,44	0	42,56	36,17	0	63,83	37,50	25,00	37,50
Penicilina	55,56	1,89	42,56	41,67	0	58,33	37,50	37,50	25,00
Rifampicina	63,00	3,67	33,33	44,50	16,67	38,83	87,50	0	12,50
Sulfazotrim	94,44	0	5,56	83,33	0	16,67	87,50	0	12,50
Tetraciclina	98,11	0	1,89	100	0	0	87,50	0	12,50
Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Biomembrana Látex	5,56	1,89	92,56	16,67	0	83,33	0	0	100
Biomembrana Látex-Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0

As bactérias mais frequentemente isoladas nas feridas cirúrgicas dos três tratamentos em ovinos foram *Staphylococcus coagulase negativa* (50,41%), bacilos Gram-positivos não identificados (32,23%), *Pseudomonas* spp. (9,09%), *Streptococcus* spp. (3,31%), *Serratia* spp. (1,65 %), *S. aureus* (1,65 %), *P. mirabilis* (0,83%) e *E. coli* (0,83%). Santos *et al.* (2016) ao realizarem uma revisão sistemática que avaliou 56 artigos entre 1960-2013, observaram que as principais bactérias identificadas em feridas cirúrgicas eram *S. aureus* (39,3%), *E. coli* (30,4%), *P. aeruginosa* (19,6%), *Staphylococcus epidermidis* (17,8%), *Klebsiella* spp. (12,5%) e *Enterobacter* spp. (10,7%).

Estudos realizados por Saha *et al.* (2019) no qual isolaram e caracterizaram bactérias isoladas em lesão de pele de ovinos, caprinos e bovinos em diferentes sistemas de criação (intensivo e semi-intensivo), observaram a presença *S. aureus*

em 50% das lesões de pele em ovinos e 15% de *P. aeruginosa*, dados similares aos resultados apresentados neste estudo. Relataram ainda que os animais criados em sistemas semi-intensivos foram mais afetados que os do sistema intensivo. O *S. aureus* também foi o microrganismo mais prevalente em feridas infectadas de pacientes humanos segundo Janssen *et al.* (2018).

Já Mohammed *et al.* (2020) relatam a *E. coli* como principal patógeno isolado em feridas humanas infectadas, seguida de *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Streptococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae*. Já feridas caninas e felinas infectadas, as bactérias mais frequentes foram *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *Streptococcus* spp. (ISHII; FREITAS; ARIAS, 2011).

Haalboom *et al.* (2018), observaram em 180 pacientes (63,9% do sexo masculino), com feridas de pé diabéticos e úlceras traumáticas que a presença de bactérias com maior frequência foram *S. aureus*, *P. aeruginosa* e espécies de estreptococos beta-hemolíticos. Já Tedeschi *et al.* (2017), observaram a prevalência de *S. aureus*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* ao analisarem culturas de esfregaço superficial de úlcera de pressão em 116 pacientes.

Bactérias Gram-negativas foram mais frequentes nas infecções de feridas cirúrgicas de cães e gatos (ARIAS *et al.*, 2008) e humanos (SANTOS *et al.*, 2016), enquanto no presente estudo bactérias Gram-positivas prevaleceram em ovinos. Isso poderia ser explicado pelo fato de os *Staphylococcus* coagulase negativa serem comumente encontrados na pele e mucosas, compondo a flora normal do tecido (NEVES *et al.*, 2007) em ovinos.

Rizk *et al.* (2019), observaram a prevalência do microrganismo *S. aureus* como principal causador de abscesso de ovelhas e cabras, além disso evidenciaram que 90% eram sensíveis à ciprofloxacino, 93,3% à gentamicina e 60% à rifampicina.

Esse grande número de bactérias Gram-positivas pode explicar a alta sensibilidade aos antibióticos, visto que há estudos que mostram maior ocorrência de resistência entre as bactérias Gram-negativas (ARIAS *et al.*, 2008; ISHII; FREITAS; ARIAS, 2011; JANSSEN *et al.*, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2020).

No presente estudo, não houve resistência bacteriana à gentamicina ou à biomembrana de látex com gentamicina, com 100% das bactérias sensíveis à gentamicina e 88% sensíveis à biomembrana de látex associada à gentamicina. Apenas uma colônia apresentou resultado intermediário no teste de sensibilidade antimicrobiana na presença de biomembrana de látex com gentamicina, sendo

identificada como *Pseudomonas* spp. Deste modo, a utilização da biomembrana com antibiótico pela via transdermal não induziu resistência bacteriana no período avaliado, uma preocupação comum na atualidade.

Quanto ao potencial antimicrobiano do látex isoladamente, foi observado que algumas bactérias apresentaram halos de inibição em volta da biomembrana de látex. Tais bactérias foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (9), Bacilos Gram-positivos não identificados (3) e *Streptococcus* spp. (1). Devido à técnica utilizada para identificação, foi possível somente identificar o gênero das bactérias, não se sabendo ao certo quais as espécies sensíveis ao látex. Mais estudos são necessários para avaliar o potencial antimicrobiano do látex, principalmente tendo-se em vista que a sensibilidade ou resistência à biomembrana de látex no teste de sensibilidade antimicrobiana foi avaliada de acordo com o halo de inibição da gentamicina, pois ainda não existe padronização para esse composto.

Estudos realizados por Boot *et al.* (2021), demonstraram que a aplicação local de um hidrogel de ácido hialurônico incorporado com gentamicina e vancomicina foi mais efetivo ao tratamento tradicional (via oral e intravenosa) frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina*. O experimento foi realizado com ovinos e norteados pelas infecções desenvolvidas por dispositivos ortopédicos implantáveis ocasionado por falhas no tratamento.

A atividade antibacteriana foi observada por Masud *et al.* (2020) em biomembranas composta por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco e nas mesmas biomembranas, mas impregnadas com sulfato de gentamicina. Foram realizados testes por difusão em disco frente aos microrganismos *E. coli* e *Samonella enterica* e ambas as biomembranas apresentaram halo de inibição, contudo os curativos impregnados com gentamicina apresentaram halos de inibição maior que o do disco padrão, sugerindo o aumento na atividade pelo sinergismo do fármaco com as nanopartículas de óxido de zinco.

Yu *et al.* (2020), demonstraram que nanocarreadores com nanopartículas de prata associado à gentamicina, ambas com atividade antibacteriana, apresentaram um efeito sinérgico diminuindo consideravelmente a carga bacteriana em feridas induzidas em ratos e infectadas por *S. aureus* de forma proposital, em comparação à grupos tratados apenas com o nanocarreador com prata e grupos sem tratamento.

Os resultados dos testes *in vitro* apresentados por Wali *et al.* (2019), demonstram formação de halo de inibição de 1,8 e 1,9 cm para *S. aureus* e 2,1 e 2,2

cm para *E. coli* das matrizes compostas por argila “Halloysite” e matrizes compostas por argila e incorporadas com gentamicina, o que indica característica antibacteriana significativa de ambas as matrizes, assim como demonstrado neste estudo pela biomembrana de látex incorporada com gentamicina.

Em teste de sensibilidade antimicrobiana, Saha *et al.* (2019) verificaram que 80% dos *S. aureus* isolados foram sensíveis à eritromicina, 70% à gentamicina, 60% à ciprofloxacina, 50% à tetraciclina, e 85,72% das *P. aeruginosa* isoladas foram sensíveis à ciprofloxacina, 71,43% à gentamicina e 14,29% à tetraciclina.

Biomembranas produzidas com zeína e com associação de gentamicina, demonstraram atividade antimicrobiana frente à microrganismos Gram positivos (*S. aureus*) e Gram negativos (*E. coli*). A biomembrana com gentamicina apresentou maior atividade que as biomembranas apenas com zeína, contudo ambas apresentaram atividade para impedir a recolonização bacteriana.

Lukác *et al.* (2019) apresentaram um novo curativo preparado com colágeno tipo I de peixe de água doce (*Cyprinus carpio*). Foram preparadas biomembranas reticuladas, com carbodimida e não reticuladas, as quais foram impregnadas com gentamicina posteriormente e submetidas ao teste de difusão em discos frente ao microrganismo *P. aeruginosa* (CNCTC 5482). Os autores demonstraram que ambas as biomembranas apresentaram halo de inibição frente ao microrganismo testado, o que indica a possibilidade do desenvolvimento de um curativo para uso biomédico.

Marcelino *et al.* (2018), demonstraram *in vitro* que biomembranas de látex natural incorporado com fluconazol são capazes de inibir o crescimento do microrganismo *Candida albicans*, produzindo halos de inibição semelhantes ao disco padrão de fluconazol, já a biomembrana sem o fármaco não foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Os resultados são semelhantes ao deste estudo, em que a biomembrana de látex incorporada com gentamicina apresentou halo de inibição equivalente ao disco padrão de gentamicina frente aos microrganismos isolados das feridas da pele dos ovinos com os diferentes tratamentos e momentos de avaliação.

O moxifloxacino, que é um antibiótico de uso oral com amplo espectro de ação, teve sua atividade antimicrobiana demonstrada quando incorporado em uma biomembrana de látex natural. O ensaio com a biomembrana foi realizado frente aos microrganismos *E. coli* (ATCC8739), *P. aeruginosa* (ATCC2327), *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. epidermidis* (ATCC 14990). A biomembrana incorporada com o fármaco

desenvolveu halo de inibição frente a todos os microrganismos testados, semelhante ao disco padrão de moxifloxacino, e a biomembrana sem o fármaco não apresentou qualquer efeito antibiótico, o que revela que o látex possui a capacidade de liberar o fármaco e inibir o crescimento dos microrganismos testados (GARMS *et al.*, 2019).

4.6 Avaliação histopatológica

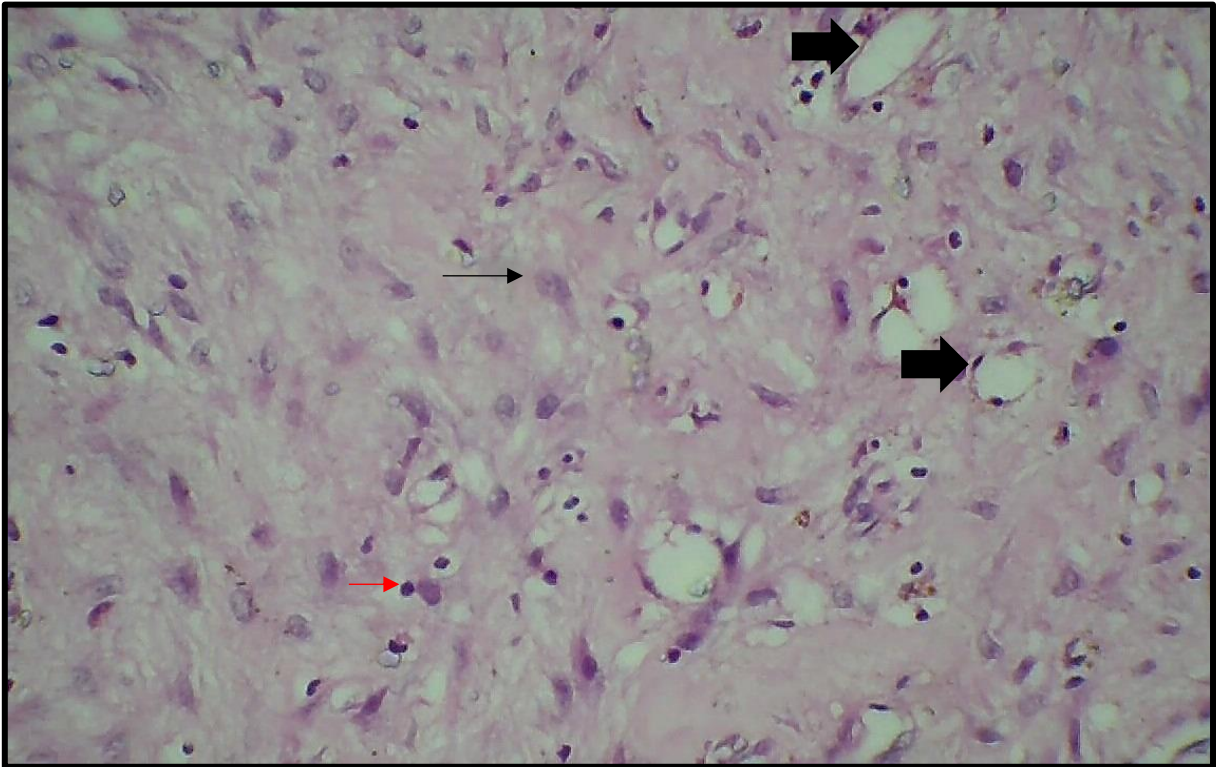
Os traumas ou lesões cutâneas são um dos responsáveis pela resposta inflamatória do organismo, o que envolve reações moleculares e celulares desencadeando o processo de cicatrização e reparação tecidual (RUH *et al.*, 2013).

Durante estes processos ocorre a fase inflamatória responsável agregação plaquetária promovendo a coagulação, a fase de granulação que favorece a reepitelização da ferida, a angiogênese e a migração e ativação dos fibroblastos, e por fim a fase da formação da matriz extracelular ou a maturação provocada pela ativação dos fibroblastos, composta por colágeno responsável pela maturação da cicatriz (ROCHA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Um desequilíbrio durante o processo inflamatório de uma lesão cutânea pode desencadear a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides ocasionados pela desregulação na produção de colágeno, o que pode levar a danos estéticos e/ou funcionais (KRUPP *et al.*, 2019).

