

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS**

Fábio André Ferreira Custódio

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA
COM E SEM NISINA COMO TRATAMENTO COMPLEMENTAR EM FERIDAS
CIRÚRGICAS DE DERMORRAFIA EM BOVINOS**

**Sorocaba/SP
2021**

Fábio André Ferreira Custódio

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA
COM E SEM NISINA COMO TRATAMENTO COMPLEMENTAR EM FERIDAS
CIRÚRGICAS DE DERMORRAFIA EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientador: Profa. Dra. Denise Grotto
Co-orientador: Profa. Dra. Angela Faustino Jozala

**Sorocaba/SP
2021**

Ficha Catalográfica

C991a Custódio, Fábio André Ferreira
Avaliação do uso de membranas de nanocelulose bacteriana com e sem nisina como tratamento complementar em feridas cirúrgicas de dermorráfia em bovinos / Fábio André Ferreira Custódio. – 2021.
84 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto.

Coorientadora: Profa. Dra. Angela Faustino Jozala.

Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais)
– Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Curativos. 2. Cicatrização de feridas. 3. Nanotecnologia. 4. Materiais biomédicos. I. Grotto, Denise, orient. II. Jozala, Angela Faustino, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Fábio André Ferreira Custódio

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA
COM E SEM NISINA COMO TRATAMENTO COMPLEMENTAR EM FERIDAS
CIRÚRGICAS DE DERMORRAFIA EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Aprovado em: 16/12/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof.(a) Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dra. Ana Carolina Rusca Corrêa Porto
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dra. Raquel de Mendonça Rosa-Castro
Universidade de Sorocaba

Dedico esse trabalho àqueles que a mim
se dedicam há 42 anos... meus pais.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, irmãos, obrigado pelo apoio incondicional. Agradecimento especial ao meu cunhado Flávio pela grande ajuda na apresentação...Minha linda esposa Mariana: foram dois anos muito difíceis, sendo um deles de Pandemia, tendo que administrar filhos, trabalho, empresa, aulas...você foi demais..., muito obrigado por tudo, te amo mais que ontem, menos que amanhã. Aos meus pequenos, Felipe e Malu, só posso dizer uma coisa: papai voltou! Como foi difícil ouvir de vocês que fiz muita falta durante esse tempo.

Preciso agradecer minha equipe do CTA Bravo: Thiago, você, além de sócio é meu amigo e parceiro em toda e qualquer empreitada, encarando esse desafio junto comigo; Igor, meu garoto de ouro, você é insubstituível, cara! Fernanda e Jéssica, exemplos de dedicação, proatividade, vestem e honram nossa camisa; Ricardo (Picapau), graças a Deus chegou prá ser nosso braço direito, esquerdo...Paulão, sócio e irmão, juntos para o que der e vier. Esse é o nosso time. Obrigado Equipe CTA!

Agradeço à UNISO pela oportunidade de ter realizado a Pós-Graduação e contribuir para meu crescimento profissional.

Obrigado também aos alunos da UNISO que estiveram presentes durante os experimentos. Vocês foram fundamentais: JP, Bia, Tayná, Verônica, Edson, Felipe, Júlia e Camila! Agradecimento especial para o Erick, responsável pela produção das membranas, que durante todo o tempo da IC esteve junto com a gente nesse desafio, ao Carlos Vergueiro (Cabrito) que muito contribuiu na revisão bibliográfica e a todos do LAPETOX, pela ajuda e disponibilidade.

Ao meu amigo, irmão e parceiro, professor Leonardo Maggio de Castro, o Léo, que conduziu as cirurgias com maestria. Cara, não tenho palavras prá dizer como você foi importante para que tudo isso desse certo, muito obrigado por aceitar e fazer aqueles momentos tensos de cirurgia se tornarem agradáveis e felizes...

À Professora Angela Jozala, sempre disposta a ajudar e passar o imenso conhecimento sobre o assunto com uma simplicidade ímpar, além de disponibilizar o LAMINFE para a produção das membranas, muito obrigado por tudo!

Alessandre Hataka e Iolanda Braga, agradeço demais por tudo que fizeram por nós na parte da patologia; tivemos muitos contratemplos causados pela pandemia e vocês sempre estiveram prontos para ajudar.

Professora Ana Carolina Porto, a Carol, minha coordenadora na Medicina Veterinária, minha amiga de tanto tempo, você sabe o quanto tem de você nesse trabalho, e o quanto eu sou grato por ter você como minha mentora e confidente. Não sei como seria sem você.

Para finalizar, minha orientadora, professora Dra. Denise Grotto, que aceitou um desafio duplo: realizar um experimento grandioso, inédito, em animais de grande porte e orientar um aluno com uma vida maluca de professor, empresário, pai de família...você foi simplesmente fantástica, sem você eu jamais teria conseguido. Nunca vou esquecer tudo o que você fez por mim, serei eternamente agradecido a você, Denise.

Esqueci das meninas! As protagonistas! Sem elas não teria como...as vacas cedidas pela Estância Hortência, a quem fica meu agradecimento também por toda a estrutura. 22HR, 110, 182, 98, 172, 37HR, 159, 16, 30, 22, 170, 151, 162, 1024, 39HR, 222, 129, 218, 901, 131, 69, 185, 175 e 146...vocês são a parte mais importante de tudo isso. Com muita técnica, respeito e Bem-Estar fizemos juntos um trabalho de muito sucesso, muito obrigado, continuem vivendo suas vidas nos pastos da fazenda, que nós continuaremos cuidando de vocês com muito amor.

RESUMO

A atividade pecuária é uma importante mantenedora da balança comercial superavitária brasileira e as condições de manejo dos animais têm grande influência. A descorna cirúrgica é um procedimento que, apesar de invasivo, pode ser necessário para diminuição da frequência de lesões em úberes, olhos e região dos flancos, além de promover maior segurança aos manejadores. Os tratamentos pós-cirúrgicos das feridas geralmente incluem aplicação tópica de cicatrizantes, antimicrobianos e repelentes. Uma alternativa biotecnológica é a utilização de curativos a partir de biomateriais, dentre eles a nanocelulose bacteriana (NCB), que é biodegradável, atóxica, não alergênica e biocompatível. A associação de substâncias à NCB, como a nisina, tem sido explorada na produção de biocomplexos ativos. Diante disso, objetivou-se avaliar a eficiência de dois novos tratamentos complementares (membranas de NCB e membranas de NCB+nisina) na cicatrização de feridas de descorna cirúrgica em bovinos. Para isso foram realizados dois experimentos de descorna cirúrgica. No primeiro, 12 animais foram utilizados; uma das feridas foi submetida à antissepsia com solução de polivinilpirrolidona iodada (PVPI) tópica seguida de repelente larvicida, chamado de tratamento controle, e a outra ferida recebeu, além do tratamento controle, a aplicação de membrana de NCB. Para o segundo experimento, n=12, uma das feridas recebeu tratamento controle e membrana de NCB enquanto a outra foi submetida ao tratamento controle e aplicação de membrana de NCB+nisina. Em ambos os experimentos as feridas foram avaliadas macroscopicamente por imagens fotográficas para análise de processo inflamatório e cicatricial, nos dias 2, 6, 10 e 14 após as cirurgias, e microscopicamente, com a realização de biópsias nos dias 3, 7, 14 e 21 pós procedimento. As avaliações macroscópicas evidenciaram diferenças estatísticas significantes somente nas comparações dentro dos grupos para os dois experimentos, enquanto as análises microscópicas não revelaram diferenças estatisticamente significativas em quaisquer tipos de comparação. Assim, conclui-se que quando as feridas cirúrgicas de cada grupo são controles delas mesmas, as feridas com membrana cicatrizaram mais rapidamente. Entretanto, a cicatrização microscópica, mesmo após 21 dias, não acompanhou os resultados observados macroscopicamente.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Cicatrização. Curativo. Dermorragia. Nisina.

ABSTRACT

The livestock activity is an important maintainer of the Brazilian surplus trade balance with great influence about the conditions for animal handling. Surgical dehorning is a procedure that, despite being invasive, may be necessary to decrease the frequency of lesions in udders, eyes and flanks, in addition to promoting greater safety for handlers. Treatments of post-surgical wounds usually includes topical application of healing agents, antimicrobials and repellents. A biotechnological alternative is the use of dressings from biomaterials, including bacterial nanocellulose (BNC), which is biodegradable, non-toxic, non-allergenic and biocompatible. The association of substances with BNC, such as nisin, has been explored in the production of active biocomplexes. Therefore, the objective was to evaluate the efficiency of two new complementary treatments (BNC membranes and BNC membranes+nisin) in healing of surgical dehorning wounds in cattle. Two experiments were performed on surgical dehorning. In the first, 12 animals were used; one of the wounds was subjected to antiseptis with Polyvinylpyrrolidone – iodine complex solution (PVPI), followed by larvicidal repellent, called the control treatment, and the other wound, in addition to the control treatment, also received the application of BNC membrane. For the second experiment, n = 12, one of the wounds received the control treatment and BNC membrane while the other was subjected to the control treatment and application of BNC+nisin. In both experiments wounds were evaluated macroscopically by photographic images, for analysis of the inflammatory and healing process, on days 2, 6, 10 and 14 after surgery, and microscopically, with biopsies performed on days 3, 7, 14 and 21 post-procedure. The macroscopic evaluations showed significant statistical differences only in the comparisons within the groups for the two experiments, while the microscopic analyzes did not reveal statistically significant differences in any type of comparison. Thus, it is concluded that when the surgical wounds of each group are their own controls, the membrane wounds healed more quickly. However, microscopic healing even after 21 days did not follow the results observed macroscopically

Keywords: Bacterial cellulose. Dermorrhaphy. Dressing. Healing. Nisin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação da produção das membranas de nanocelulose bacteriana (NCB). Em A) Cultivo estático da *Gluconacetobacter xylinus*, em meio Hestrin & Schramm, em frasco Erlenmeyer; B) Membrana de NCB após 7 dias de cultivo, com cerca de 2mm de espessura; C) Lavagem da membrana em água destilada, sob agitação e D) Membrana de NCB finalizada, após ser autoclavada a 121 °C, 15 min..... 32
- Figura 2.** Delineamento dos experimentos de descorna cirúrgica em bovinos adultos com utilização de membranas de NCB (Experimento I) e com membranas de NCB+nisina (Experimento II) 34
- Figura 3.** Procedimentos realizados para os experimentos I e II. Em A) Incisão de pele de acordo com a técnica proposta por Cunha *et al.* (2002); B) Divulsão da base do corno após serragem para garantia de baixa tensão de linha de sutura; C) Aplicação da membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal; D e E) Posicionamento da membrana de NCB para dermorrafia; F) Dermorrafia e aplicação de repelente e larvicida..... 36
- Figura 4.** Representação do protocolo de registro de imagens para avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas. Em A) Abordagem frontal em tronco de contenção; em B) Cartão em papel milimetrado desenvolvido e posicionamento do cartão com recorte central sobre a ferida; C) Obtenção de imagem a 15 cm de distância, paralelamente ao cartão..... 38
- Figura 5.** Escores de classificação das condições das feridas cirúrgicas, com notas variando entre 1 e 4..... 39
- Figura 6.** Representação das etapas de coleta das amostras de biópsias. Em A) Introdução do *punch* na borda da ferida; B) Movimentos rotatórios para remoção tecidual; C) Amostra de tecido coletado; D) Manutenção em formalina tamponada..... 41
- Figura 7.** Fotomicrografias das lâminas coradas por hematoxilina e eosina em aumento de 100x representando os Escores de Grau de Inflamação (GI) 1, 2 e 3 42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS e MEDIDAS

