

BRUNA CAMBRAIA GARMS

Caracterização física, química e biológica de membranas de látex natural incorporadas com moxifloxacina para tratamento de feridas cutâneas.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

Co-orientador: Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Co-orientador: Dr. Sérgio Luiz de Sousa Salvador

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

G212c	Garms, Bruna Cambraia Caracterização física, química e biológica de membranas de látex natural incorporadas com moxifloxacina para o tratamento de feridas cutâneas / Bruna Cambraia Garms. – Araraquara: [s.n.], 2017 67 f.: il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano Coorientador: Marco Andrey Cipriani Frade Coorientador: Sérgio Luiz de Sousa Salvador 1. Látex. 2. Antibióticos. 3. Polímeros. 4. Preparações de liberação controlada. 5. Materiais biomédicos. I. Título
-------	--

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

BRUNA CAMBRAIA GARMS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestra em
Biotecnologia.

Araraquara, 05 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara - SP


Prof. Dr. Marius Chorilli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Renata Fonseca Vianha Lopez
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Bruna Cambraia Garms

Nome em citações bibliográficas: Garms, B. C.; Garms, B.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Unesp - Campus de Araraquara
Jardim Quitandinha
14800900 - Araraquara, SP - Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em andamento em Biotecnologia (Conceito CAPES 5).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti Herculano.
Co-orientador: Dr. Marco Andrey C. Frade; Dr. Sérgio Luiz S. Salvador.

Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Título: Caracterização de células-tronco e membrana de látex visando um novo modelo de biocurativo.

Orientador: Prof. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. GARMS, B.; BORGES, F.; SANTOS, R.; NIGOGHOSSIAN, K.; MIRANDA, M.; MIRANDA, I.; DALTRO, P.; SCARPARI, S.; GIAGIO, R.; BARROS, N.; ALARCON, K.; DRAGO, B.; GEMEINDER, J.; OLIVEIRA, B.; NASCIMENTO, V.; LOFFREDO, A.; HERCULANO, R. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1-10, 2017.

2. MARCELINO, M. Y.; FUOCO, N. L.; QUAGLIO, A. E. V.; DE CAMARGO BITTENCOURT, R. A.; GARMS, B. C.; DA MOTTA CONCEIÇÃO, T. H.; STASI, L. C. D.; RIBEIRO-PAES, J. T. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. **Journal of coloproctology**, v. 35, p. 20-27, 2015.

3. BARROS, N. R. D.; CHAGAS, P. A. M.; BORGES, F. A.; GEMEINDER, J. L. P.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; HERCULANO, R. D. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **Journal of Materials**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço à Deus.

Aos meus pais, Álvaro e Gabriela, e minha irmã, Laura, minhas avós Carmen e Azél, e ao meu namorado, Luis, pelo amor e paciência em todos os momentos da minha vida, permanecendo ao meu lado nas dificuldades e vitórias e todos os meus familiares e amigos pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por acreditar no meu potencial e sempre me incentivar, pela amizade, confiança, pelos ensinamentos oferecidos e por toda a atenção dispensada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (FMRP-USP), e a equipe do seu laboratório, particularmente, o Marcel Nani, pelas sugestões, ensinamentos e colaboração desde o início da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Souza Salvador (FCFRP-USP), pela orientação e por ter me permitido realizar os ensaios microbiológicos. Agradeço à atenção dispensada e também a grande dedicação de sua técnica Marina na realização dos ensaios.

Aos meus amigos dentro e fora do laboratório, Mônica, Priscila, Felipe, Natan e Matheus, pelo apoio e disposição em ajudar.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

O látex natural (LN) é um polímero natural de grande interesse na área biomédica devido à capacidade de promover o aumento da vascularização e epitelização de tecidos. Considerando as propriedades físico, química e biológica do LN, bem como sua capacidade em atuar como dispositivo de liberação buscou-se, com o presente estudo, desenvolver membranas de LN associadas à moxifloxacina (MXF), antibiótico de amplo espectro de ação, com o intuito de tratar lesões infectadas de difícil cicatrização. A caracterização do material foi realizada por técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ensaios mecânicos. Além disso, foi avaliado o potencial de liberação da MXF em diferentes pHs. Ensaio microbiológicos e de citotoxicidade foram realizados com as membranas carregadoras. A presença de cristais do fármaco na superfície e no interior do material foi observada por MEV de superfície e de corte transversal. Os espectros de FTIR identificaram as bandas de absorção características dos compostos, sugerindo que a integridade dos compostos foi mantida, o que evidencia a rápida liberação inicial do composto. Além disso, o módulo de elasticidade das membranas com e sem MXF foram similares (0,8 MPa), indicando que a elasticidade das membranas é suficiente para aplicações biomédicas. Os cristais da MXF visualizados nas micrografias da superfície da amostra, tendem a solubilizar rapidamente nas primeiras horas de liberação, promovendo o efeito denominado *burst release*. Em relação à posterior redução na velocidade de liberação, este comportamento deve-se aos cristais do fármaco alojados no interior da membrana, que foram liberados através da matriz de forma sustentada. O percentual de liberação de MXF em pH 7,4 foi de 65,44%, enquanto em pH 5,6, o percentual foi de 53,13% em 12 dias. Os ensaios de citotoxicidade mostraram alta viabilidade celular em linhagens de fibroblastos e queratinócitos inferindo a baixa toxicidade do material. Finalmente, ensaios de sensibilidade bacteriana comprovam a capacidade de liberação de MXF por meio da matriz de liberação utilizada sem que haja comprometimento da atividade do fármaco. Assim, os resultados apresentados demonstram que a membrana de LN+MXF representa um promissor biomaterial para o tratamento de lesões cutâneas.

Palavras-Chave: Látex natural. Moxifloxacina. Carreadores poliméricos.

ABSTRACT

The natural rubber latex (LN) is a natural polymer which has aroused large interest in the biomedical fields. Mostly, due its ability to promote vascularization increasing and tissue epithelization. Considering the physical, chemical and biological properties of LN, as well as its ability to act as a release device, the present study aimed to develop LN membranes associated with moxifloxacin (MXF), a wide-spectrum antibiotic, in order to treat infected wounds. The techniques performed in the biomaterial characterization were FTIR, mechanical tests and electronic microscopy. Moreover, the potential of MXF release was evaluated at different pHs. In addition, microbiological assays and cell viability were performed with carrier membranes. The presence of drug crystals on the surface and inside the material was observed by electronic microscopy. The FTIR spectra identified the characteristic absorption bands of the compounds, suggesting that their integrity was maintained, which resulted in rapid early release of the compound. Furthermore, the modulus of elasticity of the membranes with and without MXF were similar (0.80 MPa), indicating the membranes have sufficient elasticity for biomedical applications. The MXF crystals visualized by electronic microscopy on the surface of the material, tend to solubilize quickly during the first hours of release, which promote the burst release effect. Results showed that the MXF released after 295 hours, was 66.44% at pH 7.4, and 53.13% at acidic pH 5.6. Regarding to the subsequent decrease in release rate, this behavior is due to the drug crystals found inside the membrane, which were released through the matrix in a sustained manner. Cytotoxicity assays have shown high cell viability in fibroblast and keratinocyte lines, inferring the low toxicity of the material. Finally, bacterial sensitivity assays confirm the release capacity of MXF through the polymeric matrix without compromising the activity of the drug. Thus, the results presented in this study has shown that the LN+MXF membrane represents a promising biomaterial for the treatment of infected wounds.

Keywords: Natural Rubber Latex. Moxifloxacin. Polymeric carrier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do cenário mundial do mercado de biomateriais	15
Figura 2 - Fontes de polímeros naturais.....	17
Figura 3 - Ilustração do modelo proposto por Blackley (1997) (3a), e modelo de 2011 proposto por Nawamataw (3b)	18
Figura 4 - Evolução da cicatrização do palato de cães com 60 dias pós-operatório .	20
Figura 5 - Aumento da formação de capilares em membranas cório-alantóides quando em contato com ML.....	21
Figura 6 - Úlcera diabética de 6 meses antes do tratamento (A) e depois de 30 dias em contato com ML.....	222
Figura 7 - Estrutura química da MXF	26
Figura 8 - Fármaco liberado ao longo do tempo em níveis: tóxico, desejável e mínimo efetivo.	27
Figura 9 - Ilustração do fármaco sendo liberado pela matriz polimérica em sistema transdérmico.....	28
Figura 10 - Passo a passo do processo de confecção das membranas carregadoras	32
Figura 11 - Membranas de LN polimerizadas.....	33
Figura 12 - Equipamento de ensaio tensão-deformação em funcionamento (12A). Amostra antes e depois de ser submetida ao ensaio mecânico (12B).....	34
Figura 13 - Distribuição da microplaca utilizada para o ensaio de MTT	36
Figura 14 - Representação das amostras utilizadas na técnica de disco difusão; 1 - membrana de LN, 2 - membrana de LN+MXF contendo 20 µg de massa liberada, 3 - membrana de LN+MXF contendo 5 µg de massa liberada e 4 - disco comercial de MXF de 5 µg.....	38
Figura 15 - Micrografias da superfície de amostras de MXF em pó (15A), de membranas de LN+MXF (15B) e de LN (15C). Nota-se a presença de cristais do fármaco na superfície do material. As imagens apresentam ampliação de 300 x e 20.00 KV.....	39
Figura 16- As micrografias de corte transversal (A e B) são do LN e LN+MXF respectivamente, de ampliação de 300 x. A Figura 16C, de ampliação de 5000 x, buscando melhor visualização do fármaco presente no interior do material	40

Figura 17- Espectros de FTIR para amostras de LN (I), MXF (III), LN+MXF (III)	41
Figura 18 - Ensaio de tensão deformação com amostras de LN + NaOH 0,1M, em preto, e LN+MXF, em vermelho. A margem esquerda superior representa o módulo de Young das amostras	44
Figura 19 - Curva analítica da MXF.....	45
Figura 20 - Cinética de liberação de MXF carregada por membrana de LN durante 295 h	45
Figura 21 - Região do <i>burst release</i>	45
Figura 22 - Esquema da degradação de dispositivo poliméricos porosos e não porosos	45
Figura 23 - Viabilidade de amostras do LN, LN+MXF e MXF em linhagem celular 3T3.....	451
Figura 24 - Viabilidade de amostras do LN, LN+MXF e MXF em linhagem celular HaCat	452
Figura 25 - Halo de inibição apresentados pelos seguintes microrganismos: A - <i>E.coli</i> , B - <i>P. Aeruginosa</i> , C - <i>S. aureus</i> , D - <i>S. epidermidis</i> , E - MRSA.	455

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros analisados no LN pela BDF – Comércio de Produtos Agrícolas LTDA	31
Tabela 2 - Correlação dos valores de transmitância (%) com o tipo de ligação equivalente.....	42
Tabela 3 - Valores do ensaio de resistência mecânica.....	43
Tabela 4 - Valores da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração bactericida mínima (MBC) de cloridrato de moxifloxacino para diferentes cepas bacterianas.....	53
Tabela 5 - Valores, em milímetros, dos halos para <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , MRSA, <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> pela técnica de disco difusão.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OECD Organização Econômica e Desenvolvimento

ISO International Organization for Standardization

ASTM Sociedade Americana para Testes e Materiais

SUS Sistema Único de Saúde

WHO World Health Organization

PHA Polihidróxidoalcanoato

LN Látex Natural

VEGF Vascular Endothelial Factor (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular)

TGF *Transforming Growth Factor* (Fator Transformador de Crescimento)

MXF Moxifloxacina

MRSa *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SLS Sistema de Liberação Sustentada

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

FTIR Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

ATR Refletância Total Atenuada

MTT brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

DMSO Dimetilsulfóxido

MIC Concentração Inibitória Mínima

MBC Concentração Bactericida Mínima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Biomateriais	13
1.1.1	Impacto econômico	14
1.2	Polímeros naturais	16
1.2.1	Látex.....	18
1.2.2	Aplicação biológica	19
1.3	Cicatrização	22
1.3.1	Úlceras	23
1.3.2	Infecções	24
1.3.3	Antibióticos	25
1.4	Sistemas de liberação sustentada.....	26
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Extração do látex e confecção das membranas carregadoras	311
3.2	Caracterização físico-química das membranas de LN.....	33
3.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
3.2.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por Refletância Total Atenuada (ATR).....	33
3.2.3	Testes de tensão-deformação	34
3.3	Avaliação da liberação da MXF pela matriz polimérica.....	34
3.3.1	Espectrofluorometria	34
3.4.	Avaliação de citotoxicidade.....	35
3.4.1	Cultura de células.....	35
3.4.2	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)	35
3.5	Microrganismos.....	37
3.5.1	Cultivo dos microrganismos	37
3.5.2	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> dos microrganismos.....	37
3.5.3	Determinação da concentração bactericida mínima (MBC)	37
3.5.4	Ensaio de halo inibição por difusão em disco.....	38

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
4.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por refletância total atenuada (ATR).....	40
4.3 Testes de tensão-deformação	42
4.4 Espectrofluorometria	45
4.5 Ensaio de citotoxicidade	50
4.6 Ensaio microbiológicos	53
4.6.1 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)	53
4.6.2 Ensaio de halo inibição por disco difusão	54
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomateriais

Durante as décadas de 1960 e 1970, impulsionados pela evolução médica, iniciou-se o desenvolvimento de materiais para serem empregados no corpo humano a fim de repararem tecidos. Ocasionalmente, esta evolução coincidiu com o aumento da expectativa de vida da população.¹ Assim, a ciência dos materiais começou a se destacar e tem sido responsável por grande parte das inovações científicas nas áreas de biotecnologia e biomédica.

Hench (1980), em um trabalho pioneiro sobre biomateriais, propôs que estes tinham como finalidade atingir uma combinação adequada das propriedades físicas do material com a do tecido reimplantado, com mínima toxicidade ao hospedeiro.² Posteriormente, sugeriu que as pesquisas nessa temática deveriam direcionar-se para a regeneração tecidual ao invés da substituição do tecido ou órgão lesado.³

Atualmente, o conceito mais utilizado de biomateriais é o proposto por Williams (2009), que os define como qualquer substância que tenha sido engenheirada de modo que, sozinha ou em sistemas complexos, seja empregada para conduzir, por meio do controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de determinada terapia ou diagnóstico médico.⁴

Os biomateriais são produzidos de modo a facilitar a interface entre sistemas biológicos, buscando tratar ou substituir um órgão ou tecido lesionado. Estes podem ser empregados de diferentes formas, variando de acordo com o uso terapêutico, seja como *scaffolds*, ou arcabouços facilitadores do crescimento celular ou associados à compostos que promovam a liberação sustentada em um alvo específico, por exemplo.⁴⁻⁸

Tratando-se de dispositivos médicos, é fundamental que apresentem biocompatibilidade (capacidade de um material substituir total ou parcialmente uma determinada função no organismo, sem desencadear reação inflamatória no hospedeiro), biofuncionalidade (a capacidade do material em desempenhar as funções as quais ele foi projetado durante o período necessário) e bioadesão (adesão entre um material sintético ou natural e à superfície de um tecido).^{5, 9-11}

Em relação à interação com o hospedeiro, estes podem ser classificados como bioinertes, biotoleráveis, bioativos e bioreabsorvíveis. De modo geral, definem-

se como bioinertes, dispositivos que não tenham interação com o organismo. Quanto aos biomateriais que estabelecem relações químicas com o indivíduo, denominam-se bioativos. Considera-se biotolerável, biomateriais que são isolados pelo tecido adjacente com a formação de uma camada de tecido fibroso, e por fim, os bioreabsorvíveis são aqueles que são fagocitados, degradados ou solubilizados.¹¹⁻¹²

Ensaio de biocompatibilidade e estudos pré-clínicos dos biomateriais são necessários para a avaliação da eficácia e segurança do material. Neste contexto, existem agências reguladoras no âmbito nacional e internacional que são responsáveis pelo desenvolvimento de protocolos e metodologias com o propósito de gerenciar e minimizar os riscos à saúde. Compreendem este grupo a Organização Econômica e Desenvolvimento (OECD), a International Organization for Standardization (ISO) e a Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM).¹³⁻¹⁵

A ISO 10.993, constantemente revisada e atualizada, é um conjunto de normas relacionadas com a avaliação biológica de materiais e dispositivos médicos. Esta apresenta as diretrizes para caracterização, bem como os estudos de biocompatibilidade. Dentre os principais ensaios destacam-se o bem-estar animal, genotoxicidade, carcinogênese, toxicidade reprodutiva e sistêmica, hematocompatibilidade, citotoxicidade, implantes, irritação, sensibilização e imunotoxicidade.^{14; 16-17}

Os biomateriais utilizados para aplicação dérmica devem apresentar características físicas e biológicas que sejam compatíveis com o tecido do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada. Materiais de origem natural e sintética têm sido empregados no tratamento de lesões cutâneas. Dentre os biomateriais empregados nesta terapêutica, estão os polímeros, os quais merecem destaque, os de origem naturais.¹⁸

Diversos avanços alcançados na engenharia tecidual e medicina regenerativa envolvem o campo da dermatologia. Os materiais considerados ideais para cicatrização necessitam promover adesão e proliferação celular e serem bioativos, para que o próprio material estimule o processo cicatricial.¹⁸⁻¹⁹

1.1.1. Impacto econômico

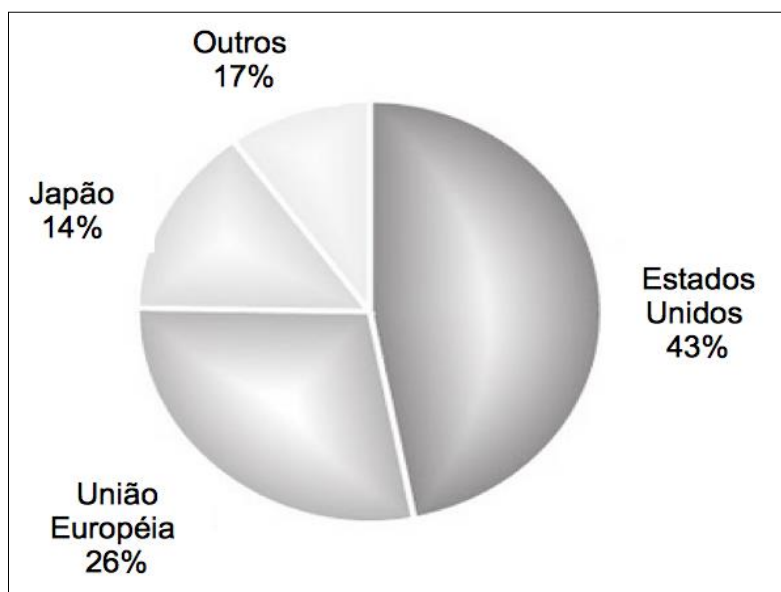
Com o aumento da expectativa de vida, os órgãos e tecidos tendem a sofrer

com os desgastes provocados pela idade, aumentando o risco de falhas e a dificuldade do restabelecimento/reparo. Além disto, elevam-se as chances de aumento de doenças degenerativas. Há ainda problemas relacionados à doenças congênitas e acidentes com veículos e armas de fogo. Estima-se, que apenas nos Estados Unidos, os gastos públicos de saúde destinados a estas questões superem os 400 bilhões de dólares.²⁰⁻²¹

Nas últimas décadas, a demanda por biomateriais que melhor atendam às necessidades da população têm aumentado, e cerca de 300 mil produtos têm sido desenvolvidos na área da saúde. No início dos anos 2000, a representatividade dos dispositivos médicos no mercado mundial girava em torno de 23 bilhões de dólares. Considerando que a taxa de crescimento anual era de 12%, estima-se que em 2017 este número deva ultrapassar os 70 bilhões de dólares gastos mundialmente.²²⁻²⁴

No cenário mundial, a participação norte americana representa 35-45% do mercado, enquanto a Europa ocupa cerca de 25% (Figura 1). No Brasil, o investimento no segmento de biomateriais no ano de 2005 foi de 550 milhões de dólares com estimativa de que atualmente o mercado nacional esteja atingindo a margem de 1,7 bilhões de dólares. Segundo o Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil, os gastos em próteses e materiais no ano de 2000 foi cerca de 242,7 milhões de reais. ²⁴⁻²⁷

Figura 1 - Representação do cenário mundial do mercado de biomateriais.