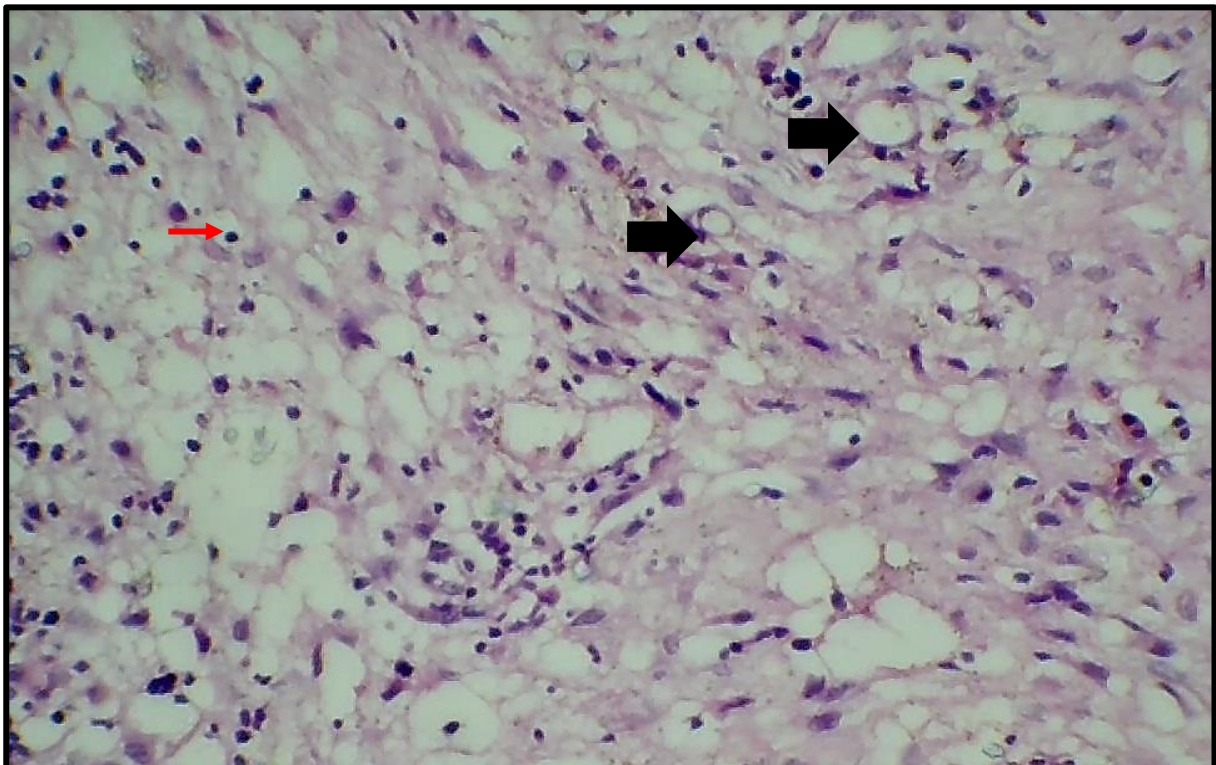
Durante a avaliação histológica observou-se os infiltrados inflamatórios crônicos, com presença predominante de leucócitos mononucleares em menos de 25% do campo (Figura 27), com predomínio entre 25% e 50% (Figura 28) e com predomínio em mais 50% do campo observado (Figura 30), e os infiltrados inflamatórios crônicos-agudos sem predomínio, mas com presença de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares (Figura 29).

Figura 27: Infiltrado inflamatório crônico presente em menos de 25% do campo (HE - 40x). Seta preta grossa: Vasos sanguíneos. Seta preta fina: Fibroblastos. Seta vermelha fina: célula mononuclear.



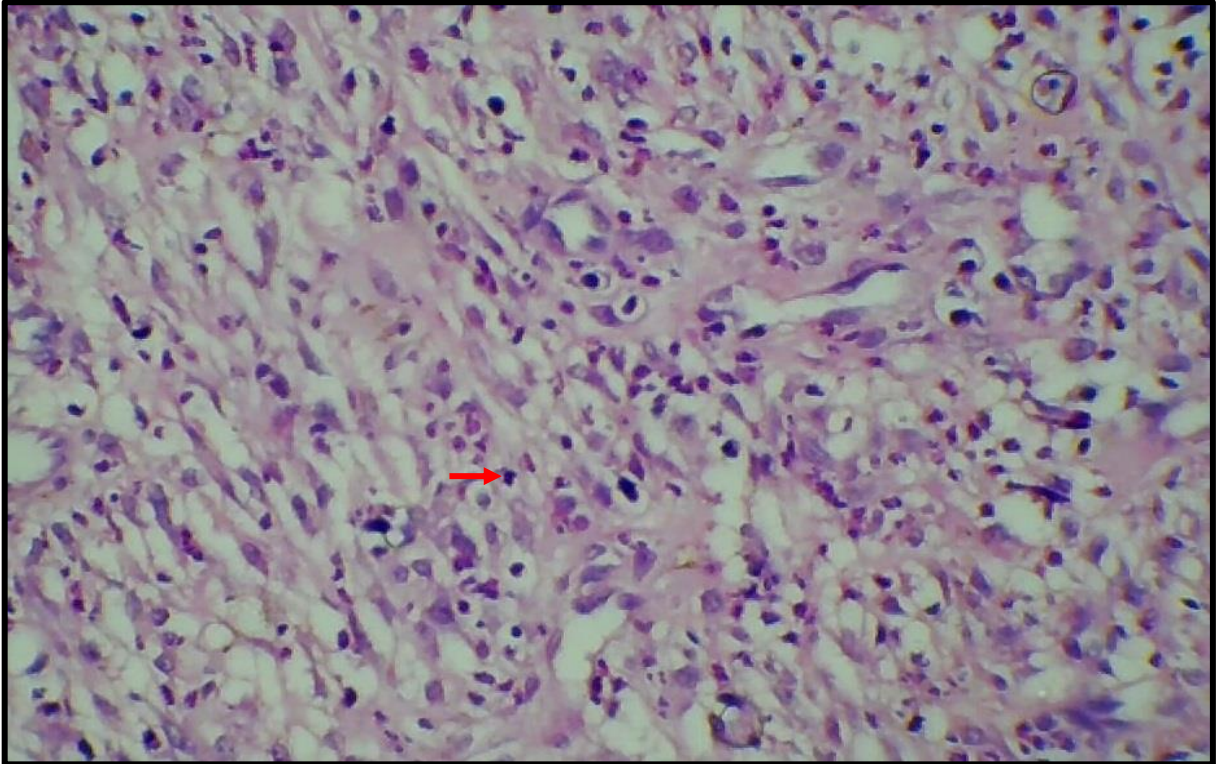
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 28: Infiltrado inflamatório crônico presente de 25-50% do campo (HE - 40x). Seta preta grossa: Vasos sanguíneos. Seta vermelha fina: célula mononuclear.



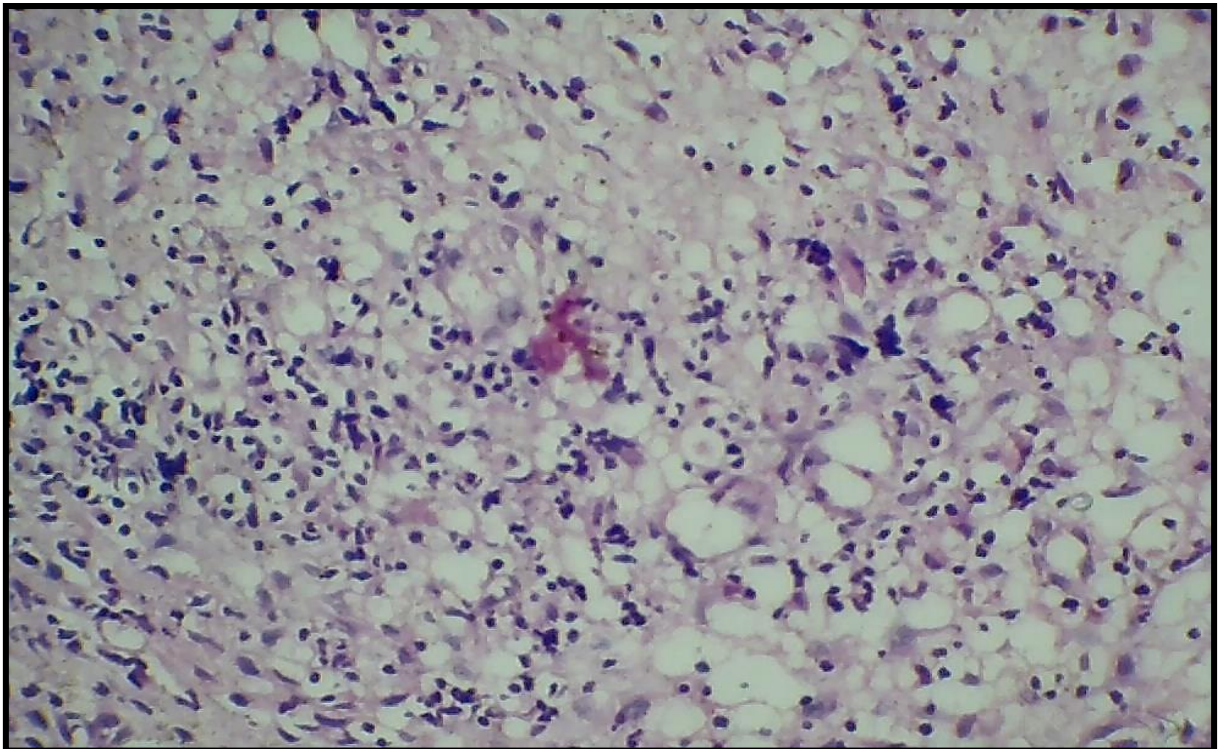
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 29: Infiltrado inflamatório agudo presente em mais de 50% do campo (HE 40x). Seta vermelha fina: célula polimorfonuclear.



Fonte: Arquivo pessoal.

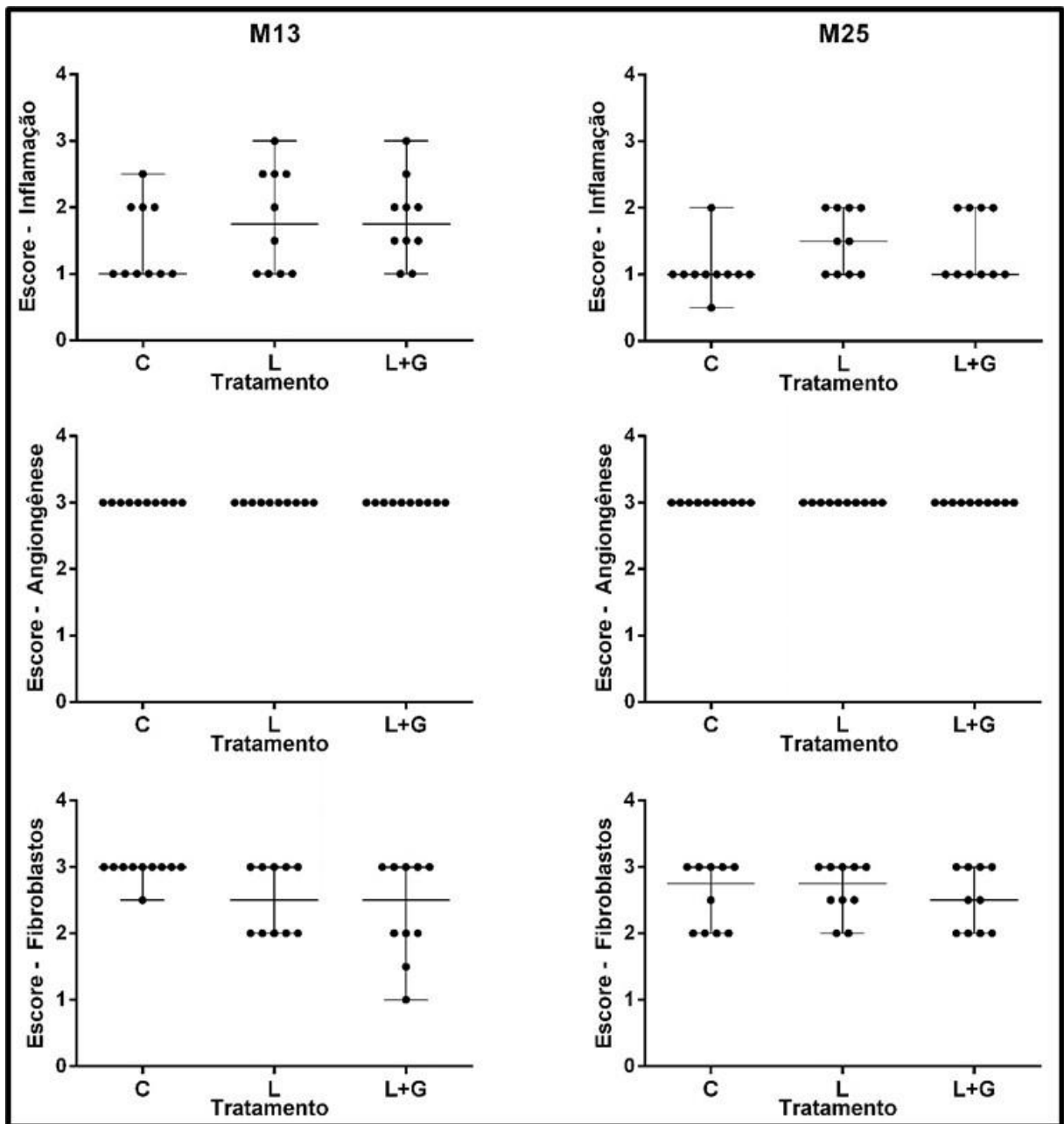
Figura 30: Infiltrado inflamatório crônico presente em mais de 50% do campo (HE 40x).



