

JOSÉ LÚCIO PÁDUA GEMEINDER

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE GENTAMICINA EM
BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL**

**ASSIS
2016**

JOSÉ LÚCIO PÁDUA GEMEINDER

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE GENTAMICINA EM
BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL**

Dissertação apresentado à Faculdade de
Ciências e Letras de Assis – UNESP –
Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do título de Mestre em Biociências
(Área de Conhecimento: Caracterização e
Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

ASSIS
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

G322d Gemeinder, José Lúcio Pádua
Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação sustentada de gentamicina em biomembranas de látex natural / José Lúcio Pádua Gemeinder. Assis, 2016.
59 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Dr Rondinelli Donizetti Herculano

1. Biomimética. 2. Fármacos. 3. Anti-infecciosos. 4. Materiais biomiméticos. 5. Engenharia biomédica. I. Título.

CDD 610.28

JOSE LUCIO PADUA GEMEINDER

AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DA
GENTAMICINA EMPREGANDO BIOMEMBRANAS DE LÁTEX
NATURAL COMO CARREADOR

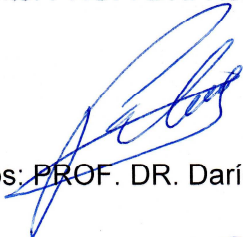
Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP para a obtenção
do título de Mestrado Acadêmico em
Biociências (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 15/03/2016

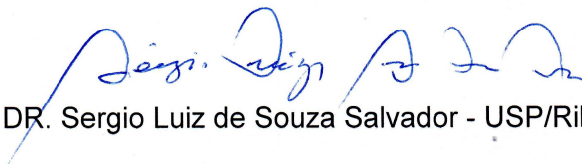
COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROF. DR. Rondinelli Donizetti Herculano - UNESP/Assis



Membros: PROF. DR. Dario Abel Palmieri - UNESP/Assis



PROF. DR. Sergio Luiz de Souza Salvador - USP/Ribeirão Preto

*“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.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por ter aceitado me orientar, pela paciência e sapiência das minhas dificuldades, pelo conhecimento adquirido e pelo novo amigo.

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 Felipe Borges pelo seu apoio e aprendizado em poucos momentos que estivemos juntos.

Aos amigos de sala de aula da Pós, em especial à Vanessa Deprá, Amanda, Janine, Caio, Gabriela e Bruno, aquele abraço e obrigado por suas companhias.

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

Ao meu ex-aluno, afilhado e agora colega de profissão Gabriel pelas conversas e troca de conhecimentos ao longo deste trabalho.

Aos técnicos da FIO: Fabiano, Jéssica, Abílio e Jakson pela colaboração nos trabalhos práticos realizados nesta Instituição.

À Faculdades Integradas de Ourinhos, em nome de seu diretor Prof. Bianor, por todo apoio e incentivo depositado em mim.

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

EPÍGRAFE

*“Sempre fazendo planos para o futuro ...
Sempre sendo surpreendido pelo presente. ”*
(Paulo Coelho)

GEMEINDER, José Lúcio Pádua. **Desenvolvimento e Avaliação de um Sistema de Liberação Sustentada de Gentamicina em Biomembranas de Látex Natural**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

RESUMO

Sistemas de liberação de fármacos são fundamentais para promoção de ações terapêuticas, dentre eles os sistemas transdérmicos que representam uma alternativa frente às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos. Através deste sistema é possível controlar sua liberação e manter a concentração por um longo período. Devido a ascensão da população idosa e das enfermidades que os acometem, o desenvolvimento destes sistemas é primordial para uma melhor adesão e conforto do paciente. Atualmente, diversos polímeros, principalmente os naturais, são usados para este fim. A membrana látex natural (NRL) extraída da seringueira *Hevea brasiliensis*, destaca-se por suas propriedades físicas, por ser um polímero renovável e extensamente utilizado para a produção de biomembranas. Vários estudos demonstraram atividades angiogênicas, de neovascularização, e de reparação tecidual deste biopolímero. O sulfato de gentamicina, um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, inibe o crescimento de vários micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, agindo principalmente na inibição da síntese proteica bacteriana por ligação ribossomal (30S). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo sistema de liberação sustentada incorporando o sulfato de gentamicina ao látex natural, utilizando-o como carreador do fármaco, aumentando a atividade deste biopolímero. Com o intuito de caracterizar as propriedades físico-química das biomembranas, foram utilizados alguns métodos como a microscopia eletrônica por varredura (MEV), resistência mecânica e a espectroscopia por infravermelho (FTIR-ATR), antes e após da incorporação do fármaco. Buscou-se entender o comportamento da taxa de liberação frente aos diferentes meios e verificar a atividade antimicrobiana após incorporação do fármaco no látex. As biomembranas foram preparadas por *casting*, em moldes de teflon®, seguida de secagem à temperatura ambiente. A imagem da MEV demonstrou a incorporação da gentamicina ao látex, observada na superfície da biomembrana. A resistência mecânica mostrou um aumento na tensão máxima com a incorporação da gentamicina quando comparada ao látex puro, apesar de não ter havido alteração no módulo de *Young*, 1,3 – 1,9 Mpa, valores reportados na literatura para NRL. Observou-se que no FTIR-ATR não houve mudança nos espectros após a mistura dos compostos, uma vez que as bandas de absorção foram preservadas e não houve novos picos. Com a liberação do fármaco em diferentes meios, durante 6 dias, foi possível constatar uma variação do *burst release* e do tempo de liberação, no qual destaca-se uma maior liberação em meio ácido e básico devido a uma maior biodisponibilidade de absorção nestes meios. O látex não alterou a atividade antimicrobiana da gentamicina frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, predominante em infecções por queimaduras e feridas, apresentando respectivamente halos de inibição de 28,4 mm e 19,5 mm frente aos 15,0 mm referidos na literatura. Estes resultados reforçam que

o látex pode ser usado como um carreador de fármacos, mostrando ser uma alternativa interessante de curativo/adesivo para uso tópico.

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

GEMEINDER, José Lúcio Pádua. **Development and evaluation of a sustained released system of gentamicin in natural latex biomembranes**. 2016. 59 pp. Master`s dissertation in Bioscience – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

ABSTRACT

Drug delivery systems (DDS) are fundamental to promoting therapeutic actions, including transdermal systems that represent an alternative for pharmacokinetic and pharmacodynamic drugs properties. Through this system it is possible to control its release and to maintain its concentration for a long period. Due to population ageing and the diseases that affect them, the development of these systems is the key to improve compliance and patient comfort. Nowadays, many polymers, especially from natural source are used for this purpose. The natural rubber latex (NRL) extracted from *Hevea brasiliensis* stands out for its physical properties, for being a renewable polymer and widely used for the biomembranes production. Several studies have showed angiogenic and neovascularization activities besides tissue repair of this biopolymer. Gentamicin sulfate, an aminoglycosides class antimicrobial, inhibits the growth of several Gram-positive and Gram-negative microorganisms, acting in the bacterial protein synthesis through ribosomal binding (30S). Therefore, the aim of this study was to develop a new sustained gentamicin sulfate release system using NRL as a drug carrier, increasing the activity of this biopolymer. In order to characterize the biomembranes physicochemical properties, they were analyzed by some methods like scanning electron microscopy (SEM), mechanical strength (by tension) and infrared spectroscopy (FTIR-ATR), before and after the drug incorporation. In addition, it was attempted to understand the release rate behavior among the different media and to verify the antimicrobial activity of the drug after its incorporation into the latex. The biomembranes were prepared by casting on Teflon® mold, and then dried at room temperature. The SEM micrographs proved the incorporation of the gentamicin into the latex, observed at the biomembrane surface. The mechanical strength showed an increase in the maximum stress with the gentamicin incorporation when compared to pure latex, although there have been no change in the Young`s modulus between 1.3-1.9 MPa, values reported in the literature for the NRL. It was observed in the FTIR-ATR that there was no change in the spectra after mixing the compounds, since the absorption bands have been preserved and there were no new peaks. The release of the drug in different media, for 6 days, showed a variation in the time and in the burst release, which highlights a higher release in acid and base media due to a higher absorption bioavailability in these media. The latex did not change the gentamicin antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains, prevalent in burns and wounds infections, showing inhibition halos of 28.4 mm and 19.5 mm against the 15.0 mm literature referred. These results emphasize that the NRL can be used as a drug carrier, showing to be an interesting alternative of a dressing/adhesive for topical use.

Keywords: Natural Rubber Latex. Sustained Release. Antimicrobial Activity. Biomaterial. Drug Release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cultura de <i>Hevea brasiliensis</i> : a) Cultura da seringueira, b) Extração do látex natural	18
Figura 2 -	Monômero de Cis-poliisopreno	19
Figura 3 -	Estímulo da angiogênese com o tratamento das biomembranas de látex natural: a) Controle, b) Tratamento	21
Figura 4 -	Casos de Úlceras Cutâneas Crônicas: Caso 1: a) Aspecto Clínico (A.C.) Inicial, b) A.C. após 3 meses; Caso 2: b) A.C. Inicial, b) A.C. após 30 dias; Caso 3: a) A.C. Inicial, b) A.C. após 2 meses; Caso 4: f) A.C. Inicial - Carcinoma de pele, g) A.C. após retirada do Carcinoma, h) A.C. após 4º dia do uso do biomembrana, i) A.C. após 2 meses do uso do biomembrana, j) A.C. após 4 meses do uso do biomembrana antes do enxerto, k) A.C. 1 semana após o enxerto	22
Figura 5 -	Membrana de látex natural utilizada como barreira mecânica: a) Técnica com o local da cirurgia e as regiões; b) Radiografias digitais do grupo tratado (A) e Grupo controle (B)	23
Figura 6 -	a) Ilustração Comercial da Gentamicina, b) Estrutura da Gentamicina	26
Figura 7 -	Látex Pré-vulcanizado da <i>Hevea brasiliensis</i>	29
Figura 8 -	Sulfato de Gentamicina Pó	30
Figura 9 -	Preparo das Biomembranas: a) Biomembrana no molde, b) Forma da Biomembrana seca, c) Espessura da Biomembrana 1,5mm, d) Flexibilidade e Elasticidade da Biomembrana	31
Figura 10 -	Máquina de Ensaio Mecânico EMIC DL 2000.....	32
Figura 11 -	Biomembranas para Ensaio: a) Biomembranas antes do ensaio, b) Biomembrana após ensaio	33
Figura 12 -	Equipamento de FTIR Bruker Tensor 27 com acessório ATR.....	34
Figura 13 -	Método de Difusão de Discos em Ágar: a) Zona (halo) de Inibição – sensibilidade/resistência, b) Ausência de Halo – resistência	35
Figura 14 -	Liberação de Fármacos em Matrizes Inertes	37
Figura 15 -	a) Espectro de Absorção da Gentamicina, b) Curva de Calibração	38
Figura 16 -	Curva de Liberação do Sulfato de Gentamicina pelas Biomembranas de Látex em Diferentes Meios	39

Figura 17 -	Ensaio de Resistência Mecânica: a) Parte Linear Referente ao Módulo de Young, b) Curva Tensão x Deformação Específica	41
Figura 18 -	Espectro FTIR – Espectros Estratificados: a) Látex, b) Látex + Sulfato de gentamicina 30 mg/mL, c) Sulfato de Gentamicina	44
Figura 19 -	Imagem de MEV da Gentamicina em Pó (ampliação de 300 vezes)	45
Figura 20 -	Imagem de MEV da Biomembrana de Látex Natural Puro (ampliação de 300 vezes)	45
Figura 21 -	Imagem de MEV da Biomembrana de Látex Natural Incorporada com Gentamicina (ampliação de 300 vezes)	46
Figura 22 -	Resultados dos Testes Microbiológicos com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> em Triplicata: a) Biomembrana de látex; b) Biomembrana de látex + gentamicina; c) Disco difusão/referência com 10 µg de gentamicina.	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Polímeros sintéticos e naturais utilizados na fabricação de sistemas de liberação sustentada	16
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medidas da resistência mecânica	42
Tabela 2	Avaliação da atividade antimicrobiana da biomembrana.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Látex Natural	17
1.2 Emprego da Biomembrana de Látex Natural na Liberação Sustentada	23
1.3 Sulfato de Gentamicina	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Látex – <i>Hevea brasiliensis</i>	29
3.2 Sulfato de Gentamicina	29
3.3 Biomembranas Carreadoras do Sulfato de Gentamicina	30
3.4 Liberação do Sulfato de Gentamicina Carreado pela Biomembrana de Látex Natural	31
3.5 Ensaio de Resistência Mecânica – Tração	32
3.6 Espectroscopia por Infravermelho (FTIR-ATR)	33
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.8 Avaliação da Atividade Antibacteriana da Biomembrana	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Liberação do Sulfato de Gentamicina	37
4.2 Ensaio de Resistência Mecânica	41
4.3 Espectroscopia por Infravermelho (FTIR-ATR)	43
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.5 Avaliação da Atividade Antibacteriana da Biomembrana	46
5. CONCLUSÃO	50
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	52
7. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

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 nas terapias existentes (ANSEL et al., 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 as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos (SILVA et al., 2010)

Uma das vantagens de tal método consiste na capacidade de controlar a liberação do fármaco, com o intuito de manter a concentração desejada da droga durante um longo período de tempo sem atingir a concentração tóxica ou não alcançar o efeito terapêutico esperado (GINEBRA, TRAYKOVA, PLANELL, 2006).