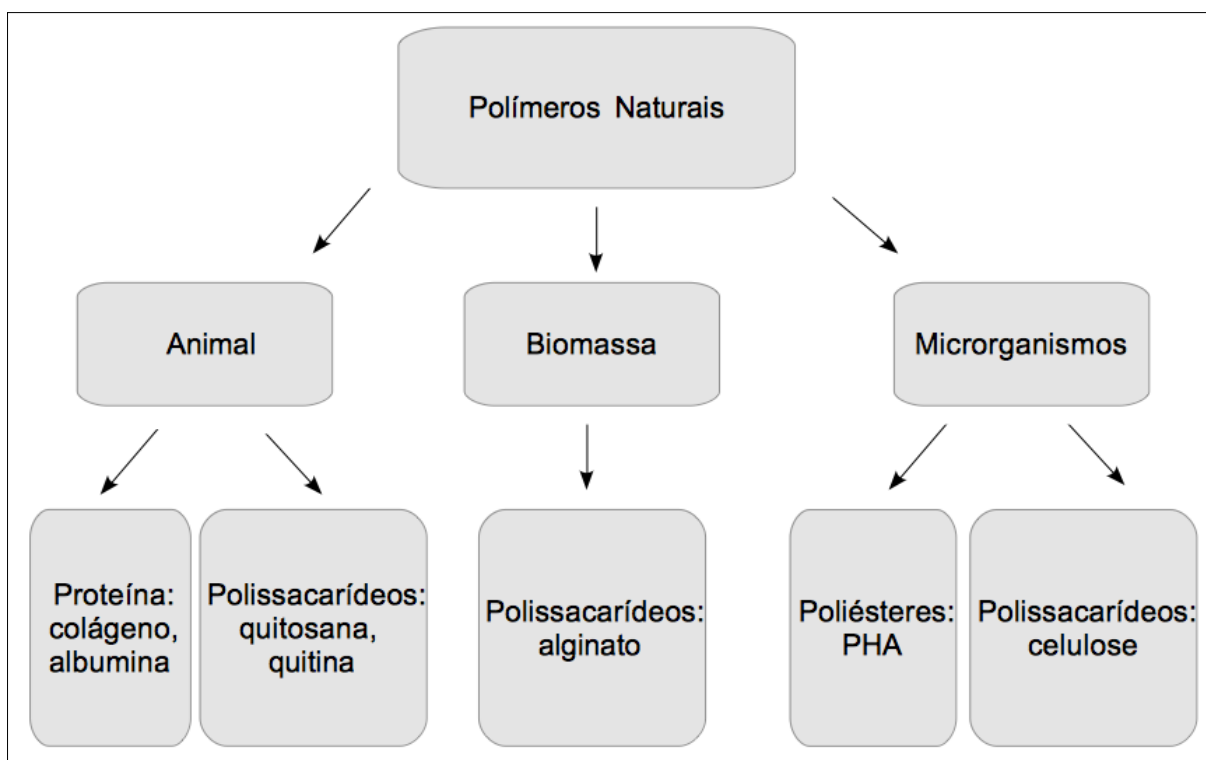
Fonte: Adaptado de WHO, Geneva, 2003.

Os gastos anuais investidos em desenvolvimento de produtos para área de engenharia regenerativa estão em torno de 200 bilhões dólares. Um percentual de 9,3 % deste mercado envolve o tratamento de lesões dérmicas. No Brasil, este segmento teve um crescimento de 24,3% desde o ano de 2010. Adicionalmente, considera-se que pacientes portadores de doenças e lesões dermatológicas, como queimaduras, úlceras de pele e infecções atinjam o número de 4 milhões no cenário norte americano.²⁰⁻²²

1.2. Polímeros Naturais

Polímeros são substâncias de alto peso molecular derivadas de reações de polimerização. Eles são resultados da combinação de monômeros (moléculas idênticas ou similares) afim de formar uma molécula complexa de elevado peso molecular (macromolécula).²⁸

Materiais poliméricos podem ser de origem natural e sintética. Os biopolímeros naturais têm despertado grande interesse industrial, por suas propriedades físicas, como por exemplo, alta resistência mecânica, flexibilidade e baixo custo.²⁹ Estes biomateriais crescem 20% ao ano no mercado mundial e estão em constante ascensão em diversos segmentos industriais. Estes materiais podem ser produzidos de diversas maneiras (Figura 2), por microrganismos (polihidróxidoalcanoatos, PHAs); extraídos de polissacarídeos de origem animal (quitosana) ou diretamente da biomassa (celulose).³⁰⁻³¹

Figura 2 - Fontes de polímeros naturais.

Fonte: Arquivo pessoal.

O polímero mais empregado na área médica para reparo tecidual é a quitosana, copolímero que corresponde a forma desacetilada da quitina. O material, comercialmente conhecido como HemCon Bandage™ (HemCon Medical Tech, Inc. Portland, Oregon), ganhou enfoque em 2002, quando começou a ser comercializado como curativo na Guerra do Iraque. Com a estrutura química muito parecida com a quitosana, a celulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Sua aplicação deve-se, majoritariamente, à *scaffolds* celulares e matrizes de liberação.³¹⁻

32

Outro material empregado em reconstrução tecidual é o colágeno, devido ao baixo índice de alergenicidade e capacidade de originar estruturas muito similares ao tecido normal. Sua aplicação tem sido associada ao reparo da parede abdominal, de tendões, ligamentos e ao fechamento de feridas.³³

A fibrina é outro biopolímero natural que pode ser bastante versátil. É comumente utilizada para melhorar a adesão de enxertos cutâneo e de cartilagem, por exemplo. Além desta propriedade, estudos evidenciam que a cola de fibrina também pode promover a cicatrização independentemente de suas propriedades adesivas. Hoppenbrouwers et al. (2017) demonstraram a redução do tempo de

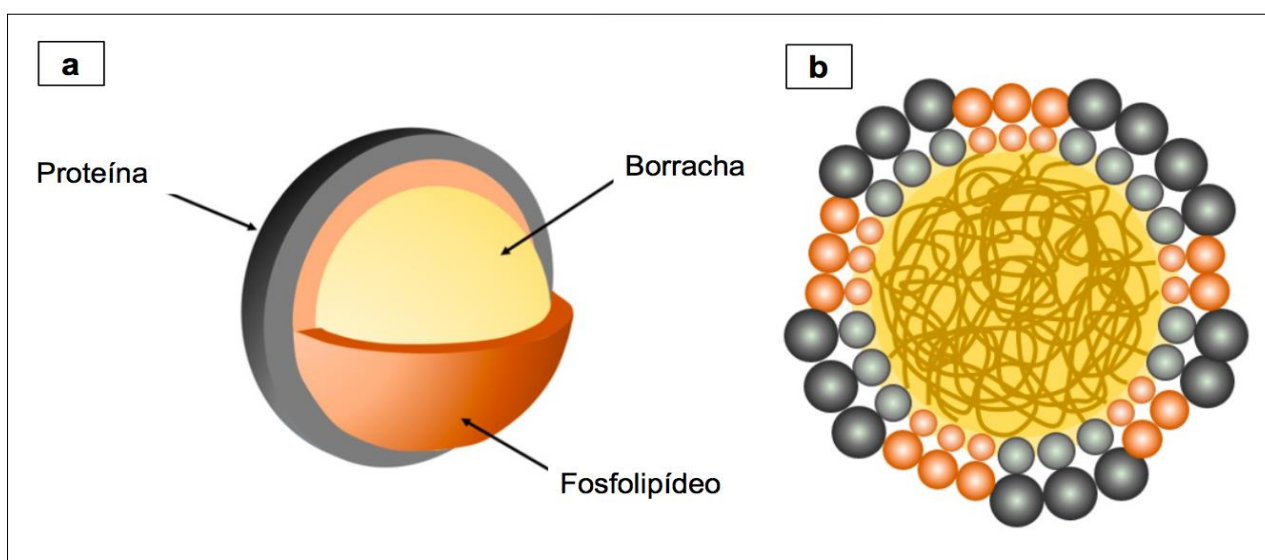
cicatrização em um modelo de lesões em ratos.³⁴

1.2.1 Látex

No que diz respeito à materiais poliméricos, o látex natural (LN) têm despertado grande interesse na área industrial e médica. O material é extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, árvore nativa da Bacia do Rio Amazonas no Brasil e sua composição corresponde a 60% de borracha, 35% de água e 4-5% de proteínas, lipídios, carboidratos e açúcar.³⁵

As partículas poliméricas que constituem a parte dispersa do látex são envolvidas por camadas de proteína e fosfolipídios.³⁶ Diferentes modelos de arranjo das proteínas têm sido descritos. Blackley (1997) foi o pioneiro e mostrou que camadas intercaladas de fosfolipídios e proteínas envolveriam a partícula da borracha (Figura 3a).³⁷ Uma nova proposição, entretanto, indica que estes elementos que circundam a partícula estão dispersos simultaneamente formando uma única camada, com conformação esférica ou ovóide com tamanho que varia entre 60 Å e 5-6 µm (Figura 3b).³⁸

Figura 3 - Ilustração do modelo proposto por Blackley (1997) (3a), e modelo de 2011 proposto por Nawamataw et al. (3b).



Fonte: Adaptado de Blackley (1997) e Nawamataw et al. ^{37,38}

Proteínas de alto peso molecular que podem desenvolver reações alérgicas e de hipersensibilidade são retiradas no processo de centrifugação. Durante esta etapa, o látex forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso que apresenta

quatro componentes fundamentais: hidrocarboneto, isoprênico, soro e fração de fundo.³⁹

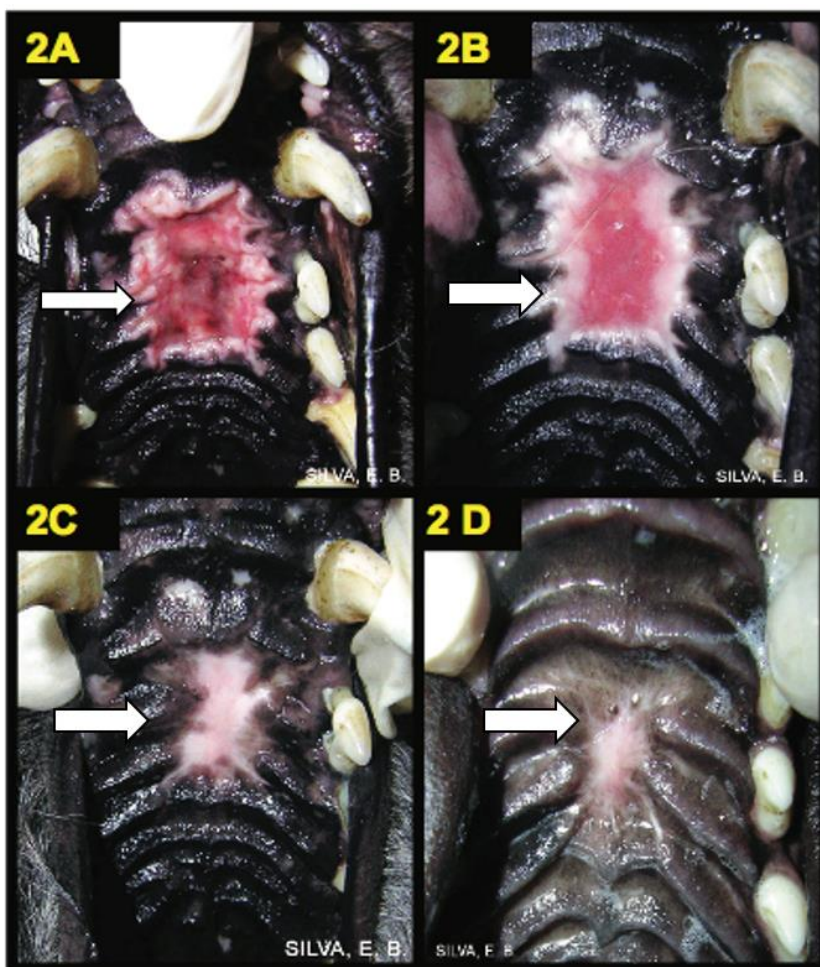
Devido às propriedades físicas do LN que incluem elasticidade, plasticidade, resistência ao desgaste (fricção) e de isolamento elétrico, justifica-se o uso na confecção de diversos produtos, tais como, luvas cirúrgicas, sondas, catéteres e drenos. Destaca-se ainda o fator econômico, uma vez que o custo de obtenção do material é consideravelmente baixo.²⁹⁻⁴⁰

1.2.2 Aplicação biológica

Algumas propriedades elevam o interesse do LN na área médica, entre elas estão: promover o aumento da vascularização/neoangiogênese, epitelização (epitélio pseudoestratificado), neoformação de glândulas submucosas e fibras musculares do esôfago. Estas características tornam o material um dispositivo bastante versátil na área médica, seja compondo *scaffolds* celulares, atuando como matrizes de liberação sustentada, ou ainda facilitando a regeneração óssea guiada na forma de barreira oclusiva.⁴¹⁻⁴³

Em um estudo do emprego do LN em palatoplastia, Silva e Maniscalco (2013), estudaram o emprego do material na regeneração óssea. A Figura 4 mostra o fechamento da lesão em 60 dias após a indução do defeito, concluindo que o LN pode ser considerado uma opção no tratamento de defeitos adquiridos.⁴⁴

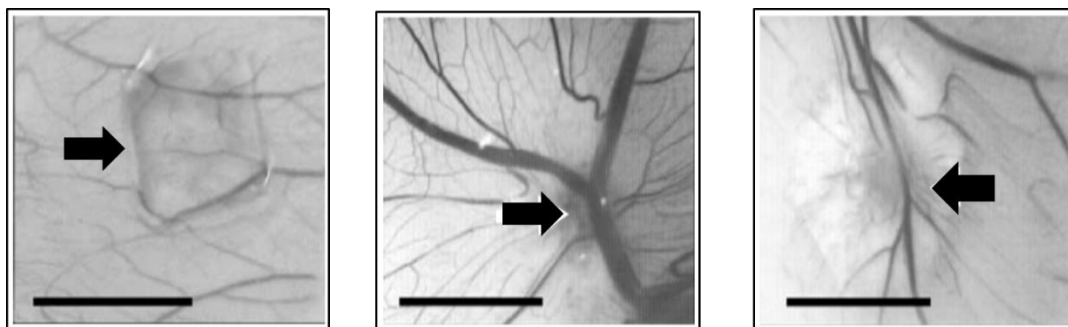
Figura 4 - Evolução da cicatrização do palato de cães com 60 dias pós-operatório



Fonte: Silva e Maniscalco (2013).

Ferreira et al. (2009) aplicaram a membrana de LN em contato com membranas cório-alantóicas de embriões de aves e observaram que o LN estimula a formação de capilares, e consequentemente, promove o aumento da vascularização quando comparada com o grupo controle (Figura 5). Desde então, membranas de LN têm sido empregadas em diferentes terapêuticas, tais como reconstrução do palato em cães, regeneração do estômago em coelhos, regeneração do nervo ciático em ratos e no tratamento de úlceras de diferentes etiologias.⁴³⁻⁴⁵

Figura 5 - Aumento da formação de capilares em membranas cório-alantóides quando em contato com membranas de LN.



Fonte: Ferreira, 2009.