Fonte: Arquivo pessoal.

Não houve diferença estatística nos escores de inflamação, angiogênese e teor de fibroblastos entre os tratamentos em todos os momentos avaliados (Figura 31).

Figura 31: Avaliação do processo cicatricial nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) 13 e 25 dias de tratamento. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).

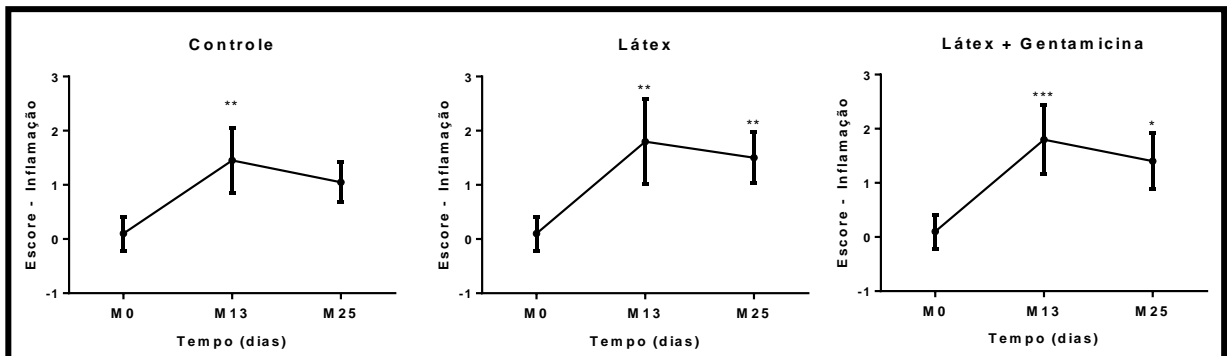


Fonte: Arquivo pessoal.

Ao se avaliar o efeito do tempo em cada tratamento, a ferida controle apresentou aumento da inflamação apenas no M13, enquanto as feridas cobertas com

biomembrana de látex e látex com gentamicina apresentaram aumento da inflamação no M13 e M25 (Figura 32).

Figura 32: Avaliação da inflamação nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) ou **** ($p<0,0001$).



Fonte: Arquivo pessoal.

A resposta inflamatória também é uma etapa importante no processo de cicatrização, pois prepara o ambiente da lesão para o reparo tecidual (ACKERMANN, 2018).

Nesta etapa o sistema imune inato é ativado, recrutando os neutrófilos e monócitos para o sítio lesionado, responsáveis por eliminar agentes patogênicos na infecção da ferida e posteriormente pela liberação de fatores de crescimento e citocinas (ELLIS; LIN; TARTAR, 2018; SHUKLA *et al.*, 2019).

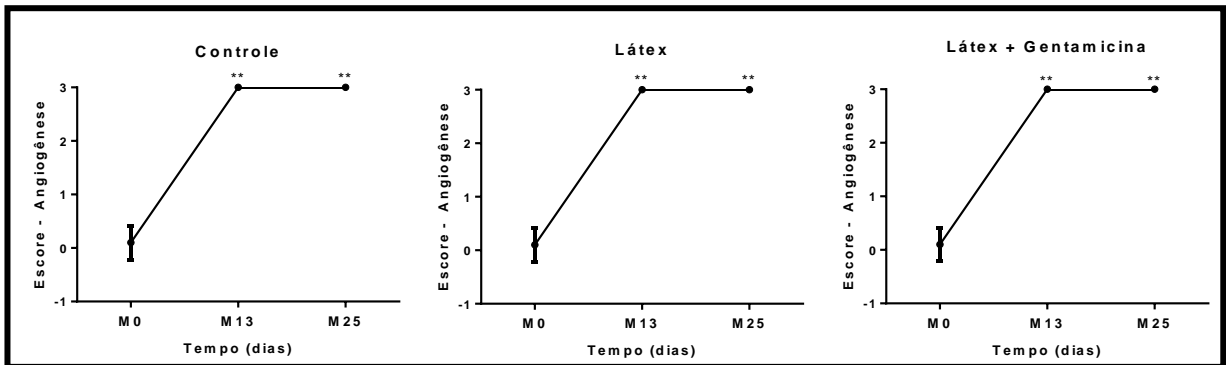
Sob efeito do tempo, a ferida com tratamento controle apresentou aumento da inflamação apenas no décimo terceiro dia, a ferida com tratamento látex e látex com gentamicina teve aumento da inflamação no décimo terceiro dia e vigésimo quinto dia.

Essa inflamação no décimo terceiro dia do tratamento com ferida controle teve predomínio de células polimorfonucleares em 40% das biópsias e 40% de células mononucleares, no tratamento da ferida com látex teve predomínio de 70% das biópsias com células polimorfonucleares e no tratamento da ferida com látex com gentamicina teve predomínio de 50% das biópsias com células polimorfonucleares.

No vigésimo quinto dia, todos os tratamentos tiveram predomínio de inflamação crônica composta por células mononucleares (controle 90%, látex e látex com gentamicina 60%).

Sousa *et al.* (2011) relatam resultados semelhantes na utilização de látex em inguinoplastia de cães que promoveu inflamação mononuclear nos dias 14, 21 e 28. Em um transplante de conjuntiva de coelho, notou-se que a inflamação foi crônica no décimo quarto e vigésimo primeiro dia (PINHO *et al.*, 2018). A inflamação se manteve por mais tempo nas feridas tratadas com biomembranas de látex. Todos os tratamentos apresentaram aumento da angiogênese no M13 e M25 (Figura 33).

Figura 33: Avaliação da angiogênese nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).



Fonte: Arquivo pessoal.

A angiogênese é um fator importante na cicatrização, pois com a formação de novos vasos acabam suprindo a lesão com oxigênio, removendo o dióxido de carbono e outros produtos da degradação, e acabam drenando o excesso de fluídos e permite acesso à ferida para as células tronco (ACHERMANN, 2018).

Estudos demonstram que os macrófagos são primordiais na resposta angiogênica durante o processo de cicatrização de feridas, pois dependendo do estímulo podem sofrer diferenciação específica. No início e na sustentação da inflamação são denominadas de fenótipos M1, devido a sua maior concentração, e no período de cicatrização de fenótipo M2, associado também com a angiogênese (VEITH *et al.*, 2019).

Com relação à contagem dos vasos sanguíneos neoformados, no presente estudo não houve diferença estatística entre os grupos. Andrade *et al.* (2011) compararam diferentes tipos de implantes subcutâneos em camundongos (C57BL/6), um feito de látex natural (NBL), outro de látex desnaturalizado (DL), outro de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e um sem implante (SHAM). Observaram

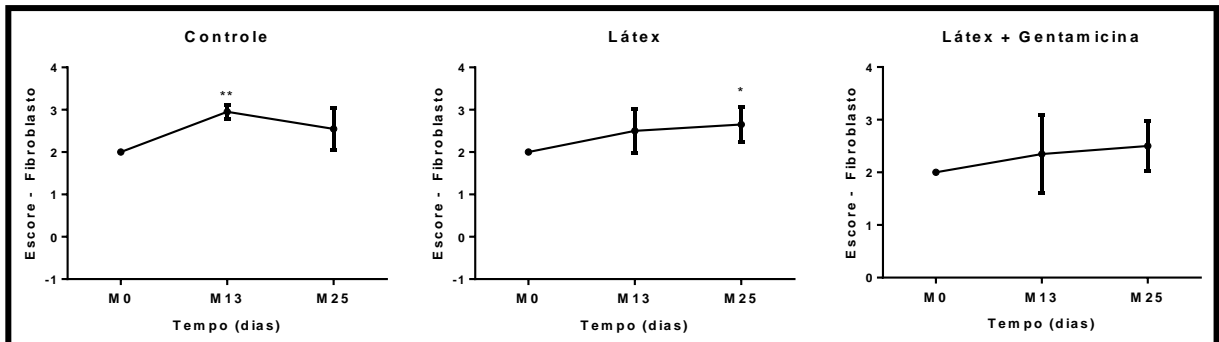
que no sétimo dia os implantes de NBL e DI proporcionaram neoangiogênese maior que SHAM e no 14^o dia também superior a ePTFE.

Zimmermann *et al.* (2018) observaram que a quantidade de vasos sanguíneos no tratamento com látex no subcutâneo de bovinos foi significativamente maior que no grupo controle, para todos os tempos testados.

Em ratos com queimaduras térmicas tratados com biomembrana de látex por 14 dias, o grupo com látex apresentou melhor cicatrização e neoangiogênese quando comparados com o grupo controle (BOLINA-MATOS *et al.*, 2013). Tais discrepâncias devem-se provavelmente às diferentes metodologias utilizadas na avaliação da angiogênese.

O tratamento controle apresentou aumento de fibroblastos no M13, enquanto o tratamento com biomembrana de látex apresentou no M25 e o tratamentos com biomembrana de látex incorporada com gentamicina não apresentou diferença significativa (Figura 34).

Figura 34: Avaliação do número de fibroblastos nos diferentes tratamentos realizados das feridas de pele de ovinos (n=10) sem tratamento algum (Controle, C) ou cobertas com biomembrana de látex (L) e biomembrana de látex com gentamicina (L+G) sob efeito do tempo. Os gráficos são expressos por média e desvio-padrão e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) ou **** (p<0,0001).



Fonte: Arquivo pessoal.

O aumento do número de fibroblastos é importante para a produção de colágeno no local, e para ocorrer a substituição da matriz extracelular por tecido conjuntivo, denominado de fibroplasia, que para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo a formação de novos vasos sanguíneos, além disso, também são importantes para realizar a contração da ferida (ACKERMANN, 2018).

No presente trabalho a avaliação de fibroblastos foi semelhante à descrita por Penhavel *et al.* (2016) visto que em todos os tratamentos a contagem de fibroblastos foi maior que 50% do campo.

Em experimentos *in vitro*, Barros *et al.* (2021) observaram o aumento da atividade metabólica em culturas de fibroblastos e queratinócitos com eluatos de biomembranas de látex natural incorporadas com 15% de alginato, o que demonstra seu potencial uso no processo de cicatrização. O aumento do número de fibroblastos foi significativo no tratamento controle no décimo terceiro dia e no tratamento com látex no vigésimo quinto dia, o que pode indicar uma melhor reepitelização da ferida tratada com a biomembrana de látex.

Nos estudos realizados por Andrade *et al.* (2011) em implantes subcutâneos indicaram mesmo número de células inflamatórias e fibroblastos para o grupo NBL, para grupo ePTFE o número de fibroblasto foi maior que as células inflamatórias, enquanto os grupos DI e SHAM apresentaram maior número de células inflamatórias que os fibroblastos.

5. CONCLUSÃO

As biomembranas de látex não promoveram aumento da velocidade de cicatrização das feridas, entretanto observou que no meio e fim do processo de cicatrização uma maior retração das feridas.

As alterações apresentadas pelos parâmetros hematológicos e bioquímicos estão relacionadas ao processo de cicatrização. As alterações no nível de fibrinogênio plasmática estão relacionadas a eventos inflamatórios e/ou traumáticos e o aumento de monócitos e eosinófilos podem ser justificados pela fase cicatricial das feridas.

Os marcadores renais, como a creatinina e ureia não apresentaram alterações em suas dosagens, uma vez que a gentamicina pode levar a nefrotoxicidade, assim recomendando como um curativo seguro para uso tópico.

O microrganismo *Staphylococcus* coagulase negativa foi o de maior prevalência nas feridas, o que pode estar associado a facilidade de formação de biofilme em dispositivos médicos.

A biomembrana de látex com gentamicina promoveu redução da carga bacteriana sem indução de resistência antimicrobiana, reafirmando a indicação do seu uso para o tratamento de feridas com processo de infecção.

A análise histopatológica não revelou diferenças estatística nos quesitos inflamação, angiogênese e teor de fibroblastos entre os tratamentos nos momentos avaliados. Nos momentos medianos, M13 e M25, foi observado um aumento dos quesitos avaliados, contudo este aumento está relacionado ao processo de cicatrização. Na etapa inflamatória os neutrófilos são recrutados para inibir possíveis infecção e liberação das citocinas, na angiogênese ocorre uma melhor oxigenação e proliferação de células tronco e o aumento dos fibroblastos é importante na produção de colágeno e formação do tecido conjuntivo.