Usadas como remédio há milhares de anos, as plantas representam um grande potencial de reserva natural de drogas, ainda inexplorados (MELO-REIS et al., 2010). Como exemplo desta reserva, configuram-se as florestas tropicais, o que denota seu grande potencial para encontrar compostos ativos, todavia apenas 1% das suas espécies foram investigadas pelo seu potencial farmacêutico (GURIB-FAKIM, 2006).

Inúmeros materiais, naturais ou sintéticos, são testados constantemente como sistemas carreadores de drogas e apresentam características próprias para manter a droga inserida e liberá-la em um sítio específico, progressivamente ou não (GINEBRA, TRAYKOVA, PLANELL, 2006). Atualmente, diversos polímeros sintéticos e naturais são utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (Quadro 1). Esses dispositivos são projetados para terem propriedades cada vez mais específicas e adequadas ao fármaco a ser empregado e ao sítio a ser atingido (KANG et al., 2006).

Quadro 1 - Polímeros sintéticos e naturais utilizados na fabricação de sistemas de liberação sustentada.

POLÍMEROS SINTÉTICOS	POLÍMEROS NATURAIS E SEUS DERIVADOS
Polímeros não biodegradáveis: _ Acrilatos: poli (metacrilato de metila) (PMMA), poli (ácido acrílico) (PA), poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA); _ Acrilamidas: poliacrilamida, poli (N-isopropilacrilamida); _ Polidimetilsiloxano (PDMS); _ Polietilenoglicol (PEG); _ Copolímeros de acetato de etilenovinila (EVA); _ Polivinilpirrolidona (PVP). Polímeros biodegradáveis: _ Poliésteres: poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-ϵ-caprolactona (PLC), poli (diaxanona) (PDS); _ Polioortoésteres; _ Polifosfazenos; _ Polianidridos; _ Poliuretanas; _ Poliaminoácidos sintéticos.	Polímeros de base proteica: _ Gelatina, albumina, colágeno, fibrina, proteína de soja. Polissacarídeos: _ Quitosana, dextrana, alginato, agarose, carragenina, sulfato de condroitina, ácido hialurônico, pectina, amido, derivados de celulose, celulose bacteriana. Polihidroxicanoatos: _ Poli (3-hidroxiбутирато), poli (3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато), cis- poliisopropeno (látex).

Fonte: MIRANDA, 2014.

Utilizado há tempos pelas indústrias, o látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (*H. brasiliensis*), se insere neste contexto como um carreador de fármaco. Em 1996, foi relatado o primeiro resultado experimental do uso da biomembrana de látex da seringueira como substituto do esôfago cervical de cães (PAULO et al., 2005). Além disso, biomembranas produzidas deste biomaterial foram empregadas em próteses e enxertos médicos, devido às suas características de biocompatibilidade (SILVA, 2015), cicatrização (FRADE et al., 2004), estímulo natural à angiogênese (MRUÉ et al., 2004) e crescimento ósseo (ERENO et al., 2010).

O látex natural da *H. brasiliensis*, por defesa natural da planta é um cicatrizante. Detém notórias características físicas, por ser um material polimérico renovável e é extensamente utilizado para produção da biomembrana (película fina) (PAULO et al., 2005).

Com o intuito de aumentar a atividade cicatrizante da biomembrana de látex natural, o antibiótico gentamicina foi incorporado a este biopolímero. A gentamicina é indicada para o tratamento de meningite purulenta, pielonefrite, otite, infecções cutâneas, entre outros (MOULDS, JEYASINGHAM, 2010). Desta forma, foi desenvolvido um novo sistema de liberação sustentada eficaz que proporcionasse a liberação da gentamicina no sítio a ser tratado por períodos prolongados e em doses apropriadas.

A associação de fármacos em matrizes de látex natural é algo novo e de profunda relevância à pesquisa, pois a partir de simples modificação na morfologia do material, torna-se possível alterar o perfil da cinética de liberação *burst release* (curta duração), além do processo de liberação lenta (perfil estável), e o tempo de liberação.

1.1. Látex Natural

Pertencente ao gênero *Hevea* (família Euphorbiaceae), a seringueira é considerada a espécie mais importante das 11 existentes, de aspecto rústico e adaptável a grande parte do território nacional, caracterizada como uma espécie arbórea de rápido crescimento (GONÇALVES et al., 2002; CARMO et al., 2003). O cultivo da *H. brasiliensis* (Figura 1) é a mais explorada comercialmente, aplicada em praticamente todos os ramos da atividade humana (farmacêutica, brinquedos, revestimentos, dentre outras) (GOMES, SPERANDIO, CALDEIRA, 2012). Seu cultivo tem como destaque as Regiões Sudeste, Centro-Oeste, o Estado da Bahia e também no oeste do Paraná. Tem origem tropical, com longo ciclo de vida, cultivada e utilizada de modo extrativo, com o objetivo de produção de borracha natural (CAMPELO JUNIOR, 2000; SANTOS, 2014).

Figura 1 - Cultura de *Hevea brasiliensis*: a) Cultura da seringueira, b) Extração do látex natural.



Fonte: Figura a: *Hevea brasiliensis* seed (2015), Figura b: *Hevea* (2015).

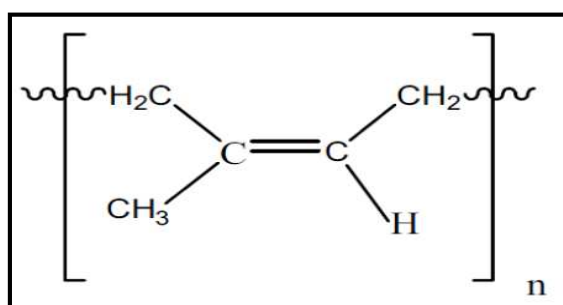
Até a década de 50, o Brasil era considerado como um dos principais produtores e exportadores de borracha no mundo, sendo que atualmente produz somente cerca de 1% da produção mundial. Entretanto, tenta se recuperar com a produção do Estado de São Paulo, considerado como o maior produtor do país (AGOSTINI, 2013).

A borracha natural é obtida por coagulação do látex da seringueira, uma importante matéria-prima agrícola renovável, essencial para a manufatura de vários produtos destinados a uso humano, considerado, junto com o aço e petróleo (matérias-primas não renováveis), um dos responsáveis pelo progresso da humanidade (AGOSTINI, 2008).

O látex extraído tem características de um sistema complexo, de uma polidispersão coloidal no qual as partículas carregadas negativamente são suspensas em soro. Composta predominantemente por dois tipos de partículas: de borracha e os lutóides; destaca-se também o soro, que contém proteínas aniônicas e sais minerais que conferem estabilidade coloidal ao sistema (RIPPEL, LEITE, GALEMBECK, 2002).

As partículas de borracha são constituídas pelo polímero poli (*cis*-1,4-isopreno) (Figura 2), com características únicas devida a sua forma intrínseca, alta massa molar, lipídios e minerais presentes no látex. Inúmeras plantas são capazes de produzirem látex, contudo o látex da *H. brasiliensis*, se torna a única fonte comercial importante de borracha natural. Por ser um material estratégico, não pode ser substituída por borracha sintética em muitas aplicações, devido a dois principais fatores: a) suas propriedades particulares (elasticidade, flexibilidade, resistência à abrasão, ao impacto e à corrosão, fácil adesão a tecidos e aço e impermeabilidade, propriedades isolantes de eletricidade, impermeabilidade a líquidos e gases, capacidade de dispersar calor e maleabilidade a baixas temperaturas); b) relação de preço versus desempenho das borrachas sintéticas que se equiparem à borracha natural (BRAGANÇA, 2009).

Figura 2 - Monômero de Cis-poliisopreno.



Fonte: NEVES JUNIOR, 2006

Uma das propriedades naturais na planta é a defesa, fato que proporciona ao látex um efeito cicatrizante. Devido a esta característica, tem demonstrado ser um biomaterial promissor quando utilizado como implantes, em diferentes tecidos, em diferentes espécies, o que justifica a realização de novas pesquisas nesta área. Alguns experimentos revelaram que a biomembrana de látex detém propriedades bioquímicas capazes de mediar o processo de reparação tecidual, sem necessitar de técnicas complexas para sua confecção e manuseio, o que destaca o produto como novo material de fonte biológica (ZIMMERMANN et al., 2007).

A pré-vulcanização do látex produz uma biomembrana reticulada e, assim, as propriedades físicas do produto final podem ser controladas pelas ligações cruzadas durante secagem. Experimentos demonstraram que a velocidade de reação depende

dos sistemas de vulcanização, e o grau da pré-vulcanização tem um grande efeito sobre a formação do filme de látex (SANGUANSAP et al., 2005).

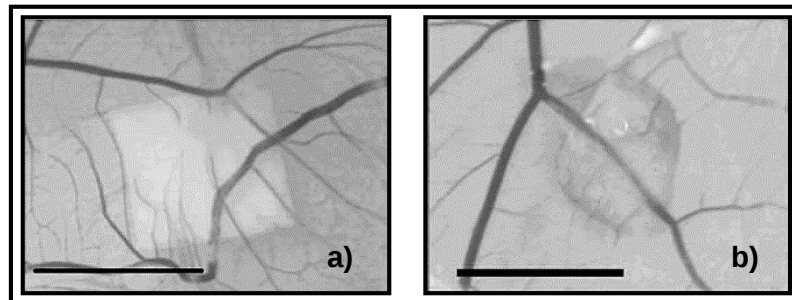
Embora, algumas proteínas específicas, encontradas em alguns produtos deste material, e/ou produtos químicos utilizados na polimerização possam desencadear reações alérgicas (SUSSMAN, BEEZHOLD, KURUP, 2002; NEVES JUNIOR et al., 2006), no processo de preparação das biomembranas, centrifuga-se o látex para a remoção destas proteínas e a vulcanização ocorre a temperatura ambiente sem uso de aditivos químicos (HERCULANO, 2009; HERCULANO et al., 2010).

Pesquisas realizadas por Frade et al. (2011) para verificar possíveis reações alérgicas ao látex, demonstraram que a biomembrana de látex é segura como curativo para úlceras cutâneas, pois não induziu a reações de hipersensibilidade entre os voluntários submetidos ao *patch test*, nem entre os usuários da biomembrana vegetal, como demonstrado clínica e imunologicamente.

Além dos relatos sobre substituição parcial de tecidos, a biomembrana apresenta atividade de angiogênese, 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. Todavia, também está envolvida no desenvolvimento de tumores, retinopatia diabética e aterosclerose (MELO-REIS et al., 2010).

Seu mecanismo de regulação ainda requer estudos mais intrínsecos. Algumas moléculas angiogênicas, como fatores de crescimento, são conhecidos por estimular a proliferação celular, embora muitas questões permanecem sem respostas, como ativar e regular a angiogênese normal e anormal, (Figura 3) (FERREIRA et al., 2009).

Figura 3 - Estímulo da angiogênese com o tratamento das biomembranas de látex natural: a) Controle, b) Tratamento



Fonte: FERREIRA et al., 2009

Em 2003, Oliveira et al. através da miringoplastia, cirurgia com a finalidade de controlar a infecção no ouvido médio, e reconstruir o mecanismo de transmissão sonora para a janela oval e proteger a janela redonda, comprovaram que o uso de uma biomembrana de látex natural com polilisina, como um implante transitório para o fechamento da perfuração da membrana timpânica, merece uma significativa atenção, pois em 90,5% das orelhas (181) tiveram aceitação do enxerto.

Frade et al. (2004), demonstraram a evolução do tratamento feito com a biomembrana de látex natural em 4 casos de úlceras cutâneas crônicas de diferentes causas em pacientes diabéticos com dificuldades de cicatrização. Os resultados evidenciaram seu potencial desbridante e neoangiogênico, o que tornou o processo de cicatrização rápido e dinâmico, fundamental nestes casos, além de ser um curativo eficaz, econômico e de fácil manuseio (Figura 4).

Figura 4 - Casos de Úlceras Cutâneas Crônicas: **Caso 1:** a) Aspecto Clínico (A.C.) Inicial, b) A.C. após 3 meses; **Caso 2:** c) A.C. Inicial, d) A.C. após 30 dias; **Caso 3:** e) A.C. Inicial, f) A.C. após 2 meses; **Caso 4:** g) A.C. Inicial - Carcinoma de pele, h) A.C. após retirada do Carcinoma, i) A.C. após 4º dia do uso do biomembrana, j) A.C. após 2 meses do uso do biomembrana, k) A.C. após 4 meses do uso do biomembrana antes do enxerto, l) A.C. 1 semana após o enxerto.