Além disso, os estudos evidenciam que o LN apresenta a capacidade de cicatrizar diferentes tecidos.⁴⁰⁻⁴⁵ Mendonça (2004) correlacionou esta propriedade às proteínas presentes na fração do soro do látex demonstrando que quando submetidos à temperatura acima de 60°C, as atividades angiogênicas e de reepitelização do LN ficam comprometidas.⁴⁶

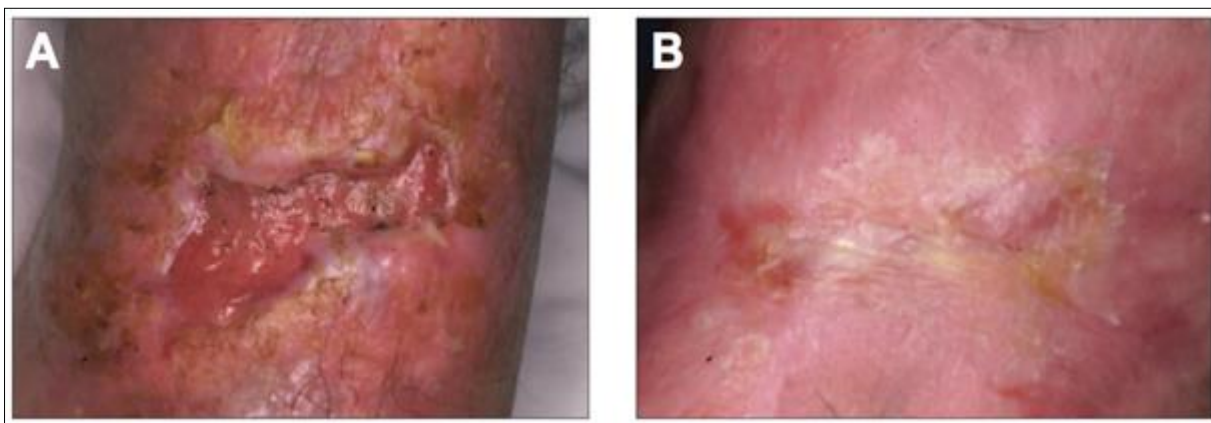
Relatos na literatura evidenciam que o LN é um material biocompatível em modelos animais e humanos, não produzindo reações de hipersensibilidade e com alto potencial de cicatrização. Além de não promover reações adversas no hospedeiro, ressalta-se a aceitação do material pelo organismo que conduz a uma resposta inflamatória equivalente com o processo de cicatrização normal.⁴⁷

Além do mais, alguns autores relataram atividade antimicrobiana do látex.⁴⁸⁻⁵¹ Giordani et al.⁵² observaram a atividade antifúngica do látex extraído da *Hevea brasilienses* para várias linhagens de fungos, sendo este mais efetivo contra *Trichosporon cutaneum* e *Cryptococcus neoformans*. Outro aspecto verificado é de que o látex em presença de anfotericina B apresenta efeito sinérgico.⁴⁸⁻⁵²

Após extensivos estudos em animais, no ano de 2001, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), iniciaram os primeiros estudos em humanos utilizando membranas de LN para o tratamento de lesões cutâneas.⁵³ Os resultados obtidos mostraram que as membranas poliméricas

induziram a cicatrização e epitelização de pacientes com úlceras diabéticas.⁵⁴⁻⁵⁵ Em outro estudo, foi observado que o LN induziu a diferenciação do tecido cicatrizado, promoveu o aumento de fatores de crescimento como VEGF e TGF- β 1, reduziu áreas de necrose tecidual além de aumentar a permeabilidade vascular (Figura 6).⁵⁴ Adicionalmente, ressalta-se que o curativo não é aderente, mantendo a umidade das feridas e contribuindo para o desbridamento e angiogênese.⁵³⁻⁵⁵

Figura 6 - Úlcera diabética de 6 meses antes do tratamento (A) e depois de 30 dias em contato com membrana de LN.



Fonte: Frade, et al. (2004).

1.3 Cicatrização

A regeneração tecidual envolve um complexo processo cicatricial em cascata que se divide em quatro etapas: homeostase, inflamação, proliferação e maturação. No início do processo, durante a homeostase, o organismo se organiza de modo a reduzir a perda de sangue e assim, dar início ao processo de reparo. Posteriormente, a inflamação é iniciada com a migração de neutrófilos e macrófagos para o local lesionado, com o propósito de eliminar bactérias e partículas estranhas.⁵⁵⁻⁵⁶

Durante a proliferação, os macrófagos atraem fatores de crescimento que promovem a proliferação do tecido e os fibroblastos invadem a ferida, iniciando a produção de colágeno tipo III e expansão celular. Finalmente, durante a maturação, o colágeno tipo III, produzido anteriormente, é, então, substituído por colágeno tipo I, e as células se arranjam de forma a buscar maior resistência do tecido. Nesta etapa, a cicatriz formada no processo perde sua tonalidade vermelha e passa a apresentar características semelhantes do tecido normal. Esta sequência de eventos depende

da dimensão e profundidade da lesão, bem como de fatores externos relacionados ao paciente.⁵⁵⁻⁵⁷

Considera-se que o crescimento de capilares a partir da vasculatura pré-existente de tecidos, denominado angiogênese, é uma etapa crítica do processo de cicatrização, uma vez que os vasos formados contribuem para a oxigenação da derme, e assim, controlam a atividade celular presente na lesão. Apesar de extensivamente estudadas, as características bioquímicas que compreendem o processo de cicatrização ainda não estão totalmente elucidadas. Modelos matemáticos têm sido propostos a fim de explicar e prever o comportamento do reparo tecidual.⁵⁸⁻⁵⁹

1.3.1 Úlceras

Diversos fatores podem influenciar o processo de cicatrização, podendo ser pontuais, como oxigenação, vascularização e infecção da lesão; e sistêmicos, como por exemplo, doenças pré-existentes, idade, gênero, alimentação, obesidade, estresse, alcoolismo e tabagismo.^{58; 60-61} Em indivíduos saudáveis, o restabelecimento do tecido cutâneo pode levar de dias a até 3 meses. No entanto, este período pode ser prolongado quando há falhas no reparo tecidual natural, devido à ausência ou retardo do processo de cicatrização.⁶¹

Podem ser descritas como úlceras cutâneas lesões que comprometam a integridade do tecido, independente da sua extensão, podendo atingir a região subcutânea e tecidos subjacentes.⁶² Quanto aos tipos de ulcerações, estas, quando associadas à doenças crônicas, podem resultar em diferentes tipos de feridas, podendo ser crônicas ou agudas.

Conceitualmente, feridas agudas têm a capacidade de cicatrizar espontaneamente passando por todas as fases do processo (homeostase, inflamação, proliferação e maturação) sem complicações.⁶³ Quando este processo não é completado, ou apresenta falhas, estas ulcerações passam a ser classificadas como crônicas.^{62,}

Embora existam diversos fatores etiológicos, úlceras crônicas dos membros inferiores são, majoritariamente, decorrentes de doenças venosas e arteriais, dentre as quais cerca de 60-70% são associadas a problemas venosos (úlceras venosas), 10-25% destas lesões são relacionadas a insuficiência arterial, podendo coexistir

com doenças venosas (úlceras mistas), e certa de 3,5% não tem a etiologia identificada.⁶⁴⁻⁶⁵

Estas lesões podem provocar desconforto, ocasionar dor, infecção, dificuldade de higienização do local, principalmente em pacientes acamados, e em casos extremos, pode levar a necrose da região afetada ou amputação do membro. Esses fatores geram considerável encargo aos sistemas de saúde, além de intervir na qualidade de vida dos pacientes.⁶⁴

Dados do Ministério da Saúde indicam que aproximadamente 5 milhões de brasileiros convivem com lesões ulcerosas crônicas, o que gera um grande impacto sócio econômico, visto que esta ocupa a 10ª posição no ranking de afastamento de trabalhadores de suas ocupações. Embora não existam dados sobre os impactos econômicos no Brasil causados por esta condição, estima-se que nos Estados Unidos o custo anual seja de aproximadamente US\$25 bilhões.^{55; 58; 61; 66}

1.3.2 Infecções

Algumas lesões não cicatrizadas podem persistir por longos períodos, até mesmo anos, e isso faz com que sejam mais susceptíveis à entrada de partículas e organismos externos, causando infecção no local. Ressalta-se que o crescimento de microrganismos compromete a cicatrização e retarda o restabelecimento do tecido.⁶⁷

A inflamação é etapa fundamental do processo de cicatrização, onde busca-se a remoção de microrganismos que possam ter colonizado o tecido lesionado. Entretanto, uma vez que a descontaminação não tenha sido efetiva, a inflamação persiste e faz com que ocorra um aumento de citocinas pró-inflamatórias, visto que há associação de bactérias com endotoxinas.^{58; 60-61}

Os microrganismos podem colonizar os tecidos de duas maneiras, por meio da formação de biofilmes e da forma planctônica. Os biofilmes representam complexas comunidades de bactérias, altamente organizadas, envolvidas por uma matriz extracelular de polissacarídeos aderidos entre si a uma superfície. Ressalta-se que as células deste arranjo celular diferem em relação ao metabolismo e expressão gênica quando comparadas às formas planctônicas. Biofilmes maduros desenvolvem microambientes e são bastante resistentes ao tratamento convencional de antibióticos. Alguns dos microrganismos bastante encontrados em lesões infectadas são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.⁶⁷⁻⁶⁸

Infecções em lesões crônicas, principalmente úlceras diabéticas e de pressão, tendem a ser colonizadas por um grupo de microrganismos que nem sempre trazem sinais de infecção. Estudos demonstraram que em 87% de lesões sem manifestação de sinais de infecção apresentavam pelo menos uma espécie de microrganismo no local. A presença de *Staphylococcus aureus* é encontrada em uma frequência que varia de 43-88% em úlceras de membros inferiores. *Staphylococcus epidermidis*, por outro lado, está presente em 14% de úlceras venosas e 20,6% das ulcerações de pés diabéticos. Outro microrganismo comumente identificado em lesões é a *Pseudomonas aeruginosa*, representando 7-33% das infecções. Organismos aeróbios, como *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*, *Klebsiella sp.* e *Enterococcus sp.*, também colonizam estas feridas.⁶⁸

1.3.3 Antibióticos

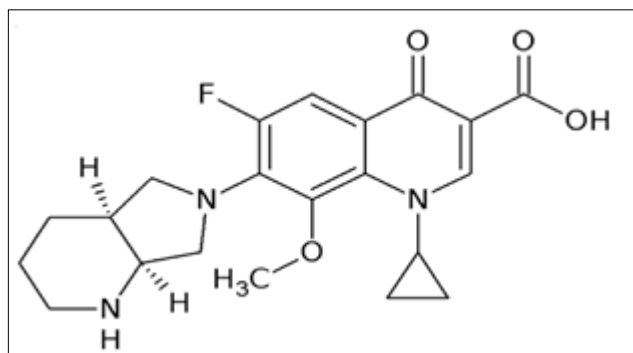
Diversos métodos são empregados no tratamento de lesões crônicas infectadas, incluindo, desbridamento cirúrgico ou mecânico, tratamento químico tópico e administração de antibióticos. Dentre estes, o último é o mais empregado, com destaque para as fluoroquinolonas, devido ao seu amplo espectro de ação, atuando contra patógenos Gram positivos e negativos. Este grupo pertence à classe das quinolonas, que sofreram evolução no espectro de atividade ao longo do tempo, compondo, no total, quatro gerações. A primeira geração tem ação sobre enterobactérias, ao ampliar o espectro de ação contra *Pseudomonas spp.*, passam-se para a segunda geração do fármaco. A terceira geração têm atividade contra microrganismos Gram-negativos e *Staphylococcus spp.*, estendendo sua atuação para tratamentos sistêmicos. Por fim, na última geração, o espectro de ação tem atividade contra *Streptococcus* hemolíticos, pneumococos e anaeróbios.⁶⁸⁻⁷⁰

A lista de antibióticos recomendados para administração via oral ou venosa é extensa, e sua indicação varia de acordo com o tipo de lesão e o histórico do paciente. Participam deste grupo a ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulanato, clindamicina, e por fim, quinolonas de segunda ou terceira geração e quinolonas associadas a metronidazol.⁶⁸

O cloridrato de moxifloxacino ou moxifloxacina (MXF), com estrutura química ilustrada na Figura 7, é um agente antibacteriano fluoriquinolônico de quarta geração com atividade contra uma série de microrganismos, com maior cobertura contra Gram-positivos e micobactérias. O mecanismo de ação do fármaco é o mesmo da

classe das quinolonas, inibindo a DNA girase bacteriana e topoisomerase II e IV, enzimas essenciais ao processo de divisão celular.⁷¹⁻⁷² Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sustentado a atividade do fármaco contra um amplo espectro de agentes infecciosos, incluindo patógenos dérmicos.⁷²⁻⁷⁵

Figura 7 - Estrutura química da MXF.



Fonte: Arquivo pessoal.

Jacobsen *et al.* (2011) estudaram o emprego tópico da MXF para o tratamento de lesões dérmicas não cirúrgicas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).⁷³ O estudo mostrou que o antibiótico apresenta-se como uma terapêutica eficiente para o controle microbiológico de úlceras.

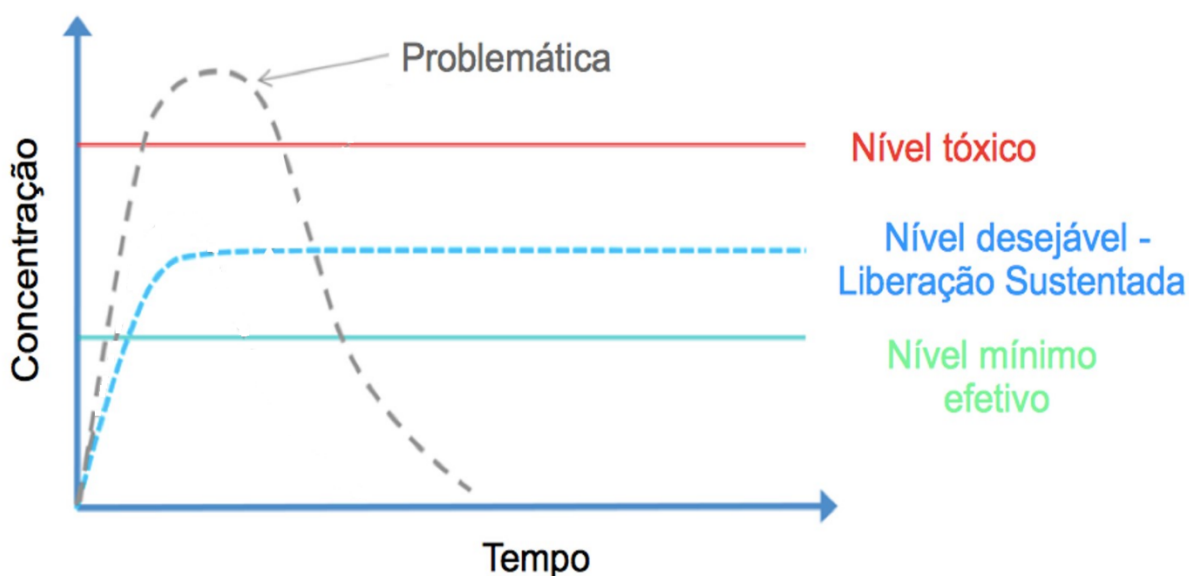
Guay (2006) realizou a triagem de 5 estudos aleatórios de tratamento de lesões de pele e de pele infectada utilizando a MXF em diferentes vias (venosa, oral) afim de demonstrar a eficácia do fármaco para uso dermatológico. Além disso, o estudo evidenciou a vantagem terapêutica da MXF em relação à quinolonas anteriores, como por exemplo a ciprofloxacina, principalmente contra potenciais patógenos dérmicos.⁷²

1.4 Sistemas de Liberação Sustentada

Tratamentos utilizando fármacos administrados via convencional, seja oral ou venosa, raramente atingem um alvo específico do organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido quando se verifica que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas

(físicos, químicos e biológicos).^{40; 76} A Figura 8 apresenta a liberação do fármaco em relação ao tempo. As linhas que indicam os níveis tóxico e mínimo efetivo do fármaco são descritas em vermelho e verde, respectivamente. O nível de liberação desejável está em azul, enquanto que, em cinza, dois casos ilustram a problemática do uso convencional, onde a liberação do fármaco termina antes de atingir o nível desejável ou, em algumas ocasiões, está abaixo do nível mínimo efetivo ou, ainda, superior ao nível tóxico. Ressalta-se que o veículo ideal, deveria promover, após uma pequena quantidade inicial de tempo, que a concentração de fármaco liberada seja constante e se mantenha entre o nível tóxico e o mínimo efetivo.⁷⁷

Figura 8 - Fármaco liberado ao longo do tempo em níveis: tóxico, desejável e mínimo efetivo.



Fonte: Adaptado de Ward e Georgiou (2015).⁷⁷

Constantemente têm sido realizados investimentos em tecnologia com o propósito de desenvolver fármacos com alta eficiência, especificidade e efeitos colaterais reduzidos. Formulações convencionais comumente envolvem alta concentração do composto ativo com meia-vida relativamente curta. A problemática leva ao consumo de concentrações acima do necessário para causar o efeito desejado, ocasionando, eventualmente, aumento de efeitos indesejáveis, alergias e resistência a antibióticos.^{40; 76; 78}

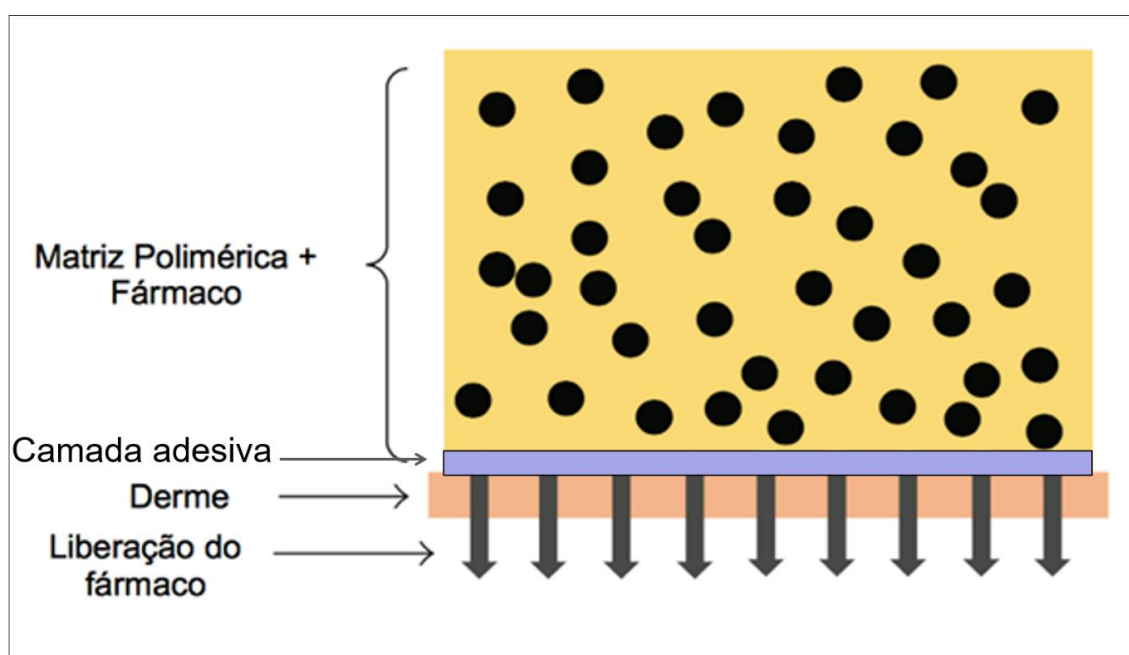
Buscando superar essas questões, surgem os sistemas de liberação sustentada (SLS), com a finalidade de promover maior especificidade entre o fármaco e o tecido/órgão alvo. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento

de um SLS eficaz que promova a liberação de fármacos em um sítio específico por períodos prolongados com dose adequada.⁷⁹⁻⁸⁰

Dentre as diversas matrizes utilizadas nos sistemas de liberação, destacam-se os materiais poliméricos. Considerando seu potencial de liberação de compostos, acrescido de suas propriedades cicatrizantes, o LN torna-se um interessante candidato no emprego de matriz sólida de liberação sustentada.⁷⁹⁻⁸¹ Na última década, buscando potencializar as propriedades terapêuticas do material, iniciou-se o estudo da incorporação de compostos bioativos nestas membranas. Desde então, este elastômero natural têm sido veículo de liberação de extratos vegetais, peptídeos, nanopartículas e fármacos.^{78; 80}

O LN têm sido empregado em diversos sistemas de liberação e associados a compostos que variam com o objetivo da aplicação. Com o intuito de desenvolver adesivos de liberação transdérmica, Pichayakorn et al. (2012) utilizaram o LN como matriz de dispersão de nicotina para tratamento de pacientes com dependência ao tabaco.⁸² Barros et al. (2015) desenvolveram um adesivo de liberação transdérmico com ação anti-inflamatória local, incorporando o diclofenaco de potássio em membranas de LN (Figura 9).⁷⁹ Em outro estudo, Barros et al. (2016), associaram à matriz polimérica a oxitocina, hormônio peptídico responsável por promover a lactação pós parto.⁸⁰

Figura 9 - Ilustração do fármaco sendo liberado pela matriz polimérica em sistema transdérmico.