Baseado nos resultados deste estudo, onde a biomembrana de látex incorporada com gentamicina não promoveu alterações toxicológicas, levou a redução da carga bacteriana sem induzir a resistência antimicrobiana e ao término do processo cicatricial as feridas apresentaram melhor aparência estética, desta forma sugere-se sua aplicação no auxílio da oclusão de feridas decorrentes de queimaduras, úlceras de pressão e diabetes, ou seja feridas de primeira, segunda e terceira intenção com o intuito de diminuir a probabilidade de uma cicatriz hipertrófica e quelóide.

6. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R. Inflamação e cicatrização. In: ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária**. 6 edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. cap.3, p.73-131.
- AHRENDT, G. M.; TANTRY, U.S.; BARBUL, A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. **American Journal of Surgery**, v.171, p.102-107, 1996.
- AKHTAR, B. *et al.* Toxicity studies of oral and transdermal formulations of gentamicin loaded PLGA nanoparticles in animal model. **Pakistan Veterinary Journal**, v.40, n.1, p.67-72, 2020.
- ALLEN JR, L. V; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013. p.716.
- ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap.29 p.398-411.
- ALMEIDA, E. V. S.; WAGNER, R. Análise da concentração de gentamicina comercializada nas farmácias de Curitiba-PR. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.2, n.12, p.99-108, 2014.
- ALVES, M. C. O. **Teste de angiogênese estimulada por membranas de látex natural**. 2010. Dissertação (Mestrado), FFCLRP - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- AMSTERDAM, D. **Antibiotics in laboratory medicine**. 6.ed. Philadelphia: Wolter Kluwer, 2015. p.807.
- ANDRADE, T. A. M. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2007.
- ANDRADE, T. A. M. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 1036-1047, 2011.
- ARIAS, M. V. B. *et al.* Identification of antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from dogs and cats with contaminated and infected traumatic wounds. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.861-874, 2008.
- BARROS, N. R. *et al.* Highly absorptive dressing composed of natural latex loaded with alginate for exudate control and healing of diabetic wounds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111589, 2021.

BOLINA-MATOS, R. S. *et al.* Efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos Wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.12, n.4, p.270-277, 2013.

BOOT, W. *et al.* A Hyaluronic Acid Hydrogel Loaded with Gentamicin and Vancomycin Successfully Eradicates Chronic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Orthopedic Infection in a Sheep Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. e01840-20, 2021.

BRANDÃO, M. L. *et al.* Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe vera extract in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.31, n.9, p.570-577, 2016.

BRASIL. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília: Anvisa, 2017 p.122.

BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12.ed. Rio de Janeiro: MacGraw hill, 2012, p.2112.

BRUYETTE, D. **Clinical Small Animal Internal Medicine – Volume II**. First Edition, John Wiley & Sons, 2020. p.1712.

CARLOS, B. L. *et al.* Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.30, n.14, p.1291-1307, 2019.

COLE, D. J.; ROUSSEL, A. J.; WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute-phase proteins. **The Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, Philadelphia, v.92, n.5, p.470-478, 1997.

COSTA, N. A. *et al.* Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.30, n.5, p.435-442, 2010.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.107, n. 1-3, p.233-235, 1995.

EK, N. The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cows with inflammatory conditions. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum, Denmark**, v.13, n.2, p.175-184, 1972.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of wound healing. **Current Dermatology Reports**, v. 7, n. 4, p. 350-358, 2018.

FERNANDES, F. P. *et al.* Sistemas de liberação tópica: síntese, caracterização e estudos antimicrobianos. In: **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**,

Foz do Iguaçu, PR. v.10, 2009.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FERREIRA, A. R. S. *et al.* Avaliação macroscópica e microscópica de implante de biomembrana em estômago de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.177-184, 2014.

FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v.39, n.3, p.564-569, 2009.

FRADE, M. A. C. *et al.* Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 238-240, 2001.

FRADE, M. A. C. *et al.* A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v.34, n.3, p.137-142, 2006.

FRADE, M. A. C. *et al.* The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.1, p.45-51, 2012.

FRIESEN, W. J. *et al.* The minor gentamicin complex component, X2, is a potent premature stop codon readthrough molecule with therapeutic potential. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0206158, 2018.

GARCIA, V. G. *et al.* Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: Histological study in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 221-228, 2010.

GARDNER, D. S. *et al.* Remote effects of acute kidney injury in a porcine model. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.310, n.4, p.259-271, 2016.

GARMS, B. *et al.* Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.15, n.1, p.1-10, 2017.

GARMS, B. C. *et al.* Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.12, p.4767-4778, 2019.

GARNER, M. R. *et al.* Antibiotic prophylaxis in open fractures: evidence, evolving issues, and recommendations. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 28, n. 8, p. 309-315, 2020.

GEMEINDER, J. L. P. *et al.* Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.32, n.1, p.93-111, 2021.

GERONEMUS, R. G.; MERTZ, P. M.; EAGLSTEIN, W. H. Wound healing: the effects

of topical antimicrobial agents. **Archives of Dermatology**, v.115, n.11, p. 1311-1314, 1979.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n.7193, p.314-321, 2008.

HAALBOOM, M. *et al.* Wound swab and wound biopsy yield similar culture results. **Wound Repair and Regeneration**, v.26, n.2, p.192-199, 2018.

HERCULANO, R. D. *et al.* Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research**, v.12, n.2, p.253-256, 2009.

HERCULANO, R. D. *et al.* Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v.13, n.1, p.57-61, 2010.

HERCULANO, R. D. *et al.* On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 272-275, 2011.

HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; GRAEFF, C. F. O. Optimization of a novel Nitric Oxide Sensor using a latex rubber matrix. **Journal of Applied Sciences**, v.7, n.23, p.3801-3805, 2007.

HERRMANN, P. S. P. *et al.* Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros**, v. 7, p. 51-61, 1997.

ISHII, J. B.; FREITAS, J. C.; ARIAS, M. V. B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.31, n.6, p.533-537, 2011.

JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology. In: JAIN, N.C. (Ed). Philadelphia: Lea & Febinger. p. 19-22, 1993.

JANSSEN, H. *et al.* Antimicrobial-resistant bacteria in infected wounds, Ghana, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, n.5, p.916, 2018.

JERRY KANEKO, J.; HARVEY, J. J.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. [s.l: s.n.].

KANDAVILLI, S.; NAIR, V.; PANCHAGNULA, R. Polymers in transdermal drug delivery systems. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 5, p. 62-81, 2002.

KARPPINEN, S. M. *et al.* Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. **F1000 Research**, v. 8, 2019.

KORZYBSKI, T.; KOWSZYK-GINDIFER, Z.; KURYLOWICZ, W. **Antibiotics: Origin, Nature and Properties**. Poland: Elsevier, 2013. p. 526.

KRAHWINKEL, D.J.; BOOTHE, H.W. Topical and systemic medications for wounds. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.739-757, 2006.

KRUPP, T. *et al.* Natural rubber-propolis membrane improves wound healing in second-degree burning model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 980-988, 2019.

LINEAWEAVER, W. C. *et al.* Squamous carcinoma arising in a pilonidal sinus. **Journal of Surgical Oncology**, v.27, n.4, p.239-242, 1984.

LUKÁČ, P. *et al.* A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.34, n.3, p.246-262, 2019.

MARIA DE FÁTIMA, G. S.; ANDRADE, Y. A. M. V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirao Preto Online)**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

MARINHO, P. V. T. *et al.* Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Ximenia americana* no processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais em caprinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.4, p.604-614, 2013.

MARTINEZ, F. O. *et al.* Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. **The Journal of Immunology**, v.177, n.10, p.7303-7311, 2006.

MASUD, R. A. *et al.* Preparation of novel chitosan/poly (ethylene glycol)/ZnO bionanocomposite for wound healing application: Effect of gentamicin loading. **Materialia**, v.12, p.100785, 2020.

MCSHERRY, B. J.; HORNEY, F. D.; DEGROOT, J. J. **Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows.** **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canada, v.34, n.7, p.191-197, 1970.

MELO-REIS, P. *et al.* Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MENCIA-HUERTA, J. Rôle des mastocytes et des polynucléaires basophiles et éosinophiles dans les phénomènes inflammatoires. **Veterinary Research**, v. 24, n. 4, p. 358-359, 1993.

MOHAMMED, A. A. *et al.* Correlation of Medical Treatment for Wound Infection with Isolated Bacteria and Antibiotics Sensitivity Profile in Baqubah Teaching Hospital. **Diyala Journal of Medicine**, v.18, n.1, p.14-20, 2020.

NAJAFI, H. *et al.* Protective effect of *Malva sylvestris* L. extract in ischemia-reperfusion induced acute kidney and remote liver injury. **PLoS ONE**, v.12, n.11, p.1-16, 2017.

NAWAMAWAT, K. *et al.* Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, n. 1-3, p. 157-166, 2011.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;**

Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâmica**, v. 44, p. 212-219, 1998.

NEVES, M. C. *et al.* Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arq Inst Biol**, v.74, n.3, p.207-213, 2007.

NUNES, G. A. M. A. *et al.* A system for treatment of diabetic foot ulcers using led irradiation and natural latex. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v.32, n.1, p.3-13, 2016.

O'SULLIVAN, M. E. *et al.* Dissociating antibacterial from ototoxic effects of gentamicin C-subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 51, p. 32423-32432, 2020.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.21, n.4, p.444-452, 2006.

PASMOOIJ, A.M. Gentamicina tópica para o tratamento de doenças genéticas da pele. **Journal of Investigative Dermatology**, v.138, n.4, p.731-734, 2018.

PEGORIN, G. S. *et al.* Natural latex serum: characterization and biocompatibility assessment using *Galleria mellonella* as an alternative in vivo model. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, n. just-accepted, p. 1-18, 2021.

PENHAVEL, M. V. C. *et al.* Effect of *Hevea brasiliensis* latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.43, n.1, p.048-053, 2016.

PEREIRA, A. C. A. *et al.* Cicatrização: uso de matriz de colágeno. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, p. 274-277, 2019.

PEREIRA, V. C.; SOUZA, M. L. R. **Do comensalismo à patogenicidade: Um estudo sobre estafilococos coagulase-negativa**. São Paulo: Editora UNESP, 2018.

PFEFFER, A. *et al.* Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.3, p.360-366, 1993.

PINHO, E. C. C. M. *et al.* The study of the use of a latex biomembrane and conjunctival autograft in rabbit conjunctiva wound healing. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 81, n. 2, p. 125-129, 2018.

PINTO, E. P.; RAMOS, G. Q.; FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na

escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2015.

PRABHU, V. et al. Spectroscopic and histological evaluation of wound healing progression following Low Level Laser Therapy (LLLT). **Journal of Biophotonics**, v. 5, n. 5, p. 168-184, 2012.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilms in wounds: management strategies. **Journal of Wound Care**, v.17, n.11, p.502-508, 2008.

RIZK, A. *et al.* Bacteriological profile and antibiogram of Staphylococcus aureus isolated from sheep and goats abscess. **Benha Veterinary Medical Journal**, v.37, n.1, p.128-130, 2019.

ROCHA JÚNIOR, A. M. *et al.* Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 150-156, 2006.

ROSA, J. P. P. Efeitos da biomembrana de látex de seringueira na cicatrização de feridas experimentais em coelhos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 821-840, 2016.

RUH, A. C. *et al.* Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 11-19, 2013.

SAHA, T. K. *et al.* Characterization of bacterial isolates from skin lesions of sheep, goat and cattle in different rearing condition. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, v.5, n.2, p.117-125, 2019.

SANTOS, W. B. *et al.* Surgical wounds infective microbiota: national and international analysis of scientific production. **Rev. Sobecc**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2016.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J.. Hematologic techniques. **Schalm's Veterinary Hematology, 4th edition. Lea and Febiger, Philadelphia**, p. 20-86, 1986.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E. J. **Veterinary hematology**. [s.l.] Lea & Febiger., 1975.

SHUKLA, S. K. *et al.* Pharmacological control of inflammation in wound healing. **Journal of Tissue Viability**, v. 28, n. 4, p. 218-222, 2019.

SILVA, F. P.; ALENCAR, I. R. Revisão sistemática da utilização de biomembranas em feridas e queimaduras. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 15, n. 2, p. 18-28, 2017.

SILVA, R. G. **Eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com extrato de Stryphnodendron barbatiman mart. na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas**. . 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências) Universidade Estadual Paulista, Assis, 2015.

- SILVA, T. V. *et al.* Voriconazole-natural latex dressings for treating infected *Candida* spp. skin ulcers. **Future Microbiology**, v. 15, n. 15, p. 1439-1452, 2020.
- SILVA, J. A. *et al.* Administração cutânea de fármacos: Desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v.31, n.3, p.125-131, 2010.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.
- SOUSA, F. D. B.; SCURACCHIO, C. H. The use of atomic force microscopy as an important technique to analyze the dispersion of nanometric fillers and morphology in nanocomposites and polymer blends based on elastomers. **Polímeros**, v. 24, p. 661-672, 2014.
- SOUSA, L. H. *et al.* Morphologic evaluation of the use of a latex prosthesis in videolaparoscopic inguinoplasty: an experimental study in dogs. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, p.84-91, 2011.
- TANAKA, J. L. *et al.* Natural rubber dressing loaded with silver sulfadiazine for the treatment of burn wounds infected with *Candida* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 597-606, 2021.
- TEDESCHI, S. *et al.* Superficial swab versus deep-tissue biopsy for the microbiological diagnosis of local infection in advanced-stage pressure ulcers of spinal-cord-injured patients: a prospective study. **Clinical Microbiology and Infection**, v.23, n.12, p.943-947, 2017.
- TOTTOLI, E. M. *et al.* Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.
- VEITH, A. P. *et al.* Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 146, p. 97-125, 2019.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res**, v.37, n.5, p.1528-1542, 2009.
- WALI, A. *et al.* In Vivo Wound Healing Performance of Halloysite Clay and Gentamicin-Incorporated Cellulose Ether-PVA Electrospun Nanofiber Mats. **ACS Applied Bio Materials**, v.1, n.10, p.4324-4334, 2019.
- WANG, P. *et al.* The efficacy of topical gentamycin application on prophylaxis and treatment of wound infection: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Clinical Practice**, v.73, n.5, p.e13334, 2019.
- WEI, Y. C. *et al.* Influence of non-rubber components on film formation behavior of natural rubber latex. **Colloid and Polymer Science**, v. 298, n. 9, p. 1263-1271, 2020.