ABIEC	Associação Brasileira dos Exportadores de Carne
AINE	Anti-inflamatório não Esteroidal
AU	Unidades de Atividade Arbitrárias
BEA	Bem-Estar Animal
BFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CB	Celulose Bacteriana
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECC	Escore de Condição Corporal
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
GI	Grau de Inflamação
ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL1	Interleucina 1
IM	Intramuscular
kDa	Quilo Dalton
ml	Mililitro
mg/kg	Miligramas por quilo
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCB	Nanocelulose Bacteriana
nm	Nanômetro
OIE	Organização Internacional de Epizootias
PBS	Solução de tampão fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PIB	Produto Interno Bruto
pH	Potencial Hidrogeniônico

PVPI	Polivinilpirrolidona iodada
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UI	Unidades Internacionais
UNISO	Universidade de Sorocaba
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μ g/ml	Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1	Panorama da Pecuária Brasileira e Bem-Estar Animal	12
1.2	Descorna cirúrgica em bovinos.....	13
1.3	Cicatrização de feridas	16
1.4	Tratamentos	21
1.5	Membrana de Nanocelulose Bacteriana (NCB)	23
1.6	Nisina	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Obtenção das Membranas de NCB e incorporação do antimicrobiano nisina.....	31
3.2	Caracterização dos animais e delineamento dos experimentos	33
3.3	Procedimento cirúrgico e pós-operatório	35
3.4	Avaliação macroscópica	37
3.5	Avaliação microscópica	40
3.6	Análise estatística.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A	83
	ANEXO B	84

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Panorama da Pecuária Brasileira e Bem-Estar Animal

A atividade pecuária é uma importante mantenedora da balança comercial superavitária brasileira, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). O Brasil encerrou o ano de 2018 atingindo o Produto Interno Bruto (PIB) de R\$ 6,83 trilhões; somente o PIB da pecuária somou R\$ 597,22 bilhões, 8,3% acima dos R\$ 55,4 bilhões apurados em 2017, elevando para 8,7% sua participação no PIB total brasileiro (ABIEC, 2019). O Brasil destaca-se como o maior exportador mundial de carne bovina, com crescimento de 9,6% em volume e 13,9% em faturamento (ABIEC, 2018). Dados do último Censo Agropecuário divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019) mostram a redução das áreas de pastagens naturais e um efetivo do rebanho bovino de 214,9 milhões de cabeças.

A produção brasileira no setor leiteiro foi de aproximadamente 33,5 bilhões de litros, com as regiões Sul e Sudeste no controle da produção, com 35,7% e 34,2% do total de litros, respectivamente. Em relação ao número de vacas ordenhadas, é na região Sudeste que está localizada a maior parte do efetivo: 30,4% do total de 17,1 milhões de animais no Brasil (IBGE, 2017). Tais informações são importantes para demonstrar a tendência da utilização de sistemas intensificados de produção (sistemas que adotam o uso de tecnologias para integração entre pecuária, meio ambiente e recursos naturais) com foco na eficiência produtiva, ou seja, menor tempo para o abate em animais destinados ao corte e maior produção e qualidade na pecuária leiteira.

Além da produtividade, é fundamental a adoção de práticas de Bem-Estar Animal (BEA), que incluem o manejo dos animais como importante medida de avaliação em relação às questões dos procedimentos que os animais são submetidos para que se alcance a eficiência produtiva desejada. Broom e Molento (2004) sugerem que as condições de manejo dos animais são as mais importantes influências sobre o BEA. Segundo os autores, instalações inadequadas, condições ambientais e de manejo são fatores de grande preocupação em relação às práticas de eventos dolorosos de curta duração, como vacinações e procedimentos cirúrgicos. Portanto, os problemas de

BEA devem estar associados ao tempo de permanência ou frequência de realização desses eventos.

Segundo Stafford e Mellor (2005), o conhecimento do comportamento natural sobre a espécie é fundamental para aprimoramento e diagnóstico de avaliação do grau de BEA, assim como a possibilidade de quantificá-lo. Exemplos como alterações de postura, de temperamento e de locomoção associados ao manejo sanitário e nutricional adequados são importantes para essa interpretação. Instalações que não possuam espaçamento satisfatório de cocho para consumo alimentar prejudicam o desenvolvimento animal, pois menos de 70% dos animais conseguem acessar a alimentação, ou seja, maiores espaços de cocho proporcionam diminuição na intensidade das interações agressivas entre os animais e conseqüentemente maior tempo de alimentação (DEVRIES; VON KEYSERLINGK; BEAUCHEMIN, 2005; HUZZEY; VON KEYSERLINGK; WEARY, 2005).

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) mantém atualizado seu Código de Bem-Estar para Animais Terrestres, e alguns trechos relacionados ao BEA em animais de produção podem ser destacados e diretamente associados ao presente estudo. Dentro dos princípios de BEA em sistemas de produção é importante a manutenção de ambiente de socialização para minimizar injúrias e estresse excessivo. Procedimentos que possam provocar dor devem ser criteriosamente avaliados e gerenciados para realização justificável.

A realização de procedimentos cirúrgicos ou não cirúrgicos são comumente realizados para facilitação de manejo e segurança dos manejadores e para o Bem - Estar dos animais, tendo como forma de avaliação de atendimento ao BEA a resposta animal mais rápida possível a esses procedimentos. Quando houver potencial doloroso, esses procedimentos devem ser criteriosamente realizados com uso de analgesia ou anestesia (OIE, 2019). Uma dessas práticas de facilitação de manejo é a descorna cirúrgica, caracterizada pela remoção dos cornos seguida de dermorráfia (sutura da pele para oclusão da ferida cirúrgica).

1.2 Descorna cirúrgica em bovinos

A descorna cirúrgica em animais adultos é uma prática invasiva (STAFFORD; MELLOR, 2005) que se faz necessária não somente por questões produtivas, mas também em casos de agressividade entre animais, fraturas ou conformação anormal

dos cornos. A descorna contribui também na diminuição da frequência de lesões em úberes, olhos e região dos flancos (WEAVER; ST. JEAN; STEINER, 2005), além de promover maior segurança aos manejadores (OIE, 2019; SYLVESTER *et al.*, 1998). Questões relacionadas à produtividade não devem ser esquecidas, como a facilitação do manejo, manutenção de rebanhos mais uniformes, mais espaço de alimentação nos comedouros e bebedouros, além da diminuição de perfurações de pele, garantindo qualidade ao couro e carcaça (FIORAVANTI *et al.*, 1999).

O conceito de descorna se refere à dois procedimentos: a descorna em bezerros com no máximo sessenta dias de vida (também chamada de mochação) e a descorna cirúrgica em animais mais velhos. A descorna em bezerros é caracterizada pela degeneração das células da derme que originam os cornos, enquanto ainda situam-se na camada de pele acima do crânio, condição que o bezerro apresenta até cerca de dois meses de idade (STAFFORD; MELLOR, 2005). Para realização da descorna em bezerros, três são os métodos mais utilizados: a abscisão (utilização de instrumento cortante), a cauterização (que envolve o uso de ferro candente através de eletricidade ou fogo) e o método químico, com emprego de pasta à base de hidróxido de sódio ou cálcio, chamada de pasta cáustica (STILWELL; LIMA; BROOM, 2007; STOCK *et al.*, 2013). O método mais difundido é a cauterização através do ferro candente (GOTTARDO *et al.*, 2011).

Há formas de se mitigar a dor proveniente do processo de descorna em bezerros, com o emprego de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e anestésicos locais. O uso de anestésicos locais garante o bloqueio imediato do nervo cornual, mas sem eficiência no controle da dor após o procedimento. Para terapia após a descorna é recomendado o uso de AINEs (STOCK *et al.*, 2013). Duffield (2008) sugere que o emprego da pasta cáustica no lugar do ferro quente, em animais de até quatro semanas de idade, é o método menos traumático. Segundo o autor, a descorna em bezerros causa um menor quadro de dor e estresse em comparação à descorna cirúrgica devido ao menor desenvolvimento da estrutura cornificada da derme e ausência de ligação ao processo cornual. Geralmente as descornas são realizadas em bezerros jovens pela simplicidade do procedimento e também pela recuperação mais rápida (COZZI *et al.*, 2015).

A descorna cirúrgica é um procedimento mais invasivo, que tem como conceito a amputação do corno em sua base após incisão cutânea, seguida de dermorráfia; é

considerada bastante cruenta, segundo Cunha *et al.* (2002), e pode ser evitada se for realizada em bezerros.

É possível fazer uma correlação entre a escolha por bovinos mochos em regiões de maior confinamento dos animais e a disseminação da prática da descorna atualmente. A literatura traz dados sobre descorna a partir dos anos 40, período em que já se trabalhava no conceito de intensificação da produção bovina, principalmente leiteira (FAVERO; SARRIERA, 2014). A descorna, tanto em bezerros como a feita de forma cirúrgica, é um conceito amplamente difundido a partir da década de 1960, acompanhando o avanço de sistemas de produção cada vez mais intensivos, particularmente no gado leiteiro. Cozzi *et al.* (2015) relatam que no continente europeu cerca de 80% do gado leiteiro e 60% do gado de corte são descornados.

Cunha *et al.* (2002) propuseram uma técnica de incisão cutânea visando a menor tensão na sutura realizada após a amputação dos cornos. Essa técnica de incisão retilínea se inicia próxima à eminência nucal até a base medial do corno, sendo completada com uma incisão curva com início próximo à eminência nucal no mesmo ponto da anterior e em direção látero-rostral, formando assim uma meia-elipse médio-rostral. Na base lateral do corno é feita uma incisão retilínea que segue em direção látero-ventral por 4 a 5 cm de extensão. Na sequência é realizada outra incisão partindo do limite ventral da base lateral do corno e curvando-se caudalmente ao corno. Essa incisão permite uma maior aproximação entre as bordas da pele, resultando em cicatrização por primeira intenção.

Como se trata de uma cirurgia invasiva, alguns problemas podem acontecer, tanto durante o procedimento quanto no pós-operatório. Dentre eles é possível citar a deiscência dos pontos cirúrgicos pela tensão da linha de sutura, a ocorrência de deformações ósseas, além de fatores consequentes da inflamação causada pela técnica, como febre, anorexia, letargia, sinusites e eliminação de secreções mucopurulentas (SILVA *et al.*, 2009). Cunha *et al.* (2002) afirmam que a perda tecidual e a divulsão do tecido subcutâneo são importantes parâmetros de avaliação de eficiência da técnica cirúrgica e contribuem para o aparecimento desses problemas. Segundo Silva *et al.* (2009), a sinusite pode estar relacionada a condutas inadequadas antes, durante e após o procedimento, sendo fundamental sua execução por médico veterinário, detentor de todo os conhecimentos sobre anatomia, farmacologia e protocolos terapêuticos, assim como antisepsia, higiene das mãos e esterilização dos instrumentais utilizados para a técnica.

1.3 Cicatrização de feridas

A ferida pode ser definida como a quebra de continuidade de pele, membrana mucosa ou superfície tecidual que tenha como causa os mais variados agentes, sejam físicos, biológicos ou químicos (BASHA *et al.*, 2019). Segundo Rajan *et al.* (2016), a resposta natural de qualquer tecido frente a estímulos agressores é a inflamação, independente do estímulo nocivo aplicado.