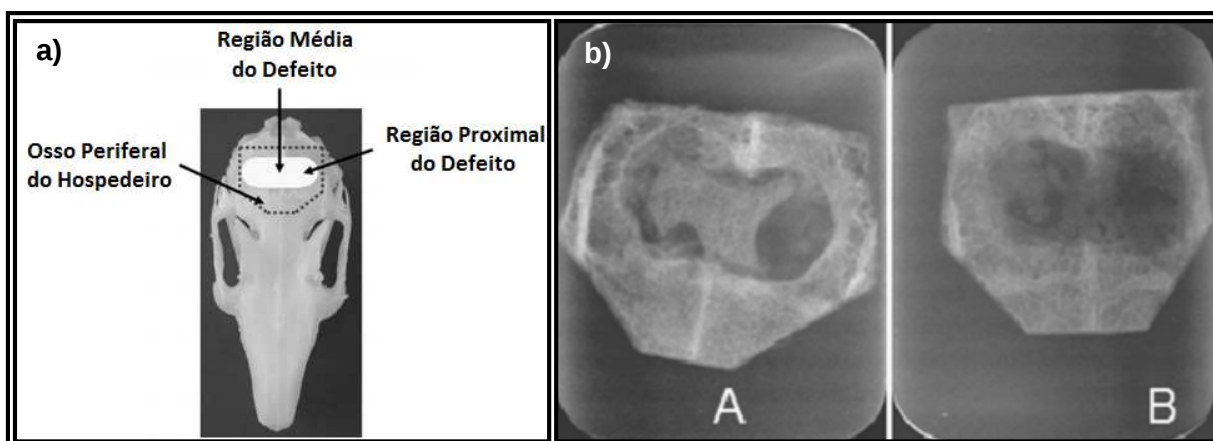
Fonte: FRADE, 2004

Segundo Paulo et al. (2005), ao compararem o implante da biomembrana de látex da seringueira sem e com polilisina 0,1% e a tela de polipropileno (Marlex®) na reparação de defeitos abdominais iatrogênicos em ratos, observou-se a formação de tecido conjuntivo fibroso, similar ao observado no grupo que recebeu o Marlex®. Outras alterações notadas foram aderências viscero-parietais em todos os grupos avaliados, o que levou a concluir que a biomembrana de látex da seringueira com e

sem polilisina a 0,1%, quando utilizada para reconstrução de defeitos abdominais em ratos, deixa uma base fibrosa de reparação, similar à observada após a implantação da tela de polipropileno.

Ereno et al. (2010) avaliaram o uso de membranas de látex na regeneração óssea. Neste experimento, as membranas foram aplicadas sobre a fratura óssea impedindo a migração do tecido epitelial e conjuntivo, facilitando a migração de células ósseas regenerativas. A Figura 5a, mostra a técnica da cirurgia e suas regiões, e a Figura 5b mostra as radiografias digitais do grupo tratado (A) e do grupo controle (B) 120 dias após a cirurgia.

Figura 5 - Membrana de látex natural utilizada como barreira mecânica: a) Técnica com o local da cirurgia e as regiões; b) Radiografias digitais do grupo tratado (A) e grupo controle (B)



Fonte: ERENO et al., 2010

Estes trabalhos demonstraram que o látex natural é eficaz na reconstituição tecidual e óssea, tornando este material um excelente candidato em aplicações como matriz sólida na liberação sustentada de substâncias de interesse farmacológico, principalmente em aplicações regenerativas.

1.2. Emprego da Biomembrana de Látex Natural na Liberação Sustentada

O desenvolvimento e estudos de novos sistemas de liberação sustentada de fármacos tem projetado o látex natural como alvo de grande interesse para este fim. Herculano et al. (2009) estudaram a utilização do látex natural como suporte polimérico para um sistema de liberação sustentável de metronidazol. Neste trabalho

foi observado que a quantidade de fármaco liberada pode variar com o controle da densidade de poros na superfície da membrana, obtida a partir da utilização de baixas temperaturas durante a confecção das membranas funcionalizadas com o fármaco. Desta forma, Herculano et al. (2009) propuseram a utilização do látex natural como sistema de liberação sustentada variável às necessidades de cada paciente.

Pichayakorn et al. (2012a) através de ensaios da liberação tópica de nicotina por membranas de látex natural, demonstraram que o látex é eficaz na liberação de nicotina por períodos de 24 horas.

Guidelli et al. (2013), observaram em seus estudos, a liberação de nanopartículas de prata por até 48 horas, no qual o látex natural foi empregado como matriz sólida na liberação sustentada.

Trecco et al. (2014) e Borges et al. (2014) identificaram a liberação de mais de 80% de extrato natural da *Casearia sylvestris* incorporado ao látex natural, em suas análises, modificando os valores de pH da solução e o método de dissolução do extrato, respectivamente.

Murbach et al. (2014) demonstraram com seus experimentos a liberação sustentada da ciprofloxacina por um período de até 170 horas, utilizando o látex natural como matriz polimérica sólida para este tipo de liberação.

Com base nestes referenciais pode-se concluir que o látex natural extraído da seringueira *H. brasiliensis* pode ser utilizado como matriz sólida na liberação de diferentes tipos de substâncias.

Avaliações realizadas com a incorporação do diclofenaco de sódio em látex da *H. brasiliensis*, usado como carreador de fármaco nos sistemas de liberação sustentada, demonstraram que o composto não sofreu nenhuma modificação físico-química e estrutural, bem como uma liberação prolongada, evidenciando seu uso com um futuro promissor no emprego em processos anti-inflamatórios localizados (AIELO et al., 2014).

Acerca destas citações, a biomembrana preparada a partir do látex natural da seringueira *H. brasiliensis* mostra-se como uma matriz para um sistema de liberação sustentada, evidenciando resultados promissores em aplicações biomédicas, além de suas propriedades farmacológicas, em particular na aplicação em úlceras e ferimentos (SUSSMAN, BEEZHOLD, KURUP, 2002; HERCULANO, 2009; MURBACH et al., 2014).

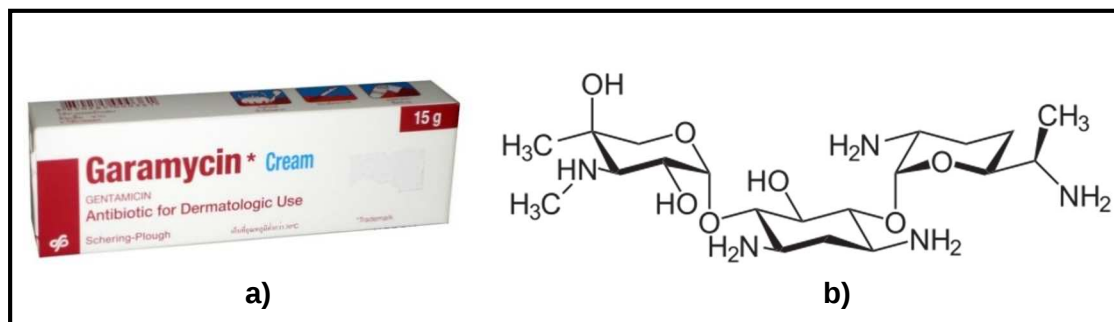
1.3. Sulfato de gentamicina

O sulfato de gentamicina ($C_{21}H_{43}O_7$) é um complexo de aminoglicosídeo produzido por fermentação de *Micromonospora purpurea* ou *M. echinospora*, utilizado como o sal de sulfato (ROSENKRANTZ et al., 1981; MERK, 2000). Trata-se de um antibiótico de largo espectro e que apresenta sua ação por inibir o crescimento de uma vasta variedade de micro-organismos 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.* (USP, 2006; KORZYBSKI, KOWSZYK-GINDIFER, KURYLOWICZ, 2013).

Os antibióticos aminoglicosídeos, desde sua descoberta na década de 40, fazem parte de um importante acervo terapêutico antibacteriano. A partir do isolamento da estreptomicina em 1943, em uma cepa de *Streptomyces griseus* que produzia uma substância que inibia o crescimento de diversos micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, inclusive do bacilo da tuberculose, foi possível isolar inúmeras novas substâncias com potencial antibacteriano (OLIVEIRA, CIPULLO, BURDMANN, 2006). Os aminoglicosídeos recebem este nome por serem compostos basicamente por açúcares aminados e resultam em um pKa superior a 9,0 (ALMEIDA, WAGNER, 2014).

O sulfato de gentamicina inibe a síntese proteica bacteriana por ligação à subunidade ribossomal 30S, levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, ocasionando a morte celular (KORZYBSKI, KOWSZYK-GINDIFER, KURYLOWICZ, 2013; AMSTERDAM, 2015). Tal produto é altamente solúvel em água (50 mg/mL), praticamente insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos, estável à temperatura ambiente e em pH 6 a 8, possuindo estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral dificultando sua penetração intracelular (ROSENKRANTZ et al., 1981; OLIVEIRA, CIPULLO, BURDMANN, 2006; MARTINDALE, 2011). A Figura 6 ilustra o fármaco comercial e a estrutura do sulfato de gentamicina.

Figura 6 - a) Ilustração Comercial da Gentamicina, b) Estrutura da Gentamicina



Fonte: **Figura a:** GARAMYCIN, 2015, **Figura b:** GENTAMICIN SULFATE, 2015

Devido a estas características, sua ação antimicrobiana ocorre sobretudo em meio aeróbio e em pH alcalino, dado que requer oxigênio para o transporte ativo nas células microbianas sendo mais ativo em meio alcalino do que ácido (OLIVEIRA, CIPULLO, BURDMANN, 2006).

Pode ser utilizada no tratamento de infecções do trato biliar, endocardite, meningite, otites média e externa, septicemia, infecções de pele causadas por queimaduras ou devido a úlceras (causadas por *Pseudomonas spp.* e outros organismos Gram negativos), infecções do trato urinário (pielonefrite aguda). 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, 2015).

Como desvantagem, o sulfato de gentamicina, quando utilizado em altas concentrações e por um longo período de tempo, promove sérios problemas de toxicidade. Decorrente de sua absorção por meio intracelular, seus efeitos tóxicos mais relevantes são nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular (OLIVEIRA, CIPULLO, BURDMANN, 2006).

Todavia, seu uso se faz importante pelo amplo espectro de ação diante das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e baixo custo em relação a outras classes de antimicrobianos de igual efetividade (ALMEIDA, WAGNER, 2014).

O sistema de absorção percutânea advém de 1965, quando Stoughton conceituou este processo. O modelo de liberação controlada de fármaco por meio transdérmico, tem o objetivo de atingir a corrente sanguínea através da pele ou uma ação local, contrastando diretamente com as formas farmacêuticas de uso tópico, nas quais a permanência do fármaco na pele é desejada. Assim, tanto o dispositivo de

liberação do fármaco quanto as propriedades da pele servem como mecanismo de controle sobre a velocidade de liberação (ANSEL et al., 2013).

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).

Em consequência do seu amplo espectro de ação, o aminoglicosídeo sulfato de gentamicina, configura-se como um dos antibióticos mais extensamente utilizados em dispositivos de liberação controlada, além de sua solubilidade e estabilidade em altas temperaturas (FERNANDES et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver um novo sistema de liberação sustentada incorporando o sulfato de gentamicina ao látex natural, utilizando-o como carreador (carregador) do fármaco.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar e quantificar a liberação do sulfato de gentamicina carreado pela biomembrana de látex natural;
- Avaliar a resistência mecânica das biomembranas de látex natural;
- Caracterizar de forma química e estrutural as biomembranas, utilizando a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) e a Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV);
- Avaliar e caracterizar a interação da gentamicina em biomembranas de látex natural, para entender o comportamento da taxa de liberação frente a diferentes meios;
- Avaliar a atividade microbiológica da gentamicina quando incorporada ao látex natural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Látex – *Hevea brasiliensis*

O látex natural da *H. brasiliensis* empregado neste projeto foi adquirido da empresa **BDF-Látex** (Comércio e Revenda de Látex Natural) da cidade de Guarantã/SP e que apresentou os seguintes dados analíticos: Sólidos totais = 61; borracha seca-DRC = 60; diferença entre sólidos totais e borracha seca = 1,00; NH₃ = 0,71; pH = 10,2; viscosidade = 30 seg.; estabilidade mecânica = 515; VFA (números de ácidos graxos voláteis) = 0,0136; cor e odor = normais). Para manter o látex em estado líquido foi adicionado amônia, mantendo o pH em torno de 10,0. O material foi centrifugado a 8000g com a finalidade de reduzir proteínas presentes no látex que possam ocasionar reações alérgicas (Figura 7).

Figura 7 - Látex pré-vulcanizado da *H. brasiliensis*



Fonte: Arquivo Pessoal

3.2. Sulfato de Gentamicina

A matéria-prima, sulfato de gentamicina (Figura 8) foi adquirida da empresa Henrifarma – Distribuidora de Insumos Farmacêuticos, estabelecida na cidade de São Paulo/SP, autorizada e licenciada pela ANVISA, seguindo normas de qualidade e BPM (Boas Práticas de Manipulação) inspecionadas por este órgão.