Fonte: Adaptado de Barros et al. (2015).

Em um estudo da liberação de extrato natural da *Casearia sylvestris*, Borges et al. (2014) mostraram que o LN apresenta capacidade em liberar até 80% do extrato com atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antissépticas e antitumorais provenientes das casearinas e fenóis.⁸³ Nanopartículas de prata também foram associadas à matriz polimérica e liberadas por 48h, afim de controlar atividade microbiana de lesões.⁸⁴

Mudanças estruturais do material podem alterar o perfil de liberação dos compostos. Herculano et al. (2010), ao variarem a porosidade do material, observaram que a porcentagem do composto incorporado também sofria alteração.⁸⁵ A porosidade foi modificada ao submeter as membranas à baixas temperatura durante o processo de polimerização. Além da temperatura, a utilização de lasers e outros métodos também podem ser empregados para essa finalidade.⁸⁶

A partir dos estudos descritos, evidencia-se a eficiência do LN como suporte sólido de liberação. Considerando as propriedades físicas, químicas e biológicas do material, bem como sua capacidade em atuar como dispositivo de liberação buscou-se, com o presente estudo, desenvolver membranas de LN associadas à um antibiótico de amplo espectro de ação com o intuito de tratar lesões infectadas de difícil cicatrização.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver um sistema de liberação sustentada à base de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* capaz de liberar MXF visando uma alternativa terapêutica para lesões infectadas de difícil cicatrização.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar de forma física e química as membranas, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ensaios de resistência mecânica.
- Avaliar o potencial de liberação da MXF utilizando a membrana de LN como matriz.
- Avaliar a citotoxicidade do material, utilizando duas linhagens celulares.
- Avaliar o potencial antibiótico do fármaco liberado pela membrana em diferentes ensaios microbiológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração do látex e confecção das membranas carregadoras

O látex natural utilizado, extraído de seringueiras *Hevea brasiliensis* foi adquirido pela empresa BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda., Guarantã, SP. Este látex foi derivado da mistura de dois clones, RRIM 600 e PB 235 (Lote: 01703/13).

Após a extração, o material foi colocado em presença de amônia para impedir a coagulação, corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao valor de pH igual à 10,2. Posteriormente, o polímero foi submetido à centrifugação de 8000 g por 2 horas, com o objetivo de diminuir a quantidade de proteínas de alto peso molecular, responsáveis por reações de hipersensibilidade.²⁹

Na Tabela 1 estão descritos os dados das análises do Lote no 01703/13 realizadas pela empresa fornecedora do LN, seguindo os padrões de controle de qualidade.

Tabela 1 - Parâmetros analisados no látex natural pela BDF – Comércio de Produtos Agrícolas LTDA.

Requisitos	*Valores
Sólidos totais	61
Borracha Seca (DRC)	60
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1,00
NH ₃	0,71
pH	10,20
Viscosidade	30 seg
Estabilidade mecânica	515
VFA	0,0136
Cor	Normal
Odor	Normal

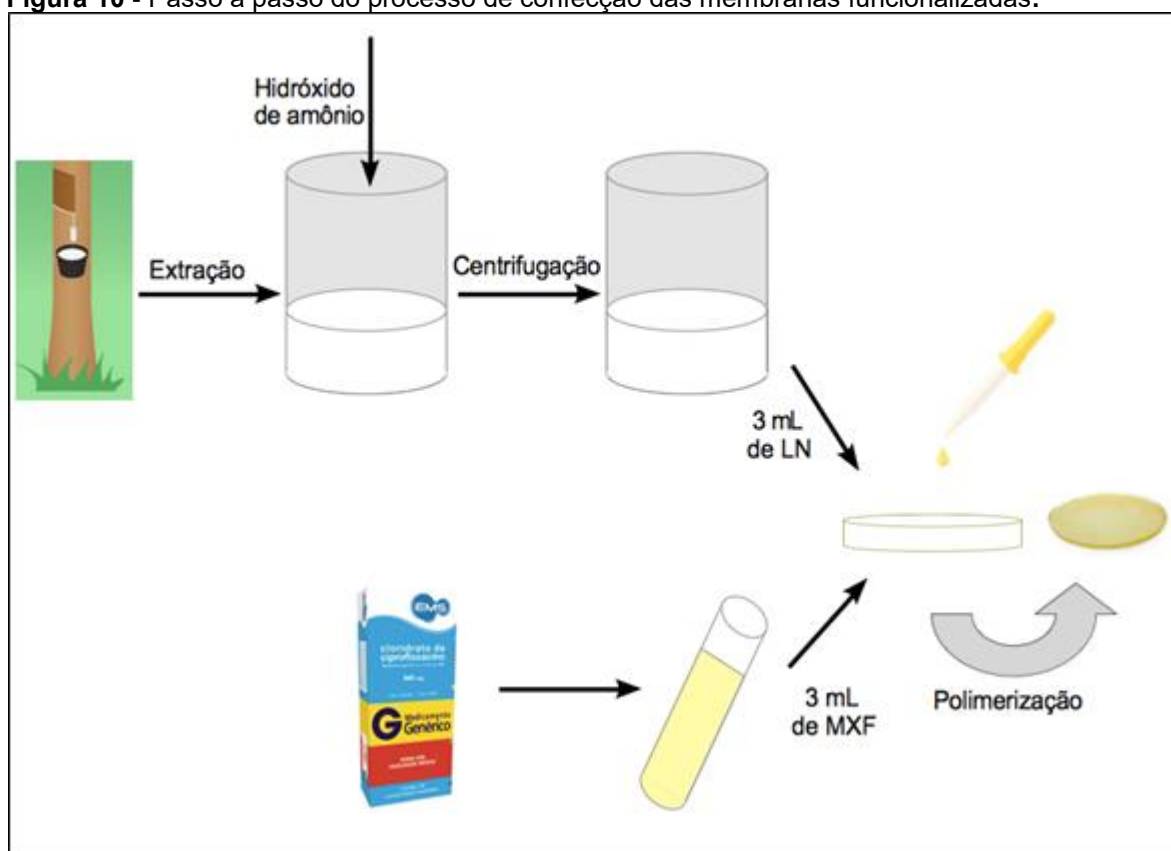
Fonte: BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã – SP.

* Unidades não informadas.

Para a confecção das membranas carregadoras de MXF, comprimidos de cloridrato de moxifloxacino 400 mg (EMS, Hortolândia/SP, lote: 688531) foram macerados, solubilizados em NaOH 0,1 M e deixados em sonificador durante 15 minutos.⁸⁷

As membranas foram confeccionadas pelo método de “casting”, depositando-se 3 mL de látex natural e 3 mL da solução com o fármaco.⁸⁸ Esta solução foi homogeneizada e depositada em placas de Petri (60 mm x 15 mm) a 37°C por 24 h ou até completa polimerização (Figura 10).

Figura 10 - Passo a passo do processo de confecção das membranas funcionalizadas.



Fonte: Arquivo pessoal.

O material polimerizado foi recortado com *punch* histológico de 6 mm de diâmetro, afim de se obter discos poliméricos com área de 28,26 mm² (Figura 11). Foram preparadas membranas com 5 µg, 10 µg e 20 µg, e posteriormente, esta massa foi ajustada ao percentual de liberação de MXF no período de 24 h, resultando em valores finais de massa de 19,23 µg, 38,46 µg e 76,92 µg.

Figura 11 - Membranas de LN polimerizadas.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2. Caracterização físico-química das membranas de LN

3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da membrana de LN bem como o tamanho e forma dos cristais de MXF dispersos sobre a superfície da mesma foram avaliados por microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F), em um ângulo de 35° , localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) no prédio multi-usuário do Instituto de Química da UNESP, Araraquara. Para a obtenção da imagem transversal (interior das membranas), o material foi congelado em nitrogênio líquido por 2 minutos, e na sequência fraturado. Esta caracterização foi realizada em 2.00 kV e com magnificação de 300 x e 5000 x. Todas as amostras foram recobertas com ouro (Au) durante 20 segundos.

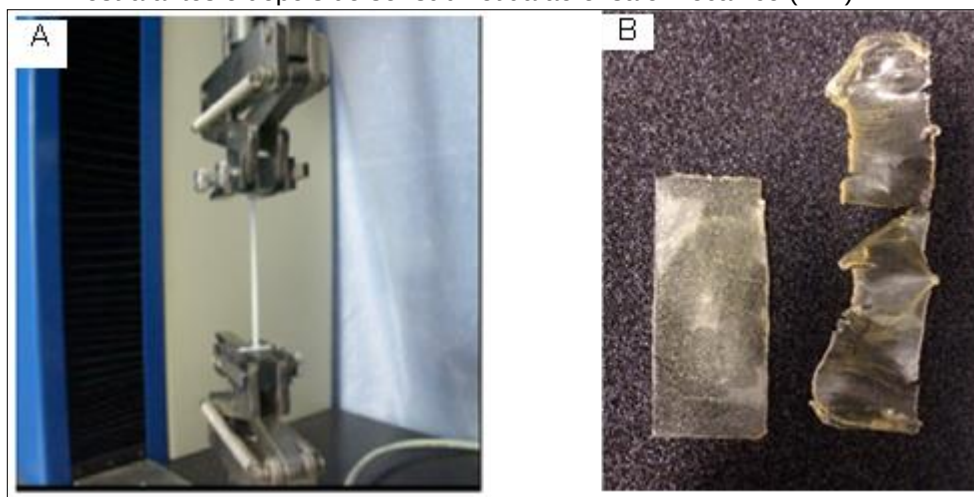
3.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por refletância total atenuada (ATR)

As interações entre o LN e o MXF foram avaliadas pela técnica de espectroscopia no infravermelho em um espectrofotômetro TENSOR 27 fabricado pela BRUKER. A técnica permite identificar os grupos funcionais (aminas, amidas, álcoois, fenóis, entre outros) presente nas membranas. O equipamento opera mediante a técnica de transformada de Fourier com o método de ATR, fonte: Laser de He-Ne (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS). Os espectros foram registrados com absorção na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.2.3 Testes de tensão-deformação

O ensaio foi realizado com o equipamento EMIC-DL 2000 (Figura 12), onde uma carga constante de 10 kgf foi aplicada sobre as amostras em uma velocidade de 500 mm/min e a temperatura controlada de 28°C. Os resultados foram analisados por meio do software TESC versão 3.01 que acompanha o equipamento e gera curvas de resposta (força vs deformação) de cada corpo de prova. As dimensões das amostras foram obtidas a partir das médias de altura, espessura e largura das amostras, sendo, 44,80 mm, 0,84 mm e 26,19 mm, respectivamente.

Figura 12 - Equipamento de ensaio tensão-deformação em funcionamento (12A). Amostra antes e depois de ser submetida ao ensaio mecânico (12B).



Fonte: Arquivo pessoal.

3.3 Avaliação da liberação da MXF pela matriz polimérica

3.3.1 Espectrofluorometria

Para a construção da curva analítica, soluções de MXF com concentrações no intervalo de 2,5 – 100 ng/mL foram preparadas em NaOH 0,1 M. O espectrofluorímetro de fluorescência, Perkin Elmer LS 45, com lâmpada de 20kW foi utilizado para mensurar a intensidade de fluorescência do fármaco em comprimento de onda fixo para excitação e emissão de 291 nm e 462 nm, respectivamente. Os dados foram compilados utilizando o software FL Winlab.

Buscando determinar a cinética de liberação, membranas incorporadas com o fármaco foram submersas em 100 mL de soluções com valores de pH 7,4 e 5,6 com o intuito de mimetizar o perfil em pH da lesão e da pele sadia, respectivamente.⁸⁹ O

comportamento da liberação foi analisado com a retirada de alíquotas da solução em diferentes intervalos de tempo e sua concentração foi mensurada. As alíquotas foram retornadas à solução para que não houvesse alteração no volume de liberação. Os dados foram compilados utilizando o software Origin Pro 8 SR 4, da OriginLab Corporation.

3.4. Avaliação de citotoxicidade

3.4.1. Cultura de células

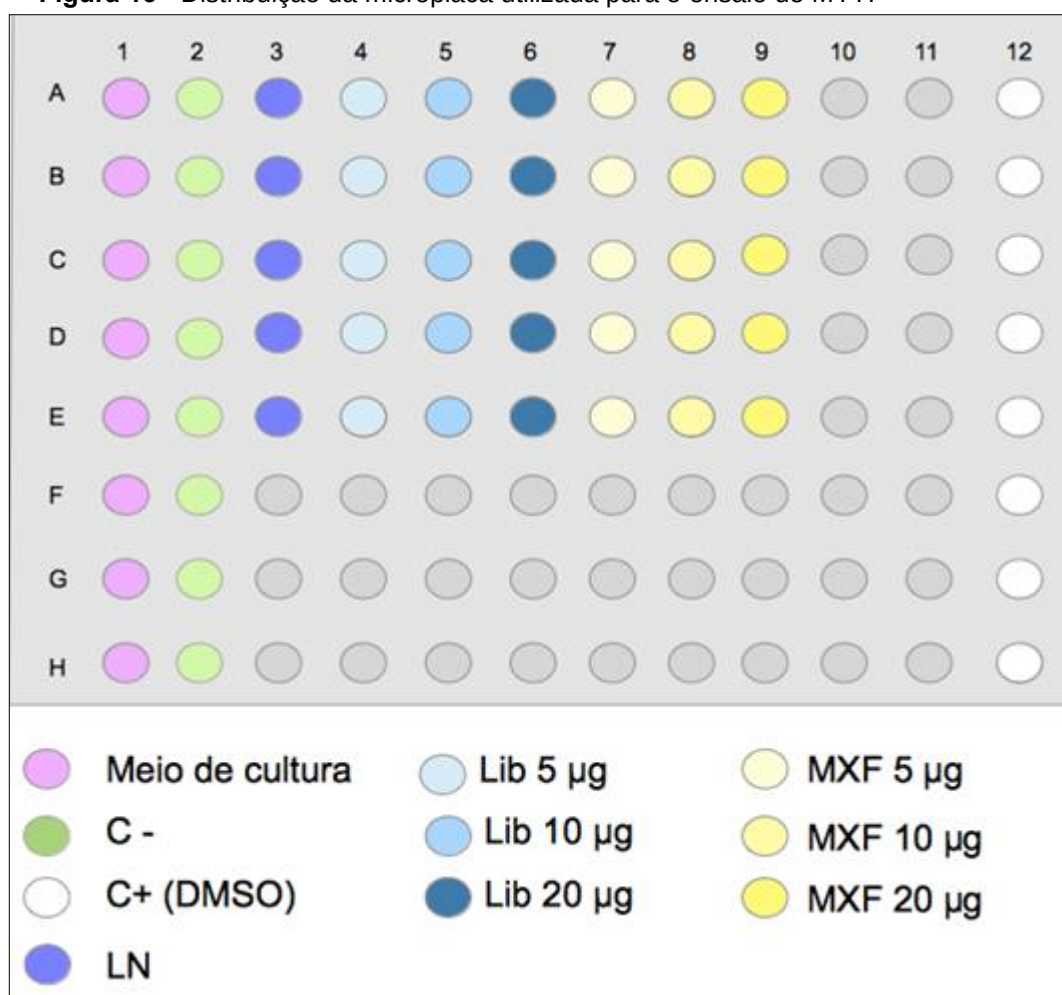
Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares normais HaCat (queratinócitos) e 3T3 (fibroblastos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ. As células foram cultivadas em garrafas de cultura a uma concentração de 1×10^5 células/cm², na presença de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma-Aldrich[®]) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Vitrocell[®]), 1% de Solução de Antibiótico e Antimicótico (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, USA) e 3 g/L de glicose e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 48h. Ao atingirem 60-80% de confluência, as células foram dissociadas dos frascos de cultivo com utilização de Tripsina (Gibco[®], New York, USA) e contadas em câmara gematocimétrica.