O processo de reparação tecidual, altamente complexo e rápido, é desencadeado por uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos no combate aos danos teciduais, principalmente em pele e musculatura esquelética (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Shin *et al.* (2014) reforçam que ocorre uma sequência lógica de eventos para formação de tecido cicatricial. O tipo de resposta tecidual à lesão formada a partir desses eventos bioquímicos e celulares é fundamental para a qualidade da cicatrização (MENDONÇA *et al.*, 2006). O organismo é capaz de tolerar injúrias, sejam elas penetrantes, por queimaduras ou contundentes; para tanto, o recrutamento de células especializadas para o processo de resposta cicatricial ocorre em direção ao local da ferida (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Os processos de regeneração e reparo dos tecidos para fins de cicatrização de feridas ocorrem em estágios sequenciais de eventos moleculares e celulares (GONZALEZ *et al.*, 2016). Esses estágios podem ser divididos em três ou quatro fases, descritas com denominações diferentes, mas de formas semelhantes pela literatura: fase inflamatória ou exsudativa, fase de reconstrução ou proliferativa, fase de epitelização ou regenerativa e fase de maturação (MARTINS *et al.*, 2006; SCHEIBE *et al.*, 2016); fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (DIEGELMANN; EVANS, 2004); fases de reação inflamatória, proliferação celular e síntese de elementos da matriz extracelular e remodelação (MENDONÇA *et al.*, 2006; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009; SINGER; CLARK, 1999).

Diferentes estruturas de tecidos participam da interação dos eventos biológicos envolvidos na cicatrização, além de um grande número de células infiltrativas, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, que cumprem o papel de células efetoras imunes (SILVEIRA *et al.*, 2016). Brett (2008) e Singer e Clark (1999) reiteram a importância do envolvimento de mediadores de citocinas, diferentes tipos de células e componentes de matriz celular de forma interativa durante as fases da cicatrização.

A transição dessas fases pode ocorrer de maneira esperável, porém fatores como infecções e diferentes graus de extensão das lesões influenciam na regulação do processo cicatricial, resultando em infiltrados inflamatórios crônicos, excesso de fibrose tecidual e cicatrização incompleta (SHIN *et al.*, 2014). É fundamental o conhecimento do processo biológico da cicatrização de feridas e regeneração tecidual para que se obtenha um rápido fechamento da lesão com cicatriz funcionalmente satisfatória (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

O processo inflamatório inicial ocorre como uma resposta localizada para proteção frente à agressão desencadeada pela lesão. A função imediata do processo inflamatório inicial é a destruição de tecidos primariamente afetados. As células inflamatórias contribuem para a liberação de enzimas lisossômicas, espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como na facilitação da limpeza de debris celulares (MEDRADO *et al.*, 2003). A resposta inflamatória tem início assim que ocorre a injúria tecidual, com os componentes sanguíneos entrando em contato com o local da lesão; essa resposta é muito rápida e coincide com os principais sinais de inflamação, caracterizados por edema e hiperemia no local da lesão (GONZALEZ *et al.*, 2016). Uma das características principais da resposta inflamatória a patógenos e a injúrias teciduais por estímulos químicos ou físicos é o recrutamento de células neutrofílicas para o foco da inflamação. Após serem ativados por substâncias inflamatórias os neutrófilos produzem citocinas e quimiocinas, que atraem outros neutrófilos e outras células do sistema imune (DAL SECCO *et al.*, 2006; SCHWACHA, 2003).

As plaquetas entram em contato com o colágeno exposto e, assim que ocorre a agregação plaquetária há liberação de fatores de coagulação para deposição de coágulo de fibrina no local, com função de matriz provisória (CLARK, 2006). Plaquetas e células inflamatórias, como são as primeiras a chegar ao local de injúria, desempenham funções-chave na emissão de sinais necessários para o influxo de células de tecido conectivo e novo suprimento sanguíneo. Esses sinais são fatores de crescimento e são exemplos as citocinas e hormônios que se ligam a receptores. Dois dos principais fatores de crescimento são os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação do crescimento beta (TGF- β) (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Após a hemostase, os neutrófilos penetram no local da ferida e iniciam a fase de fagocitose de corpos estranhos, remoção bacteriana ou outros agentes invasores e tecido lesado (GURTNER *et al.*, 2008). Macrófagos são células muito importantes no

processo inflamatório, e chegam ao local para dar continuidade à fagocitose, assim como para liberação de PDGF e TGF- β . O PDGF também estimula a mitogênese de fibroblastos e células de musculatura lisa. O TGF- β atua em outro papel importante, iniciando a cascata de cicatrização, atraindo mais macrófagos e os estimulando a secretar citocinas adicionais, incluindo o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 1 (IL-1) (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Enzimas como a mieloperoxidase (MPO) também desempenham funções relacionadas a biomarcadores da inflamação. Os neutrófilos, quando chegam à área da lesão, promovem o aumento da atividade dessa enzima, contribuindo para a amplificação da lesão (SERRANO *et al.*, 2011; SHIN *et al.*, 2014). Além disso, essas células polimorfonucleadas liberam ERO, que auxiliam na morte de agentes invasores (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2016; XIAO; MIWA, 2017). Outras substâncias antimicrobianas também altamente ativas, como peptídeos catiônicos e proteases, são expressos pelos neutrófilos em resposta à ativação do sistema complemento, degranulação plaquetária e produtos de degradação bacteriana (GURTNER *et al.*, 2008). A liberação de ERO tem um papel crucial na cicatrização de feridas, mas quando essa liberação ocorre em excesso, pode retardar o processo de reparo do tecido acometido por alterar o estado de oxidação-redução (estado redox), culminando em estresse oxidativo e permitindo o aumento da lesão tecidual. (SILVEIRA *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é um evento comum em lesões teciduais de pele e musculatura esquelética, e ocorre devido ao desequilíbrio entre geração e remoção de ERO por defesas celulares, culminando na oxidação de constituintes como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (GAO *et al.*, 2017; JACKSON *et al.*, 2010). De acordo com Butterfield, Best, Merrick (2008), restringir a atividade de ERO em excesso limita o dano ao tecido resultado da injúria por incisão e traz como consequência melhores condições cicatriciais.

Uma vez que o local da ferida está apto, ocorre a migração de fibroblastos para dar início à fase proliferativa e de deposição de nova matriz extracelular. Os fibroblastos são as células de tecido conectivo responsáveis pela deposição de colágeno necessária para reparação do tecido lesionado, que proporciona ao tecido a força, integridade e estrutura (DIEGELMANN; EVANS, 2004). A fase proliferativa caracteriza-se pelo fechamento da lesão e inclui etapas de angiogênese, fibroplasia e

reepitelização, com objetivo de reduzir a área de tecido lesionada, estabelecendo uma barreira epitelial viável para ativar queratinócitos. Estes processos podem ter início nas primeiras 48 horas pós-injúria ou incisão e podem se desdobrar até o 14º dia após o início da lesão, dependendo da gravidade da lesão (GONZALEZ *et al.*, 2016; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). As várias fases da reparação não podem ser vistas como etapas realizadas em sequências cronologicamente definidas; cada fase da cicatrização contribui com seu efeito no tempo e intensidade certos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Segundo Dvorak (2002) e Dvorak *et al.* (1999), o aumento da permeabilidade vascular antecede todo o processo, permitindo a formação de matriz extracelular provisória para a migração e multiplicação das células endoteliais pelo extravasamento de proteínas, citocinas e outros elementos celulares. Após a injúria, os fibroblastos são atraídos para a ferida pelos fatores citados anteriormente (PDGF e TGF- β); ocorre então proliferação fibroblástica e produção das matrizes proteicas fibronectina, ácido hialurônico e depois colágeno e proteoglicanos. Os novos componentes ajudam na construção da nova matriz celular para estímulo de crescimento celular de forma intensa para a regulação de mais síntese de matriz celular e subsequente remodelação. A matriz extracelular consiste em proteínas fibrosas estruturais como colágeno e elastina, além de uma matriz intersticial composta por glicoproteínas de adesão sustentadas por uma camada gelatinosa de proteoglicanos e glicosaminoglicanos. A matriz desempenha fundamental papel de sustentação, assim como promove o suprimento de substrato para a adesão celular e regula o crescimento movimentação e diferenciação celular (ENOCH; LEAPER, 2005).

Medrado *et al.* (2010) reportaram nessa fase da cicatrização o início do processo de contração da ferida, em que os fibroblastos atuam como precursores e podem se diferenciar em miofibroblastos, dotados de filamentos de actina de musculatura lisa. Essas células acumulam-se nas bordas da ferida e exercem atividade contrátil em direção ao centro da lesão (CALIN; COMAN; CALIN, 2010). A angiogênese ocorre na matriz extracelular com a estimulação mitogênica e de migração de células endoteliais (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Segundo Singer e Clark (1999), enquanto os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular, os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local.

O processo de formação de tecido de granulação pode durar até 4 semanas e tem como característica importante a angiogênese. Algumas etapas são importantes para a neovascularização: migração de células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico, proliferação dessas células ao redor de células epiteliais migratórias e maturação celular para organização em capilares tubulares. O contínuo crescimento desse tecido de granulação promove a ocupação do tecido lesionado e retrata os momentos finais de fase proliferativa, caracterizando a reepitelização (ENOCH; LEAPER, 2005). O estabelecimento da formação do tecido de granulação, formado por vasos sanguíneos recém-formados, fibroblastos e seus produtos (colágeno fibrilar, elastina, fibronectina, proteases e glicosaminoglicanas) marca um passo intermediário entre a malha fibrina/fibronectina da matriz provisória e a reestruturação de colágeno para cicatrização total (BERRY II; SULLINS, 2003).

Calin, Coman, Calin (2010) sustentam que os mecanismos de formação do tecido de granulação incluem o crescente aumento de proliferação fibroblástica, síntese de colágeno e elastina para formação de reticulação do tecido conectivo, além da produção de fatores quimiotáticos e TNF- α pelos fibroblastos. A nova matriz de colágeno torna-se então reticulada e organizada durante a fase final de remodelação.

A fase remodelação começa duas a três semanas após o início da lesão e pode durar vários meses. Tem como principal objetivo a promoção de resistência à tração através da reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular. É a fase de recuperação da estrutura do tecido normal em que o tecido de granulação é gradualmente remodelado, para obtenção de tecido cicatricial menos celular e vascular, com aumento progressivo de fibras de colágeno (GONZALEZ *et al.*, 2016). Colágenos são sintetizados pelos fibroblastos e são a mais abundante família de proteínas no corpo; promovem força e integridade para todos os tecidos desempenhando um papel vital na reparação tecidual. PDGF, fator de crescimento fibroblástico básico (BFGF), TGF- β , IL-1 e TNF- α induzem a síntese de colágeno durante as fases proliferativa e de remodelação (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Portanto, o colágeno é o maior componente do tecido conectivo cicatricial, sendo o colágeno tipo III o predominantemente sintetizado pelos fibroblastos nas etapas iniciais dessa fase (ISAAC *et al.*, 2010). Conforme a cicatrização transcorre, a deposição de matriz extracelular sofre alterações em sua composição; com o fechamento da ferida inicia-se uma degradação do colágeno tipo III e aumento da síntese de colágeno tipo I (LI; CHEN; KIRSNER, 2007), assim como redução de ácido

hialurônico e fibronectina, que são degradados por proteinases e células plasmáticas (GONÇALVES *et al.*, 2010)

Durante os processos de maturação e remodelação, que culminam com a cicatrização, grande parte dos vasos formados, fibroblastos e células inflamatórias não são mais encontrados na área da injúria. Apoptose, processos de emigração celular ou outros mecanismos de morte celular permitem a formação de cicatriz com número reduzido de células. Ainda nesse processo ocorre alteração dos padrões dos fibroblastos do tecido de granulação que expressam temporariamente propriedades contráteis de fibras de actina de musculatura lisa, caracterizando-se como miofibroblastos (CALIN; COMAN; CALIN, 2010). Harper, Young, McNaught (2014) atentam que uma ferida não mais possuirá a mesma resistência à tensão após cicatrizada, podendo alcançar em torno de 80% dessa condição a longo prazo.