Figura 8 - Sulfato de gentamicina pó



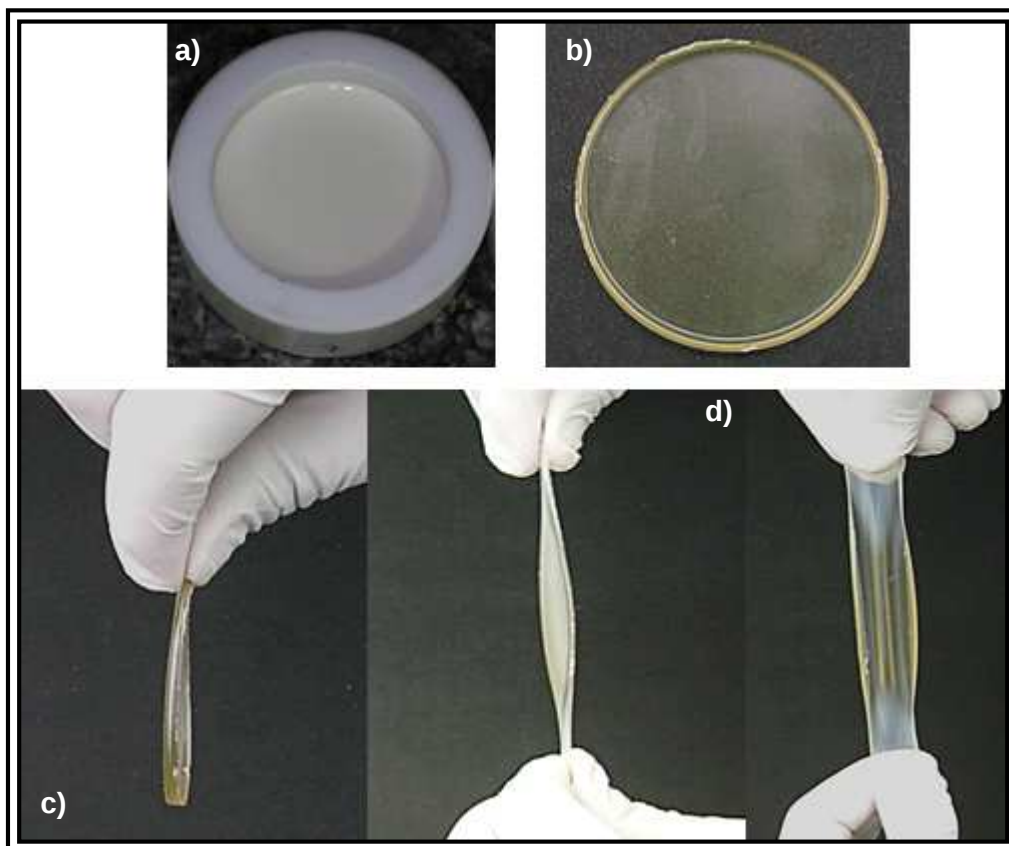
Fonte: Arquivo Pessoal

3.3. Biomembranas Carreadoras do Sulfato de Gentamicina

As biomembranas foram preparadas por *casting*, através de simples deposição, seguida de secagem a temperatura ambiente (Figura 9), no Laboratório da Farmácia Escola das Faculdades Integradas de Ourinhos.

- Biomembrana Controle: preparada através da mistura de 4,0 mL de látex e 2,0 mL de água purificada, depositada em molde de teflon® de formato redondo com diâmetro de 50,0 mm, obtendo biomembranas com espessura de $1,5 \pm 0,1$ mm, após secagem em temperatura ambiente.
- Biomembrana com Sulfato de Gentamicina: preparada através da mistura de 4,0 mL de látex e 2,0 mL de água purificada com sulfato de gentamicina. No preparo do composto água purificada com sulfato de gentamicina, foram pesados 180 mg deste ativo e posteriormente dissolvidos na água, perfazendo 30 mg/mL. Após a homogeneização de todos os componentes a solução foi depositada em molde de teflon® de formato redondo de 50,0 mm, obtendo biomembranas com espessura de $1,5 \pm 0,1$ mm, seguido de secagem em temperatura ambiente.

Figura 9 - Preparo das Biomembranas: a) Biomembrana no molde, b) Forma da biomembrana seca, c) Espessura da biomembrana 1,5 mm, d) Flexibilidade e elasticidade da biomembrana



Fonte: Arquivo Pessoal

3.4. Liberação do Sulfato de Gentamicina Carreado pela Biomembrana de Látex Natural

A técnica de espectroscopia óptica (UV-VIS) foi empregada para avaliar a liberação sustentada da gentamicina, onde foram coletadas alíquotas da solução na qual as biomembranas ficaram imersas em distintos intervalos de tempos, e analisadas no comprimento de onda de 250 nm. O equipamento utilizado para a leitura foi o espectrofotômetro **SP2000-UV, BEL Photonics®** do Laboratório de Análises Clínicas das Faculdades Integradas de Ourinhos, durante 145 horas, retornando esta alíquota ao final de cada ensaio. Os dados foram compilados utilizando o software de estatística OriginPro 8 SR4®, da OriginLab Corporation.

O ensaio de liberação procedeu em sistema estático (sem circulação), após vulcanização das biomembranas incorporadas com a gentamicina. Béqueres distintos foram imersos em 100,0 mL contendo respectivamente, solução tampão Na_2HPO_4 /

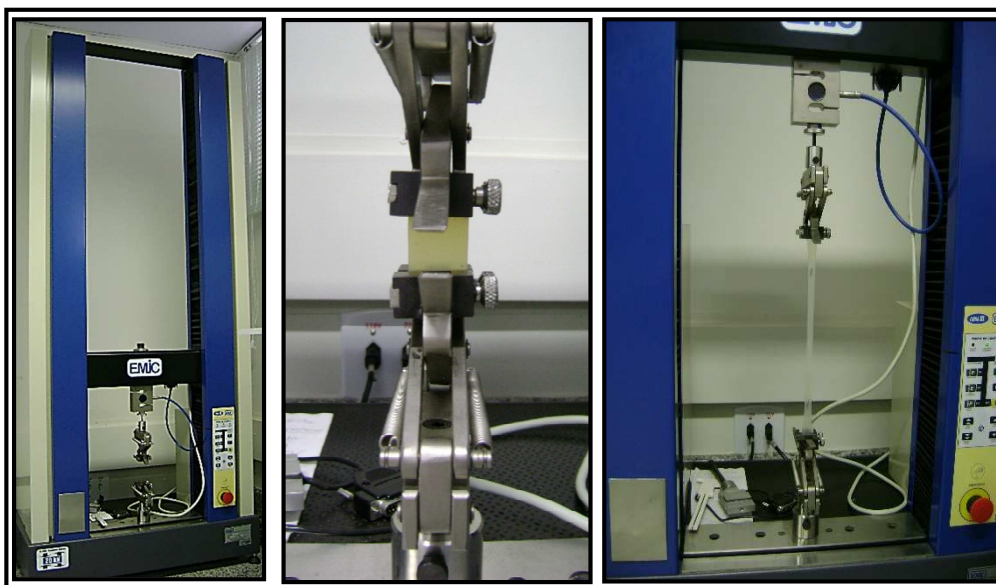
NaH_2PO_4 0,1M com valores de pH: 5,7, 7,0 e 8,0, água destilada e solução fisiológica 0,9%. Com a finalidade de reduzir a interferência de contaminantes fúngicos, foi acrescentado 0,05% v/v de azida sódica (NaN_3), (Dinâmica®).

3.5. Ensaio de Resistência Mecânica – Tração

Cada material possui características próprias de dureza, fragilidade, resistência, impermeabilidade, elasticidade, condução de calor. Estas propriedades estão relacionadas à natureza das ligações que existem entre os átomos, seja ele metálico ou não-metálico. Essas características podem ser reunidas em dois grupos: propriedades físicas e propriedades químicas, designando assim seu comportamento.

Os ensaios de resistência mecânica foram realizados utilizando-se a máquina de ensaio mecânico – **EMIC modelo DL 2000** (Figura 10) do Grupo de Bioengenharia de Biomateriais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara.

Figura 10 - Máquina de Ensaio Mecânico EMIC DL 2000



Fonte: Arquivo Pessoal

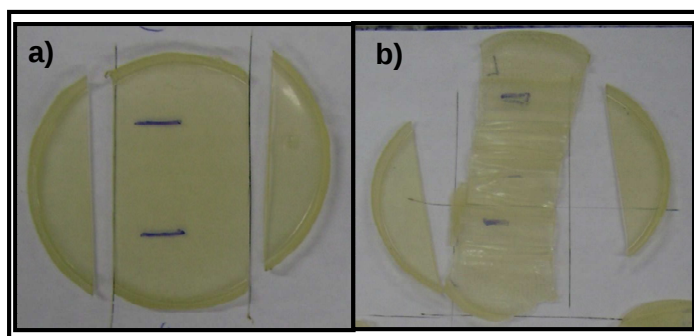
Como a espessura é uma variável que influencia na resistência mecânica à tração, a solução de gentamicina foi cuidadosamente misturada ao látex natural. Depois de vulcanizadas, as espessuras destas membranas foram mensuradas por um micrômetro.

As biomembranas (Figura 11) foram preparadas em formatos retangulares de 26 x 35 mm, onde suas extremidades foram presas por uma célula de carga de 50 kgf, à temperatura ambiente até ruptura, ensaios estes realizados em triplicatas.

Os dados foram interfaciados via computador e geraram gráficos/dados da Tensão (força/área) X Deformação específica (deformação/comprimento da biomembrana).

A razão entre a tensão aplicada e a deformação do material determinou o módulo de *Young* (E - elasticidade do material), independente das dimensões do material. Assim em tal ensaio, quanto maior for o módulo de *Young*, maior será sua resistência à deformação. Que corresponde a uma característica do material, não importando suas dimensões.

Figura 11 - Biomembranas para Ensaio: a) Biomembrana antes do ensaio, b) Biomembrana após ensaio



Fonte: Arquivo Pessoal.

3.6. Espectroscopia por Infravermelho (FTIR-ATR)

O princípio básico da leitura no FTIR é determinar a quantidade absorvida de radiação infravermelha (IR) quando incide na amostra. Os raios IR, quando em contato com a amostra, excitam as moléculas ocasionando movimentos vibracionais ou rotacionais, e isto resulta em comprimentos de onda na absorção destes raios, interpretados por um detector. O FTIR utiliza um algoritmo matemático, com transformada de Fourier (FT), para converter os dados recolhidos pelo detector nos espectros. O comprimento de onda formado pela transmissão ou absorção é determinado pela estrutura molecular da amostra (BEASLEY et al., 2014).

Nessa análise foram realizadas por espectroscopia de infravermelho - Transformada de Fourier (FTIR) acoplada a um elemento de reflexão total atenuada (ATR). O espectro foi varrido de 4000 a 400 cm^{-1} e à resolução de 4 cm^{-1} . O

equipamento utilizado foi **FTIR Bruker Tensor 27** (Figura 12), com acessório ATR (MORGANO, MORIYA, FERREIRA, 2003) do Grupo de Bioengenharia de Biomateriais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara.

Figura 12 - Equipamento de FTIR Bruker-Tensor 27 com acessório ATR



Fonte: Arquivo Pessoal.

As leituras foram realizadas com a amostra do sulfato de gentamicina em pó, biomembranas de látex natural e biomembranas de látex natural incorporada com sulfato de gentamicina (30 mg/mL).

3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Em 1942, Zworykin apresentou o primeiro MEV para amostras espessas usando um detector de elétrons secundários para obtenção de imagens; em 1965 surge o primeiro MEV comercial, enfim evoluindo para uma técnica mais versátil e rotineira na caracterização micro estrutural e químicas de diversas amostras, lembrando ainda da substituição do sistema analógico pelo digital, permitindo que as imagens sejam mais precisas e definidas, facilitando seu armazenamento e processamento (BOZZOLA; RUSSEL; LONNIE, 1992; TORRES et al., 2005).

Basicamente, o MEV é um microscópio que utiliza elétrons para formar imagens tridimensionais, diferentemente dos microscópios comuns, que emitem luz. Por meio destas imagens, formadas pela captação e medida de diferentes radiações resultantes das interações elétrons-amostra, revela-se informações como composição, topografia, morfologia e natureza da amostra, demonstrando sua flexibilidade de uso (MATRAB et al., 2010).

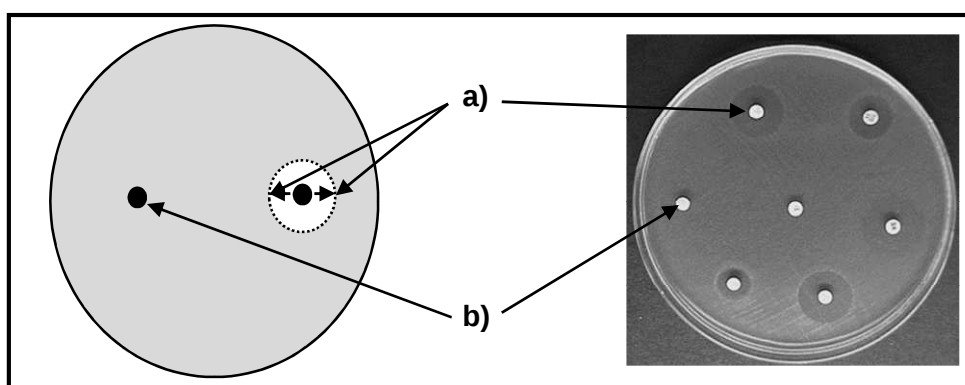
A imagem de uma amostra é formada por varredura de um feixe de elétrons com alta energia, que interagem com os átomos da amostra e produzem sinais que contém informações sobre a topografia da superfície, composição e outras características da amostra. Ainda que o mecanismo para obtenção da imagem seja complexo, a imagem resultante é de fácil compreensão (FONTANIVE et al., 2015).