WOOD, D.; QUIROZ-ROCHA, G. F. Normal hematology of cattle. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**, 6th ed., Wiley: Ames, 2010. p. 829-835.

WELCH FOSSUM, T. **Small animal surgery**. 4. ed. Missouri: Elsevier, 2013.

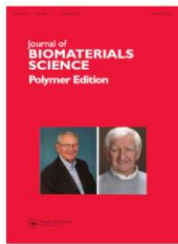
YONASHIRO MARCELINO, M. *et al.* Antifungal activity of fluconazole-loaded natural rubber latex against *Candida albicans*. **Future Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 359-367, 2018.

YU, N. *et al.* Bacteria-triggered hyaluronan/AgNPs/gentamicin nanocarrier for synergistic bacteria disinfection and wound healing application. **Chemical Engineering Journal**, v.380, p.122582, 2020.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Membranas de látex natural na herniorrafia diafragmática experimental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1476-1483, 2008.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis* auxilia no processo de reparação tecidual em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.3, p.741-748, 2018.

APÊNDICE 1



Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition



ISSN: 0920-5063 (Print) 1568-5624 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsp20>

Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers

José Lúcio Pádua Gemeinder, Natan Roberto de Barros, Giovana Sant'Ana Pegorin, Junya de Lacorte Singulani, Felipe Azevedo Borges, Marina Constante Gabriel Del Arco, Maria José Soares Mendes Giannini, Ana Marisa Fusco Almeida, Sérgio Luiz de Souza Salvador & Rondinelli Donizetti Herculano

To cite this article: José Lúcio Pádua Gemeinder, Natan Roberto de Barros, Giovana Sant'Ana Pegorin, Junya de Lacorte Singulani, Felipe Azevedo Borges, Marina Constante Gabriel Del Arco, Maria José Soares Mendes Giannini, Ana Marisa Fusco Almeida, Sérgio Luiz de Souza Salvador & Rondinelli Donizetti Herculano (2021) Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 32:1, 93-111, DOI: [10.1080/09205063.2020.1817667](https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1817667)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1817667>



Published online: 08 Sep 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 241



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)




Citing articles: 12 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbsp20>



Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers

José Lúcio Pádua Gemeinder^{a,b}, Natan Roberto de Barros^{b,c},
Giovana Sant'Ana Pegorin^{b,c} , Junya de Lacorte Singulani^d,
Felipe Azevedo Borges^{b,c}, Marina Constante Gabriel Del Arco^e,
Maria José Soares Mendes Giannini^d, Ana Marisa Fusco Almeida^d,
Sérgio Luiz de Souza Salvador^e and Rondinelli Donizetti Herculano^c

^aDepartment of Biotechnology, São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry and Chemical Technology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara, São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Biotechnology and Bioprocesses Engineering, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil; ^dDepartment of Clinical Analysis, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil; ^eDepartment of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, São Paulo University (USP), School of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Skin wound infection requires carefully long-term treatment with an immense financial burden to healthcare systems worldwide. Various strategies such as drug delivery systems using polymer matrix from natural source have been used to enhance wound healing. Natural rubber latex (NRL) from *Hevea brasiliensis* has shown angiogenic and tissue repair properties. Gentamicin sulfate (GS) is a broad-spectrum antibiotic which inhibits the growth of a wide variety of microorganisms and, because of this, it has also been applied topically for treatment of local infections. The aim of this study was to develop a GS release system using NRL as matrix for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers treatment, without changing drug antibiotic properties. The matrix did not change the GS antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* strains. Moreover, the NRL-GS biomembrane did not exhibit hemolytic activity, being non-toxic to red blood cells. The eluates of NRL-GS biomembranes and GS solutions did not significantly reduce the survival of *Caenorhabditis elegans* worms for 24 h at any of the tested concentrations. Thus, these results emphasize that the NRL-GS biomembrane proved to be a promising biomaterial for future studies on the development of dressings for topical uses, inexpensive and practicable, keeping drug antibiotic properties against pathogens and to reduce the side effects.

ARTICLE HISTORY

Received 20 July 2020
Accepted 28 August 2020

KEYWORDS

Biomembrane; dressing; gentamicin; antimicrobial activity; hemolysis; *Caenorhabditis elegans*

CONTACT Giovana Sant'Ana Pegorin  giovanapegorin@gmail.com

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

Cutaneous injuries, especially chronic wound and skin wound infection, require painstakingly long-term treatment with an immense financial burden to healthcare systems worldwide, accounting for over \$25 billion every year in the US alone, with approximately 300 million chronic and 100 million traumatic wound patients [1–3]. Several factors can result in non-healing wounds such as chronic disease, vascular deficiency, diabetes mellitus, malnutrition, aging, immunocompromised comorbidities, soft tissue trauma, burns, operative or highly contaminated wounds, obesity, poor hygiene and exposure to contaminated water [4–6].

In general, all chronic wounds are susceptible to contamination by microorganisms. *Staphylococcus aureus*, an aerobic Gram-positive coccus, is the most dominant causative pathogen (39.28%) and has paramount epidemiological significance in complicated skin and soft tissue infections. *Pseudomonas aeruginosa* (19.64%), *Escherichia coli* (30.35%), and *Enterococcus* spp. (10.71%) have also been identified as causes of these infections [7, 8].

Infected and chronic wounds not only impair the physiological functions of skin barrier, but they can also cause morbidity and even death [9]. Various strategies including growth factor, cell therapy and drug delivery systems have been used to enhance healing of non-healing wounds, because they accelerate this process [3, 10].

Thus, transdermal systems are of great interest, because they enable the adverse effects minimization of conventional formulations, maintaining the desired concentration over a long period of time without reaching toxic concentrations or not achieve the expected therapeutic effect [11–13]. Currently, many synthetic and natural polymers are used in the development of controlled release systems, designed to be more specific and suitable for drug to reach the wound site [14, 15].

Some strategies with biopolymers such as the use of chitosan, hyaluronic acid and abietic acid in matrix [16], solid dispersion [17], nanofibers [18] and hydrogels [19] can promote and accelerate wound healing and tissue regeneration, in addition to preserve their intrinsic biological properties like antimicrobial characteristics and biocompatibility.

Many researchers have shown that natural rubber latex (NRL) from *Hevea brasiliensis* composed by a natural polymer poly(*cis*-1,4-isoprene) has wide variety in health applicability, such as replacement of cervical esophagus in dogs [20], used as prosthesis and medical grafts due to its biocompatibility [21], wound healing [22], angiogenesis natural stimulus [23] and bone growth [24].

New studies had designed NRL as polymeric support for sustained release systems using metronidazole [25], sodium and potassium diclofenac [26, 27], ciprofloxacin, that also showed antimicrobial activity against *Burkholderia* sp. [28, 29], moxifloxacin, which revealed antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* [30] and as modified porous NRL films loading gentamicin, that exhibited the good antimicrobial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* [31]. This new strategy has been used, because it is possible to modify kinetic release profiles and release time through simple changes in the material morphology. Then, various antibiotics can be employed as gentamicin sulfate (GS).

Gentamicin used as sulfate salt is a broad-spectrum antibiotic which has action by inhibiting the growth of a wide variety of Gram-positive and Gram-negative microorganisms [32, 33]. It has been used for systemic treatments as biliary tract infections, endocarditis, meningitis, among others, and can also be applied topically for treatment of local infections, such as infectious impetigo, seborrheic dermatitis and superficial ocular infection [34]. However, GS promotes severe toxicity problems, especially nephrotoxicity, toxicity and neuromuscular blockade when used by parenteral route in high concentrations for a long period of time [35]. GS is configured as one of the most widely used antibiotics in controlled release devices, as well as their solubility and stability at high temperatures [36].

The aim of this work was to incorporate GS into the NRL biomembranes to reduce the drug side effects [37] and evaluate its antibiotic properties against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* present in infected skin ulcers. The interaction of the dressing with red blood cells was assessed through hemocompatibility assays, in order to investigate toxicity *in vitro*. Furthermore, safety tests on *Caenorhabditis elegans* was employed to evaluate its biocompatibility as an alternative to mammals, because this organism presents biological functions, as innate immune response, similar among mammals [38], in addition to several advantages in experimental assays [39], and its genome has already been fully sequenced [40]. As an *in vivo* model, *C. elegans* provides several characteristics that complement *in vitro* or cellular models [41]. Thus, the study novelty is to use testing such as hemolysis and toxicity in alternative animal model to estimate aspects of biocompatibility of the NRL-GS biomembranes.

2. Materials and methods

2.1. Natural rubber latex

NRL was acquired from BDF Latex Company (Guarantã, Brazil), of about 60% dry rubber content, 35% of water and 4–5% weight of non-rubber constituents such as proteins, lipids, carbohydrates. It was produced by the crossing clones: RRIM 600 e PB 235 (Lot: 01703/13). After extraction, ammonia was added to the material to prevent coagulation and adjust pH value at 10.2. The material was centrifuged at 8000 g for purpose of reducing the high molecular weight proteins present in NRL serum which are responsible for allergic and cytotoxic reactions [28, 42]. Cream fraction after centrifugation was redispersed to make the desired 60% of dry rubber content latex and then washed twice by centrifugation to reduce the protein content on the solution.

2.2. Gentamicin sulfate

GS, Lot. 10041226, composed by a mixture of GS isomers such as structures C1, C1a, C2, C2a and C2b, was obtained in powder, without excipients from Henrifarma Company (Distributor of Pharmaceutical Drugs, São Paulo, Brazil). The drug has been dissolved with aqueous solution at 25 °C (room temperature).



Figure 1. The NRL-GS biomembrane (final material).

2.3. Biomembranes production

The GS loaded biomembranes were prepared by mixing 4 mL of NRL and 3 mL of GS solution (30 mg/mL). After this, the mixture was poured onto Teflon® plates with 5.00 ± 0.05 cm diameter and 1.00 ± 0.01 mm thick. The blend was maintained at room temperature (25 °C) for two days for complete polymerization (Figure 1). For the biomembranes antimicrobial activity, the films were cut with histologic punch (6 mm; total area = 28.26 mm^2). The drug concentration was adjusted in order to produce discs with 1 mg of GS.

2.4. Gentamicin delivery system

In order to verify GS released from biopolymer, the biomembranes were immersed in 100 mL containing buffer solutions ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/0.1\text{M NaH}_2\text{PO}_4$) at pH value equal 5.7 and 0.9% saline solution (pH \approx 6.9). GS released into solution was measured using a UV-Vis spectrophotometer SF200 ADV (BEL ENGINEERING®, Italy) [43, 44], where the drug has the maximum absorption at 250 nm, according to Saptarini et al. [45]. These experiments were carried out in triplicate.

2.5. Mechanical resistance

Mechanical resistance test on the biomembranes were carried out on a DL-2000 (EMIC®, Brazil) testing machine at room temperature (25 °C), with a 50 kgf load cell at a speed of 500 mm/min (according to ASTM D412) and elongated until failure. Values were converted to stress-strain curves and the Young modulus was calculated from the initial linear part (0–5% elongation).

2.6. Fourier Transform Infrared

FTIR spectra from pure GS, NRL biomembrane and NRL-GS biomembrane were obtained to prove the drug chemical integrity in the polymer. The samples were directly measured by an Attenuated Total Reflection method (ATR-FTIR) equipped by

diamond crystal, which is an excellent method for obtaining infrared information to the surface of sample and powdered drug. Biomembranes were characterized by a Tensor 27 (Bruker[®], Germany) ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) source: HeNe laser; detector: DLaTGS with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans.

2.7. Scanning Electron Microscopy

The GS compound distribution on the NRL biomembrane surface was examined at 300x magnification using SEM EVO 50 (Zeiss[®], Germany), with 2 kV, take-off angle of 35° and gold as conductor material. Three aleatory areas were analyzed to perform the analysis.

2.8. Biomembranes antimicrobial activity

Antimicrobial activity of the drug incorporated into the NRL biomembranes was evaluated using the agar diffusion method. *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) ATCC 25923 and *Escherichia coli* (Gram-negative) ATCC 25922 were employed as standard microbes. The strains of *S. aureus* and *E. coli* were seeded on Brain Heart Infusion agar (BHI, Sigma-Aldrich, USA). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Each microorganism was suspended in broth at standardized concentration of 1.5×10^8 cells/mL prior to spreading 1 mL broth onto agar plate [46]. The NRL biomembranes and NRL-GS biomembranes were cut into 5 mm circular discs. These biomembranes were gently placed onto colonized agar plate. GS-loaded cellulose (10 µg per disc) was employed as a positive control. These plates were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of circular zones of inhibition was measured after 24 h of incubation. All determinations were carried out in triplicates.