1.4 Tratamentos

O método mais comum empregado na cicatrização de lesões em animais é a aplicação tópica de substâncias cicatrizantes, antimicrobianas e repelentes, sendo o óxido de zinco um dos elementos mais utilizados e presentes em produtos tópicos comerciais com finalidade de acelerar o tempo de cicatrização (CANGUL *et al.*, 2006). A eficácia de tratamentos tópicos em feridas não é totalmente esclarecida na literatura (HUEBNER *et al.*, 2017). Tratamentos à base de alumínio também são comumente utilizados como uma forma de proteger a superfície das lesões sem promover danos aos tecidos, sendo um coadjuvante no processo de cicatrização de feridas externas pela ação adstringente na precipitação de proteínas e atuando discretamente na atividade antimicrobiana (RAHMATI; MOZAFARI, 2019).

Alguns outros produtos podem ser utilizados como auxiliares da cicatrização: curativos à base de alginato de cálcio e sódio, soluções iodadas, produtos com sulfadiazina de prata além de soluções detergentes à base de permanganato de potássio. Todos os produtos citados têm propriedades antissépticas e/ou antimicrobianas (BRAWN, 2015).

Estudos são realizados na tentativa de se detectar a eficácia do uso de plantas na cicatrização de feridas para estimulação de atividade de fibroblastos e síntese de colágeno e glicosaminoglicanas, como o *Triticum vulgare* (trigo) (SOLÓRZANO *et al.*, 2001). Martins *et al.* (2003) também analisaram o uso de fitoterápicos como

barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*), calêndula (*Calendula officinalis*) e confrey (*Symphytum officinale*). O mel de abelha também é descrito como auxiliar de cicatrização, com ação antimicrobiana e antiinflamatória, além de estimular novos fatores de crescimento de tecido e promover a regulação de citocinas inflamatórias nos monócitos (TONKS *et al.*, 2003).

As fototerapias e suas diferentes modalidades demonstram eficácia, sobretudo em lesões por queimaduras, na bioestimulação do processo cicatricial (BARBOSA, 2016). Rezende *et al.* (2007) e Núñez *et al.* (2013) investigaram o efeito da laserterapia em uma única aplicação em doses distintas na cicatrização de lesões em ratos e demonstraram efeito positivo e significativo na cicatrização quando comparados ao grupo controle.

Além disso, a utilização de enxertos biológicos de pele ou placenta tem sido relatada como favorável na promoção de cicatrização, induzindo resposta inflamatória branda e diminuindo a formação de tecido cicatricial em excesso, além de agirem com propriedades antibacterianas (PURNA; BABU, 2000). Conceição *et al.* (2017) reportaram a utilização de plasma rico em plaquetas em feridas com o objetivo de aumentar a expressão de proteínas responsáveis por quimiotaxia, angiogênese e síntese de matriz extracelular, atuando positivamente na reparação tecidual.

Uma alternativa biotecnológica relativamente recente é a utilização de biomateriais. Variedades de biomateriais vêm sendo desenvolvidas com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, dependendo da aplicação, incluindo regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (CZAJA *et al.*, 2007). Esses materiais, geralmente compostos por biopolímeros, podem ser utilizados como alternativa para curativos de feridas e queimaduras por possuírem alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de baixo custo e semelhança com a matriz extracelular (BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005).

Segundo Rambo *et al.* (2008), a nanocelulose bacteriana (NCB) é um biopolímero de estrutura nanofibrilar com semelhança à matriz extracelular. Ataíde *et al.* (2017) afirmam que a NCB possui as propriedades desejáveis para cicatrização de feridas, como alta pureza e capacidade de retenção de água, além de ser moldável; Klemm *et al.* (2011) e Trovatti *et al.* (2011) completam incluindo a alta resistência mecânica e porosidade tridimensional. Essas são algumas das propriedades que fazem crescer o interesse nas pesquisas em desenvolvimento de materiais como a

NCB para aplicação em feridas e queimaduras (KWAK *et al.*, 2015; LIYASKINA *et al.*, 2017)

1.5 Membrana de Nanocelulose Bacteriana (NCB)

A celulose é um dos materiais encontrados em maior abundância na natureza, normalmente extraída de plantas, mas também produzida como resultado da fermentação de algumas espécies de bactérias (CACICEDO *et al.*, 2016), além de fungos e algumas algas (NOBLES; ROMANOVICZ; BROWN, 2001). Klemm *et al.* (2005) afirmam que a celulose é o polímero orgânico mais encontrado, representado por $1,5 \times 10^{12}$ toneladas de produção total de biomassa; segundo os autores é uma fonte quase inesgotável de matéria prima para suprir a demanda de produtos ambientalmente corretos e biocompatíveis. As fontes principais de produção da celulose são glicose, frutose e glicerol (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015).

A celulose sintetizada por bactérias, conhecida como celulose bacteriana (CB) caracteriza-se por um biopolímero obtido como resíduo da fermentação em meios de cultura ricos em açúcares (KESHK; RAZEK; SAMESHIMA, 2006). Os primeiros relatos de celulose produzida por bactérias datam de 1886 (BROWN, 1886), especificamente pela bactéria *Acetobacter xylinum*, renomeada posteriormente para *Gluconacetobacter xylinus* (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000) e recentemente denominada *Komagaeibacter xylinus* (CACICEDO *et al.*, 2016). Considerada uma bactéria Gram negativa, aeróbia estrita, tem habilidade para sintetizar celulose em abundante quantidade em um meio de cultura que apresente fontes de carbono e nitrogênio como nutrientes, como frutas ou produtos à base de frutas, vegetais, vinagre e bebidas alcoólicas (KLEMM *et al.*, 2005). Outras bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* e *Acetobacter* também secretam esse polissacarídeo extracelular (MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011). As celulosas produzidas por diferentes bactérias possuem particularidades em algumas características, como morfologia, estrutura e aplicação; as fontes de CB com mais utilização são *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter xylinus* (*Gluconacetobacter xylinus* ou *Komagaeibacter xylinus*), sendo a última mais utilizada comercialmente pela alta produtividade (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Quimicamente, a CB tem semelhança quando comparada à celulose produzida por plantas (KLEMM *et al.*, 2005; MOHITE; PATIL, 2014), porém a grande diferença é

o fato de ser um material livre de hemicelulose, lignina e pectina (ATAIDE *et al.*, 2017; DUBEY *et al.*, 2017; KLEMM *et al.*, 2005), sendo uma fonte altamente pura de celulose e que a distingue favoravelmente da celulose vegetal (KESHK; RAZEK; SAMESHIMA, 2006). Nakagaito, Iwamoto, Yano (2005) reportam significantes diferenças entre celulose vegetal e bacteriana, tanto em termos de pureza quanto de propriedades e características macromoleculares: a CB possui valores de Módulo de Young (definido como a relação entre tensão e deformação quanto à elasticidade linear) bem mais altos. Trovatti *et al.* (2010) afirmam ainda que a CB possui maior proporção de retenção de água em relação à celulose obtida de plantas.

A celulose bacteriana não contém componentes de origem animal, segundo Ataide *et al.* (2017); sua obtenção se apresenta em forma de hidrogel altamente hidratado, com aproximadamente 99% de água, cristalinidade exuberante e alta taxa de polimerização (entre 2000 a 8000), conferindo propriedades biodegradáveis, atóxicas e não alergênicas (KLEMM *et al.*, 2005), alta porosidade (LEE *et al.*, 2014) e elevado grau de biocompatibilidade (JOZALA *et al.*, 2016; SANCHAVANAKIT *et al.*, 2006).

Segundo Fu, Zhang, Yang (2013), a estrutura fibrosa da CB é semelhante ao colágeno, e se apresenta como uma rede tridimensional de nanofibras sustentada por uma ligação inter e intra fibrilar que confere grande capacidade de tensão. Essa rede de finíssimas fibras tem diâmetro mais de 100 vezes menor que a fibras derivadas de plantas (MOHITE; PATIL, 2014), compostas por uma grande proporção de fibras com diâmetro entre 20 a 100 nm (DAHMAN, 2009) e organizadas em nanofibrilas entre 40 a 60 nm, com 10 a 250 cadeias poliméricas simples lineares de comprimento entre 1 a 9 nm, equivalentes a 2000 até 20.000 unidades de glicose cada (CACICEDO *et al.*, 2016). Essa morfologia nanométrica confere à CB ampla superfície, grande capacidade de retenção e absorção de líquidos, elasticidade e maleabilidade (DAHMAN, 2009; KLEMM *et al.*, 2011), podendo ser denominada como nanocelulose bacteriana (NCB).

A NCB, por ter essas propriedades supracitadas, apresenta-se como uma matriz ideal para utilização em muitos campos, especialmente aqueles relacionados a aplicações biomédicas e biotecnológicas, como material biológico para a indústria alimentícia, esponjas para coleta de material contaminante e absorção de toxinas e fabricação de materiais optoeletrônicos (DONINI *et al.*, 2010),

Shah *et al.* (2013) e Kwak *et al.* (2015) reforçam a utilização da NCB na indústria médica, com atuação em engenharia tecidual, implantes dentários e, sobretudo no auxílio à melhorias das condições de feridas em forma de dispositivos médicos. Fu, Zhang, Yang (2013) corroboram que a biocompatibilidade, elasticidade, transparência, manutenção de ambiente úmido aliada à capacidade de absorção de exsudato durante a fase inflamatória de cicatrização revelam grande potencial para a aplicação desse biopolímero na cicatrização de feridas. A NCB, quando utilizada em curativos de feridas, também possui a função de reduzir dor e acelerar o processo de granulação (SULAEVA *et al.*, 2015), além de criar uma barreira entre a ferida e o ambiente, graças à sua estrutura reticulada e porosa, prevenindo infecções bacterianas (ATAIDE *et al.*, 2017; SULAEVA *et al.*, 2015). Jozala *et al.* (2016) relatam a importância dos avanços das pesquisas em biopolímeros pela grande aplicação no campo médico-farmacêutico, tanto em relação à aplicação em cicatrização de feridas, como para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas, *scaffolds* para engenharia de tecidos, enxertos vasculares e curativos para queimaduras.