As análises das superfícies (morfologia) das biomembranas de látex natural e biomembranas de látex natural incorporadas com gentamicina e do fármaco (em pó) foram realizadas para avaliar a distribuição e o tamanho do composto na biomembrana. Para esta análise foi utilizado o equipamento **Zeiss® EVO 50 (20 KV)** dos Laboratórios Multiusuários do Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

3.8. Avaliação da Atividade Antibacteriana da Biomembrana

Para medir a atividade *in vitro* sobre os micro-organismos, pode-se empregar diferentes métodos. Dentre estes métodos, foi escolhido o ensaio de difusão em meios sólidos, um método quantitativo onde a substância estudada é difundida em um meio de cultura sólido previamente inoculado com os micro-organismos testes. A partir da difusão ocorre o aparecimento ou não de um halo de inibição (Figura 13), no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (SILVEIRA et al., 2009).

Figura 13 - Método de Difusão de Discos em Ágar: a) Zona (halo) de Inibição - sensibilidade/resistência, b) Ausência de Halo - resistência.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Os discos para os testes foram confeccionados a partir das biomembranas polimerizadas (sólidas), com o diâmetro padronizado em 5 mm, obtido a partir do uso de um furador de rolha esterilizado.

Foram preparados três tipos de discos (amostra): biomembrana de látex (Controle Negativo), biomembrana de látex + Gentamicina 30 mg/mL (Teste) e disco de difusão/referência com 10 µg de Gentamicina.

O inóculo foi preparado utilizando as cepas de micro-organismos padrão, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 e *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, que foram transferidas com o auxílio de uma pinça estéril para 5 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth), Himedia® até obter-se turvação de 0,5 da escala de MacFarland, o que corresponde a 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL, de acordo com as normas NCLLS – M7A8 para suspensão direta da colônia (NCLLS, 2009).

Foi utilizado o meio de cultura Muller-Hinton (Himedia®), preparado conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi distribuído em placas de Petri de 150 x 150 mm com uma profundidade uniforme de 4 mm, e após solidificado, em uma superfície horizontal procedeu-se a semeadura (NCLLS, 2009).

As placas foram semeadas com swab, embebido no caldo com inóculo ajustado, onde o swab foi espalhado sobre toda a superfície do ágar, sucessivamente em três eixos diferentes (BRASIL, 2001).

Os discos foram aplicados à superfície do ágar, por meio de pinça estéril, seguindo recomendações de um espaçamento de 3 cm entre os discos e de 2 cm entre o disco e a borda da placa (BRASIL, 2001).

Após a aplicação dos discos, as placas foram incubadas em condições de aerobiose a uma temperatura constante de 35° a 37°C por um período de 24 a 48 horas (NCCLS, 2009).

As leituras foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, após período de incubação. Para fins estatísticos todos os testes foram realizados em triplicata, e os resultados expressos pela média simples com desvio padrão. Foram considerados resistentes os discos que não apresentaram crescimento ao redor, ou seja, formação de halo de inibição de crescimento (BRASIL, 2001).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas das Faculdades Integradas de Ourinhos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

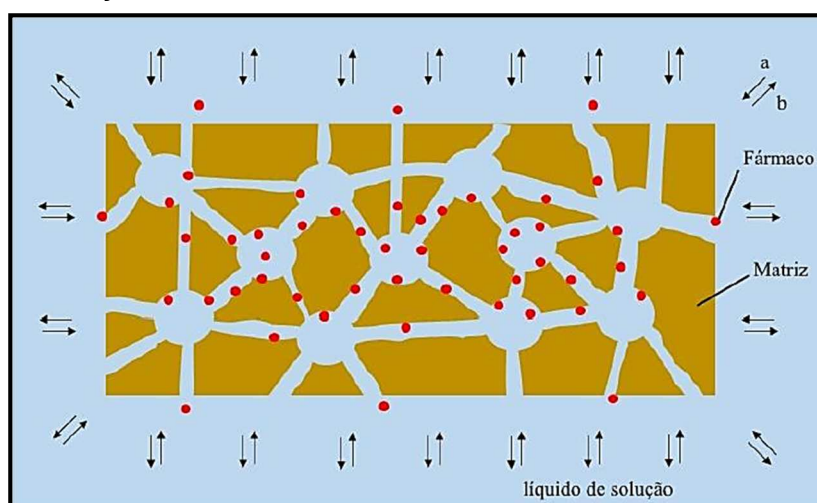
4.1. Liberação do Sulfato de Gentamicina

Geralmente um composto bioativo, como um fármaco, é incorporado a um carreador que usualmente pode ser um polímero ou uma mistura deles, o que resulta em um sistema de liberação sustentada. A caracterização da velocidade e quantidade de fármaco liberado está intimamente relacionado às propriedades dos polímeros (materiais utilizados como transportadores) e sua dependência com o meio ambiente (pH fisiológicos) (SALAZAR, 2015).

A eficiência de um sistema de liberação depende rigorosamente da seleção de um componente apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco e sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo. Dentro das várias opções, os polímeros são agentes versáteis e promissores para exercer tal função, de acordo com suas características: hidrofóbicas, hidrofílicas ou insolúveis (DIAS, 2011; SALAZAR, 2015).

Em carreadores hidrofóbicos ou lipídicos o controle de liberação do bioativo ocorre principalmente por mecanismo de difusão (Figura 14) através dos poros ou erosão e prevalece um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do fármaco e do excipiente utilizado.

Figura 14 - Liberação de fármacos em matrizes inertes

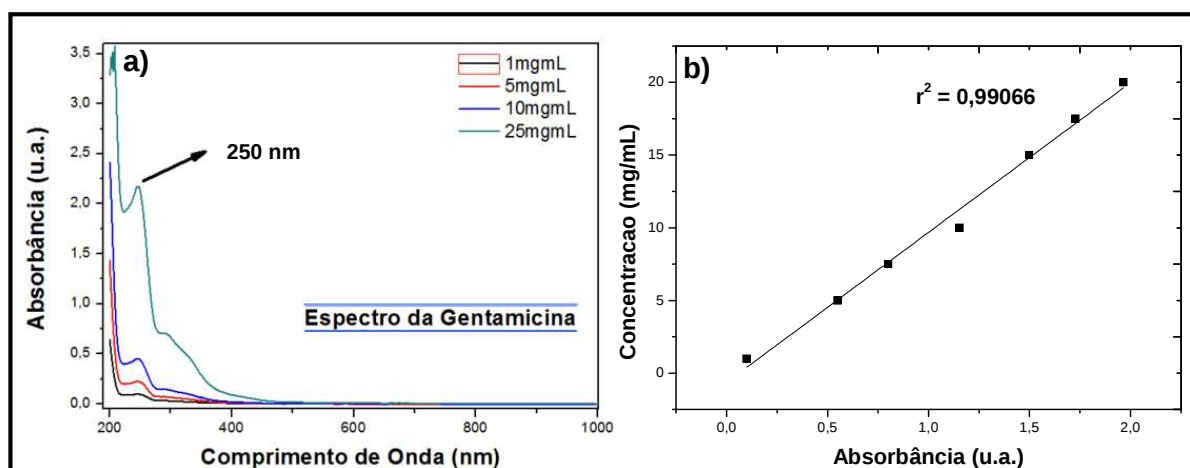


Fonte: SALAZAR, 2015.

Cada composto liberado apresenta um máximo de absorbância, ou pico de absorbância, em um característico comprimento de onda. No caso da gentamicina, o

máximo de absorbância foi de 250nm em acordo com a literatura (FRUTOS et al., 2000; SZANISZLO, CRISTINA, BOJITA, 2011). Posteriormente construiu-se a curva de calibração, onde para cada concentração, obteve-se um máximo de absorbância. A Figura 15 representa a curva de calibração, onde no eixo-x observa-se a absorbância (UA) e no eixo-y, a concentração (mg/mL).

Figura 15 - a) Espectro de absorção da gentamicina, b) Curva de calibração.



Fonte: Arquivo Pessoal.

De acordo com Romeira et al. (2012), Aiello et al. (2014) e Borges et al. (2015), a biomembrana de látex funciona como um reservatório, onde quanto maior a quantidade de substâncias presentes nas biomembranas, maior a quantidade total de substância liberada. Além da quantidade, a espessura e dimensão são parâmetros importantes que influenciam na liberação, assim, estas grandezas foram padronizadas.

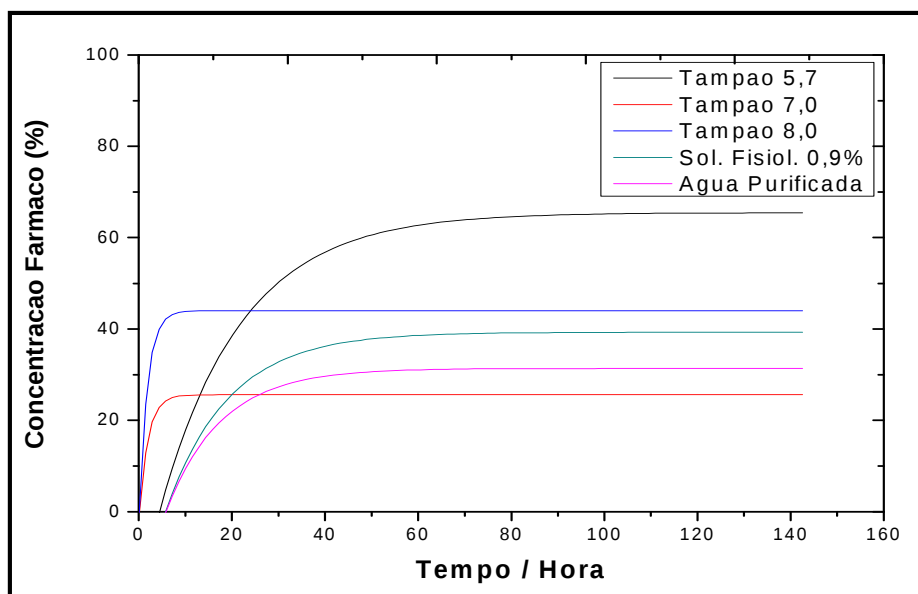
Neste trabalho, avaliou-se a liberação da gentamicina em soluções com diferentes valores de pHs e diferentes meios com o propósito de analisar a influência dos meios no perfil de liberação.

Sarabia-Sainz et al. (2012) demonstraram a liberação da gentamicina incorporada em microesferas de albumina, por 24 horas em três diferentes meios: glicina/HCl (pH = 2,0), tampão acetato (pH = 4,0) e PBS (pH = 6,0). Os resultados indicaram uma liberação mais rápida da gentamicina em condições ácidas (pH = 2,0 e 4,0) quando comparado ao pH = 6,0, o que sugere este fato devido à alta solubilidade do fármaco em pH ácido.

Campos et al. (2009) avaliaram, em seus experimentos, a taxa de liberação do fármaco frente a variação da concentração da gentamicina e do grau de reticulação de filmes de quitosana, durante 2 semanas em tampão salino pH = 7,4. Os resultados encontrados revelaram que uma maior concentração inicial de fármaco e um alto grau de reticulação promoveram uma liberação mais lenta, e depois de 14 dias, apenas 20% da concentração inicial foi disponibilizada no meio. Por outro lado, uma menor concentração inicial da gentamicina e um baixo grau de reticulação favoreceu a uma difusão mais rápida, no qual obteve-se 70% da concentração inicial do fármaco, após os 14 dias.

A Figura 16 mostra a cinética da liberação da gentamicina empregando biomembranas de látex natural como carreador em diferentes meios.

Figura 16 - Curva de Liberação do Sulfato de Gentamicina pelas Biomembranas de Látex em Diferentes Meios.



Fonte: Arquivo Pessoal

Na Figura 16, observa-se que o perfil de liberação obedece a uma exponencial dupla (ExpDec2), $C = A_1 \cdot e^{-t/t_1} + A_2 \cdot e^{-t/t_2} + y_0$, onde y_0 é o máximo de liberação, e as amplitudes A_1 e A_2 e os tempos t_1 e t_2 são os tempos característicos dessa função.

A gentamicina carregada pela biomembrana de látex natural demonstra uma maior liberação nas primeiras horas em acordo com resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (HERCULANO et al., 2010; ROMEIRA et al., 2012; MURBACH et al., 2014). Este fenômeno intitulado *burst release*, ocorre devido à presença do

fármaco na superfície. Além disso, é possível observar uma liberação constante da gentamicina nos vários meios estudados. Este processo ocorre, pois o fármaco encontra-se nas camadas mais internas do biopolímero.

Nota-se que para a solução tampão com pH = 7,0, para a solução fisiológica 0,9% e para a água destilada a liberação do fármaco foram de 28,75% (51,75 mg), 39,40% (70,92 mg) e 31,50% (56,70 mg) do total do composto incorporado, respectivamente.

O *burst release* que ocorre em diferentes meios corrobora parcialmente com estudos realizados por Tamanna et al. (2015), que demonstraram a liberação da gentamicina por nanopartículas de sílica mesoporosa em pH = 7,4 e 1,4. A princípio observou-se uma rápida liberação do fármaco nos meios em estudo, e posteriormente as amostras foram avaliadas com revestimento para ajustar a cinética de liberação frente aos diferentes meios, com objetivo de buscar uma liberação mais sustentada.

Barros et al. (2015) demonstraram em seus experimentos o *burst release* ao liberarem o diclofenaco de potássio utilizando o látex natural como carreador, porém o estudo foi realizado apenas em solução aquosa.