3.4.2. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)

A viabilidade celular dos materiais foi realizada com as recomendações da norma técnica ISO 10993-5, por meio do ensaio MTT, conforme descrito por Mosmann (1983).⁹⁰ Utilizou-se o kit de ensaio Vybrant[®] MTT Cell Proliferation V-13154 (Gibco[®], New York, USA), conforme instruções do fabricante. Para cada ensaio, 1×10^5 células/mL foram adicionadas nos poços de microplacas de 96 poços, permitindo um volume final de 200 µL e incubadas por 24 h à 37°C com 5% de CO₂ para permitir a adesão celular antes da análise com as amostras. Foram testadas amostras do eluato de 24 h de liberação das membranas de LN sem o fármaco e incorporadas com MXF contendo 5 µg, 10 µg e 20 µg de massa liberada. Além disso, o fármaco também foi avaliado nestas 3 concentrações (Figura 13). As células

foram expostas aos compostos por 24 h e então, adicionou-se 30 μL de MTT (5 $\mu\text{g/mL}$) em cada poço e incubadas por 4 h. Após esse período, o precipitado foi descartado e os cristais de formazan foram eluídos com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. O valor da média da densidade óptica do grupo controle (C-, células + meio de cultura) foi considerado 100% de viabilidade celular e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a este valor. Como controle positivo, utilizou-se DMSO, o qual representa 0% de viabilidade celular.

Figura 13 - Distribuição da microplaca utilizada para o ensaio de MTT.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.5 Microrganismos

3.5.1 Cultivo dos microrganismos

Para a realização dos ensaios microbiológicos foram utilizados cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2327), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus metilicina resistentes* (MRSA), pertencentes ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-Ribeirão Preto, cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto, SP. As bactérias foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion – Sigma Aldrich[®], EUA) à 37°C durante 24 horas.

3.5.2 Teste de sensibilidade *in vitro* dos microrganismos

O teste de sensibilidade *in vitro* foi realizado conforme preconizado pela norma M7-A10 referente à testes de sensibilidade antimicrobiana do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (CLSI, 2015), com modificações.⁹¹ Concentrações finais de MXF de 2,5 à 320 mg/L foram testadas com os microrganismos propostos. As concentrações finais das suspensões bacteriana foram de 15×10^8 células/mL, semelhante a solução padrão McFarland de 0,5 (NCCLS, 2003).⁹¹ As placas de microdiluição foram incubadas à 37° por 24 horas. Considerou-se a Concentração Inibitória Mínima (MIC), a menor concentração da droga que impediu o crescimento. Para revelação dos poços foi empregado 30 µL de resazurina (Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich[®], USA).

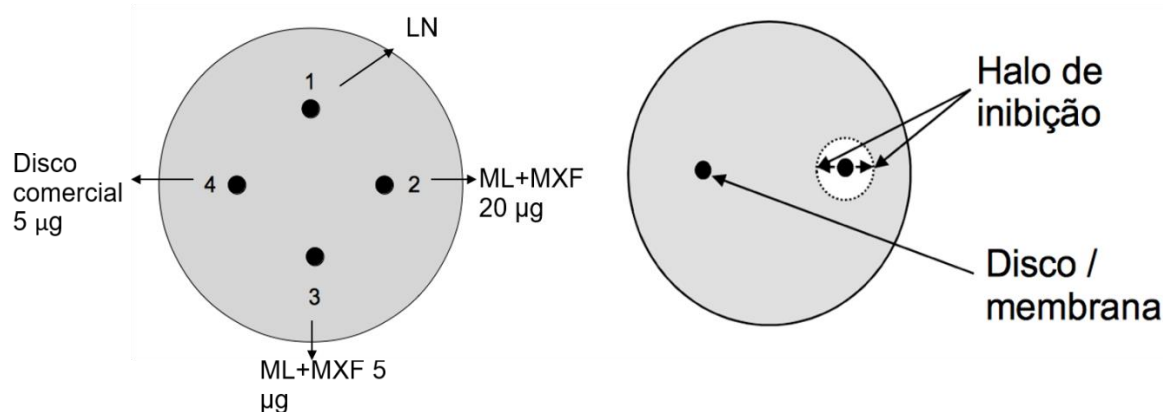
3.5.3 Determinação da concentração bactericida mínima (MBC)

As suspensões celulares utilizadas para realização do teste de sensibilidade por microdiluição foram subcultivadas em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo ágar Mueller-Hinton. Após 24 horas de incubação à 37°C foram realizadas leituras para verificar a MBC, determinada pela menor concentração do fármaco que impediu o crescimento visível do subcultivo (CLSI, 2015).⁹¹

3.5.4. Ensaio de halo inibição por difusão em disco

As análises para os testes de difusão foram realizadas conforme preconizado pelo CLSI (2015), com adaptações.⁹² Placas de Petri de 90 x 15 mm contendo Muller Hinton foram inoculadas com 2 mL de inóculo contendo $1,5 \times 10^8$ células/mL. Após a inoculação foi retirado o excesso com auxílio de pipeta. As placas foram deixadas entreabertas em câmara de fluxo laminar até apresentarem superfície seca. Posteriormente, quatro discos de amostras foram distribuídos na superfície da placa, conforme mostra a Figura 14. As placas foram incubadas à 37°C por 24 h. Finalmente, os diâmetros dos halos de inibição (ausência de crescimento) foram mensurados com o auxílio do paquímetro.

Figura 14 - Representação das amostras utilizadas na técnica de disco difusão; 1 - membrana de LN, 2 - membrana de LN+MXF contendo 20 µg de massa liberada, 3 - membrana de LN+MXF contendo 5 µg de massa liberada e 4 - disco comercial de MXF de 5 µg.



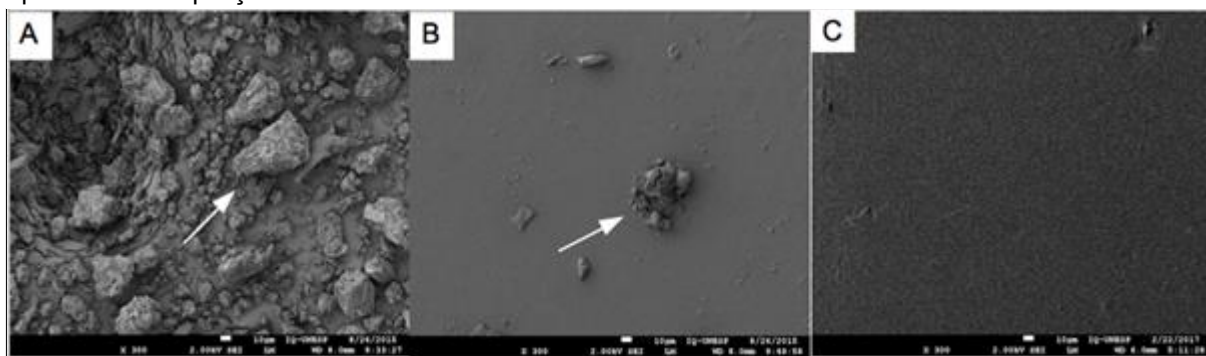
Fonte: Arquivo pessoal.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

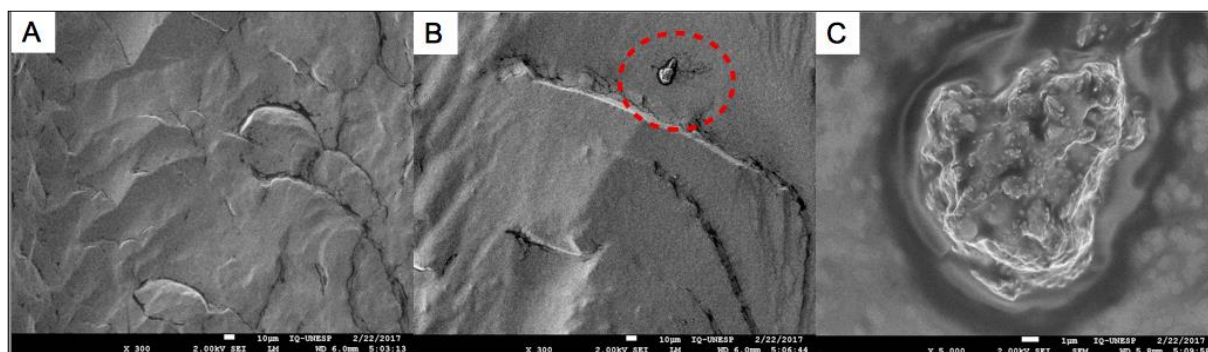
Com o propósito de analisar a morfologia do biomaterial, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura (MEV). A Figura 15A apresenta a micrografia da MXF em pó, onde é possível observar diferentes dimensões dos cristais do composto. Os cristais, quando incorporados ao látex, aparecem dispersos na superfície da membrana de LN (Figura 15B). Por sua vez, o LN puro (Figura 15C), apresenta superfície homogênea e sem ondulações.⁸⁰

Figura 15 - Micrografias da superfície de amostras de MXF em pó (15A), de membranas de LN+MXF (15B) e de LN (15C). Nota-se a presença de cristais do fármaco na superfície do material. As imagens apresentam ampliação de 300 x e 20.00 KV.



A presença do composto também foi observada no interior do material por meio de imagens obtidas em corte transversal das membranas. A Figura 16A mostra o LN sem a presença de MXF, onde é possível observar apenas as irregularidades do material sofridas no momento da fratura. A Figura 16B, nota-se a presença do cristal de MXF entre os poros na região interna da membrana, este cristal é apresentado em magnificação de 5000 x na Figura 16C.

Figura 16- As micrografias de corte transversal (A e B) são do LN e LN+MXF respectivamente, de ampliação de 300 x. A Figura 16C, de ampliação de 5000 x, buscando melhor visualização do fármaco presente no interior do material.



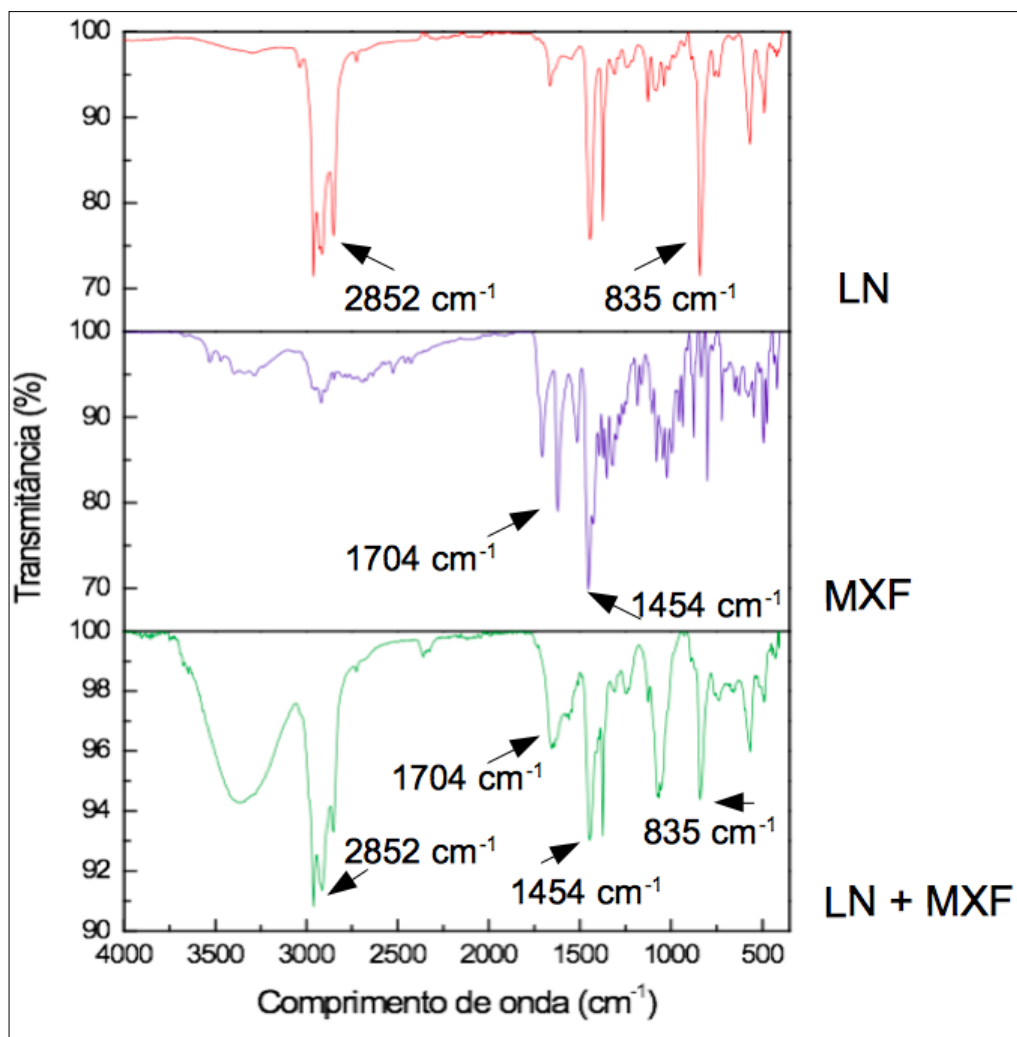
A partir da presença dos cristais do fármaco na superfície da membrana sugere-se como será o perfil de liberação do antibiótico por meio da matriz polimérica. Estes cristais tendem a se solubilizar rapidamente durante as primeiras horas de liberação, dando origem ao efeito denominado *burst release*.^{79, 80}

Em relação ao corte transversal da matriz polimérica, assume-se que os cristais presentes no interior do material só seriam solvatados e então carregados, após entrarem em contato com a solução do sistema de liberação. Este comportamento, refere-se ao efeito de *stable profile*, ou perfil estável, uma vez que a liberação ocorre por difusão simples, do meio mais concentrado para a área de menor concentração.⁹³

4.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por Refletância Total Atenuada (ATR)

Com o intuito de identificar os grupos funcionais do LN, da MXF e da associação dos compostos, foi utilizada a técnica de FTIR. A Figura 17 mostra o espectro de FTIR do LN (I), da MXF (II) e da associação LN + MXF (III) usando o modo de refletância total atenuada (ATR) obtidos na região de 400-4000 cm^{-1} .

Figura 17- Espectros de FTIR para amostras de LN, MXF, LN+MXF.



A partir do espectro do LN é possível observar a presença de vários componentes do látex, através de absorções características para o poli (*cis*-1,4-isopreno): entre 2960-2852 cm⁻¹ (estiramento simétrico CH₂ e assimétrico CH₃), 1446 cm⁻¹ e 1375 cm⁻¹ (deformação de CH₂ e CH₃), 1662 cm⁻¹ (alongamento C=C) e 835 cm⁻¹ (dobramento fora do plano de =C-H). Esta última absorção, em 835 cm⁻¹, é a mais importante para a identificação do LN, pois caracteriza a função R₂C=CHR (*cis*-1,4). Este espectro também mostra as vibrações de proteínas e fosfolipídios que estabilizam as moléculas de borracha em 3537 cm⁻¹ (estiramento de OH e NH), 1542 cm⁻¹ (flexão de NH) e entre 1130 a 1010 cm⁻¹ indicam compostos com oxigênio (C–O e –O–O–). A relação entre a transmitância e os tipos de relação que estes representam estão descritos na Tabela 2.^{79, 80}

O espectro da MXF comprova a presença das principais ligações de MXF: 1704 cm^{-1} (estiramento de C=O), 1622 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} (deformação de C=C), 875 cm^{-1} (alongamento de C-H), 1352 cm^{-1} e 1321 cm^{-1} (C-N) e 1183 cm^{-1} (monofluorobenzeno).⁹⁴ Por sua vez, na associação do látex com a MXF, no espectro do LN+MXF, as bandas de absorção em 1704 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} , demonstram a presença do antibiótico, enquanto as bandas de absorção em 835 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} representam as bandas características do látex.

Tabela 2 - Correlação dos valores de transmitância (%) com o tipo de ligação equivalente.

Transmitância	Ligação
2852 cm^{-1}	CH ₂ , CH ₃
1704 cm^{-1}	C=O
1454 cm^{-1}	C=C
835 cm^{-1}	C-H

Garms et al. (2017), ao incorporarem outro antibiótico do grupo das quinolonas à membranas de LN, observaram que ambos espectros, fármaco e polímero, não foram alterados, indicando que não houve interação química entre os componentes da membrana.⁹⁶ O resultado foi semelhante ao encontrado por Barros et al. (2015) que no estudo de adesivos transdérmicos de LN com diclofenaco de potássio, demonstraram que o fármaco se manteve estável e as propriedades do LN foram mantidas.⁷⁹ Desta forma, evidencia-se que, no presente estudo, a integridade da estrutura da MXF foi preservada após a associação dos compostos.

4.3. Testes de tensão-deformação

A fim de avaliar se a incorporação do fármaco influenciou na elasticidade do biomaterial, membranas de LN+MXF e de LN+NaOH 0,1M (utilizado como controle), foram submetidas ao ensaio de tração. As amostras foram confeccionadas em triplicata com média de 27,47 mm de altura, 27,18 mm de largura e 0,876 mm de espessura. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores do Ensaio de Resistência Mecânica.