As bactérias conseguem sintetizar celulose de duas formas distintas: pelo cultivo estático ou agitado. O primeiro é o mais utilizado para obtenção de filmes ou membranas de NCB na interface entre ar e meio (CHAO *et al.*, 2000), sendo o método mais barato e possível de ser realizado em recipientes com diferentes formatos e tamanhos. No entanto, é necessário um tempo longo para biossíntese (entre 7 a 20 dias), dificultando sua produção em escala comercial (RECOUVREUX *et al.*, 2011). Por outro lado, por possuírem alta porosidade e biocompatibilidade, além de moldabilidade durante o crescimento, esses compósitos produzidos nesse tipo de cultivo podem ter importante função nas alternativas de aplicações médicas (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

A síntese em cultivo agitado, em que a celulose é sintetizada e distribuída pelo meio de cultura sob forma de esferas homogêneas ou estruturas irregulares fibrosas, tem alto rendimento e potencial para uso em escala comercial; no entanto, apresenta menor cristalinidade, resistência mecânica e grau de polimerização. Esferas de celulose podem ter maior utilização para biodisponibilidade de medicamentos, adsorção iônica e contaminantes orgânicos (RECOUVREUX *et al.*, 2011), enquanto a celulose em cultivo estático apresenta maior aplicação em curativos de feridas. Wang, Tavakoli, Tang (2019) reportam que muitos métodos estão sendo investigados

atualmente para aprimorar as taxas de crescimento de celulose, principalmente pelo fato de que existe uma variedade de bactérias produtoras, com características diferentes das celuloses produzidas em relação à morfologia, estrutura, propriedades e aplicações.

Os custos de produção dos meios de cultura para produção da NCB podem ser os principais fatores limitantes para sua obtenção; por isso, a identificação de maneiras economicamente viáveis de produzi-la é fundamental para sua utilização (ÇAKAR *et al.*, 2014). Pesquisas são frequentes para aumentar a eficiência do processo de produção e muitos resultados se mostraram satisfatórios economicamente para justificar a demanda para a celulose bacteriana (ÇAKAR *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). Muitos pesquisadores sugerem o uso de meios de cultura de custos baixos, como palha de trigo (CHEN *et al.*, 2013), resíduos industriais de abacaxi (ALGAR *et al.*, 2015), suco de frutas (KUROSUMI *et al.*, 2009), frutas apodrecidas e resíduos da pecuária leiteira (JOZALA *et al.*, 2015), caldos de resíduos de fermentação vinícola (WU; LIU, 2012), caldos de resíduos de produção de gomas mastigáveis (LI *et al.*, 2015), resíduos e bioprodutos de biodiesel e indústria têxtil (TSOUKO *et al.*, 2015), e resíduos de fermentação de acetona-butanol-etanol (HUANG *et al.*, 2015). Jozala *et al.* (2015) demonstraram que a utilização de frutas apodrecidas podem ser um excelente substrato para produção de NCB pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*; o meio de cultura, além de economicamente vantajoso, promove a redução de poluição ambiental e estimula as pesquisas associadas à sustentabilidade. O impacto socioeconômico aliado à produção ecologicamente correta é fundamental para o prosseguimento dos estudos nessa área. Revin *et al.* (2018) concluem que o uso de resíduos da pecuária leiteira e da indústria sucroalcooleira são substratos promissores para obtenção da CB pelos baixos custos produtivos.

Há relato que as membranas de NCB, sozinhas, não possuem atividade anti-inflamatória ou antimicrobiana (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008). Por outro lado, alguns trabalhos têm sido muito bem sucedidos quando há incorporação de substâncias com propriedades antimicrobianas (LIYASKINA *et al.*, 2017). A baixa bioatividade, assim como a atividade química em relação ao potencial da matriz extracelular indicam a necessidade da introdução de grupos ativos na superfície das nanofibras para melhoria de desempenho na reparação tecidual (MEYER; REIS; PORTO, 2017).

A associação de substâncias ou moléculas bioativas à NCB tem sido explorada na produção de biocomplexos ativos (JEBEL; ALMASI, 2016). Membranas de NCB associadas à quitosana (polissacarídeo semelhante à celulose) apresentaram uma significativa inibição da *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus*, assim como um estímulo à epitelização e regeneração em feridas cirúrgicas em ratos (LIN *et al.*, 2013). Kim *et al.* (2011) afirmam que a quitosana e a heparina podem aumentar o potencial de ação em feridas quando incorporadas ao meio de cultura da NCB. Zaborowska *et al.* (2010) citam que a adição de materiais na fase de crescimento da NCB provoca modificações positivas no controle de estrutura, formato e outras propriedades dos compósitos formados.

A impregnação de anti-inflamatórios às membranas de NCB produzidas sob cultivo estático pode acelerar o processo de cicatrização de lesões, pois a difusão do medicamento da membrana em direção à injúria é facilitada devido à porosidade da membrana (ZANOTI, 2017). Luan *et al.* (2012) demonstraram boa atividade antimicrobiana de membranas de NCB impregnadas com sulfadiazina de prata, combatendo de forma eficaz *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como Shao *et al.* (2015) obtiveram sucesso com a utilização de nanocompósitos de NCB com íons de prata. O uso de antissépticos a base de iodopovidona incorporados à membrana também é citado (WIEGAND *et al.*, 2015), assim como a preparação de compósitos com cloridrato de tetraciclina (SHAO *et al.*, 2016). O uso de bromelina (extrato obtido de abacaxi) tem se revelado promissor quando incorporada às membranas de NCB na diminuição do tempo de cicatrização de feridas; a bromelina possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes que são potencializadas, e quando associadas às membranas conferem características interessantes na liberação controlada de medicamentos (ATAIDE *et al.*, 2017). Dutta e Bhattacharyya (2013) reportam importante ação da bromelina presente nas folhas do abacaxi, que possuem agentes proteolíticos, fibrinolíticos, fosfatases, nucleases e peroxidases, com funções antibacterianas e antifúngicas.

O uso de bacteriocinas tem sido uma alternativa para combater agentes etiológicos que possuam resistência aos antimicrobianos mais utilizados (ALLEN *et al.*, 2014; ROLAIN *et al.*, 2016). Entre elas, destaca-se a nisina (MAIA *et al.*, 2014). Na saúde humana a nisina tem sido utilizada para tratamentos odontológicos e gengivites (TONG *et al.*, 2010; VAN HEEL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011), assim como em infecções gástricas persistentes (KIM *et al.*, 2003), infecções vaginais

(GUPTA *et al.*, 2009) e como método contraceptivo (ARANHA; GUPTA; REDDY, 2004).

1.6 Nisina

A nisina é um peptídeo antimicrobiano de peso molecular ao redor de 3,4 kDa produzido por bactérias Gram positivas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, entre outras) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entre outras), sendo os *Lactococcus lactis* os produtores principais (ARAUZ *et al.*, 2009); sua solubilidade, atividade e estabilidade são diretamente relacionadas ao pH, cujos valores entre 2 a 5 encontram-se ideais para seu crescimento e manutenção. A nisina possui relativa termoestabilidade, mantendo sua conformação em temperaturas de até 115°C (ARAUZ *et al.*, 2009; DEEGAN *et al.*, 2006). Esse antimicrobiano natural pertence ao grupo das bacteriocinas, e possuem natureza proteica, diferenciando-se dos antibióticos convencionais pela atividade biológica e composição química. Além disso, a linhagem produtora de nisina é resistente à própria nisina, e inibe o crescimento de outros agentes bacterianos que competem pelo mesmo ambiente (BONINI; NETO; MARINGONI, 2012; KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013).

As bacteriocinas da classe I são aquelas que possuem em sua estrutura primária os aminoácidos lantionina e metillantionina (BIERBAUM; SAHL, 2009); agem geralmente na parede celular dos patógenos (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; GÓMEZ-TREVIÑO; JIMÉNEZ-SALAS, 2003). A nisina pertence a esse grupo, sendo denominada um lantibiótico (SCHERER *et al.*, 2013). Essas bacteriocinas possuem espectro de ação eficaz contra bactérias Gram positivas e inibição de esporos, porém com restrita ou nenhuma atividade em agentes Gram negativos, fungos ou vírus. A ligação primária à parede celular forma poros na membrana citoplasmática através de ligações iônicas, alterando a permeabilidade e causando extravasamento de conteúdo intracelular do patógeno (ARAUZ *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstram potencial terapêutico em suas aplicações (ALLEN *et al.*, 2014; BEHRENS *et al.*, 2017), incluindo lesões em humanos (VAN HEEL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011) e para a Medicina Veterinária (CINTAS *et al.*, 2001; FIELD *et al.*, 2016; PIPER *et al.*, 2009). Esses últimos autores afirmam a capacidade ativa da nisina inclusive em *Staphylococcus aureus* resistentes à

meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) com baixa toxicidade e de fácil degradação por enzimas digestivas. Heunis, Smith, Dicks (2013) realizaram experimento analisando a liberação da bacteriocina em membranas de nanocelulose bacteriana para verificação de aceleração do processo de cicatrização de feridas em ratos. Bowe *et al.* (2006) relatam a nisina e outras bacteriocinas como eficazes em tratamentos de lesões de pele causadas por *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Listeria monocytogenes*. Segundo Mastromatteo *et al.* (2010), a atividade da nisina contra bactérias Gram negativas ocorre de forma satisfatória quando associada a agentes quelantes.

A atividade antioxidante da nisina também é alvo de estudos; Dos Santos *et al.* (2018) confirmaram essa função em experimentos recentes e sugerem a utilização associada a biopolímeros como a membrana de NCB por agirem como plataforma de liberação gradual de nisina e controle de crescimento microbiano.

O alto custo de produção da nisina é um problema para sua utilização em ampla escala na área médica. Desta forma, a busca de novas condições de produção é fundamental para sua aplicação. Jozala *et al.* (2007) desenvolveram um protocolo de produção de nisina a partir de *Lactococcus lactis* utilizando soro de leite como meio de cultura. O protocolo se mostrou eficiente e a utilização de subprodutos da pecuária leiteira como alternativa de baixo custo para produção em escala industrial se mostra promissora para a continuidade dos estudos desse agente antimicrobiano.

O potencial inibitório das bacteriocinas tem demonstrado eficiência terapêutica, porém os processos de estabilização, espectro de ação antimicrobiana e aumento de potência ainda são desafiadores. Assim, o presente estudo visa avaliar, de forma inédita, a utilização da nisina incorporada à membrana de nanocelulose bacteriana como possível aplicação biotecnológica na Medicina Veterinária, mais precisamente no processo de cicatrização de feridas de dermorráfia em bovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da utilização de dois novos tratamentos como coadjuvantes na cicatrização de feridas de descorna cirúrgica em bovinos: membranas de Nanocelulose Bacteriana (NCB) e membranas de NCB com incorporação de nisina.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e padronizar a membrana de NCB de forma adequada para colocação na ferida cirúrgica;
- Incorporar a nisina à membrana de NCB;
- Observar clinicamente os animais submetidos à descorna cirúrgica após aplicação dos biomateriais para avaliação da segurança ou de possibilidade de rejeição;
- Avaliar macroscopicamente e microscopicamente as características inflamatórias e cicatriciais das lesões de descorna cirúrgica após a aplicação ou não da membrana de NCB e realizar a comparação com a utilização da membrana de NCB impregnada com nisina.