Além do meio e dos valores de pH, alguns parâmetros estruturais, morfológicos e físico-químicos influenciam na liberação da gentamicina em alguns materiais. Van de Belt et al. (2000), ao analisarem a liberação da gentamicina em seis cimentos ósseos e com rugosidades superficiais diferentes durante 7 dias, constataram uma alta taxa de liberação inicial seguida de uma rápida queda em todas as amostras nas primeiras 30 h. Os resultados preconizam uma cinética de liberação do fármaco controlada pela combinação da rugosidade e porosidade da superfície do cimento ósseo.

Enquanto, Huang et al. (2016) apresentaram um perfil bifásico de liberação ao desenvolverem uma nanoformulação composta por quitosana/ fucoídano (polissacarídeos derivados de algas pardas) para carrear o fármaco gentamicina até o pulmão. Os resultados demonstraram uma taxa de liberação de 77% nas primeiras 10 h., atingindo 99% em 72 h. Em um teste comparativo com a administração intravenosa da gentamicina, a administração intratraqueal das nanopartículas incorporadas com o fármaco indicou uma melhoria na eficácia antimicrobiana e sem efeito tóxico sistêmico.

Assim, neste trabalho, quando comparamos a liberação da gentamicina pelas biomembranas de látex em tampões com valores de pH = 5,7 (ácido) e 8,0 (básico),

observamos a liberação do fármaco de 65,35% (117,65 mg) e 44,00% (79,20 mg), respectivamente, sugerindo que uma maior interação entre ligações de hidrogênio aconteça tanto em meio básico, quanto em ácido. Quando um fármaco se encontra em meio mais carregado com íons H^+ (meio ácido) ou OH^- (meio básico), ele se torna mais biodisponível para absorção. Estes resultados corroboram com Dwivedi et al. (2015) onde constataram maior liberação da gentamicina em meio ácido e básico quando comparados ao meio neutro.

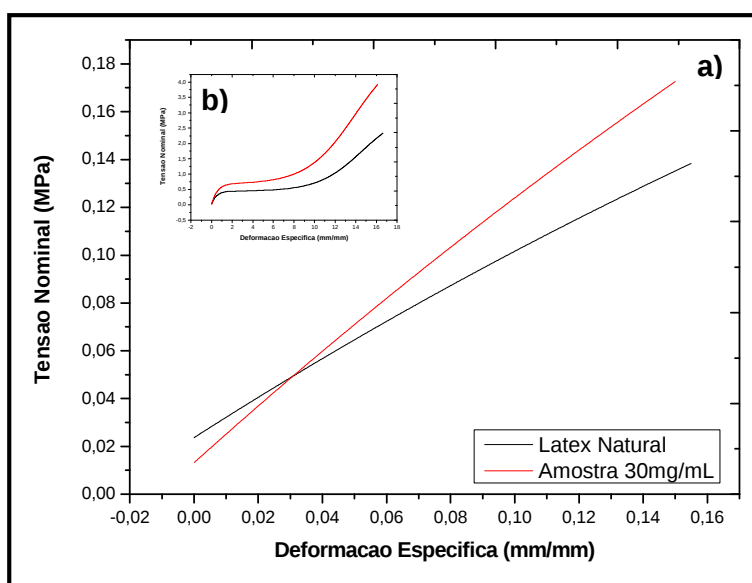
4.2. Ensaio de Resistência Mecânica

Os ensaios de tração foram realizados para determinar o grau de deformação e a resistência das biomembranas antes e após a incorporação da gentamicina.

Para a análise comparativa dos resultados de tração, deformação e módulo de *Young* foram encontradas as médias de cinco amostras de látex natural e cinco amostras de látex com gentamicina 30 mg/mL.

A Figura 17 mostra as curvas de tração-deformação das biomembranas polimerizadas, denotando um melhor desempenho à biomembrana incorporada pela gentamicina.

Figura 17 - Ensaio de Resistência Mecânica: a) Parte linear referente ao módulo de *Young*, b) Curva tensão x deformação específica.



Fonte: Arquivo Pessoal

A Figura 17b mostra um perfil típico de um elastômero, onde é possível observar que a membrana apresenta três regiões com comportamentos mecânicos diferentes: I- um comportamento elástico (Figura 17a), onde a tensão é diretamente proporcional ao alongamento, nesta fase ao remover a tensão o material retorna ao seu tamanho original; II- um comportamento plástico, onde ocorre alongamento sem grandes alterações na tensão (empescoçamento). Caso a tensão seja removida, o material retorna apenas parte do seu tamanho devido à deformação permanente; III- cristalização induzida pela tensão (devido à deformação, as cadeias se alinham paralelamente na direção da aplicação da tensão), até a falha da amostra. A Tabela 1 apresenta os resultados médios do módulo de *Young*, tensão máxima e deformação máxima (ruptura).

Tabela 1 - Medidas da resistência mecânica

Amostra	Tensão Máxima (MPa)	Deformação Máxima (mm/mm)	Módulo de <i>Young</i> (MPa)
Controle	2,33	16,61	0,93
Membrana 30 mg/mL	3,91	16,12	1,45

Fonte: Arquivo Pessoal

Observa-se que a tensão máxima da biomembrana composta (látex + gentamicina 30 mg/mL) teve um aumento de 55% em relação a tensão da biomembrana natural (látex), sugerindo que esta elevação decorre do aumento de ligações cruzadas e interações entre fármaco e látex, deixando a biomembrana mais resistente (ABHILASH et al., 2009).

Murbach et al. (2014) relataram em seus experimentos que a incorporação da ciprofloxacina à uma membrana de látex alterou seu comportamento mecânico, tornando-a mais rígida e frágil.

Herculano (2009) ao incorporar uma proteína (albumina) e um antimicrobiano (metronidazol) em membranas de látex natural observou que não houve uma mudança significativa em relação a ruptura, corroborando com o presente estudo.

O módulo de *Young* está diretamente relacionado com a rigidez do polímero. A literatura relata valores do módulo de *Young* entre 1,3 e 1,9 MPa para borracha vulcanizada, e que os valores de resistência à tração na ruptura não são influenciados por sistemas de vulcanização. O resultado para a biomembrana com a gentamicina

encontra-se dentro dos valores citados, possuindo assim características para aplicação biomédica, de acordo com a resistência apresentada (DALL'ANTONIA et al., 2009; CABRERA et al., 2013).

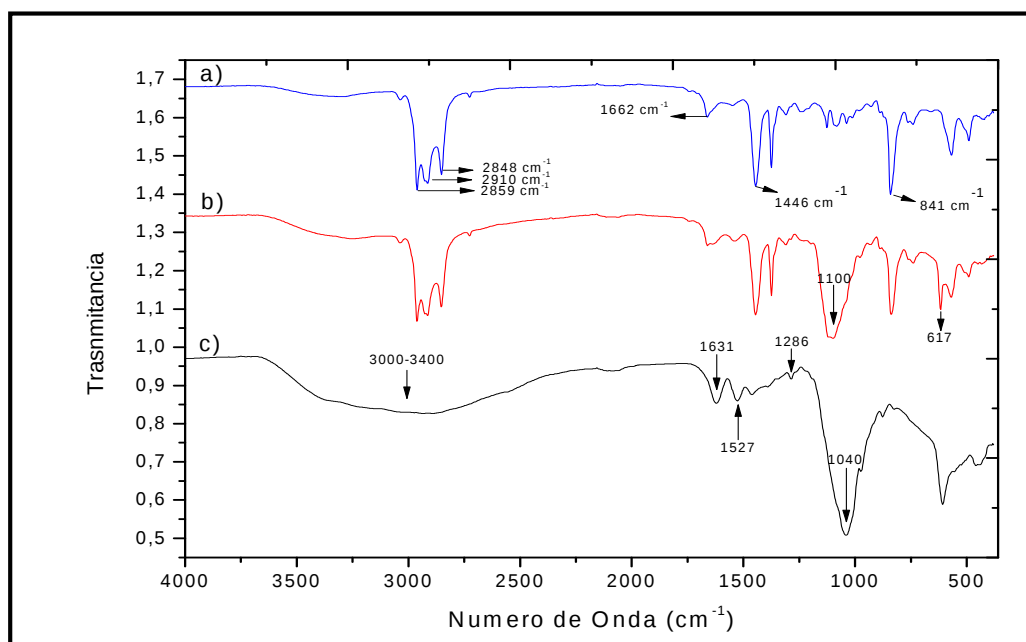
4.3. Espectroscopia por Infravermelho (FTIR-ATR)

Neste trabalho os espectros de FTIR foram utilizados para identificar grupos funcionais característicos do látex natural, do fármaco e da mistura (PRABHU et al., 2015). A Figura 18 demonstra os espectros de FTIR (no intervalo de 4000 - 400 cm^{-1}) das amostras de látex puro, látex + sulfato de gentamicina 30 mg/mL e o sulfato de gentamicina puro. No espectro do látex puro observou-se as bandas características da borracha natural, e os grupamentos funcionais isopreno, demonstrados à 2910 cm^{-1} (alongamento C–H de CH_2), 2859 cm^{-1} (alongamento C–H de CH_2 e CH_3) 2848 cm^{-1} (estiramento simétrico de CH_2), 1662 cm^{-1} (alongamento de C=C), 1446 cm^{-1} (flexão de CH_2) e 841 cm^{-1} (deformação angular de C=CH), o que corrobora com dados obtidos por Rippel et al. (2003); Pichayakorn et al. (2012b) e Murbach et al. (2014).

O espectro de FTIR do sulfato de gentamicina apresenta bandas de absorção nos comprimentos de onda de 3000-3400 cm^{-1} devido a vibração de alongamento de aminas primárias (R-NH_2) e secundárias (R_2NH), as bandas 1631 cm^{-1} , 1526 cm^{-1} e 1286 cm^{-1} referem-se as vibrações de flexão dos grupamentos de aminas (NH) I, II e III, e a banda 1040 cm^{-1} relaciona-se a deformação axial dos grupos NH e Amina Terciária (R_3N) (Figura 18) (LI et al., 2007; MAHENDRA et al., 2013; RADHAKUMARY; SREENIVASAN, 2014; DWIVEDI et al., 2015).

No composto látex e sulfato de gentamicina 30 mg/mL, as bandas de absorção em 1100 cm^{-1} e 617 cm^{-1} , demonstram a presença do fármaco (gentamicina), enquanto as bandas de absorção em 2910 cm^{-1} , 2859 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} representam as bandas características do látex (Figura 18). Sugere-se a ocorrência de uma associação entre a mistura, o que corrobora com Imbuluzqueta et al. (2011) e que indica a integridade da estrutura da gentamicina após mistura.

Figura 18 - Espectro FTIR – Espectros Estratificados: a) Látex, b) Látex + Sulfato de gentamicina 30mg/mL, c) Sulfato de Gentamicina

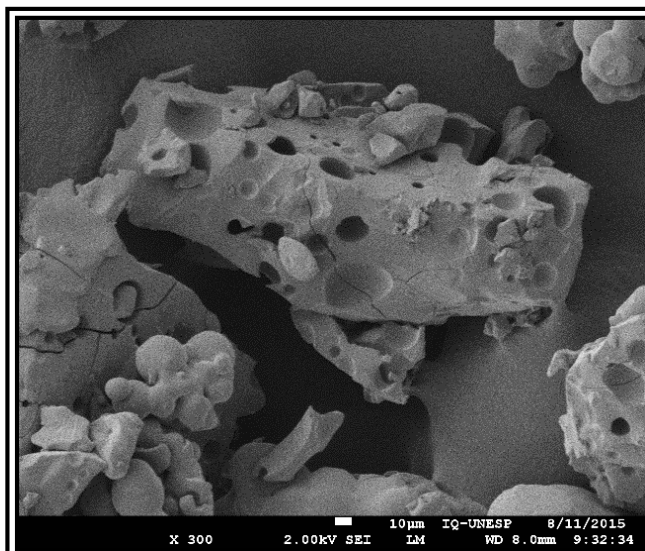


Fonte: Arquivo Pessoal.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O principal motivo de empregar esta técnica foi analisar a morfologia da biomembrana de látex natural, ou seja, a incorporação da gentamicina na superfície da biomembrana (BARROS et al, 2015). A Figura 19, demonstra a microestrutura do fármaco, onde é composto por partículas cristalinas aglomeradas.

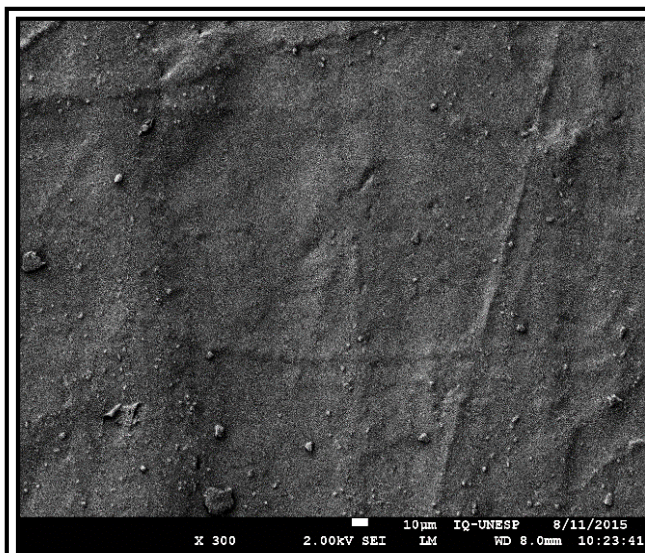
Figura 19 - Imagem de MEV da Gentamicina em Pó (ampliação de 300 vezes).