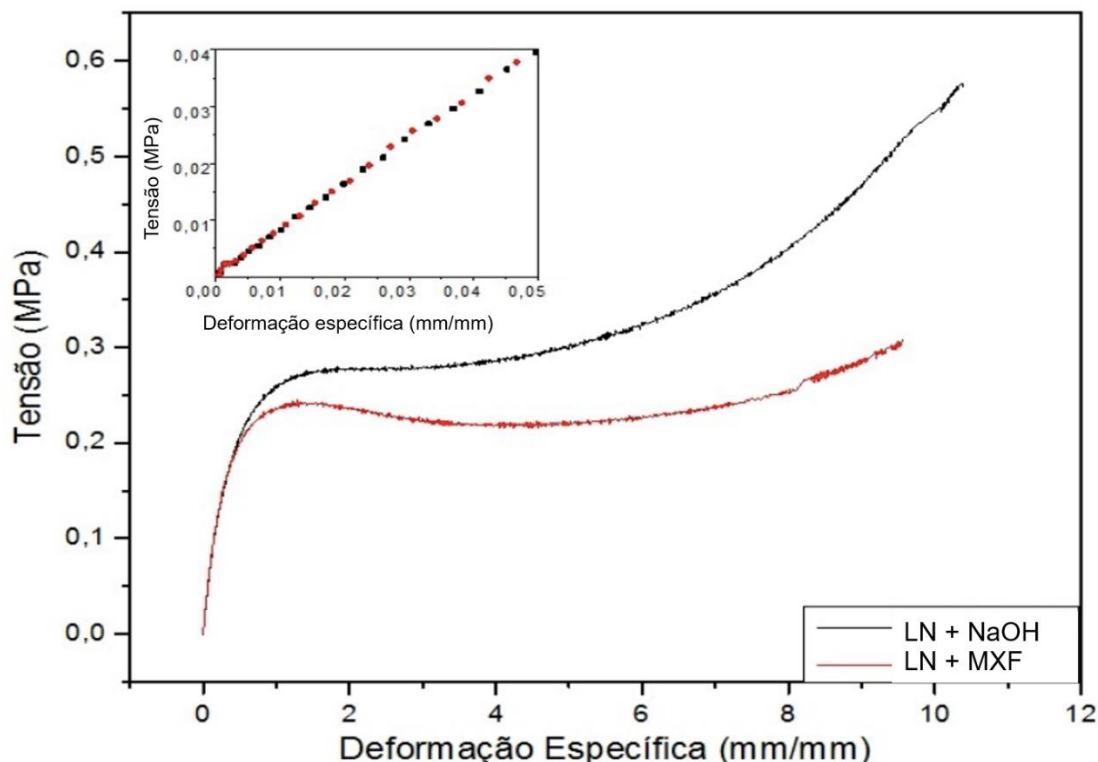
Amostras	Módulo Young (MPa)	Tensão Ruptura (MPa)	Deformação (%)
LN+NaOH	0,80 ± 0,04	0,53 ± 0,03	985 ± 50
LN+MXF	0,80 ± 0,05	0,28 ± 0,04	900 ± 103

Em relação ao módulo de elasticidade das membranas, observou-se que estes não sofreram alteração após a incorporação do composto. Este resultado corrobora com Resende et al. (2010), que analisaram a variação do módulo de Young do LN incorporados com nanocompósitos de argila e observaram que, o material com pouca ou nenhuma incorporação de argila obtiveram valores de 0,9 MPa.⁹⁷

O perfil da curva representada na Figura 18 ilustra as três regiões características de elastômeros; elástica, plástica e área de ruptura.⁹⁸ Na primeira região, a tensão é diretamente proporcional ao alongamento, e o material ainda apresenta a capacidade de retornar à forma original uma vez que a tensão aplicada é retirada.

A região subsequente refere-se ao comportamento plástico do material, onde ocorre o chamado “empescoçamento” da amostra, ou estrição, que corresponde a diminuição do diâmetro do corpo de prova. Nesta fase, a deformação do material é permanente, e apenas parte do tamanho é retornada. Posteriormente, o comportamento da curva passa a chamada cristalização induzida por tensão, levando a ruptura da amostra.

Figura 18 - Ensaio de tensão deformação com amostras de LN + NaOH 0,1M, em preto, e LN+MXF, em vermelho. A margem esquerda superior representa o módulo de Young das amostras.



Adicionalmente, os dados apresentados na Figura 18 mostram que a incorporação da MXF ao LN promoveu uma redução de 47,2 % na tensão de ruptura do material. Enquanto que a deformação do material sofreu redução de 8,63 %.

Em um estudo de caracterização de membranas de LN incorporadas com ciprofloxacina, os autores demonstraram que a associação não promoveu significativa alteração nas propriedades mecânicas do material quando comparado com membranas de látex puro.⁹⁶

Em relação as propriedades mecânicas de diferentes clones do LN, Dall'Antonia et al. (2009), observaram que não ocorreu variação significativa no desempenho em relação ao módulo elástico quando comparadas às amostras do látex comercial. Entretanto, o clone RRIM 600 apresentou melhores resultados da análise mecânica.⁹⁹

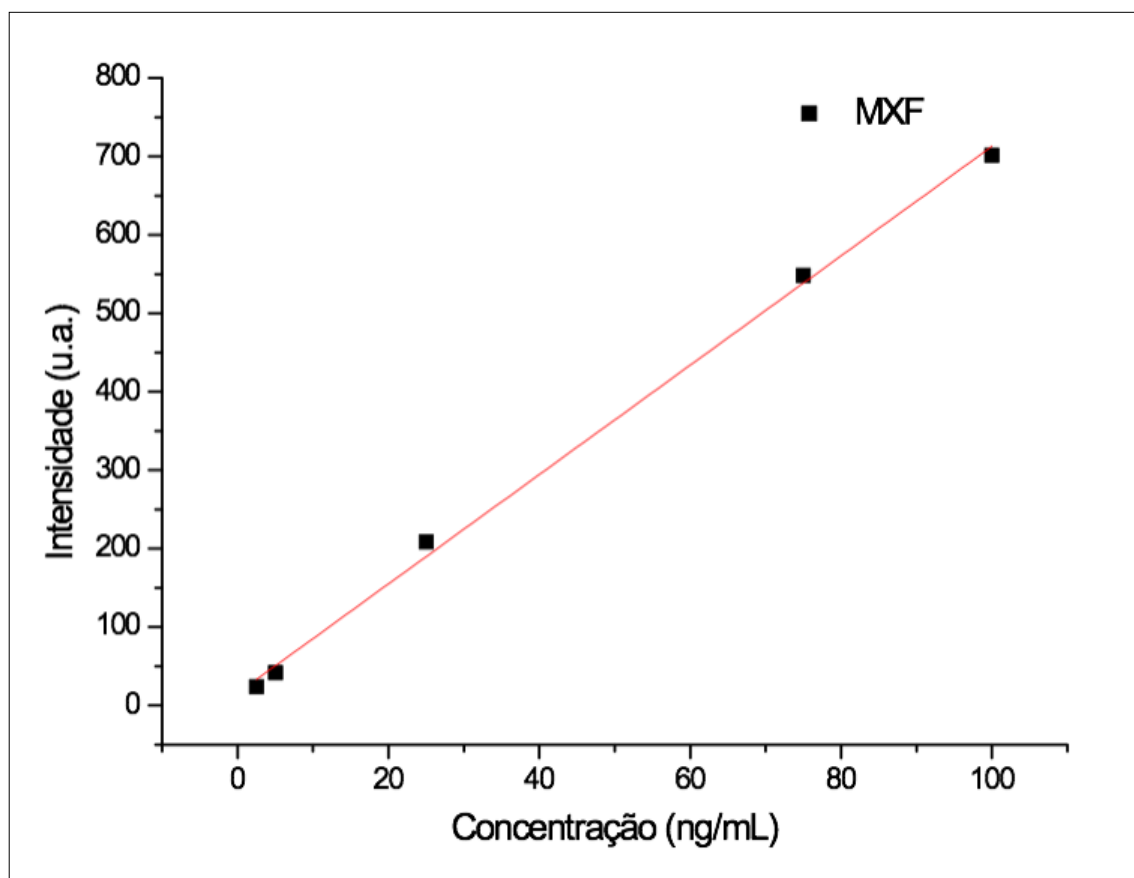
Herculano et al. (2011) e Borges et al. (2015) observaram que embora a incorporação de aditivos à membrana de LN possa alterar o módulo de elasticidade do material, o mesmo ainda apresenta resistência mecânica suficiente para aplicações biomédicas.^{29; 100}

4.4. Espectrofluorometria

A escolha do material utilizado como matriz é elemento determinante da eficiência dos sistemas de liberação. É necessário que este seja capaz de controlar a liberação do fármaco e sustentar a ação terapêutica pelo período desejado. Estudos apontam que o LN é um polímero versátil e com características promissoras no desempenho dessa aplicação, pois é hidrofóbico, e assim pode ser empregado como matriz para a liberação controlada de fármacos, pois o controle de dispersão do bioativo ocorre principalmente por meio de difusão.¹⁰¹

A avaliação da MXF carregada pelo LN foi realizada a partir das bandas de excitação e emissão características, com comprimentos de onda de 290 e 462 nm, respectivamente, de acordo com a literatura. Após a definição deste parâmetro, foi construída a curva analítica no intervalo de 2,5 a 100 ng/mL (Figura 19).

Figura 19 - Curva analítica da MXF.

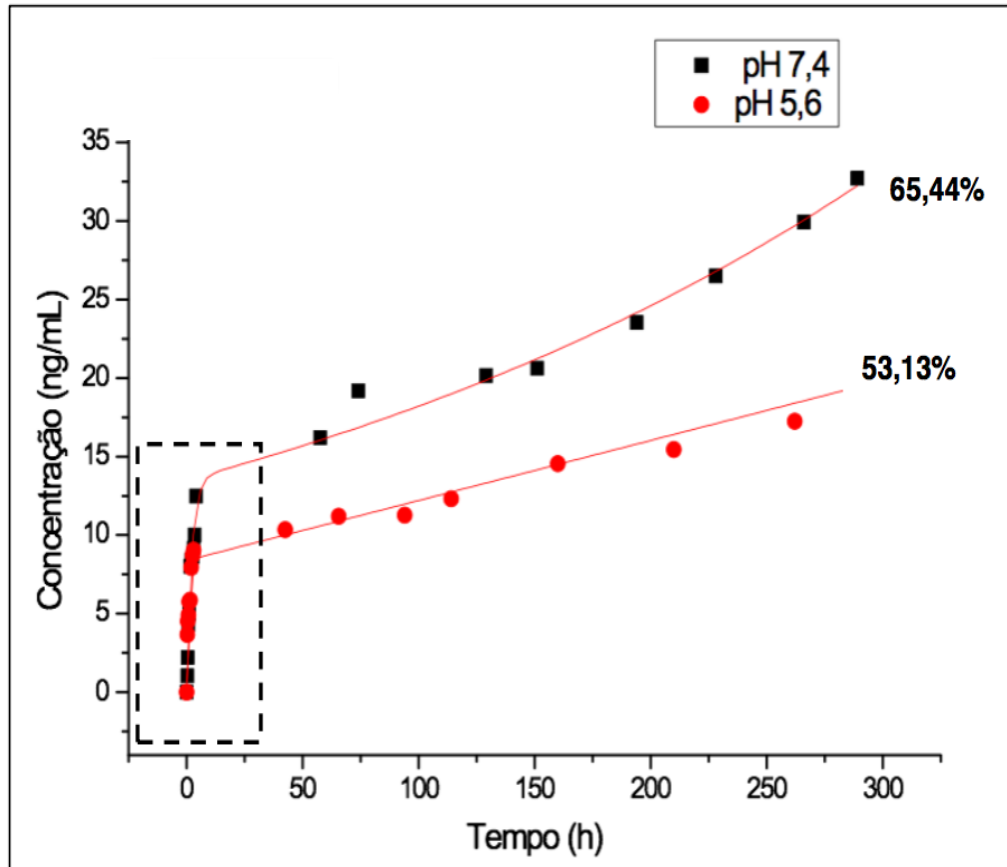


Segundo Gethin (2007), em um estudo da alteração do pH no processo de

cicatrização, úlceras apresentam variação de pH entre 6,9 – 7,6, e conforme o tecido é regenerado, o pH neutro se torna ácido, oscilando entre 5,4 – 5,6.^{89; 102} Dessa forma, neste trabalho utilizou-se membranas de LN+MXF (5 µg) imersas em solução tampão de pH 7,4, mimetizando condições da região com feridas e em pH 5,6, mimetizando condições de região de pele sadia. As membranas, após submersas nestas soluções foram deixadas por 12 dias à 34°C. Durante este período, alíquotas da liberação foram retiradas em diferentes intervalos de tempo. A concentração do fármaco liberado foi determinada a partir da intensidade de fluorescência.¹⁰³⁻¹⁰⁵

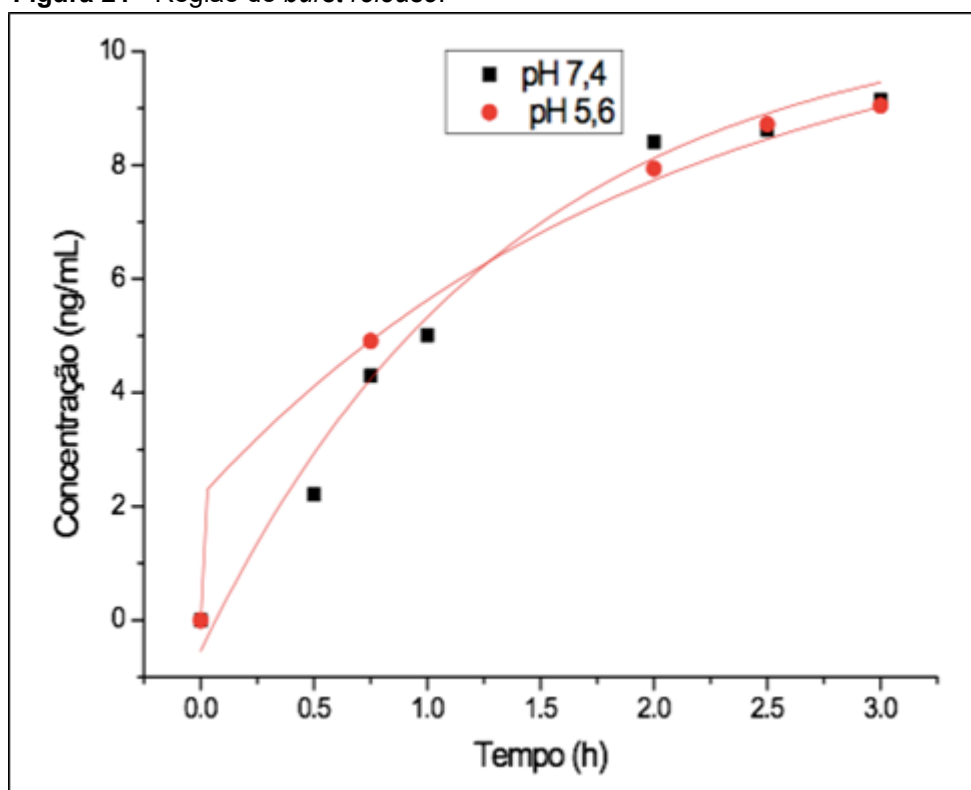
A cinética de liberação, representada na Figura 20, mostrou que 65,44% de MXF foi liberada durante as 295 horas em pH 7,4, enquanto em pH 5,6 o percentual foi de 53,13%. Este perfil de liberação obedece a função bi-exponencial $y(t) = y_0 + A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2}$, onde $y(t)$ é a quantidade de MXF presente na membrana de LN em um determinado tempo, t .

Figura 20 - Cinética de liberação de MXF carregada por membrana de LN durante 295 h.



A MXF carregada pela membrana de LN apresenta maior liberação nas primeiras horas corroborando com os dados de microscopia eletrônica que mostrou a dispersão dos cristais do fármaco na superfície do material. O perfil de liberação se inicia na etapa de *burst release*, representado na Figura 21, que consiste na fase de liberação rápida, e posteriormente a velocidade de liberação sofre acentuada redução, devido ao fármaco alojado em regiões internas do polímero, e finalmente a quantidade de MXF liberada é mantida.⁹⁴ Correlacionado com os resultados obtidos pela técnica de FTIR, onde não é possível observar interação química látex-antibiótico, sugere-se o comportamento inicial da liberação, *burst release*.^{78-80; 29; 106}

Figura 21 - Região do *burst release*.

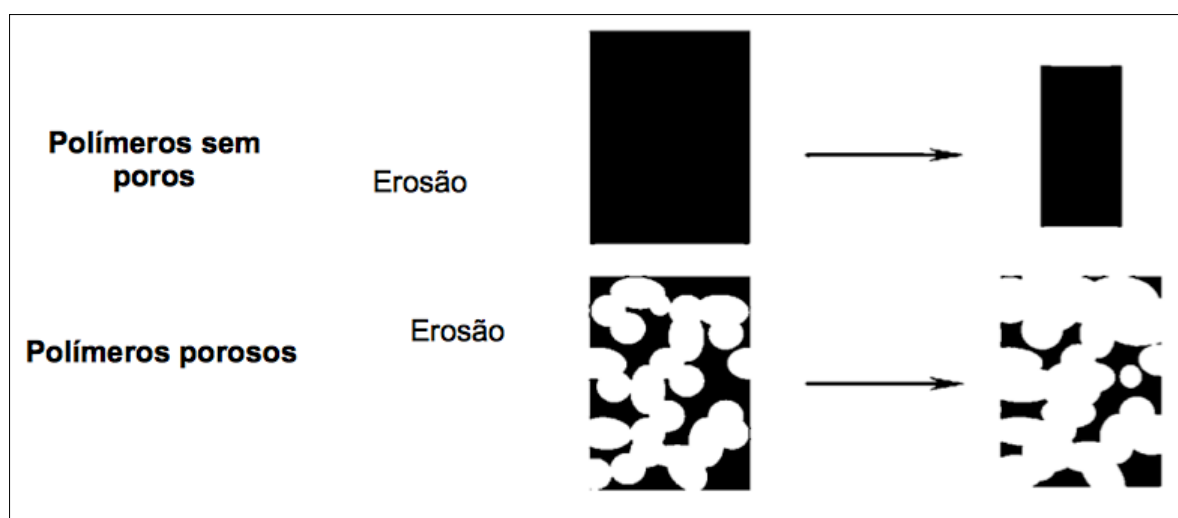


De acordo com Herculano et al (2011), Trecco et al. (2014), as membranas de LN funcionam como um reservatório, onde quanto maior a quantidade de substâncias incorporadas no biomaterial, maior será a liberação desses compostos.^{29; 107} Embora o LN funcione como reservatório, a dispersão de compostos associados é influenciada por alguns fatores, como por exemplo, degradação da matriz polimérica (erosão) e difusão através dos poros.⁸³ A liberação do bioativo em carreadores poliméricos ocorre principalmente pelo mecanismo de

difusão através dos poros, o que, possivelmente, justifica o *burst release* do início do processo.

Outro fator que também deve ser considerado é a erosão. A medida que o material sofre degradação, os compostos associados são dispersados ao meio. Este processo é possivelmente o co-responsável pela região de cinética estável (Figura 22).¹⁰⁸

Figura 22 - Esquema da degradação de dispositivos poliméricos porosos e não porosos.



Fonte: Modificado de Eglin et al. (2009).