2.9. Hemolysis assay

Interactions of the biomembrane with sheep red blood cells (NEW PROV, code: 1189, Parana, Brazil) were analyzed using hemolytic assays [47]. First, the NRL-GS and NRL biomembranes were incubated separately in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 in proportion 0.2 mg of samples per mL of PBS for 24 h. Thereafter, 50 µL of samples resulting from lixiviated biomembrane and 50 µL of erythrocyte solution were incubated at 37 °C for 1 h. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 min and aliquots of 50 µL of supernatant were pipetted into 96-well microplates. Control groups were determined using 50 µL of PBS buffer with 100 µL of 1% (v/v) Triton X-100 (100% hemolysis value), while 0% hemolysis value was obtained using 10 µL buffer by a microplate reader at 540 nm. The hemolysis rate was calculated using following equation:

$$\text{Hemolysis rate (\%)} = \frac{(ABS_{\text{sample}} - ABS_{\text{negative control}})}{(ABS_{\text{positive control}} - ABS_{\text{negative control}})} \quad (1)$$

ABS_{sample} is absorbance of the samples (NRL-GS and NRL biomembranes), $ABS_{\text{negative control}}$ is absorbance of negative control (PBS), and $ABS_{\text{positive control}}$ is absorbance of positive control (Triton X-100).

2.10. Evaluation of the toxic effect on *Caenorhabditis elegans*

C. elegans wild type N2 was grown on nematode growth medium agar plates, fed with *Escherichia coli* OP50 and incubated at 15 °C according to standard procedures [48]. For experiments, worms were synchronized by treatment with sodium hypochlorite. Worms were then washed with NaCl 50 mM, and about 20–25 worms were added to wells of 96-well plates containing 60% NaCl 50 mM, 40% brain heart infusion (BHI), 10 µg/mL cholesterol in ethanol, 90 µg/mL kanamycin and 200 mg/mL ampicillin. The eluates obtained from the biomembranes were extracted according to ISO 10993-5 [49]. One hundred µL of different concentrations of eluates obtained from the NRL biomembrane (0.2–0.02 mg/mL), NRL-GS biomembrane (1.29–0.129 mg/mL), GS solution (0.5–0.03 mg/mL) and PBS (control group) were added to the wells. The plates were maintained at 25 °C, and worm survival was assessed after 24 h, based on their mobility and their shape (rod shaped worms were considered dead and sinusoidal worms were considered alive). Images were captured in the microscope Zeiss Discovery V12 (Germany) attached to a camera. Two independent experiments were performed with a total of about 40–50 worms.

2.11. Statistical analysis

Data were expressed as mean value ± standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). Statistical variations between groups were determined using one-way ANOVA analysis (variance for multiple comparisons) followed by Bonferroni post-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Gentamicin delivery system

Usually, a bioactive compound is incorporated into a carrier to result in a sustained release system, in which its rate and amount of drug released is related to the carrier properties or the environment in which it is found [50]. Among several options, polymers are versatile and promising agents to perform this function, according to their characteristics: hydrophobic, hydrophilic or insoluble [50, 51]. In hydrophobic or lipid carriers, bioactive release control occurs primarily by diffusion mechanism through pores or erosion.

GS exhibited a peak of absorbance at 250 nm in accordance with the literature [45]. The absorbance intensity depending on concentration of GS solution was plotted (Figure 2). It is observed that the calibration curve is in accordance with the Beer-Lambert law, with a regression coefficient of 0.99418.

This work evaluated GS kinetic release using the NRL biomembranes as solid matrix in different solutions to analyze the influence on release profile.

Figure 3 shows a larger release during the first hours due to GS presence on the biomembrane surface. Moreover, it is possible to observe a steady release of GS in

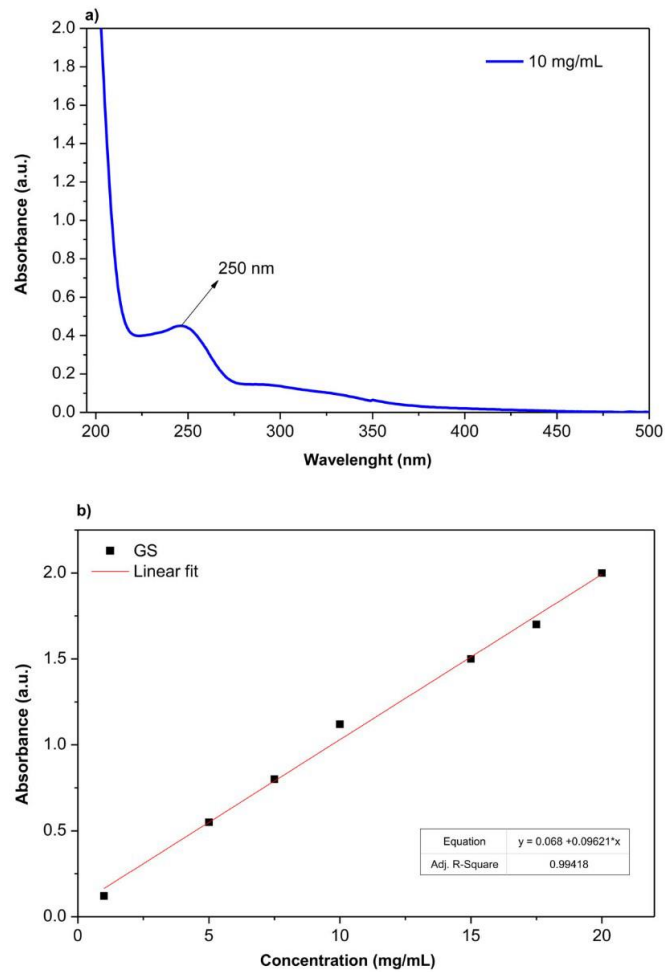


Figure 2. (a) UV-Vis spectrum of GS and (b) standard analytical curve of GS.

different studied solutions, suggesting that the drug is in the inner layers of the biopolymer.

GS released by the NRL biomembranes in physiological solution 0.9% (pH \approx 6.9) was 39.23% (35.36 mg) up to 39 h and in buffer with pH 5.7 (acid), it was observed 65.35% of GS (58.82 mg) up to 64 h, suggesting a greater solubility in an acid ambience, which showed the higher percentage of GS released. When a drug is among the most carried with H^+ ions (acid ambient) and OH^- (basic ambient), it becomes more bioavailable for absorption.

It was noticed that release profile obeyed a double exponential (ExpDec2), following equation:

$$y(t) = y_0 + A_1 \cdot e^{-t/t_1} + A_2 \cdot e^{-t/t_2} \quad (2)$$

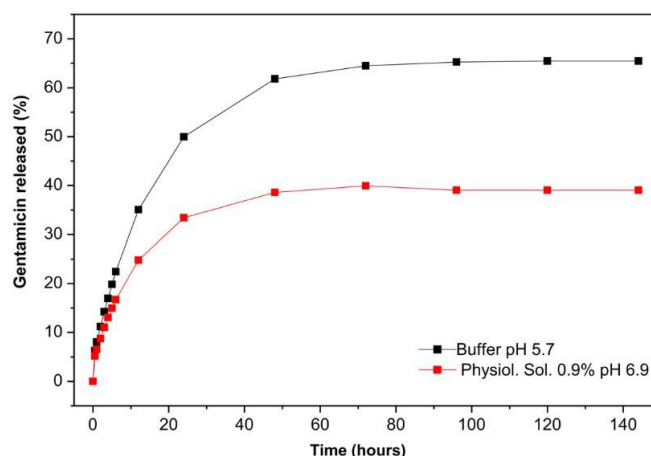


Figure 3. GS kinetic release profiles in different buffer solutions (pH 5.7 and 6.9).

$y(t)$ is GS amount released by the NRL biomembranes on time function (t), y_0 is initial drug amount in polymeric matrix, A_1 and A_2 are constants, and t_1 and t_2 are the characteristic times.

Sarabia-Sainz et al. [52] demonstrated release of GS incorporated into albumin microspheres for 24 h in three different ways: glycine/HCl (pH 2.0), acetate buffer (pH 4.0) and PBS (pH 6.0). The results showed a faster GS release under acidic conditions (pH 2.0 and 4.0) when compared at pH 6.0, suggesting this fact due to the high solubility of the drug at acidic pH.

Campos et al. [53] evaluated drug release rate against variation of GS concentration and the cross-linking degree of chitosan films for 2 weeks in saline buffer pH 7.4. The results showed that a higher starting concentration of drug and a high degree of cross-linking promoted a slower release, and after 14 days, only 20% of the initial concentration was provided in the ambience. On the other hand, a lower initial concentration of GS and a low degree of cross-linking favored a more rapid diffusion in which yielded 70% of the initial drug concentration after 14 days. GS carried by the NRL biomembranes demonstrated a greater release in the first hours in accordance with the results obtained previously by our group [25, 28, 42].

Besides the environment and pH values, structural, morphological and physico-chemical parameters influence GS release in some materials. Van De Belt et al. [54] analyzing GS release in six bone cements with different surface roughness have found a high rate of initial release followed a rapid decrease in all samples in the first 30 h, suggesting that drug release kinetics is controlled by the combination of roughness and porosity of the bone cement surface. Meanwhile, Huang et al. [55] observed that nanoformulation composed of chitosan/fucoidan (polysaccharides derived from brown algae) for carrying GS to the lung obtained a release rate of 77% within the first 10 h and showed an improvement in antimicrobial efficacy without systemic toxic effects when compared to intravenous administration of GS.

**Table 1.** Mechanical resistance measures of NRL biomembranes.

Sample	Maximum Tension (MPa)	Maximum Deformation (mm.mm ⁻¹)	Young Modulus (MPa)
NRL	2.33 ± 0.05	16.61 ± 0.04	0.93 ± 0.03
NRL-GS	3.91 ± 0.06	16.12 ± 0.01	1.45 ± 0.02

One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. There was no statistical difference between the samples NRL and NRL-GS ($p < 0.05$).

3.2. Mechanical resistance

Considering the biomaterial is been developed for dermal purpose, its mechanical properties should be suitable for application. Mechanical resistance showed the degree of deformation and strength of the biomembranes before and after GS incorporation. Besides that, the result exhibited a typical elastomer profile, where it was possible to see that the biomembrane has three regions presenting different mechanical behavior: I – elastic behavior, II – plastic behavior, and III – crystallization induced by the tension. It was also observed a best performance for the biomembrane when GS was present.

The results of Young modulus, which is directly associated with the polymer stiffness, indicated that the maximum tension for the NRL-GS biomembrane composite had 55% increase over the tension for the NRL biomembrane, suggesting that it was due to the embedded GS crystalline aggregates, as physical reinforcing fillers besides as chemical crosslinkers, making the biomembrane more resistant. In addition, it is possible to observe in Table 1 that there was no statistical difference between the NRL and NRL-GS biomembrane in relation to the maximum tension, maximum deformation and Young modulus.

Murbach et al. [28] reported in their experiments that the ciprofloxacin incorporation into the NRL biomembranes changed their mechanical behavior, making it more rigid and fragile. Already, Floriano et al. [56] observed that the mechanical behavior (Young modulus and tensile strength) of the NRL biomembranes were 0.63 MPa and 0.68 MPa, respectively. Garms et al. [29] observed that the addition of antibiotic in the NRL biomembranes increased 1.03 times the elongation at break and the tensile strength reduced in 1.07 times. Herculano [57], by incorporating a protein (albumin) and metronidazole in the NRL biomembranes, did not note any statistically significant differences in mechanical properties of the polymer.

The value of Young modulus of native human skin ranges from 0.01 to 50 MPa [58], while ultimate tensile strength (UTS) of human skin ranges from approximately 1 to 40 MPa. It is known that tensile mechanical properties of skin derive primarily from the collagen fibers in the dermis [59, 60]. Thus, the values of the modulus of elasticity observed for the NRL biomembrane and NRL-GS biomembrane (0.93 and 1.45 MPa) are in accordance with those reported for human skin.

3.3. Fourier Transform Infrared

Figure 4 shows FTIR spectra of the NRL biomembrane, NRL-GS biomembrane and pure GS. For the NRL biomembrane, it was observed characteristic bands of NRL and isoprene functional groups at 2910 cm⁻¹ (CH₂ asymmetric stretching), between

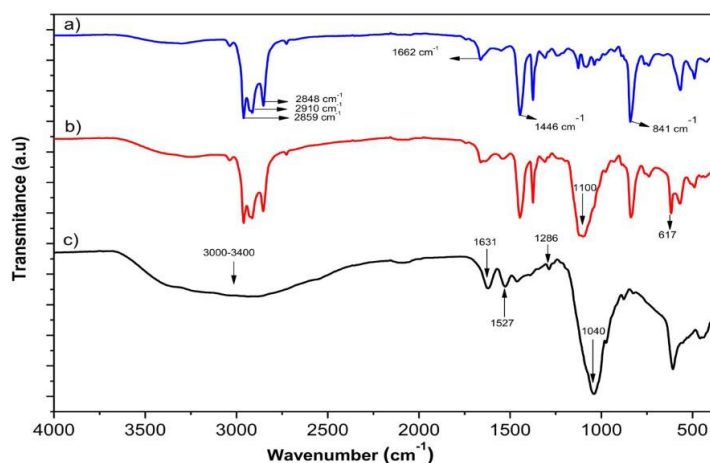


Figure 4. FTIR spectra of (a) NRL biomembrane; (b) NRL-GS biomembrane and (c) GS powder.