Fonte: Arquivo Pessoal

Nas características da biomembrana de látex puro, nota-se uma superfície lisa, sem fissuras ou formação de poros (Figura 20) de acordo com Herculano et al. (2010), Murbach et al. (2014) e Barros et al. (2015).

Figura 20 - Imagem de MEV da Biomembrana de Látex Natural Puro (ampliação de 300 vezes).

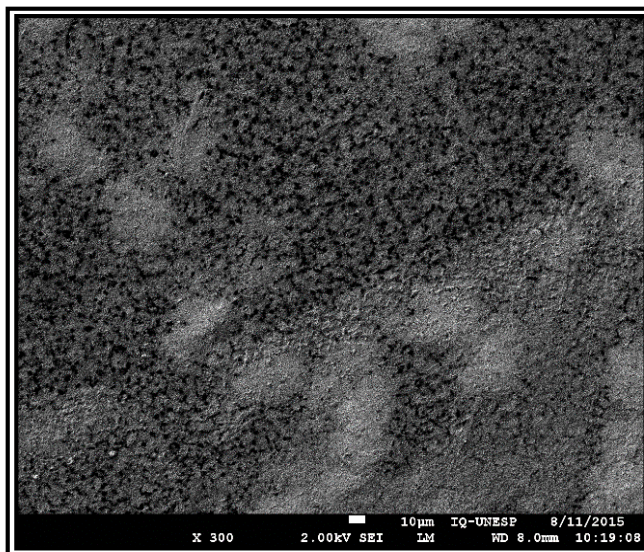


Fonte: Arquivo Pessoal

A imagem obtida através da técnica de MEV mostra a morfologia da superfície do sistema fármaco-biomembrana (Figura 21). Verifica-se que a adsorção do fármaco à biomembrana encontrou-se espalhado pela superfície em retículos. A Figura 23 reforça o padrão apresentado nos testes de liberação, onde a liberação mais rápida

ocorre devido à presença da gentamicina à superfície. Posteriormente essa liberação tem sua velocidade reduzida, pois nesse momento a água carrega o fármaco das camadas internas (bulk) da biomembrana (HERCULANO et al., 2010; AIELO et al., 2014).

Figura 21 - Imagem de MEV da Biomembrana de Látex Natural Incorporada com Gentamicina (ampliação de 300 vezes).



Fonte: Arquivo Pessoal

As análises comparativas das superfícies das biomembranas estudadas demonstraram que há diferença morfológica entre as amostras. Revela-se a formação de poros (canais), o que facilita sua liberação devido à maior troca de fluidos entre meio-membrana. Nota-se que houve homogeneidade de dispersão da gentamicina na biomembrana, com preservação estrutural do fármaco, evidenciado pelos cristais e partículas presentes na superfície (BORGES et al., 2015).

Desta forma, concluímos que a interação entre a biomembrana e o fármaco foi capaz de diminuir o grau de reticulação do látex, o qual facilitou a liberação sustentada da gentamicina.

4.5. Avaliação da Atividade Antibacteriana da Biomembrana

A avaliação da atividade antimicrobiana pode ser indicada para organismos que causem infecções da qual necessitem de terapia antimicrobiana (BRASIL, 2003).

A escolha do *S. aureus* e *E. coli*, deve-se por serem uns dos causadores predominantes das infecções em queimaduras e serem representantes de espécies Gram positivas e Gram negativas, respectivamente (MADOFF; PEREYRA, 2015). Estes micro-organismos também podem ser isolados de feridas cirúrgicas infectadas, podendo resultar no desenvolvimento de infecções sistêmicas (SANTOS et al., 2007).

Os resultados apresentados na Tabela 2, demonstram que as biomembranas em estudo possuem atividade antimicrobiana frente a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Estas análises foram realizadas em triplicatas e seus resultados foram expressos pela média simples com desvio padrão.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana da biomembrana

Biomembranas	Micro-organismo testado/ Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Látex Natural	12,40 ± 0,90	0,00
Látex + Gentamicina (30 mg/ mL)	28,40 ± 0,50	19,5 ± 0,80
Disco referência/ Gentamicina (10 µg) *	31,00 ± 0,50	18,3 ± 0,80

*Valores de halos inibitórios esperados para *Staphylococcus spp* e *Enterobacteriaceae*: **Resistente** ≤12mm; **Intermediário** = 13-14mm e **Sensível** ≥ 15mm (CLSI, 2013).

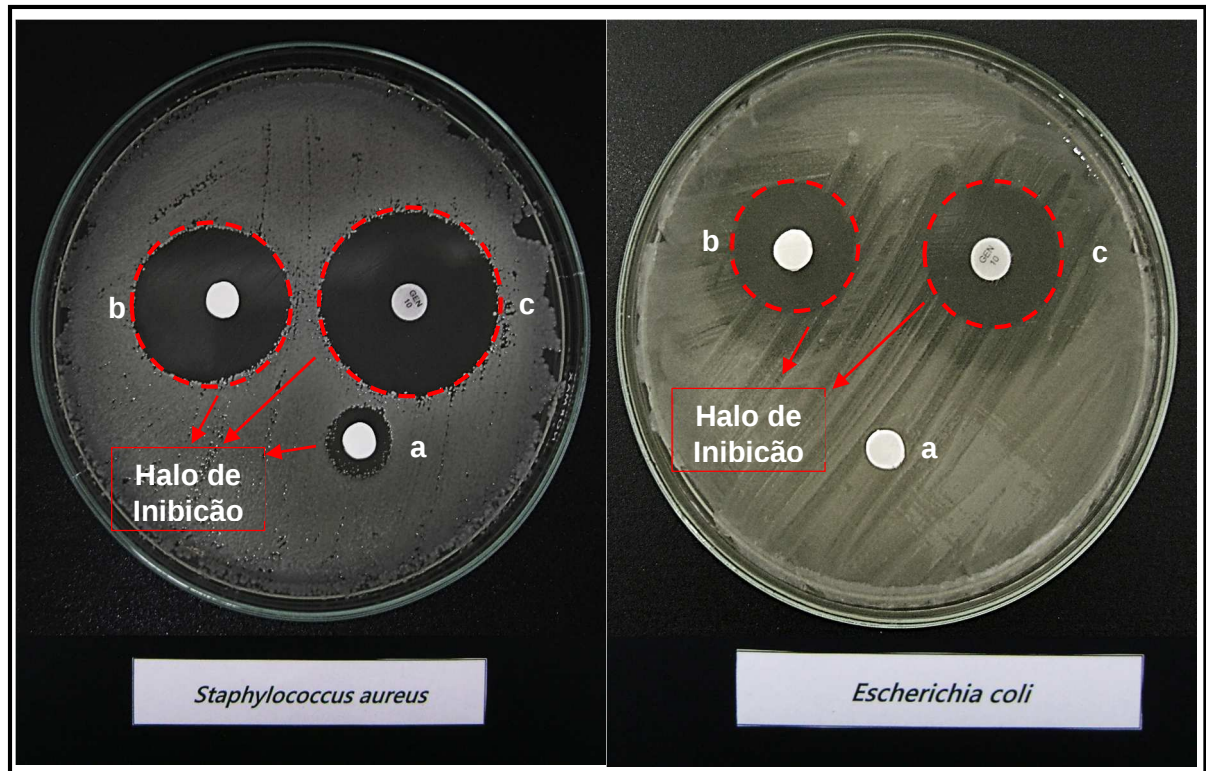
Fonte: Arquivo Pessoal

Observou-se que a biomembrana de látex natural puro apresentou halo de inibição de crescimento bacteriano frente ao *S. aureus*, no qual demonstrou sua efetividade antibacteriana, mesmo com a ausência do fármaco. Contudo, o micro-organismo é classificado como resistente ao agente testado (biomembrana), de acordo com a literatura.

Enquanto a biomembrana de látex natural puro não demonstrou nenhuma atividade antibacteriana frente à *E. coli*.

A biomembrana incorporada com a gentamicina (Figura 22), mostrou halo de inibição com valor superior aos de referência (15 mm) frente aos diferentes micro-organismos testados, no qual obteve-se um desempenho equivalente quando comparado ao disco de antibiograma de gentamicina (10 µg).

Figura 22 - Resultados dos testes microbiológicos com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em triplicata: a) Biomembrana de látex; b) Biomembrana de látex + gentamicina; c) Disco difusão/referência com 10 µg de gentamicina.



Fonte: Arquivo Pessoal

A literatura reporta critérios específicos de interpretação do diâmetro dos halos de inibição a serem usados frente ao *S. aureus* e à *E. coli*: Resistente ≤ 12 mm, Intermediário 12-14 mm e Sensível ≥ 15 mm (CLSI, 2013).

Minelli et al. (2015) demonstraram a liberação da gentamicina e vancomicina após implante de espaçadores de polimetilmetacrilato (PMMA) em procedimentos de artroplastia infectada. A gentamicina e a vancomicina liberadas pelos espaçadores atingiram concentrações bactericidas demonstrando uma alta inibição contra *S. aureus* resistente à meticilina.

Alvarez et al. (2014) avaliaram curativos de nanocompósitos de hidrogéis de colágeno incorporados por gentamicina e rifampicina, com o intuito de avaliar a eficiência antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*. Os resultados demonstraram que a gentamicina, mesmo em dose elevada, não modifica a estrutura

fibrilar e seu comportamento reológico, promovendo sua atividade antibacteriana e sua liberação por 7 dias.

Membranas de celulose incorporadas por gentamicina apresentaram atividade bactericida contra *Streptococcus mutans* e não demonstraram atividade tóxica aos fibroblastos dérmicos humanos (ROUABHIA et al., 2014).

Aquino et al. (2013) revelaram em testes antimicrobianos frente a *S. aureus*, atividade antibiótica da gentamicina por até 24 dias, quando incorporada a microssistemas (micropartículas) de algina/pectina preparados por micronização supercrítica.

Em seus experimentos, Singh et al. (2013) demonstraram a presença de zona de inibição frente a duas bactérias: *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* A presença desta zona de inibição foi observada utilizando curativos de hidrogel (goma arábica e carbopol®) incorporados com gentamicina.

Estes relatos indicam que sistemas incorporados com gentamicina tendem a diminuir infecções bacterianas primárias e secundárias. Desta forma, os resultados apresentados pelos experimentos apontam vários sistemas e veículos para serem utilizados como carreadores de fármacos, com a finalidade de melhorar a cicatrização de feridas e diminuição de infecções bacterianas.

Deste modo, as biomembranas de látex natural representam mais uma alternativa simples, barata e viável para liberação sustentada da gentamicina, na qual pode-se obter uma boa eficácia antimicrobiana e ao mesmo tempo, diminuir a toxicidade sistêmica decorrente de doses elevadas da mesma.

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, cito os sistemas transdérmicos, o qual é primordial para diminuição de efeitos colaterais, reações adversas e uma melhor adesão do paciente ao tratamento.

O sulfato de gentamicina é considerado como um dos melhores aminoglicosídeos para o tratamento de infecções graves, principalmente as provocadas por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos.

Vários pesquisadores mostraram que as biomembranas de látex natural são bioprodutos promissores na área biomédica/saúde, desta forma, neste trabalho, ao incorporar o antimicrobiano nestas membranas, potencializamos seus aspectos biofarmacológicos.

Os espectros de infravermelho mostraram que a presença das bandas de absorção em 1100 cm^{-1} e 617 cm^{-1} (fármaco), 2910 cm^{-1} e 2859 cm^{-1} (Látex), sugerem a integridade da estrutura da gentamicina após a mistura.

Os resultados da cinética de liberação reforçam que o látex natural pode ser empregado como um armazenador da gentamicina, onde observamos um *burst release* da gentamicina seguida de uma liberação sustentada em 5 diferentes meios, por 6 dias, destacando-se os tampões de pH 5,7 e 8,0, onde ocorreram as maiores liberações. Sugere-se a ocorrência deste fato devido os meios estarem mais carregados de polieletrólitos, tornado o fármaco mais biodisponível. Com este perfil, é possível diminuir uma infecção bacteriana à um curto espaço de tempo e reduzir a probabilidade de uma infecção recidiva.

As análises realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstraram que foi possível incorporar a gentamicina ao látex sem que ocorresse modificação estrutural, com cristais do fármaco adsorvido na superfície do biomaterial, corroborando com o perfil cinético de liberação.

As respostas da atividade antibacteriana realizadas *in vitro* revelaram que o látex incorporado com o sulfato de gentamicina não sofreu nenhuma alteração na sua função. Observou-se ainda que a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, frequentemente encontrada em feridas infectadas, foram sensíveis à biomembrana.

Desta maneira, as biomembranas comportaram-se de forma satisfatória para futuros estudos no desenvolvimento de um curativo para uso tópico, barato e viável

tanto para as queimaduras, quanto para as feridas decorrentes de portadores de diabetes tipo II ou úlcera de pressão.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Inicialmente serão realizados testes em animais, e caso os resultados sejam interessantes, esperamos no futuro realizar ensaios em humanos

Acerca dos resultados satisfatórios e como perspectivas futuras para a continuação deste trabalho, será interessante avaliar outros aspectos:

- Avaliar a atividade antimicrobiana das biomembranas incorporadas com a gentamicina em outras cepas de micro-organismos comumente encontrados em feridas, como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*.
- Determinar a concentração inibitória mínima da biomembrana incorporada com a gentamicina.
- Aplicar as biomembranas em modelos de úlceras em animais (ratos, camundongos ou outro animal a ser definido) e avaliar a atividade antimicrobiana em organismos vivos.