Em um estudo avaliando a liberação de um fármaco antitumoral por matrizes poliméricas, Kostková et al. (2017) observaram que em pH 7,4 a liberação era consideravelmente mais baixa do que em pH 5,0.¹⁰⁹ Este fato foi relacionado com a degradabilidade do material nestas condições. Resultados semelhantes foram encontrados por Pérez et al. (2014), onde a liberação de fármacos por matrizes de nanogéis em pH 5 foi mais rápida do que em pH 7,4.¹¹⁰

No que se refere ao LN, Gemeinder (2016) observou que em pH 7,0, a matriz apresentou potencial de liberar 28,75% de gentamicina. Entretanto, em pH 5,7, a taxa de liberação subiu para 65,35%.¹¹¹ Por outro lado, Trecco et al. (2014) demonstraram maior taxa de liberação do extrato de *Casearia sylvestris* em pH 7,4 quando comparado com valores de pH mais baixos.¹⁰⁷

Everson (2012) mostrou que o pH básico age desestabilizando a membrana (polímero) em um estudo da degradação de elásticos de látex de uso odontológico,

e verificou menor resistência do material em pH básico.¹¹² Além disso, estes resultados estão em acordo com Trecco et al. (2014), que observou que a taxa de liberação do extrato de *Casearia sylvestris* foi maior para valores de pH, 7,4 e 7,6, devido à quebra de ligações reticuladas ou cruzadas das membranas de látex natural desestabilizando a membrana.¹⁰⁷

Mudgil e Pawan (2013) avaliaram o potencial de liberação de MXF por polímeros para fins oculares por 24 h, e os protótipos apresentaram potencial de liberação equivalente a 99,17%.⁹⁴ Em outro trabalho, Mahor et al. (2016) propuseram um modelo de liberação por nanopartículas gelatinosas carregadas com MXF.¹¹³ Os resultados dos ensaios *in vitro* mostraram que o biomaterial foi capaz de liberar entre 60% - 81% de MXF ao longo de 12h. Considerando-se as variações de concentração do fármaco incorporado e do tamanho das nanoesfera, o estudo apresentou alta taxa de liberação de MXF.

Diversos estudos avaliaram a eficácia do LN como dispositivo de liberação. Herculano et al. (2010), ao modificar a porosidade do material, demonstraram a capacidade da matriz em liberar até 77,1% de metronidazol, por até 310 horas.⁸⁵

Murbach et al (2014) observaram a liberação de 59,08% de ciprofloxacina em membranas de LN durante 312 horas.⁷⁸ Além disso, Garms et al (2017) mostraram que a membrana de LN preservou as atividades farmacológicas do mesmo antibiótico em testes de macrodiluição.⁹⁶

Aielo et al (2014) e Barros et al (2015) estudaram a liberação sustentada dos diclofenacos de sódio e potássio, respectivamente.^{79; 114} Os autores observaram a capacidade da matriz polimérica em liberar até 59,62% por até 216 horas.

Romeira et al (2012) e Borges et al (2014) analisaram a liberação prolongada do *Stryphnodendron sp* e *Casearia Sylvestris* em membranas de LN.^{83; 115} Os resultados mostraram que os extratos foram liberados por um período de até 12 dias.

Pichayakorn et al. (2012) observaram que mais de 80% da nicotina incorporada em membranas de LN foi liberada em 24 horas.⁸² Por sua vez, Phaechamud et al (2016) estudaram a liberação da gentamicina por diferentes membranas de LN para tratamento de feridas, onde observaram que a totalidade do antibiótico foi liberado em 7 dias.¹¹⁶

Adicionalmente, Barros et al (2016) and Barros et al (2017) avaliaram a liberação dos peptídeos oxitocina e desmopressina, respectivamente.^{80; 117} Os

pesquisadores observaram que os peptídeos, além de preservados na matriz polimérica, foram liberados por até 96 horas.

Ao aplicar membranas de LN no tratamento de úlceras crônicas em humanos, Silva (2015) avaliou o potencial de cicatrização destas membranas com e sem extrato de barbatimão em pacientes da cidade de Assis.¹¹⁸ Neste estudo, a pesquisadora observou a necessidade da troca destas membranas a cada 2 dias, pois observou a necessidade da limpeza da região afetada que poderia favorecer a proliferação de microrganismos.

Considerando os dados do estudo de Silva (2015) e visando a aplicação clínica das membranas de LN+MXF, além da liberação da MXF em 12 dias, avaliamos também o percentual do composto liberado em 48 horas. Os resultados obtidos foram 20% para pH 5,6 e 32,4% para pH 7,4. Estes resultados mostram a viabilidade da aplicação destas membranas em lesões infectadas.

4.5. Ensaio de citotoxicidade

Ao se trabalhar com o desenvolvimento de biomateriais, é necessário garantir que o mesmo não danifique as células do organismo que for aplicado. Justifica-se assim, a necessidade dos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Métodos *in vitro* representam o primeiro passo para se comprovar a biocompatibilidade do material.³¹

Com o propósito de verificar os efeitos citotóxicos do LN, LN+MXF e do fármaco puro, foram realizados ensaios de citotoxicidade em células 3T3 e HaCat conforme apresentado nas Figuras 23 e 24.

Figura 23 – Viabilidade celular de amostras do LN, LN+MXF e MXF em linhagem celular 3T3.

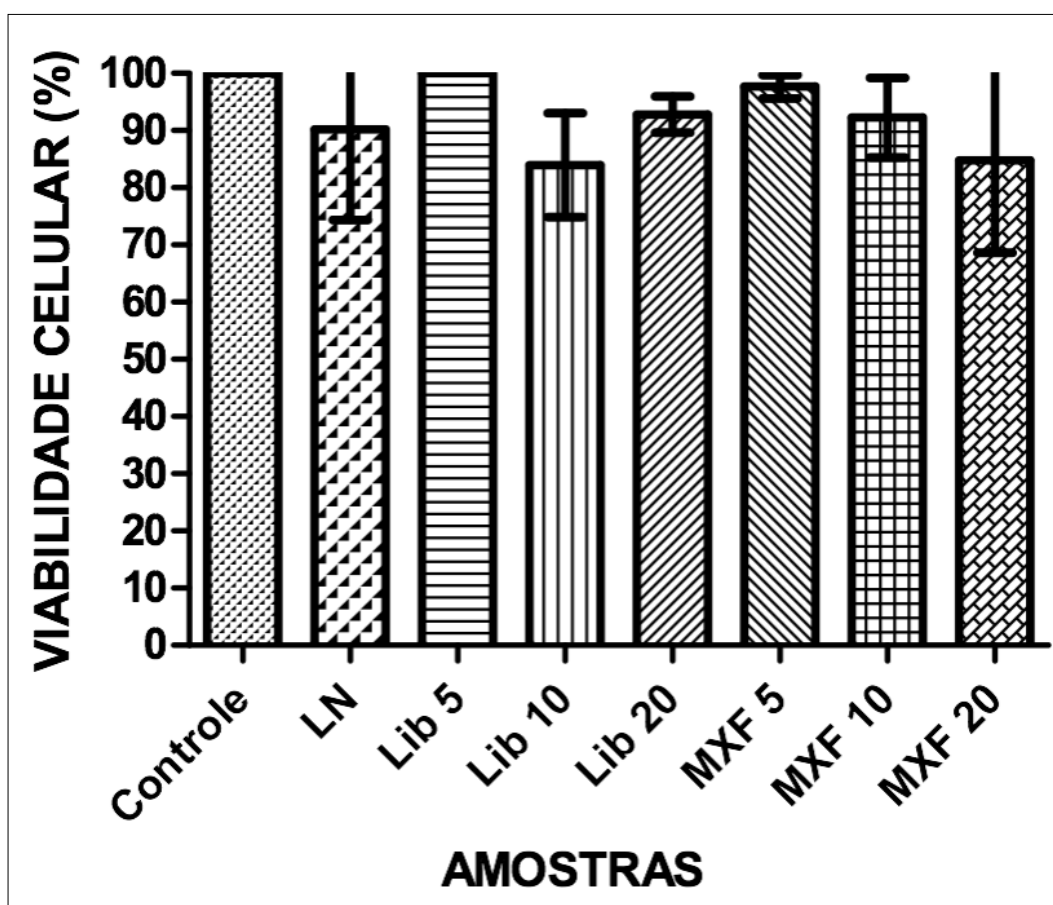
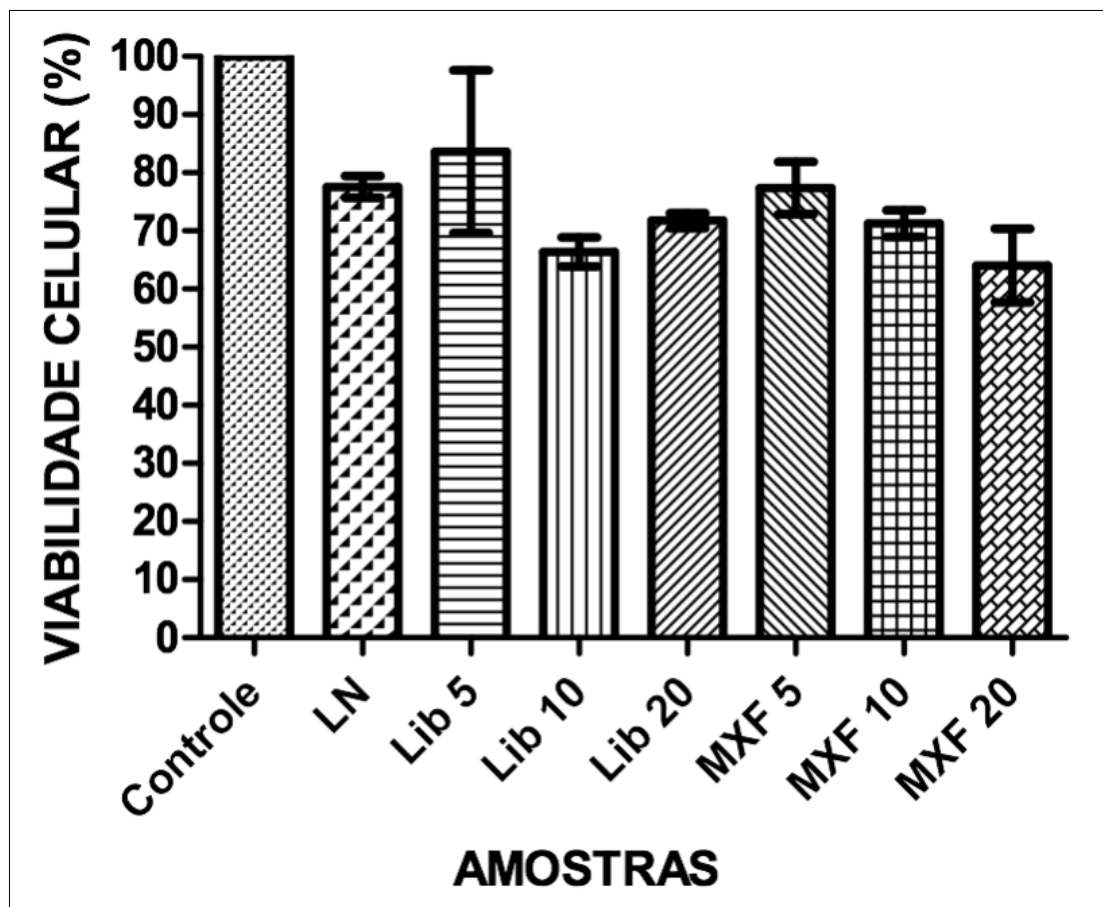


Figura 24 – Viabilidade celular de amostras do LN, LN+MXF e MXF em linhagem celular HaCat.



Os resultados mostraram que a viabilidade celular do LN foi de 90% em células 3T3. Entretanto, em cultura HaCat, a viabilidade foi de 79,60%. Por sua vez, o LN+MXF com 5 µg liberados (Lib 5) apresentou 85% de viabilidade em HaCat e não apresentou citotoxicidade em 3T3. A viabilidade do LN+MXF com 10 µg liberados (Lib 10) foi de 68% em HaCat, porém, maior viabilidade foi encontrada em 3T3, com 85,54%. Os percentuais para o LN+MXF com 20 µg liberados (Lib 10) foram de 97,26% em 3T3 e superior a 70% em HaCat.

O fármaco na concentração mais baixa (de 5 µg/mL) apresentou viabilidade próxima à 80% em HaCat e quase não apresentou citotoxicidade em 3T3, com 93,7%. Por sua vez, 10 µg/mL de MXF apresentaram 90% de viabilidade para 3T3 e aproximadamente 70% em HaCat. Os dados de MXF na concentração de 20 µg/mL revelam quase 70% de viabilidade em HaCat, enquanto em 3T3 foi de 86,41%.

Guo et al. (2016) utilizaram a técnica de MTT em um estudo da biocompatibilidade de polímeros termosensíveis e avaliou o percentual de viabilidade celular em diferentes linhagens. O polímero apresentou baixa toxicidade mesmo em altas concentrações.¹¹⁹ Em outro estudo, membranas de celulose também apresentaram alta viabilidade celular, indicando biocompatibilidade do material.¹²⁰

A partir desses resultados, podemos reafirmar o potencial das membranas de LN+MXF serem aplicadas como biomateriais, no tratamento de lesões infectadas, uma vez que estas devem seguir alguns requisitos básicos como não apresentar toxicidade.^{31; 119-120}

4.6. Ensaios microbiológicos

4.6.1 Teste de sensibilidade *in vitro* por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

Os ensaios biológicos foram realizados empregando-se bactérias que comumente estão relacionadas à colonização de úlceras crônicas, as quais causam processos infecciosos e consequentemente interferem no processo natural de cicatrização.^{60; 67; 121}

Considerando que MIC é a menor concentração de MXF capaz de inibir o crescimento bacteriano, e MBC é a menor concentração de antibiótico necessária para se obter atividade bactericida, testes de sensibilidades com cloridrato de moxifloxacino contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram realizados e os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC) de cloridrato de moxifloxacino para diferentes cepas bacterianas.

Microrganismos	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL
<i>S. epidermidis</i>	10 µg/mL	10 µg/mL
MRSA	20 µg/mL	20 µg/mL
<i>E. coli</i>	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	5 µg/mL	7,5 µg/mL

Os resultados da MIC e MBC empregando diferentes bactérias corroboram com os valores de referência preconizados pelas normativas do CSLI /NCCLI, norma M100 -S15 (2005).¹²²

4.6.2 Ensaio de Halo Inibição por Disco difusão

O ensaio de disco difusão foi realizado com o intuito de demonstrar que a atividade do fármaco foi preservada, mesmo após incorporado ao LN. Além disto, buscou-se avaliar o potencial antimicrobiano do LN contra as cepas testadas.

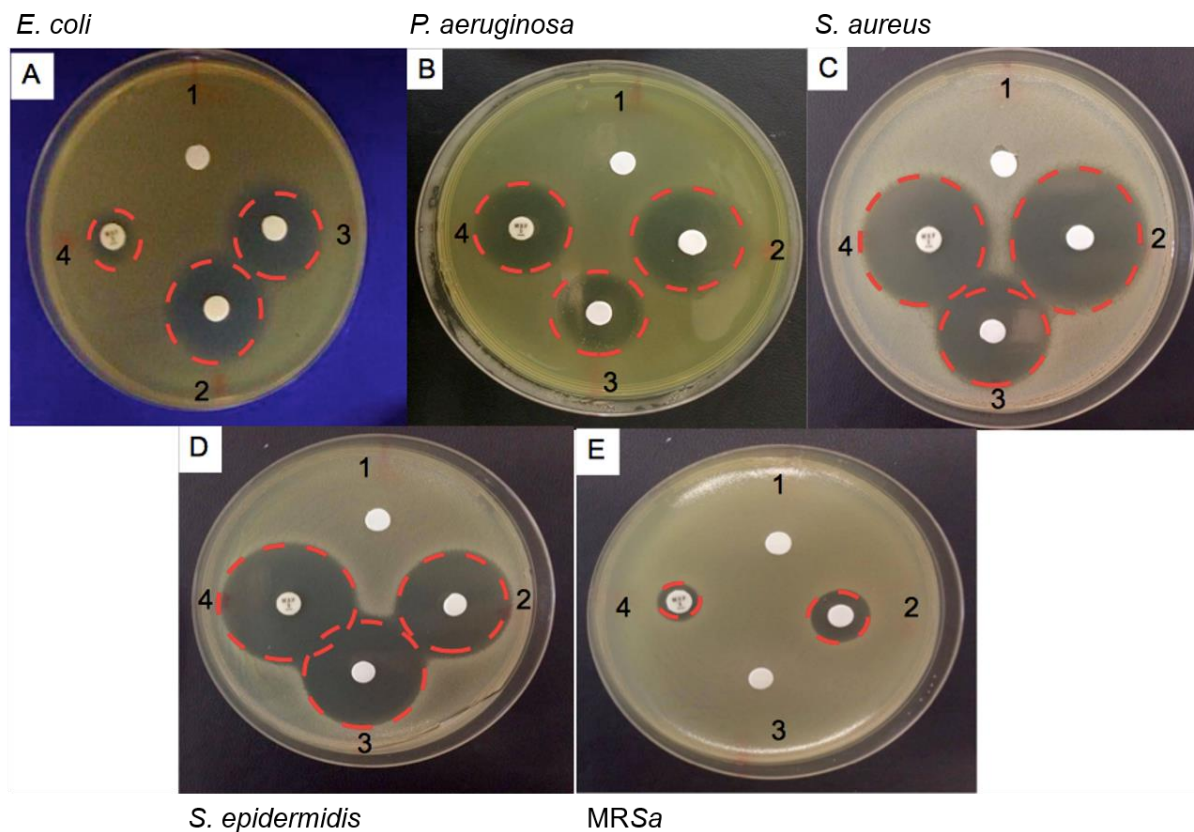
Buscando avaliar o potencial de liberação do antibiótico por meio das membranas de látex foi realizado o teste de sensibilidade por disco difusão. Nesta técnica, foram medidos os halos de inibição da membrana de LN+NaOH 0,1M, membrana de LN contendo 5 µg de MXF liberada, membrana de LN contendo 20 µg de MXF liberada e um disco comercial de 5 µg de MXF. Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores, em milímetros, dos halos para *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *E. coli* e *P. aeruginosa* pela técnica de disco difusão.

Microrganismo	LN (mm)	MXF 5 µg (mm)	LN+MXF 5 µg (mm)	LN+MXF 20 µg (mm)	Valores de referência (mm)
<i>S. aureus</i>	0	30	30	32	28-35
<i>S. epidermidis</i>	0	35	30	30	≥ 24
MRSA	0	9	0	16	≥ 24
<i>E. coli</i>	0	9	28	29	28-35
<i>P. aeruginosa</i>	0	27	20	29	17-25

O ensaio de sensibilidade realizado por meio da técnica de disco difusão mostrou que o látex apresenta a capacidade de liberar a MXF e assim inibir o crescimento dos microrganismos (Figura 25). Ressalta-se que o tamanho do halo formado pela associação LN + MXF é dependente da concentração do fármaco, ou seja, quando maior a quantidade de MXF maior o diâmetro do halo formado.