2859 cm^{-1} to 2848 cm^{-1} (CH_2 symmetric stretching), 1662 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ stretching), 1446 cm^{-1} (CH_2 deformation) and 841 cm^{-1} ($=\text{CH}$ out-of-plane bending). For pure GS, it was observed absorption bands at 3000-3400 cm^{-1} due to vibration of primary amines elongation (R-NH_2) and secondary (R_2NH), and also due to OH groups, bands 1631 cm^{-1} and 1527 cm^{-1} refer to the bending vibrations of the amine groups (NH) I, II, III, band around 1100-1040 cm^{-1} is related to the axial deformation of the NH and amine tertiary groups (R_3N), and band at 617 cm^{-1} , is a typical band for GS. For the NRL-GS biomembrane, it was observed absorption bands at 1100 cm^{-1} and 617 cm^{-1} , demonstrating GS presence, while absorption bands 2910 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} and 841 cm^{-1} represent the NRL characteristics bands. It is suggested that occurrence of an association between mixture which indicated GS structural integrity incorporation into the NRL [30, 61].

3.4. Scanning Electron Microscopy

SEM technique allowed visualizing the drug distribution on the material and its changes. On applying SEM technique in order to analyze the biomembrane surface, can be seen that: Figure 5(a) shows the drug microstructure, which consists of crystalline particles agglutinated. In Figure 5(b), there is a smooth surface without cracks or pores formation. Figure 5(c), it appears that the drug absorption to the biomembrane it was spread over the surface in reticules, which reinforces pattern shown in release tests where faster release occur due to the drug presence on the biomembrane surface, and stable step with reduced speed, because at that moment the water carries the drug of the inner layers (bulk) of the biomembrane.

Finally, when compared surfaces of pure GS, the NRL biomembrane and NRL-GS biomembrane by SEM analysis, the surfaces exhibited morphological differences, revealing formation of pores (channels), which causes greater fluid exchange between ambience-biomembrane and the drug crystals were dispersed in the matrix. SEM images also showed that it was possible to incorporate GS into the NRL without

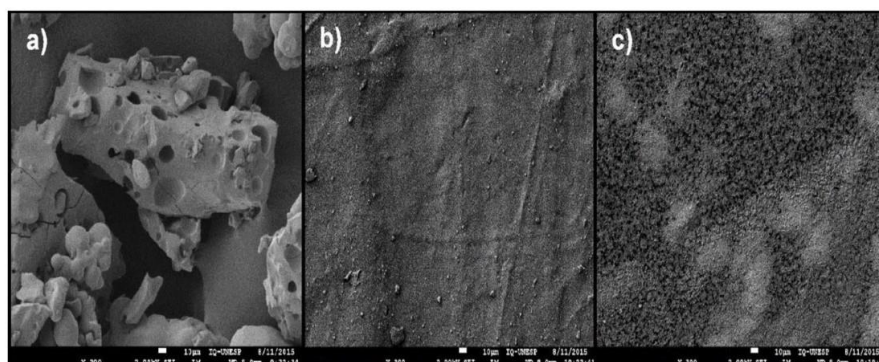


Figure 5. SEM images of (a) GS powder; (b) NRL biomembrane and (c) NRL-GS biomembrane [magnification x300].

Table 2. Antimicrobial activity evaluation of NRL biomembranes.

Sample	Microorganism Tested/Diameter Inhibition Halo (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
NRL biomembrane	12.40 ± 0.90	0.00
NRL-GS biomembrane	28.40 ± 0.50 *	19.5 ± 0.80 *
Reference Disk / GS (10 µg) †	31.00 ± 0.50 *	18.3 ± 0.80 *

One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. The * indicate if there is a significant difference ($p < 0.05$) between the group. † Expected inhibitory halos values to *Staphylococcus* spp and Enterobacteriaceae. **Resistant** ≤ 12 mm; **Intermediary** = 13-14 mm and **Sensitive** ≥ 15 mm (CLSI 2013).

structural modification occurred, having drug crystals been adsorbed on the biomaterial surface [27, 28].

3.5. Biomembranes antimicrobial activity

Disk diffusion test was performed to demonstrate that the drug activity was preserved after being incorporated into the NRL. The choice of *S. aureus* and *E. coli* for evaluation study of the biomembrane antibacterial activity is due to some of the predominant cause of infections and being represented by Gram-positive and Gram-negative species, respectively [62]. Sterilized cellulose discs containing GS (10 µg) were employed as positive control. As expected, positive control group revealed the highest antimicrobial activity. The results presented in Table 2 demonstrated that the biomembranes showed antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922) strain. Moreover, reference disk showed to be statistically different in relation to the NRL and NRL-GS biomembranes against *S. aureus* and statistically similar to the NRL-GS biomembrane against *E. coli*.

It was observed that the NRL biomembrane (12.40 ± 0.90 mm) presented a growth inhibition halo against *S. aureus*. In previous studies, NRL has demonstrated antimicrobial activity against *Candida* spp. and other pathogens due to the presence of hevein, a small cysteine-rich protein, which have strong antimicrobial activity [63].



Figure 6. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: (a) NRL biomembrane; (b) NRL-GS biomembrane and (c) Cellulose disc containing GS.

On the other hand, the NRL biomembrane (0.00 ± 0.00 mm) did not inhibited *E. coli* growth.

The zone of inhibition of the NRL-GS biomembrane (28.40 ± 0.50 mm) and commercial disk with $10 \mu\text{g}$ of GS (31.00 ± 0.50 mm) showed that *S. aureus* are susceptible to concentration of the drug in both cases. For *E. coli*, the NRL-GS biomembrane (19.5 ± 0.80 mm) and commercial disk (18.3 ± 0.80 mm) exhibited the same antimicrobial activity.

The performed test showed that the NRL has ability to release GS and, thus, inhibit the tested microorganism's growth (Figure 6).

So, the two microorganisms tested were susceptible to the NRL-GS biomembrane, being unable to grow in its presence. The results corroborate with studies of the use of the NRL as antibiotic delivery vehicle [29, 31].

Alvarez et al. [64] evaluated nanocomposites dressings of collagen hydro-gels incorporated by GS and rifampicin and observed that GS, even in high doses, does not modify the fibers structure, its rheological behavior, its antibacterial activity and fostering its release for 7 days. Aquino et al. [65] showed antibiotic activity against *S. aureus* using GS loaded micro-systems (micro-particles) of alginate/pectin prepared by supercritical micronization up to 24 days. In their experiments, Singh, Sharma and Dhiman [66] demonstrated the presence of zone of inhibition using hydro-gel dressings (Arabic glue and Carbopol[®]) incorporated with GS against *Staphylococcus* sp.

Phaechamud et al. [31] developed a transdermal patch, where GS was loaded into polymeric blends (NRL/glycerin or triethyl citrate/xanthan gum). The membranes demonstrated good antimicrobial activities against *S. aureus*. Furthermore, they observed an increase in the inhibition zone of the membranes when compared to

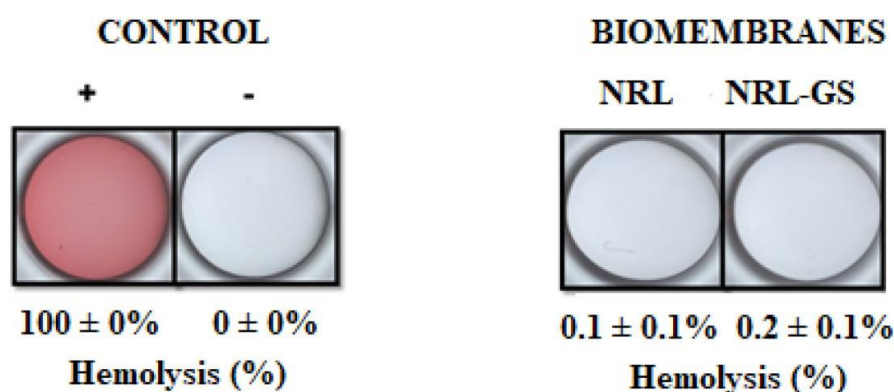


Figure 7. Hemolysis (%) resulting of control groups and the biomembranes incubated.

commercial disks of GS. These results showed that NRL is able to potentiate the action of the incorporated compound.

3.6. Hemolysis assay

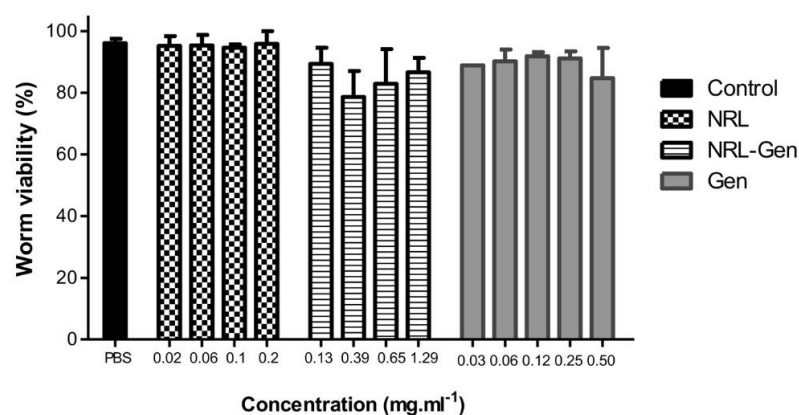
Hemocompatibility of the NRL-GS and NRL biomembranes in red blood cells were evaluated (Figure 7). In positive control group, hemoglobin was released from damaged cells ($100 \pm 0\%$ hemolysis), presenting a reddish color, while in negative control group, there was no hemolytic activity ($0 \pm 0\%$ hemolysis), resulting in a transparent color.

It was considered as non-toxic values up to 5% hemolysis follows considerations to Cesar et al. [67] and Barros et al. [68]. As expected, hemolytic activity of the NRL biomembrane was at $0.1 \pm 0.1\%$, for NRL did not present significant hemolytic activity for 24-hour incubation assays. Similar results were found in the NRL-GS biomembrane ($0.2 \pm 0.1\%$), where this biomaterial did not cause damage to red blood cell membrane. These outcomes are in agreement with others obtained by Floriano et al. [61], which did not observe hemolytic activity in membranes loaded with ketoprofen.

3.7. Evaluation of the toxic effect on *Caenorhabditis elegans*

Beyond to effectiveness, safety assessment is essential in development of new biomaterials. For this, *C. elegans* model was used to investigate the toxicity of biomembranes. There are good evidences supporting invertebrate animal as useful, facile and inexpensive models, because they present high genetic homology and conservation of biological functions such as the innate immune response which are observed between this nematode and mammals with approximately 60 to 80% of genes [38]. Thus, *C. elegans* complements both *in vitro* and *in vivo* mammalian models in toxicology because it allows a high-throughput [39, 41]. Furthermore, *C. elegans* has been used as an animal model to assess the *in vivo* biocompatibility of many biomaterials [69].

The results showed that the eluates of NRL biomembrane, NRL-GS biomembrane and GS solution did not significantly reduce survival of *C. elegans* worms for 24 h at



One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. There was no statistical difference between the worms exposed to NRL, NRL-GS or GS and control group ($p < 0.05$).

Figure 8. Percentage of viability of *C. elegans* worms treated with different concentrations of NRL, NRL-GS and GS for 24 h.

One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. There was no statistical difference between the worms exposed to NRL, NRL-GS or GS and control group ($p < 0.05$).

any of tested concentrations. That is, there was not toxicity demonstrated on worms (Figure 8).

None of the tested concentrations of three treatment groups (NRL, NRL-GS and GS) showed a statistical difference in relation to control group (PBS). The mean and of viability was $95.85 \pm 4.17\%$, $86.65 \pm 4.74\%$ and $84.75 \pm 9.83\%$ to the NRL biomembrane, NRL-GS biomembrane and pure GS solution in the highest concentrations tested.

It is known that pure GS is toxic in high concentrations and when used for a long time period [35], but no degree of toxicity was observed in *C. elegans* in analyzed concentrations in this work.

Even the high concentrations of eluates of NRL-GS biomembrane and GS solution, it was not observed toxicity. However, it is important to note that the eluates of NRL-GS biomembrane reduced larval mobility when compared to control group (Figure 9).