Evidentemente, é fundamental uma revisão bibliográfica sobre os assuntos: úlceras (feridas), queimaduras, curativos, microbiota presente nas infecções; e outras variáveis como: tempo de tratamento, qual o melhor modelo animal para realizar a aplicação da biomembrana, regeneração tecidual e tempo da atividade da biomembrana.

Concluídas as análises em animais, com os resultados satisfatórios, espera-se:

- Avaliar a atividade antimicrobiana das biomembranas incorporadas com a gentamicina em micro-organismos coletados *in vivo* de feridas humanas.
- Avaliar os resultados para o desenvolvimento de um possível curativo antimicrobiano para o uso humano em feridas e queimaduras.

7. REFERÊNCIAS

- ABHILASH, G. et al. Preparation of low-protein natural rubber latex: Effect of polyethylene glycol. **Journal of applied polymer science**, v.114, n.2, p.806-810, 2009.
- AGOSTINI, D.L.S. **Caracterização do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**: 2009. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2008.
- _____. **Estudo dos componentes não isoprênicos do látex de *Hevea brasiliensis* indutores de angiogênese**: 2013. 114f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2013.
- AIELO, P.B. et al. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, v.17, p.146-152, 2014.
- ALMEIDA, E.V.S.; WAGNER, R. Análise da concentração de gentamicina comercializada nas farmácias de Curitiba-PR. **Saúde**, v.2, n.12, 2014.
- ALVAREZ, G.S. et al. Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. **Journal of Materials Chemistry B**, v.2, n.29, p.4660-4670, 2014.
- AMSTERDAM, D. **Antibiotics in laboratory medicine**. 6.ed. China: Wolters Kluwer, 2015 807p.
- ANSEL, H.C. et al. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 716p.
- AQUINO, R.P. et al. Design and production of gentamicin/dextran microparticles by supercritical assisted atomisation for the treatment of wound bacterial infections. **International journal of pharmaceutics**, v.440, n.2, p.188-194, 2013.
- BARROS, N.R. et al. Diclofenac potassium transdermal patches using natural rubber latex biomembranes as carrier. **Journal of Materials**, v.2015, Article ID 807948, p.1-7, 2015.
- BEASLEY, M.M. et al. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, v.46, p.16-22, 2014.
- BORGES, F.A. et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science**. p.1-22, 2015.
- BORGES, F.A. et al. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, v.2014, p.1-5, 2014.
- BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, J.; LONNIE, D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2.ed. Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542p.
- BRAGANÇA, F.C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.818-826, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fármacos Utilizados em Infecções**. 2015. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/Infeccao.html#_Toc24793946.

Acesso em: 02 out. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada M2-A8. Substitui a Norma M2-A7, v.20, n.1 do CLSI (NCCLS): Clinical and Laboratory Standards Institute. 8.ed. v.23, n.1, 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar**. Brasília; Brasil. Ministério da Saúde, 2001. 52p.

CABRERA, F.C. et al. Characterization of natural rubber/gold nanoparticles SERS-active substrate. **Journal of Applied Polymer Science**, v.130, n.1, p.186-192, 2013.

CAMPELO JÚNIOR, J.H. Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.8, n.1, p.35-42, 2000.

CAMPOS, M.G.N. et al. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.20, n.2, p.537-542, 2009.

CARMO, C.A.F. de S. et al. Estimativa do estoque de carbono na biomassa do clone de Seringueira RRIM 600 em solos da Zona da Mata, Minas Gerais. **Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2003.

CLSI - **M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories**, 2013.

DALL'ANTONIA, A.C. et al. Mechanical and thermal characterization of compounds of natural rubber of the clones: GT 1, IAN 873, PB 235 and RRIM 600. **Polímeros**, v.19, n.1, p.63-71, 2009.

DIAS, B.L. **Síntese, caracterização e nanoestruturação de esferas funcionais submicrométricas**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

DWIVEDI, C. et al. Fabrication and Assessment of Gentamicin Loaded Electrospun Nanofibrous Scaffolds as a Quick Wound Healing Dressing Material. **Current Nanoscience**, v.11, n.2, p.222-228, 2015.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.95, n.3, p.932-939, 2010.

FERNANDES, F.P. et al. Sistemas de liberação tópica: síntese, caracterização e estudos antimicrobianos. In: **ANAIS ... Congresso Brasileiro de Polímeros**, v.10, 2009, Foz do Iguaçu, PR. Disponível em URL:<
<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/1009.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2015.

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.

FONTANIVE, V.C.P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.4, p.549-558 2015.

FRADE, M.A.C. et al. Curativo de biomembrana vegetal e hipersensibilidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.5, p.885, 2011.

FRADE, M.A.C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Med. Cutan. Iber. Lat Am.**, v.32, n.4, p.157-162, 2004.

FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.21, n.6, p.1149-1159, 2000.

GARAMYCIN. **Online pharmacy**. Disponível em URL<<https://www.medicinep.com/garamycin-for-the-topical-treatment-of-both-primary-and-secondary-skin-1984.html>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

GENTAMICIN SULFATE. **G-biosciences**. Disponível em URL<<http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/GentamicinSulfate.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

GINEBRA, M.P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **Journal of Controlled Release**, v.113, n.2, p.102-110, 2006.

GOMES, D.R.; SPERANDIO, H.V.; CALDEIRA, M.V.W. Aspectos técnicos à implantação de viveiros de seringueira. **Encontro Latino Americano De Iniciação Científica**, v.13, 2012.

GONÇALVES, P.S. et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.131-138, fev. 2002.

GUIDELLI, E.J. et al. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, v.15, n.4, p.1-9, 2013.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.1, p.1-93, 2006.

HERCULANO, R.D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações biomédicas**. 2009. 151f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

HEVEA. **LOOKFORDIAGNOSIS**. Disponível em URL<http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Hevea&lang=1>. Acesso em: 09 nov. 2015.

HEVEA *BRAZILIENSIS* SEED. **CNSEED**. Disponível em URL<<http://www.cnseed.org/hevea-brasiliensis-seed.html>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

HUANG, Y.C. et al. Biphasic release of gentamicin from chitosan/fucoidan nanoparticles for pulmonary delivery. **Carbohydrate Polymers**, v.138, p.114-122, 2016.

IMBULUZQUETA, E. et al. Novel bioactive hydrophobic gentamicin carriers for the treatment of intracellular bacterial infections. **Acta biomaterialia**, v.7, n.4, p.1599-1608, 2011.

KANG, H.S. et al. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly (gamma-glutamic acid) for biological application: preparation, physical properties, and cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v.103, n.1, p.386-394, 2006.

KORZYBSKI, T.; KOWSZYK-GINDIFER, Z.; KURYLOWICZ, W. **Antibiotics**: origin, nature and properties. Poland: Elsevier, 2013 526p.

LI, B. et al. Biocompatibility and antibacterial activity of plasma sprayed titania coating grafting collagen and gentamicin. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.83, n.4, p.923-930, 2007.

MADOFF, C.; PEREYRA, F. Complicações Infecciosas Queimaduras. In: KASPER, D.L.; FAUCI, A.S. **Doenças Infecciosas de Harrison**, 2.ed. Porto Alegre: AMGH, p.309-312, 2015.

MAHENDRA, L. et al. (D, L- Lactide)-Gentamicin Composite Coated Orthopaedic Metallic Implant. **International Journal of Science and Nature**, v.4, n.3, p.522-529, 2013.

MARTINDALE – **Martindale**:The Complete Drug Reference. 37.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 4113p.

MATRAB, T. et al. Scanning electron microscopy investigation of molecular transport and reactivity within polymer brushes. **Chem. Phys. Chem.**, v.11, n.3, p.670-682, 2010.

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

MERCK - **Merck Index**. 14.ed. Rahaway: Merck, 2000. 2520p.

MINELLI, E.B. et al. Antimicrobial activity of gentamicin and vancomycin combination in joint fluids after antibiotic-loaded cement spacer implantation in two-stage revision surgery. **Journal of chemotherapy**, v.27, n.1, p.17-24, 2015.

MIRANDA, M.C.R. **Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas conjugadas de látex e peptídeos bioativos**. 2014. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014

MORGANO, M.A.; MORIYA, C.; FERREIRA, M.M.C. Determinação Quantitativa do Teor de Sacarose em açúcar cristal por Espectroscopia FT-IR/ATR e Regressão Multivariada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.77-83, 2003.

MOULDS, R.F.W.; JEYASINGHAM, M.S. Gentamicin: a great way to start. **Australian Prescriber**, v.33, n.5, p.134-135, 2010.

MRUÉ, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v.7, n.2, p.277-283, 2004.

MURBACH, H.D. et al. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v.2014, n.7, 2014.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerovically**; Aprovado Standart – eight edition. NCCLS document M7-A8. NCCLS, Wayne, Pennsylvania USA, 2009, 65p.

NEVES JUNIOR, W.F.P. et al. Elastic properties of natural rubber tubes produced by dip-coating. **Journal of Applied Polymer Science**, v.100, n.1, p.702-707, 2006.

OLIVEIRA, J.A.Ap. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v.69, n.5, p.649-55, 2003.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Aminoglycoside nephrotoxicity. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.21, n.4, p.444-452, 2006.

PAULO, N.M. et al. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0, 1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.20, p.305-310, 2005.

PICHAYAKORN, W. et al. Deproteinized natural rubber latex/hydroxypropylmethyl cellulose blending polymers for nicotine matrix films. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.51, n.25, p.8442-8452, 2012a.

PICHAYAKORN, W. et al. Preparation of deproteinized natural rubber latex and properties of films formed by itself and several adhesive polymer blends. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.51, n.41, p.13393-13404, 2012b.

PRABHU, P. et al. Investigation of hydrogel membranes containing combination of gentamicin and dexamethasone for ocular delivery. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.5, n.4, p.214, 2015.

RADHAKUMARY, C.; SREENIVASAN, K. Gentamicin induced formation of gold nanoparticles as an assay protocol for its detection. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.443, p.326-330, 2014.

RIPPEL, M.M. et al. Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. **Journal of colloid and interface science**, v.268, n.2, p.330-340, 2003.

RIPPEL, M.M.; LEITE, C.A.P.; GALEMBECK, F. Elemental mapping in natural rubber latex films by electron energy loss spectroscopy associated with transmission electron microscopy. **Analytical chemistry**, v.74, n.11, p.2541-2546, 2002.

ROMEIRA, K.M. et al. Evaluation of *Stryphnodendron sp.* release using natural rubber latex membrane as carrier. **Journal of Applied Sciences**, v.12, n.7, p.693, 2012.

ROSENKRANTZ, B.E. et al. Gentamicin sulfate. **Analytical profiles of drug substances**, v.10, p.731, 1981.

ROUABHIA, M. et al. Production of biocompatible and antimicrobial bacterial cellulose polymers functionalized by RGDC grafting groups and gentamicin. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.6, n.3, p.1439-1446, 2014.

SALAZAR, M.J.C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 114f. Tese (Doutorado em Ciência – Química Orgânica) - Universidade de São Paulo, 2015.

SANGUANSAP, K. et al. Composite natural rubber based latex particles: a novel approach. **Polymer**, v.46, n.4, p.1373-1378, 2005.

SANTOS, A. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.43, p.413-423, 2007.

SANTOS, R.S. Parasitismo de ovos de *Leptopharsa heveae* Drake & Poor por *Erythmelus tingitiphagus* (Soares) em plantios de seringueira com aplicação de produtos fitossanitários. **Revista Ceres**, Viçosa, v.61, n.3, p.350, 2014.

SARABIA-SAINZ, A. et al. Formulation and characterization of gentamicin-loaded albumin microspheres as a potential drug carrier for the treatment of *E. coli* K88 infections. **International Journal of Drug Delivery**, v.4, n.2, p.209, 2012.

SILVA, J.A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.31, n.3, p.125-131, 2010.

SILVA, R.G. **Eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com extrato de *stryphnodendron barbatimão* mart. Na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas.** 2015. 134f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras – Universidade Estadual Paulista, Assis, 2015.

SILVEIRA, L.M. da S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, p.2, 2009.

SINGH, B.; SHARMA, S.; DHIMAN, A. Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: biomedical properties and histological study of wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v.457, n.1, p.82-91, 2013.

SUSSMAN, G.L.; BEEZHOLD, D.H.; KURUP, V.P. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Milwaukee, v.110, n.2, p.S33-S39, 2002. Supplement.

SZANISZLO, B.; CRISTINA, L.; BOJIȚA, M. Indirect Determination of Gentamicin by Derivative Spectrophotometry. **Acta Medica Marisiensis**, v.57, n.5, p.516-518, 2011.

TAMANNA, T.; BULITTA, J.B.; YU, A. Controlling antibiotic release from mesoporous silica nano drug carriers via self-assembled polyelectrolyte coating. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, n.2, p.1-7, 2015.

TORRES, M.A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v.5, n.4, p.306, 2005.

TRECCO, A. et al. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.35, n.1, p.89-95, 2014.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 29.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Merck, 2006.

VAN DE BELT, H. et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. **Biomaterials**, v.21, n.9, p.1981-1987, 2000.

ZIMMERMANN, M. et al. Biocompatibility and resistance test of latex membranes in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.6, p.1719-1723, 2007.