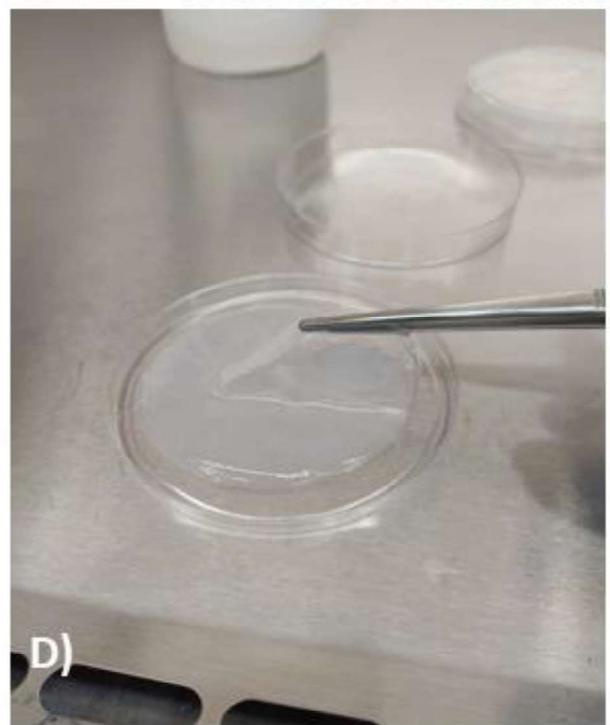
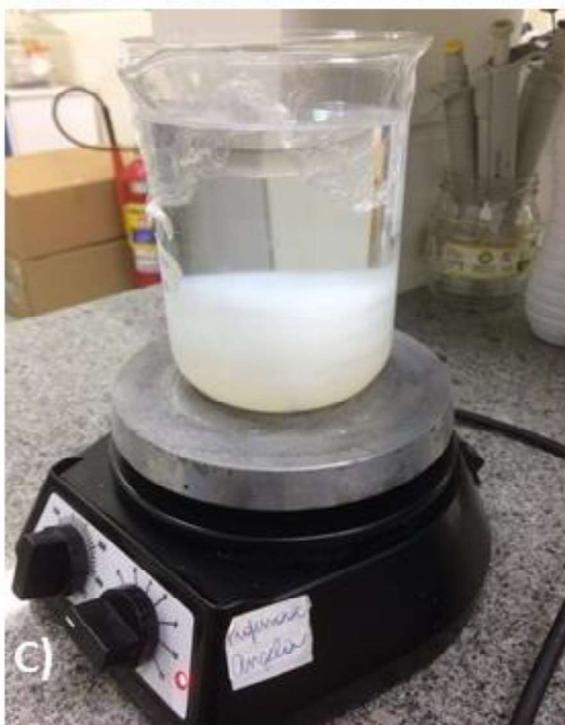
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Membranas de NCB e incorporação do antimicrobiano nisina

As membranas de NCB foram produzidas pelo cultivo da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582, em meio Hestrin & Schramm (20 g/L glicose, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Fosfato de sódio anidro; 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado). O cultivo foi realizado em frasco tipo Erlenmeyer de capacidade volumétrica de 250 ml (Figura 1A). O volume inoculado foi de 10 ml de meio contendo aproximadamente 10^7 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de *Gluconacetobacter xylinus*. Os frascos foram mantidos por 7 dias em cultura estática, a 30 °C. Membranas com aproximadamente 2 mm de espessura foram obtidas (Figura 1B).

Após o crescimento, as membranas foram imersas em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, sob agitação a 60 °C por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em água destilada (Figura 1C). As membranas foram então autoclavadas a 121 °C por 15 minutos em água destilada e solução de tampão fosfato (PBS) a 1%, e armazenadas a 4 °C, seguindo o protocolo proposto por Jozala *et al.* (2015).

Figura 1 – Representação da produção das membranas de nanocelulose bacteriana (NCB). Em A) Cultivo estático da *Gluconacetobacter xylinus*, em meio Hestrin & Schramm, em frasco Erlenmeyer; B) Membrana de NCB após 7 dias de cultivo, com cerca de 2mm de espessura; C) Lavagem da membrana em água destilada, sob agitação e D) Membrana de NCB finalizada, após ser autoclavada a 121 °C, 15 min.



Fonte: Elaboração própria.

A Nisina de *Lactococcus lactis* a 2,5% de pureza foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). De acordo com informações do fabricante, 1 g de pó contém 2,5% de nisina, com 10^6 AU de atividade. AU refere-se a unidades de atividade arbitrárias definidas por halo de inibição. A solução padrão de nisina foi preparada então dissolvendo 1 g do pó (25 mg de nisina) em 1 L de PBS estéril, pH 7. Assim, a solução de nisina utilizada para a incorporação nas membranas foi de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Para a incorporação do antimicrobiano, cada membrana previamente esterilizada foi imersa em 10 ml da solução de 25 $\mu\text{g/ml}$ de nisina, em frasco tipo Erlenmeyer, em ambiente asséptico. Os frascos foram mantidos em agitação de 100 rpm a 25 °C, por 4 horas. Após esse período as membranas foram removidas e mantidas a 4 °C, em protocolo adaptado de Dos Santos *et al.* (2018).

3.2 Caracterização dos animais e delineamento dos experimentos

Este é um estudo experimental com animais da espécie bovina em que o procedimento de descorna cirúrgica foi idealizado como modelo para avaliação e comparação do comportamento macroscópico e microscópico de feridas cirúrgicas em relação à fase inflamatória do processo cicatricial. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba – CEUA/UNISO, Sorocaba, SP, e aprovado sob os protocolos 162/2019 e 149/2019.

Para a realização desse estudo foram utilizadas 24 vacas anelradas ou mestiças, provenientes da propriedade Estância Hortência, localizada na cidade de Salto de Pirapora, São Paulo. Esses animais possuíam entre dois e dez anos de idade e residiam há no mínimo 12 meses na propriedade, portanto, estavam devidamente adaptados ao sistema de produção e manejo realizado.

Os animais foram mantidos desde 60 dias pré-cirurgia até 60 dias pós-cirurgia em Sistema Intensivo a Pasto, em que todo o lote permanece sob as mesmas condições nutricionais, com forrageira de qualidade do gênero *Panicum*, cultivar Mombaça. O pasto em que esses animais permaneceram tem cerca de 11,5 ha, divididos em 5 piquetes de aproximadamente 2,3 ha cada. As vacas, nesse tipo de sistema, são periodicamente trocadas de piquete de acordo com o consumo da forragem existente, em sistema de rotação; esse manejo garante aos animais

excelentes condições alimentares e de Bem-Estar Animal, pois prioriza o uso de tecnologias para manejo eficiente e produtivo. Além disso, durante todo o tempo de permanência nos piquetes, os animais receberam água *ad libitum* e suplementação mineral.

Os animais foram selecionados pela avaliação de Escore de Condição Corporal (ECC), realização de diagnóstico de gestação negativo e pela avaliação prévia do cirurgião responsável pelo procedimento de descorna a partir do diâmetro do corno em relação à base cornual, para que houvesse a garantia de realização da dermorrafia com baixa tensão da linha de sutura.

O estudo foi dividido em dois experimentos, I e II, conforme Figura 2.

Figura 2 – Delineamento dos experimentos de descorna cirúrgica em bovinos adultos com utilização de membranas de NCB (Experimento I) e com membranas de NCB+nisina (Experimento II).



Fonte: Elaboração própria.

Para o experimento I foram utilizados 12 animais; as dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado esquerdo receberam tratamento controle, composto neste estudo por limpeza com gaze e antissepsia com solução de polivinilpirrolidona iodada (PVPI) tópica seguida de repelente larvicida a cada 48 horas. As dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado direito receberam a aplicação da Membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal sucedida de tratamento controle.

Para o experimento II, foram utilizados outros 12 animais; as dermorráfias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado esquerdo receberam a Membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal; as dermorráfias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado direito receberam a aplicação da Membrana de NCB impregnadas com nisina. Em ambas as feridas houve também aplicação do tratamento controle.

3.3 Procedimento cirúrgico e pós-operatório

A preparação da cirurgia foi conduzida de forma individual, assim como os procedimentos de descorna e dermorráfia, realizados por apenas um profissional experiente e devidamente capacitado na técnica proposta. Cada animal foi previamente contido em tronco de contenção, equipado com balança digital (marca Beckhauser®, tipo parede móvel, com balança integrada), cabrestado e submetido à sedação com Cloridrato de Xilazina 2% na dose de até 0,2 mg/kg via intramuscular (IM), após conferência da pesagem.

Na sequência, houve o encaminhamento do animal para a área de realização da cirurgia e a realização de contenção física. Essa contenção ocorreu pelo derrubamento do animal com cordas utilizando a técnica Almeida Barros, e a manutenção sob decúbito esternal com a cabeça fletida à esquerda (posição de autoauscultação) para realização dos procedimentos. Para obtenção de analgesia local infiltrativa foi administrado Cloridrato de Lidocaína 2% sem vasoconstritor, sendo respeitada a dose máxima de 7 mg/kg para bloqueio sensitivo do ramo zigomático temporal do nervo cornual, além de aplicação subcutânea de 30 ml do mesmo anestésico local na região caudal da base de cada corno. Todos os materiais cirúrgicos utilizados foram os apropriados para a técnica e passaram por esterilização prévia em caixas cirúrgicas de inox preparadas para cada cirurgia.

O procedimento cirúrgico realizado teve como base a técnica proposta por Cunha *et al.* (2002), que consta em uma incisão retilínea com início nas proximidades da eminência nucal, estendendo-se até a base medial do corno; completa-se com incisão curva com início no mesmo ponto da eminência nucal em direção látero-rostral ao longo da crista frontal. Com essa técnica forma-se uma meia-elipse médio-rostral. Outra meia-elipse é constituída iniciando no limite ventral da base lateral do corno,

realizando-se uma curva na direção caudo-medial. A Figura 3 representa a sequência dos procedimentos de descorna cirúrgica, aplicação das membranas e dermorrafia.

Figura 3 – Procedimentos realizados para os experimentos I e II. Em A) Incisão de pele de acordo com a técnica proposta por Cunha *et al.* (2002); B) Divulsão da base do corno após serragem para garantia de baixa tensão de linha de sutura; C) Aplicação da membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal; D e E) Posicionamento da membrana de NCB para dermorrafia; F) Dermorrafia e aplicação de repelente e larvicida.



Fonte: Elaboração própria.

As duas meia-elipses formadas são liberadas através da divulsão por toda a base do corno entre pele e subcutâneo. A base do corno é então serrada e o corno e as meia-elipses são retirados, facilitando a dermorrafia pela diminuição da tensão da sutura de pele. Para a dermorrafia utilizou-se fio de náilon (inabsorvível) número 0,60, com padrão de sutura "Sultan" (também conhecido como padrão de sutura em X).

O protocolo de tratamento pós-operatório imediato foi realizado em todos os animais com aplicação única de soro antitetânico, administração do anti-inflamatório não esteroide (AINE) Flunixin Meglumine na dose de 2,2 mg/kg, IM, assim como antibioticoterapia com Penicilina Benzatina na dose de 40.000 UI/animal. Para a

sequência do tratamento pós-operatório, Diclofenaco Sódico (AINE) foi administrado na dose de 5 mg/kg, uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos, em todos os animais, além de Penicilina Benzatina na dose de 40.000 UI/animal, com intervalo de aplicação de 48 horas, totalizando mais duas aplicações. Esses protocolos foram realizados visando o Bem-Estar Animal.