4. Conclusions

In summary, the present study showed that GS has been incorporated into the NRL biomembranes to enhance its biopharmacological aspects, as used in the treatment of skin infections, especially those caused by Gram-negative and Gram-positive microorganisms. It has been noted release of 65.35% of GS by biomembrane in acid ambience up to 64 h, which reinforces its application as a reservoir. FTIR spectra and SEM images suggest GS structure integrity after incorporated into the NRL. Antibacterial activity has shown that *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were sensitive to the NRL-GS biomembrane. Hemolysis assay demonstrated that the NRL and NRL-GS biomembranes did not present hemolytic activity. The analysis of the biomembranes

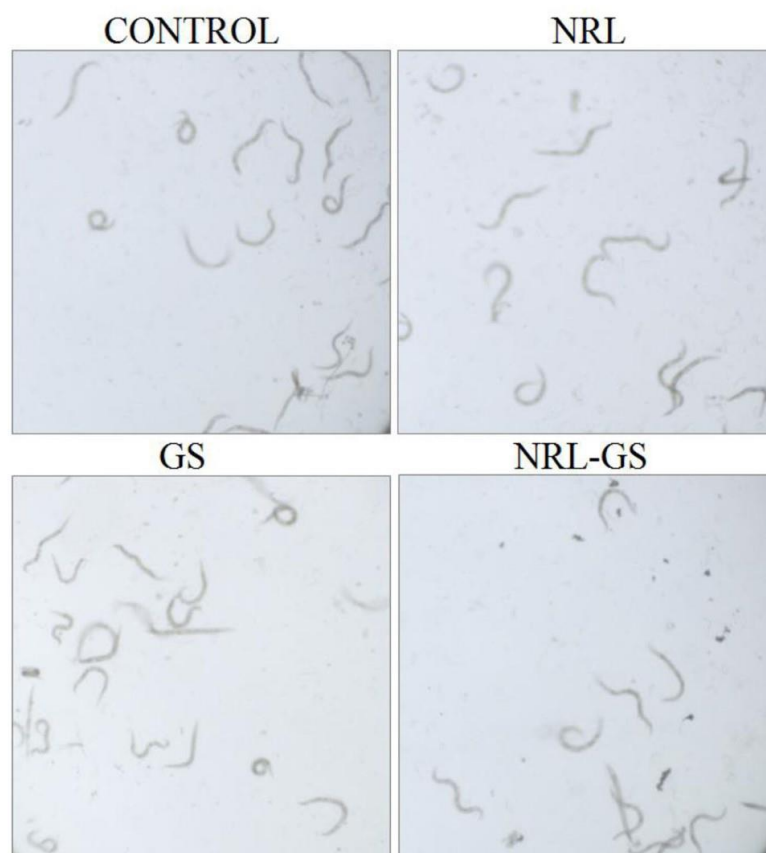


Figure 9. Representative images of *C. elegans* worms: control (PBS), NRL (0.2 mg/mL), NRL-GS (1.29 mg/mL) and GS (0.5 mg/mL) groups after 24 h of treatment.

eluates and pure GS revealed that even in high concentrations, both were not toxic within 24 h in *C. elegans*. Thus, the biomembrane has behaved satisfactorily, showing promising for future studies on dressings development for topical uses, keeping drug antibiotic properties against pathogens and reducing the side effects. Also, this work opens opportunities for studying the use of NRL as a solid support in release of other antibiotics in the treatment of skin infections.

Acknowledgments

We thank all partners and laboratory members for their kind help. The authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP, São Paulo Research Foundation, (Processes: 2011/17411-8 and 2014/17526-8).

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interests.

ORCIDGiovana Sant'Ana Pegorin  <http://orcid.org/0000-0003-3817-8202>**References**

- [1] Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009;17(6):763–771.
- [2] Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, et al. An Economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value Health.* 2018; 21(1):27–32.
- [3] Kim HS, Sun X, Lee JH, et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146:209–239.
- [4] Leong HN, Kurup A, Tan MY, et al. Management of complicated skin and soft tissue infections with a special focus on the role of newer antibiotics. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1959–1974.
- [5] Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg.* 2004;187(5):S65–S70.
- [6] Guo SA, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219–229.
- [7] Esposito S, Noviello S, Leone S. Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(2):109–115.
- [8] Santos WB, Araujo MGS, Silva JC, et al. Surgical wounds infective microbiota: national and international analysis of scientific production. *Rev Sobecc.* 2016;21(1):46–51.
- [9] Swanson T, Keast D, Cooper R, et al. Ten top tips: identification of wound infection in a chronic wound. *Int Wound.* 2015;6(2):22–27.
- [10] Chen W, Palazzo A, Hennink WE, et al. Effect of particle size on drug loading and release kinetics of gefitinib-loaded PLGA microspheres. *Mol Pharm.* 2017;14(2): 459–467.
- [11] Silva JA, Apolinário AC, Souza MSR, et al. Skin administration of drugs: challenges and strategies for the development of transdermal formulations. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2010;31(3):125–131. Portuguese.
- [12] Allen LV, Jr Popovich NG, Ansel HC. *Pharmaceutical forms and drug delivery systems.* Porto Alegre: Artmed; 2013. Portuguese.
- [13] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release.* 2006;113(2):102–110.
- [14] Kang HS, Park SH, Lee YG, et al. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly (gamma-glutamic acid) for biological application: preparation, physical properties, and cytocompatibility. *J Appl Polym Sci.* 2007;103(1):386–394.
- [15] Das S, Baker AB. Biomaterials and Nanotherapeutics for enhancing Skin wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4(82):1–20.
- [16] Silvestro I, Lopreiato M, d'Abusco AS, et al. Hyaluronic acid reduces bacterial fouling and promotes fibroblasts' adhesion onto chitosan 2D-wound dressings. *IJMS.* 2020; 21(6):2070–2085.
- [17] Crucitti VC, Migneco LM, Piozzi A, et al. Intermolecular interaction and solid state characterization of abietic acid/chitosan solid dispersions possessing antimicrobial and antioxidant properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;125:114–123.
- [18] Hussein Y, El-Fakharany EM, Kamoun EA, et al. Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: nanofibers optimization and in vitro bioevaluation. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:667–676.
- [19] Choi J-S, Oh SH, Kim Y-M, et al. Hyaluronic acid/alginate hydrogel containing hepatocyte growth factor and promotion of vocal fold wound healing. *Tissue Eng Regen Med.* 2020;1–8.

- [20] Paulo NM, Lima FG, Siqueira Júnior JT, et al. Seringueira's latex membrane (*Hevea brasiliensis*) with and without polylysine 0.1% and marlex mesh for the reconstruction of iatrogenic abdominal wall defects in rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(4):305–310.
- [21] Silva RG. Eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com extrato de *Stryphnodendron barbatimão* Mart. na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas [dissertation]. Assis (SP): Universidade Estadual Paulista; 2015.
- [22] Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 2004;32(4):157–162.
- [23] Mrué F, Netto JC, Ceneviva R, et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res.* 2004;7(2):277–283.
- [24] Ereno C, Guimaraes SAC, Pasetto S, et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res.* 2010;95A(3):932–939.
- [25] Herculano RD, Guimarães SAC, Belmonte GC, et al. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. *Mat Res.* 2010;13(1):57–61.
- [26] Aiello PB, Borges FA, Romeira KM, et al. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. *Mat Res.* 2014;17(suppl 1):146–152.
- [27] Barros NR, Chagas PAM, Borges FA, et al. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. *J Mater.* 2015;2015:1–7.
- [28] Murbach HD, Ogawa GJ, Borges FA, et al. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. *Int J Biomater.* 2014;2014:1–7.
- [29] Garms BC, Borges FA, Santos RE, et al. Characterization and microbiological application of ciprofloxacin loaded in natural rubber latex membranes. *BJPR.* 2017;15(1):1–10.
- [30] Garms BC, Borges FA, Barros NR, et al. Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(12):4767–4778.
- [31] Phaeachamud T, Issarayungyuen P, Pichayakorn W. Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing. *Int J Biol Macromol.* 2016;85:634–644.
- [32] Korzybski T, Kowszyk-Gindifer Z, Kuryłowicz W. Antibiotics: origin, nature and properties. Poland: Elsevier; 2013.
- [33] Amsterdam D. Antibiotics in laboratory medicine. China: Wolters Kluwer; 2015.
- [34] Musters GD, Burger JW, Buskens CJ, et al. Local application of gentamicin in the prophylaxis of perineal wound infection after abdominoperineal resection: a systematic review. *World J Surg.* 2015;39(11):2786–2794.
- [35] Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006;21(4):444–452.
- [36] Fernandes FP, Costa ACO, Fonseca SGC, et al. [Topical delivery systems: synthesis, characterization and antimicrobial studies]. In: *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros.* Brazil: Foz do Iguaçu; 2009. <https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/1009.pdf>.
- [37] Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Nanotechnology-based polymeric bio(muco)adhesive platforms for controlling drug delivery – properties, methodologies and applications. *Polímeros.* 2014;24(2):203–213.
- [38] Millet AC, Ewbank JJ. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(1):4–9.
- [39] Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(5):387–399.
- [40] Consortium CES. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 1998;282(5396):2012–2018.
- [41] Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci.* 2008;106(1):5–28.
- [42] Romeira KM, Drago BC, Murbach HD, et al. Evaluation of *Stryphnodendron* sp. release using natural rubber latex membrane as carrier. *J Appl Sci.* 2012;12(7):693–697.
- [43] Frutos P, Torrado S, Perez-Lorenzo ME, et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21(6):1149–1159.

- [44] Szaniszló B, Bojita CI. Indirect determination of gentamicin by derivative spectrophotometry. *Acta Med Marisiensis*. 2011;57(5):516–518.
- [45] Saptarini NM, Warya S, Sari ADP, et al. Stability studies of amoxicillin and gentamicin injection in intravenous infusions. *JYP*. 2015;7(3):250–256.
- [46] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard M7-A8. Wayne: CLSI; 2009.
- [47] Borges FA, Filho EDA, Miranda MCR, et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2015;26(17):1256–1268.
- [48] Wood WB. *The nematode Caenorhabditis elegans*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
- [49] International Organization for Standardization (ISO). *Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: ISO; 2009.
- [50] Salazar MJC. *Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos [dissertation]*. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2015.
- [51] Dias BL. *Síntese, caracterização e nanoestruturação de esferas funcionais submicrométricas [dissertation]*. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
- [52] Sarabia-Sainz A, Montfort GRC, Mendoza JL, et al. Formulation and characterization of gentamicin-loaded albumin microspheres as a potential drug carrier for the treatment of *E. coli* K88 infections. *Int J Drug Deliv*. 2012;4(2):209–218.
- [53] Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, et al. *In vitro* gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(2):537–542.
- [54] Van De Belt H, Neut D, Uges DRA, et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials*. 2000; 21(19):1981–1987.
- [55] Huang YC, Li RY, Chen JY, et al. Biphasic release of gentamicin from chitosan/fucoidan nanoparticles for pulmonary delivery. *Carbohydr Polym*. 2016;138:114–122.
- [56] Floriano JF, Neto FC, Mota LSL, et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. *Biomed Phys Eng Express*. 2016;2(4):045007.
- [57] Herculano RD. *Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações biomédicas [dissertation]*. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2009.
- [58] Zhao X, Sun X, Yildirim L, et al. Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing. *Acta Biomater*. 2017;49:66–77.
- [59] Jin G, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011; 7(8):3113–3122.
- [60] Sander EA, Lynch KA, Boyce ST. Development of the mechanical properties of engineered skin substitutes after grafting to full-thickness wounds. *J Biomech Eng*. 2014; 136(5):051008.
- [61] Floriano JF, Barros NR, Cinman JLF, et al. Ketoprofen loaded in natural rubber latex transdermal patch for tendinitis treatment. *J Polym Environ*. 2018;26(6):2281–2289.
- [62] Madoff C, Pereyra F. *Complicações Infeciosas Queimaduras*. In: Kasper DL, Fauci AS (ed.). *Doenças Infeciosas de Harrison*, 2nd ed. Porto Alegre: AMGH; 2015. p. 309–312.
- [63] Kanokwiroon K, Teanpaisan R, Wititsuwannakul D, et al. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses*. 2008;51(4):301–307.
- [64] Alvarez GS, Hélarly C, Mebert AM, et al. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *J Mater Chem B*. 2014;2(29):4660–4670.

- [65] Aquino RP, Auriemma G, Mencherini T, et al. Design and production of gentamicin/dextran microparticles by supercritical assisted atomisation for the treatment of wound bacterial infections. *Int J Pharm.* 2013;440(2):188–194.
- [66] Singh B, Sharma S, Dhiman A. Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: biomedical properties and histological study of wound healing. *Int J Pharm.* 2013; 457(1):82–91.
- [67] Cesar MB, Borges FA, Bilck AP, et al. Development and characterization of natural rubber latex and polylactic acid membranes for biomedical application. *J Polym Environ.* 2020; 28(1):220–230.
- [68] Barros NR, Vieira SCH, Borges FA, et al. Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. *Biomed Phys Eng Express.* 2018;4(3): 035026.
- [69] Liang S, Liu Y, Fu T, et al. A water-soluble and biocompatible polymeric nanolabel based on naphthalimide grafted poly(acrylic acid) for the two-photon fluorescence imaging of living cells and *C. elegans*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;148:293–298.

ANEXO A**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**

Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos
Rodovia BR 153 - KM 338,42 - Bairro Água do Cateto - Ourinhos / S.P.

**Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)****CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto “**AValiação da Eficácia da Biomembrana de Látex Natural Incorporada com Gentamicina na Cicatrização de Feridas Experimentais em Ovinos**”, de responsabilidade do pesquisador **RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pelo CEUA, sob o número de protocolo 022/2018.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'B. Floriano', is written over a horizontal line.

Prof.ª Dra. Beatriz Perez Floriano
Secretária do CEUA