Figura 25 - Halo inibição apresentados pelos seguintes microrganismos: A – *E. coli*, B – *P. aeruginosa*, C – *S. aureus*, D – *S. epidermidis*, E – MRSa.



O LN sem a presença do fármaco não demonstrou atividade antimicrobiana, este resultado corrobora com os descritos por Garms et al (2017), onde o LN não demonstrou atividade para o microrganismo testado em ensaio de sensibilidade por diluição em caldo.⁹⁶

Os microrganismos que foram sensíveis às amostras de LN+MXF nas duas concentrações testadas foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os resultados corroboram com estudos do emprego do LN como veículo de liberação de fármacos com ação antibiótica.^{96, 116}

Phaechamud et al. (2016) demonstraram que ao avaliarem a atividade das membranas de LN+gentamicina em cepas de *S. aureus* e *P. Aeruginosa* houve aumento do halo de inibição em relação ao controle (discos comerciais de gentamicina). Estes resultados sugerem que o LN potencializou a ação do composto.¹¹⁶

Em uma análise qualitativa, Garms et al. (2017) demonstraram que a atividade do fármaco liberado pelas membranas foi mantida, inibindo o crescimento microbiano.⁹⁶

Por outro lado, cepas de MRSA embora apresentem halo de inibição, não demonstrou sensibilidade à concentração do fármaco testada. Segundo Guay (2006), esta resistência é, possivelmente, devido à virulência da cepa, sendo necessário um aumento da dosagem do antibiótico para atingir melhores resultados.⁷²

5. CONCLUSÃO

Os cristais da MXF visualizados nas micrografias da superfície da amostra, corroboram com o perfil de liberação do composto por meio da membrana de látex, dando origem ao efeito denominado *burst release*. Quanto a posterior redução na velocidade de liberação, este comportamento deve-se aos cristais do fármaco alojados no interior da membrana, que foram liberados através da matriz de forma sustentada.

Os espectros de FTIR identificaram as bandas de absorção características dos compostos, sugerindo que a integridade destes foi mantida, resultando na rápida liberação inicial do composto.

Além disso, o módulo de elasticidade das membranas com e sem MXF foram similares, e o perfil da curva dos ensaios mecânicos correspondem com o comportamento característico de elastômeros. Isto indica que a elasticidade das membranas é suficiente para aplicações biomédicas.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram alta viabilidade celular em linhagens de fibroblastos e queratinócitos inferindo a baixa toxicidade do material.

Finalmente, ensaios de sensibilidade bacteriana comprovam a capacidade de liberação de MXF por meio da matriz de liberação utilizada sem que haja comprometimento da atividade do fármaco.

Os resultados dos estudos apresentados demonstraram que a membrana de LN+MXF representa um promissor biomaterial para o tratamento de lesões cutâneas infectadas.

REFERÊNCIAS

- 1 HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.
- 2 HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, v. 208, n. 4446, p. 826-831, 1980.
- 3 HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.
- 4 WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-909, 2009.
- 5 VALLET-REGI, M. Introduction to the world of biomaterials. **Anales de Química**, v. 93, p. S14-S16, 1997. Suppl 1.
- 6 WILLIAMS, D.F. Materials for surgical implants. **Metals and Materials**, v. 1, p. 24-29, 1991.
- 7 FATTAHI, P. et al. A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces. **Advanced Materials**, v. 26, n. 12, p. 1846-1885, 2014.
- 8 SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 941-945, 2014.
- 9 RATNER, B. D. The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 5/6, p. 617-625, 1996.
- 10 WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.
- 11 CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3/4, p. 584-871, 2013.
- 12 ELLINGSEN, J.; LYGSTADAAS, S. **Bio-implant interface**: improving biomaterials and tissue reactions. New York: CRC Press, 2003. 464 p.
- 13 ARENAS, A. M. Z. **Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH**. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 14 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10.993-5:1999(E)**: biological testing of medical and dental material devices - part 5: test for *in vitro* cytotoxicity. Geneve, 1999. 14 p.

- 15 OECD. **Test n. 428**: skin absorption: in vitro method. Paris, 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742801e.pdf?expires=1491399438&id=id&accname=guest&checksum=4B93FA530E8843A7D7DA8E67865ACA49>. Acesso em: 31 mar. 2017.
- 16 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7405:2008**: evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Geneva, 2008.
- 17 RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 864 p.
- 18 PANG, C. et al. An overview of the therapeutic potencial of regenerative medicine in cutaneous wound healing. **International Wound Journal**, 2017. doi:10.1111/iwj.12735.
- 19 ZOU, Z. et al. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber- producing tissue. **BMC Genomics**, 2015. doi:10.1186/s12864-015-2152-6.
- 20 LANGER, R. Tissue engineering: a new field and its challenges. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 840-841, 1997.
- 21 COELHO, M. B. **Desenvolvimento de metodologias para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos**. 2003. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- 22 MARKETS AND MARKETS. **Brazil biomaterials market (2010-2015)**. May 2011. Disponível em: <[http://www.marketsandmarkets.com/Market- Reports/biomaterial-392.html](http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterial-392.html)>. Acesso em: 23 mar. 2017.
- 23 MARKETS AND MARKETS. **Biomaterial market by type of materials (metallic, ceramic, polymers, natural) & application (cardiovascular, orthopedic, dental, plastic surgery, wound healing, neurology, tissue engineering, ophthalmology) – global forecast to 2021**. Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterial-393.html>>. Acesso em: 13 mar. 2017.
- 24 BELOTTI, J. C. Cenário atual do uso de próteses ortopédicas - discussão sobre próteses nacionais *versus* importadas. **Diagnóstico & Tratamento**, v. 14, n. 1, p. 9-11, 2009.
- 25 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability**: guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. Geneva, 2005. 100 p.

26 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Optimizing the use of medical resources. In: _____. **Medical device regulations**: global overview and guiding principles. Geneva, c2003. Chap. 6, p. 24-35.

27 AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório final do grupo de trabalho externo de órteses, próteses e materiais especiais (GTE OPME) ANS/ANVISA**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.ans.gov.br/images/stories/Participacao_da_sociedade/2016_gt_opme/gt-opme-relatoriointegral.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2017.

28 MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. 208 p.

29 HERCULANO, R. D. et al. Nitric oxide release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v. 14, n. 3, p. 355-359; 2011.

30 PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e intermediários químicos. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**. 2016. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2017.

31 CARRETERO, A. C. **Desenvolvimento de fibras têxteis à base de polímeros naturais para aplicações médicas**. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Têxtil e Moda) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

32 GARG, H. G.; COWMAN, M. K.; HALES, C. A. **Carbohydrate chemistry, biology and medical applications**. Amsterdam: Elsevier, 2008. 432 p.

33 RAHIMNEJAD, M.; DERAKHSHANFAR, S.; ZHONG, W. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care. **Burns & Trauma**, v. 5, n. 4, 2017. doi:10.1186/1sw038-017-0069-9.

34 HOPPENBROUWERS, T. et al. Fibrin improves skin wound perfusion in a diabetic rat model. **Thrombosis Research**, v. 151, p. 36-40, 2017.

35 OTHMAN, A. B.; HEPBURN, C.; HASMA, H. Influence of non-rubber constituents on elastic properties of natural rubber vulcanizates. **Plastics, Rubber and Composites Processing and Applications**, v. 19, n. 3, p. 185-194, 1993.

36 AGOSTINI, D. L. S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

37 BLACKLEY, D. C. **Polymers latices**: science and technology. 2nd ed. Glasgow: Chapman & Hall, 1997. 592 p.

- 38 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.
- 39 SCHLOMAN, W. W. Jr. Processing guayule for latex and bulk rubber. **Industrial Crops and Products**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2005.
- 40 HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de latex natural para aplicações biomédicas**. 2009. 151 f. 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.
- 41 MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex**: estudo experimental em cães. 1996. 86 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.
- 42 THOMAZINI, J. A. et al. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 798-799, 1997. Suppl. B.
- 43 MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina**: aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- 44 SILVA, E. B.; MANISCALCO, C. L. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 785-792, 2013.
- 45 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, set. 2009.
- 46 MENDONÇA, R. J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- 47 MRUÉ, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.
- 48 JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **European Journal of Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 123-130, 1991.
- 49 MARTIN, M. N. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. **Plant Physiology**, v. 95, n. 2, p. 469-476, 1991.

- 50 GIORDANI, R. et al. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses**, v. 42, n. 7/8, p. 465-474, 1999.
- 51 GIORDANI, R.; REGLI, P.; BUC, J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 45, n. 11/12, p. 476-481, 2002.
- 52 KANOKWIROON, K. et al. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 301-307, 2008.
- 53 FRADE, M. A. C. et al. Chronic phlebotopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 238-240, 2001.
- 54 FRADE, M. A. C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.
- 55 FRADE, M. A. C. et al. Curativo de biomembrana vegetal e hipersensibilidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 885-891, 2011.
- 55 FANTINATI, M. S. et al. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 463-471, 2016.
- 56 FEESS, S.; KURFISS, K.; MICHELS, D. L. **Accurate simulation of wound healing and skin deformation**. 2016. Disponível em: <http://cs.stanford.edu/~michels/publications/feess_2016_wound-healing/feess_2016_wound-healing.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- 57 UD-DIN, S. et al. Is induced and wound size is reduced by electrical stimulation in an accurate wound healing model in human skin. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0124502.
- 58 FLEGG, J. A. et al. On the mathematical modeling of wound healing angiogenesis in skin as a reaction-transport process. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 30, p. 1-17, 2015.
- 59 MALHOTRA, S. et al. Mesenchymal stromal cells as cell-based therapeutics for wound healing. **Stem Cells International**, 2016. doi:10.1155/2016/4157934.
- 60 GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.
- 61 POWERS, J. G. et al. Wound healing and treating wounds chronic wound care and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 4, p. 607-625, 2016.

- 62 BRITO, K. K. G. et al. Feridas crônicas: abordagem da enfermagem na produção científica da pós-graduação. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 7, n. 2, p. 414-421, 2013.
- 63 LAZARUS, G. S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Archives of Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 489-493, 1994.
- 64 ABBADE, L. P. F.; LASTORIA, S. Abordagem de pacientes com úlceras de pernas de etiologia venosa. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 509-522, 2006.
- 65 SALOMÉ, G. M.; BLANES, L.; FERREIRA, L. M. Assessment of depressive symptoms in people with diabetes mellitus and foot ulcers. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 38, n. 3, p. 327-333, 2011.
- 66 BRASIL. Ministério da Saúde. **Avaliação de múltiplas tecnologias em feridas crônicas e queimaduras**. Brasília, DF, maio. 2011. Parecer técnico-científico.
- 67 MADOFF, C.; PEREYRA, F. Complicações infecciosas queimaduras. In: KASPER, D. L.; FAUCI, A. S. **Medicina interna de Harrison**, 2.ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. Cap. 1, p. 309-312.
- 68 HOHELL-JONES, R. S. et al. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 143-149, 2005.
- 69 ZHU, H.; LI, X.; ZHENG, X. A. Descriptive study of open fractures contaminated by seawater: infection, pathogens, and antibiotic resistance. **BioMed Research International**, 2017. doi:10.1155/20172796054.
- 70 ADHIKARI, R. et al. Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and determination of minimum inhibitory concentration of vancomycin for *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples of the patients attending a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2017. doi:10.1155/2017/2191532.
- 71 LORENZO, F. et al. Primary photophysical properties of moxifloxacin fluoroquinolone antibiotic. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1118-1125, 2008.
- 72 GUAY, D. R. P. Moxifloxacin in the treatment of skin and skin structure infections. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 4, p. 417-434. 2006.
- 73 JACOBSEN, F. et al. Efficacy of topically delivered moxifloxacin against wound infection by *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2325-2334. 2011.

74 GYSSENS, I. C. et al. A randomized trial of the efficacy and safety of sequential intravenous/oral moxifloxacin monotherapy versus intravenous piperacillin/tazobactam followed by oral amoxicillin/clavulanate for complicated skin and skin structure infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n.11, p. 2632-2642, 2011.

75 GURUSAMY, K. S.; WILSON, P.; DAVIDSON, B. R. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in non surgical wounds. (PROTOCOL). **Cochrane Database System Review**, n. 3, 2013. doi:10.1002/14651858.CD010427.

76 CHAUDHARY, S. S. et al. Chronomodulated drug delivery system of urapidil for the treatment of hypertension. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 5, n. 2, p. 107-113, 2015.

77 WARD, M. A.; GEORGIU, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, p. 1215-1242, 2011.

78 MURBACH, H. D. et al. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/157952.

79 BARROS, N. R. et al. Diclofenac potassium transdermal patches using natural rubber latex biomembranes as carrier. **Journal of Materials**, 2015. doi:10.1155/2015/807948.

80 BARROS, N. R. et al. Oxytocin sustained release using natural rubber latex membranes. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 435-444, 2016.

81 SWAMY, B. Y.; YUN, Y. S. In vitro release of metformin from iron (III) cross-linked alginate– carboxymethyl cellulose hydrogel beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 114-119, 2015. Suppl. C.

82 PICHAYAKORN, W. et al. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: effect of polymer and plasticizer blends. **Journal of Membrane Science**, v. 411/412, p. 81-90, 2012.

83 BORGES, F. A. et al. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* swarts delivery. **ISRN Polymer Science**. v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/241297.

84 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.

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

86 OTUKA, A. J. G. et al. Femtosecond lasers for processing glassy and polymeric materials. **Materials Research**, v. 17, n. 2, p. 352-358, 2014.

87 HEFNAWY, M. M. et al. Potentiometric determination of moxifloxacin in some pharmaceutical formulation using PVC membrane sensors. **Chemistry Central Journal**, 2014. doi:10.1186/s13065-0140059-y.

88 DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality**. Lancaster: Technomic Publishing, 1994. Chap 1, p. 1-25

89 GETHIN, G. The significance of surface pH in chronic wounds. **Wound Healing Science**, v. 3, n. 3, p. 52-56, 2007.

90 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth a survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

91 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 10th ed. Wayne, 2015. CLSI M07-A10.

92 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. 12th ed. Wayne, 2015. CLSI M02-A12.

93 BARROS, N. R. **Estudo da incorporação e liberação de peptídeos hormonais utilizando membranas de látex natural como carreador**. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

94 MUDGIL, M.; PAWAR, P. K. Preparation and in vitro/ex vivo evaluation of moxifloxacin-loaded PLGA nanosuspensions for ophthalmic application. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 2, p. 591-606, 2013.

95 PAWAR, P.; KATARA, R.; MAJUMDAR, D. Design and evaluation of moxifloxacin hydrochloride ocular inserts. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 1, p. 93-104, 2012.

96 GARMS, B. C. 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.

97 RESENDE, C. A. et al. Natural rubber-clay nanocomposites: mechanical and structural properties. **Polymer**, v. 51, n. 16, p. 3644-3652, 2010.

98 ROYALANCE, D. **Stress-strain curves**. Aug. 2001. Disponível em: <<http://www.saylor.org/site/wp-content/uploads/2012/09/ME1022.2.4.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2017.

- 99 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.
- 100 BORGES, F. A. et al. Novel sustained-release os *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 379-384, 2015.
- 101 SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 102 SCHNEIDER, L. A. et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 9, p. 413-420, 2007.
- 103 LORENZO, F. et al. Primary photophysical poperties of moxifloxacin - a fluoroquinolone antibiotic. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1118-1125, 2008.
- 104 LV, Y. K. et al. Fluorescence quenching study of moxifloxacin interaction with calf thymus DNA. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 38, p. 202-209, 2014.
- 105 PATEL, S.; RAVAL, M.; SHAH, U. Development and validation of spectrofluorimetric method for the estimation of moxifloxacin in pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 252-254, 2013.
- 106 DRAGO, B. C. **Avaliação da liberação sustentada de fármaco e nanopartícula utilizando membranas de látex natural como carreador**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Araraquara, 2015.
- 107 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**, v. 35, n. 1, p. 89-95, 2014.
- 108 EGLIN, D.; MORTISEN, D.; ALINI, M. Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs. **Soft Matter**, v. 5, p. 938-947, 2009.
- 109 KOSTKOVÁ, H. et al. Star polymer-drug conjugates with pH-controlled drug release and carrier degradation. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017. doi:10.1155/2017/8675435.
- 110 PÉREZ, E. et al. Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 470, n. 1/2, p. 107-119, 2014.

- 111 GEMEINDER, J. L. P. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação de gentamicina em biomembranas de látex natural**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2016.
- 112 EVERSON, M. B. **A comparison of the force degradation of marketed latex elastics in varying normal resting pHs**. 2012. 57 p. Thesis (Master of Science in Oral Science) - Graduate College, University of Illinois, Chicago, 2012.
- 113 MAHOR, A. et al. Moxifloxacin loaded gelatin nanoparticles for ocular delivery: formulation and in-vitro, in-vivo evaluation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 132-138, Dec. 2016.
- 114 AIELO, P. B. et al. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, v. 17, n. 1, p. 146-152, 2014.
- 115 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. 693-697, 2012.
- 116 PHAECHAMUD, T.; ISSARAYUNGYUEN, P., PICHAYAKORN, W. Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing. **International Journal of Macromolecules**, v. 85, p. 634-644, 2016.
- 117 BARROS, N. R. et al. Natural rubber latex: development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 2017. doi:10.1080/00914037.2017.1280795.
- 118 SILVA, R. G. **Eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com extrato de *Stryphnodendron barbatiman* mart. na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas**. 2015. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2015.
- 119 GUO, Z. et al. Biocompatibility and cellular uptake mechanisms of poly (*N*-isopropylacrylamide) in different cells. **Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32, n. 1, p. 17-31, 2016.
- 120 SOUZA, S. F. et al. Cytotoxicity studies of membranes made with cellulose nanofibers from fique macrofibers. **Journal of Material Science**, v. 52, n. 2017. p. 2581-2590, 2017.
- 121 GRILLON, A. et al. Comparative activity of ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* assessed by minimum inhibitory concentrations and time-kill studies. **PLoS One**, v. 11, n. 6, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0156690.

122 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15º suplemento informativo. Wayne, c2005. CLSI M100-S15. Traduzido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2017.