A dinâmica do tratamento controle, em todas as feridas, ocorreu com limpeza com gaze e antissepsia com solução de PVPI tópica seguida de repelente larvicida a cada 48 horas ou mediante avaliação do cirurgião responsável, com os animais contidos em tronco de contenção. Os pontos da cirurgia foram retirados somente após 15 dias após a realização das biópsias.

3.4 Avaliação macroscópica

Para análise macroscópica das feridas cirúrgicas foi estabelecido um protocolo de registro de imagens das lesões a cada 48 horas a partir do procedimento cirúrgico até a realização das biópsias com os animais devidamente contidos em tronco de contenção. Após contenção procedia-se a antissepsia e higienização das feridas cirúrgicas com solução de PVPI tópica e água destilada e em seguida as feridas eram secas com gaze.

Para unificação da obtenção das imagens um cartão retangular (30x15 cm) em papel milimetrado, com recorte central (15x7 cm), foi desenvolvido para posicionamento da ferida. O cartão era posicionado de modo que a ferida permanecesse na área do recorte. As imagens eram então capturadas utilizando-se câmera fotográfica de smartphone (Samsung Galaxy Note10 Plus) a uma distância aproximada de 15 cm das feridas, paralelamente ao cartão. A Figura 4 mostra a dinâmica de avaliação das imagens para avaliação macroscópica.

Figura 4 – Representação do protocolo de registro de imagens para avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas. Em A) Abordagem frontal em tronco de contenção; em B) Cartão em papel milimetrado desenvolvido e posicionamento do cartão com recorte central sobre a ferida; C) Obtenção de imagem a 15 cm de distância, paralelamente ao cartão.



Fonte: Elaboração própria

A partir desse protocolo estabeleceu-se uma dinâmica de comparação macroscópica entre as feridas nos dias 2, 6, 10 e 14 após o procedimento cirúrgico, havendo exclusão, nessa avaliação, dos animais que foram submetidos às biópsias nos dias 3 e 7 após as cirurgias.

As 48 imagens foram compiladas e organizadas em um arquivo de PowerPoint para a avaliação comparativa das feridas cirúrgicas. Com base nas fotos obtidas os pesquisadores do grupo elaboraram um Escore de Classificação das condições das feridas cirúrgicas, com notas variando entre 1 e 4, sendo 1) Moderada inflamação; ausência de epitelização; 2) Leve inflamação; início de epitelização; 3) Ausência de inflamação; epitelização presente e 4) Crescimento de pelos; evidência de epitelização, como mostra a Figura 5.

Figura 5 – Escores de classificação das condições das feridas cirúrgicas, com notas variando entre 1 e 4.



Escore 1 - Moderada inflamação; ausência de epitelização



Escore 2 - Leve inflamação; início de epitelização



Escore 3 - Ausência de inflamação; epitelização presente



Escore 4 - Crescimento de pelos; evidente epitelização

Fonte: Elaboração própria.

As 48 imagens foram arranjadas de forma aleatória quanto aos dias e ao tipo de tratamento. Essas imagens foram enviadas, via arquivo de PowerPoint, para seis avaliadores cegos, sendo três médicos veterinários (docentes da UNISO sem envolvimento com o projeto) e três estudantes de Medicina Veterinária (discentes da UNISO matriculados no 9° semestre do curso, sem envolvimento com o projeto). Os

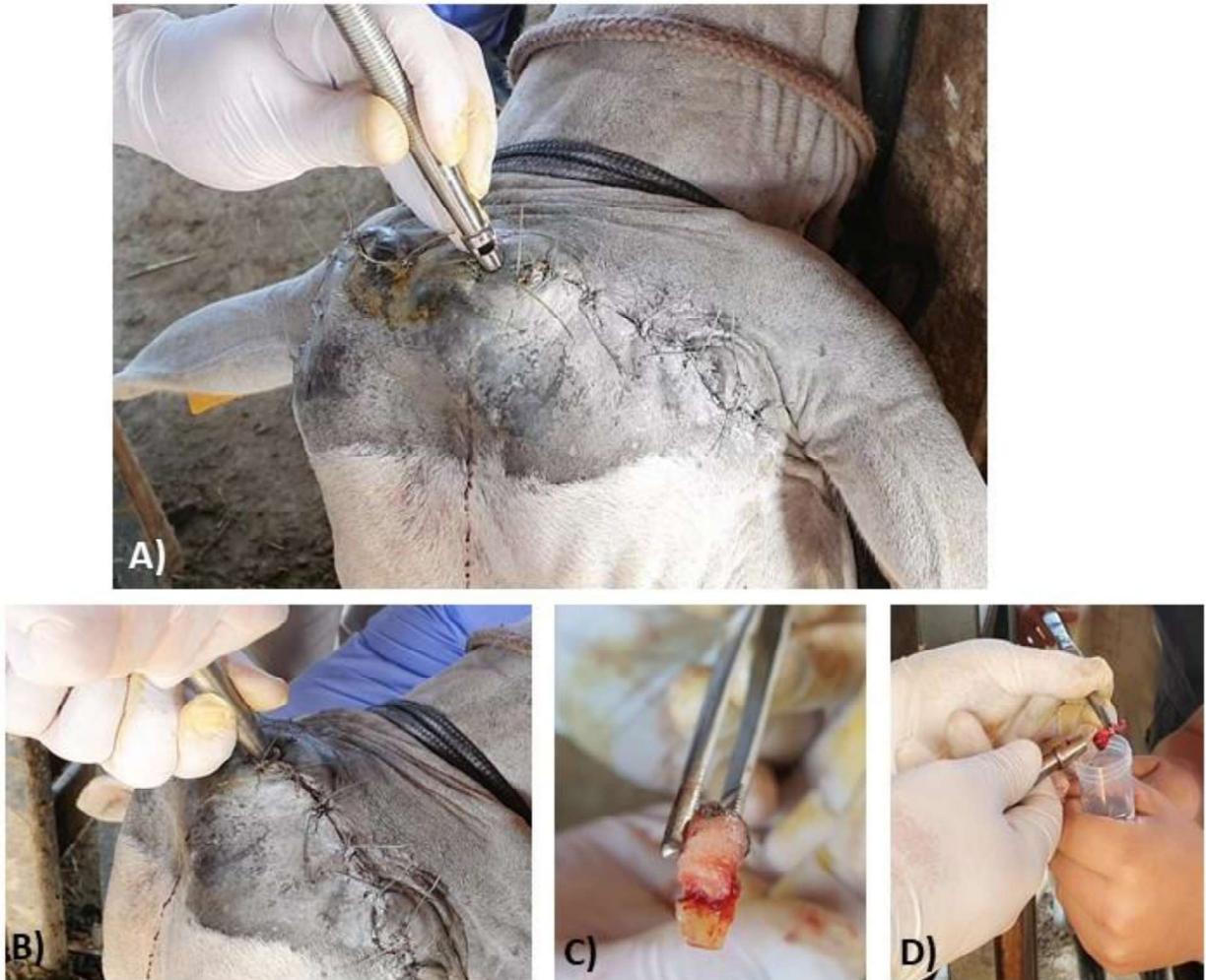
avaliadores precisaram levar em consideração o processo de inflamação local e a condição do processo de cicatrização das bordas das feridas. Para conhecimento e alinhamento, as fotos com as padronizações dos escores (Figura 5) foram enviadas aos avaliadores previamente à avaliação.

A avaliação clínica dos animais foi realizada concomitantemente ao registro das imagens; a cada 48 horas as feridas eram avaliadas quanto à presença de alterações que pudessem indicar toxicidade ou rejeição aos novos tratamentos propostos, como reações inflamatórias exuberantes, processos infecciosos mucopurulentos, abscessos ou até mesmo expulsão das membranas de NCB. Além disso, procedimentos de verificação da qualidade da sutura, percussão de seios paranasais, auscultação traqueal, avaliação de Escore de Condição Corporal (ECC) e pesagem dos animais foram feitos nos mesmos intervalos.

3.5 Avaliação microscópica

Nos dias 03, 07, 14 e 21 após os procedimentos cirúrgicos dos Experimentos I e II foram realizadas biópsias por meio de *punchs* (Figura 6). Os *punchs* são cilindros com superfície cortante, introduzidos rotatoriamente para remoção dos tecidos. Neste estudo, *punchs* de 8 mm de diâmetro foram utilizados, e as biópsias foram realizadas pelo médico veterinário responsável. As amostras de tecidos obtidas através dos *punchs* foram utilizadas para as análises microscópicas das lesões. Em cada dia estabelecido, um número amostral de 03 (três) animais foi submetido à biópsia, sem repetição de biópsia no mesmo animal (uma vez que a biópsia *per se* induz lesão e novo processo de cicatrização), conforme representado na Figura 6. Com isso, evitou-se interferência na análise microscópica pelo possível processo inflamatório oriundo do *punch*. Após a biópsia, as amostras dos tecidos eram colocadas em formalina tamponada e seguiam para análise histológica.

Figura 6 – Representação das etapas de coleta das amostras de biópsias. Em A) Introdução do *punch* na borda da ferida; B) Movimentos rotatórios para remoção tecidual; C) Amostra de tecido coletado; D) Manutenção em formalina tamponada.



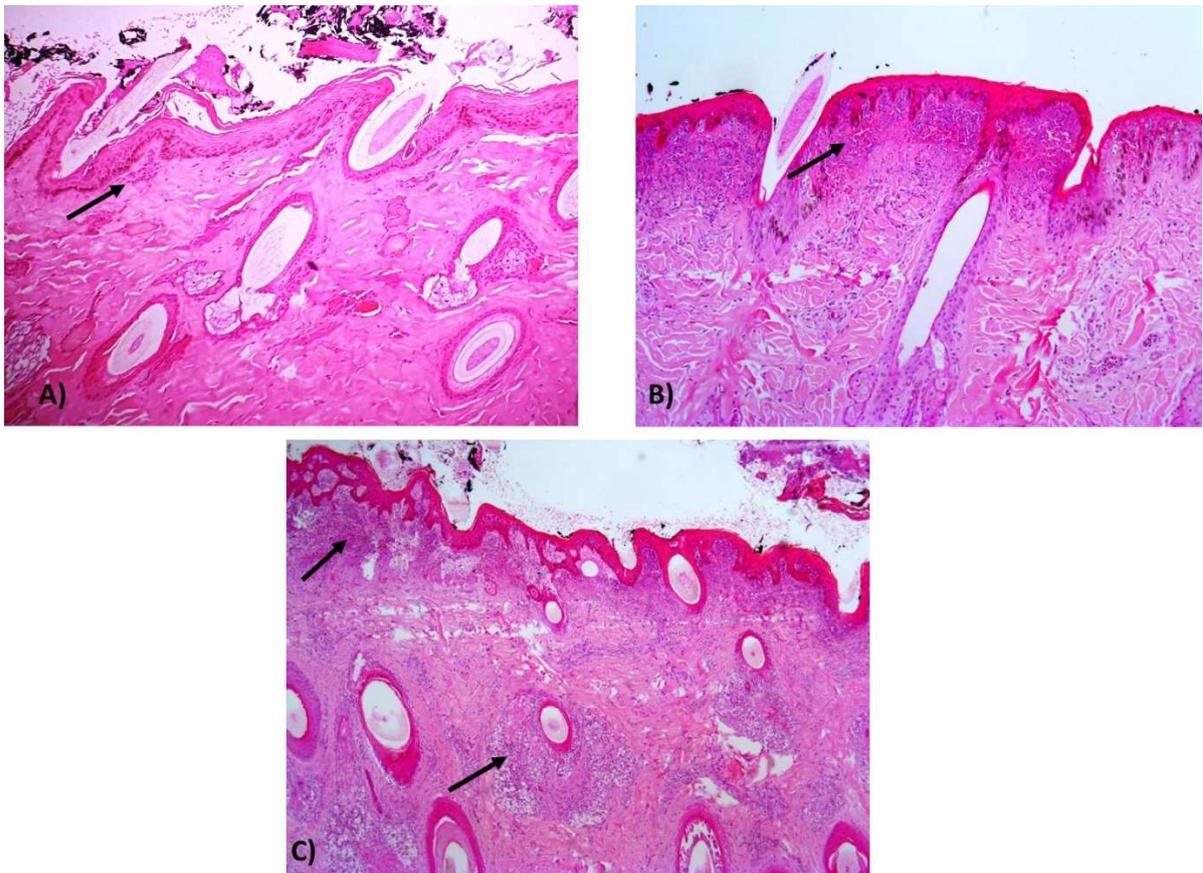
Fonte: Elaboração própria.

Para análise histológica, as amostras, logo após coletadas, foram mantidas em formalina tamponada 10% por 24 horas. Ao fim deste tempo, foram colocadas em recipiente com água *overnight* e, após essa etapa, foram deixadas em etanol 70% até o momento do processamento. Finalizando a etapa de fixação, o processamento dos tecidos foi realizado pelo equipamento automatizado - Processador Automático de Tecidos - e as peças foram emblocadas em parafina histológica.

Os cortes histológicos das amostras dos *punchs* das feridas foram realizados em micrótomo padrão com quatro micrômetros de espessura. A seguir, as lâminas foram coradas por técnica de hematoxilina e eosina, e montadas com resina histológica (TOLOSA *et al.*, 2003). As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico

por patologista (condição de cegamento simples). Uma análise semiquantitativa das lâminas foi realizada, por meio de Escores de Grau de Inflamação (GI): GI 1 (inflamação leve), GI 2 (inflamação moderada) e GI 3 (inflamação severa), representados na Figura 7.

Figura 7 – Fotomicrografias das lâminas coradas por hematoxilina e eosina em aumento de 100x representando os Escores de Grau de Inflamação (GI) 1, 2 e 3.



Nota: em A) Fotomicrografia caracterizando o Grau de Inflamação GI 1 (Leve) com até 25% de infiltrado inflamatório; em B) Fotomicrografia caracterizando o Grau de Inflamação GI 2 (Moderada) com até 50 % de infiltrado inflamatório; em C) Fotomicrografia caracterizando o Grau de Inflamação GI 3 (Severa) com até 75% de infiltrado inflamatório. As setas indicam o processo inflamatório.

3.6 Análise estatística

Uma vez que os dados estão reportados como escores, os resultados foram apresentados como porcentagem (%) de animais em cada escore. Quando são comparados os grupos ou ainda os tempos de cicatrização, teste de Wilcoxon ou teste de Qui quadrado foram utilizados, valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Stata® 11.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o Manual do Aluno do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais - Mestrado Profissional, o trabalho final resultante da pesquisa pode ser um artigo científico. Assim, as seções “Resultados” e “Discussão” encontram-se agrupadas e apresentam o manuscrito resultante deste trabalho. O artigo será submetido para uma revista indexada no estrato superior da CAPES.

Evaluation of bacterial nanocellulose membranes loaded or not with nisin as a complementary treatment in surgical wounds from dermorrhaphy in cattle

Fábio André Ferreira Custódio¹, Leonardo Maggio de Castro¹, Erick Unterkircher¹, Ana Carolina Rusca Corrêa Porto¹, Iolanda Simões Braga², Alexandre Hataka², Angela Faustino Jozala¹, Denise Grotto^{1*}

¹University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil

²Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

***Corresponding author:**

Denise Grotto

denise.grotto@prof.uniso.br

Phone: +55 1521017147

Fax: +55 15 21017000

Address: University of Sorocaba, Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5

ZIPCODE: 18023-000, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

Abstract

The livestock activity is an important maintainer of the Brazilian surplus trade balance with great influence about the conditions for animal handling. Surgical dehorning is a procedure that, despite being invasive, may be necessary to decrease the frequency of lesions in udders, eyes and flanks, in addition to promoting greater safety for handlers. Treatments of post-surgical wounds usually includes topical application of healing agents, antimicrobials and repellents. A biotechnological alternative is the use of dressings from biomaterials, including bacterial nanocellulose (BNC), which is biodegradable, non-toxic, non-allergenic and biocompatible. The association of substances with BNC, such as nisin, has been explored in the production of active biocomplexes. Therefore, the objective was to evaluate the efficiency of two new complementary treatments (BNC membranes and BNC membranes+nisin) in healing of surgical dehorning wounds in cattle. Two experiments were performed on surgical dehorning. In the first, 12 animals were used; one of the wounds was subjected to antiseptis with Polyvinylpyrrolidone – iodine complex solution (PVPI), followed by larvicidal repellent, called the control treatment, and the other wound, in addition to the control treatment, also received the application of BNC membrane. For the second experiment, n = 12, one of the wounds received the control treatment and BNC membrane while the other was subjected to the control treatment and application of BNC+nisin. In both experiments, wounds were evaluated macroscopically by photographic images, for analysis of the inflammatory and healing process, on days 2, 6, 10 and 14 after surgery, and microscopically, with biopsies performed on days 3, 7, 14 and 21 post-procedure. The macroscopic evaluations showed significant statistical differences only in the comparisons within the groups for the two experiments, while the microscopic analyzes did not reveal statistically significant differences in any type of comparison. Thus, it is concluded that when the cirurgical wounds of each group are their own controls, the membrane wounds healed more quickly. However, microscopic healing even after 21 days did not follow the results observed macroscopically

Keywords: Bacterial cellulose. Dermorrhaphy. Dressing. Healing. Nisin.

Introdução

O uso de tecnologias que integrem meio ambiente, recursos naturais e práticas de Bem-Estar Animal (BEA) é fundamental para atingir elevado nível de eficiência produtiva na pecuária. As práticas de BEA incluem o manejo dos animais, ou seja, os procedimentos a que os animais são submetidos para que se alcance a eficiência produtiva desejada. A realização de alguns procedimentos cirúrgicos pode ser realizada para promover o Bem-Estar dos animais, para ganho produtivo e ainda para garantir segurança dos manejadores (OIE, 2019), uma vez que contribuem com a diminuição da intensidade de interações agressivas entre os animais (DEVRIES; VON KEYSERLINGK; BEAUCHEMIN, 2005; HUZZEY; VON KEYSERLINGK; WEARY, 2005).

A descorna cirúrgica em animais adultos é um procedimento cuja necessidade de realização se aplica em casos de agressividade entre animais, fraturas ou conformação anormal dos cornos, apesar de ser invasiva (STAFFORD; MELLOR, 2005). A descorna contribui também na diminuição da frequência de lesões em úberes, olhos e região dos flancos (WEAVER; ST. JEAN; STEINER, 2005), além de promover maior segurança aos manejadores (OIE, 2019; SYLVESTER *et al.*, 1998). O procedimento cirúrgico tem como conceito a amputação do corno em sua base após incisão cutânea, seguida de dermorrafia (CUNHA *et al.*, 2002). Alguns problemas podem acontecer tanto durante o procedimento quanto no pós-operatório, dentre eles a deiscência dos pontos cirúrgicos pela tensão da linha de sutura, a ocorrência de deformações ósseas, além de fatores consequentes da inflamação, como febre, anorexia, letargia e infecções (SILVA *et al.*, 2009).

A aplicação tópica de fármacos cicatrizantes, antimicrobianos e repelentes como o óxido de zinco (CANGUL *et al.*, 2006), produtos à base de alumínio (RAHMATI; MOZAFARI, 2019), curativos à base de alginato de cálcio e sódio, soluções iodadas, produtos com sulfadiazina de prata, além de soluções detergentes à base de permanganato de potássio (BRAWN, 2015) são os tratamentos mais frequentes nesse tipo de lesão.

Uma alternativa biotecnológica relativamente recente é o emprego de biomateriais com diferentes propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas, incluindo regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (CZAJA

et al., 2007). Esses materiais, geralmente compostos por biopolímeros, podem ser utilizados como alternativa para curativos de feridas e queimaduras; possuem alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de semelhança com a matriz extracelular (BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005). Segundo Rambo *et al.* (2008), a nanocelulose bacteriana (NCB) é um biopolímero de estrutura nanofibrilar com semelhança à matriz extracelular. Ataíde *et al.* (2017) afirmam que a NCB possui as propriedades desejáveis para cicatrização de feridas, como alta pureza e capacidade de retenção de água, além de ser moldável. Klemm *et al.* (2011) e Trovatti *et al.* (2011) completam incluindo a alta resistência mecânica e porosidade tridimensional.

Por outro lado, a membrana de NCB, sozinha, não possui atividade anti-inflamatória ou antimicrobiana (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008). Porém, alguns trabalhos têm sido muito bem sucedidos quando há incorporação de substâncias ou moléculas bioativas à NCB (LIYASKINA *et al.*, 2017; JEBEL; ALMASI, 2016). Membranas de NCB associadas à quitosana apresentaram significativa inibição da *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus*, assim como um estímulo à epitelização e regeneração de feridas cirúrgicas em ratos (LIN *et al.*, 2013). Mais ainda, o uso de bacteriocinas tem sido uma alternativa para combater agentes etiológicos resistentes aos antimicrobianos mais utilizados (ALLEN *et al.*, 2014; ROLAIN *et al.*, 2016). Dentre as bacteriocinas destaca-se a nisina (MAIA *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram potencial terapêutico de suas aplicações (ALLEN *et al.*, 2014; BEHRENS *et al.*, 2017) em lesões em humanos (VAN HEEL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011) e na área de Medicina Veterinária (CINTAS *et al.*, 2001; FIELD *et al.*, 2016; PIPER *et al.*, 2009).

Diante disso, este estudo objetivou avaliar, de forma inédita, a eficiência da utilização de dois novos tratamentos - as membranas de NCB e as membranas de NCB com nisina incorporada - como coadjuvantes na cicatrização de feridas de descorna cirúrgica em bovinos, bem como a segurança dos materiais, tendo em vista a biocompatibilidade da membrana.

Material e Métodos

Obtenção das membranas de NCB e incorporação da nisina

As membranas de NCB foram produzidas pelo cultivo da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582, em meio Hestrin & Schramm (20 g/L glicose, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Fosfato de sódio anidro; 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado). O cultivo foi realizado em frasco tipo Erlenmeyer de capacidade volumétrica de 250 ml. O volume inoculado foi de 10 ml de meio contendo aproximadamente 10^7 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de *Gluconacetobacter xylinus*. Os frascos foram mantidos por 7 dias em cultura estática, a 30 °C. Membranas com aproximadamente 2 mm de espessura foram obtidas.

Após o crescimento, as membranas foram imersas em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, sob agitação a 60 °C por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em água destilada. As membranas foram então autoclavadas a 121 °C por 15 minutos em água destilada e solução de tampão fosfato (PBS) a 1% e armazenadas a 4 °C, seguindo o protocolo proposto por Jozala *et al.* (2015).

A Nisina de *Lactococcus lactis* a 2,5% de pureza foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com 10^6 AU de atividade (AU refere-se a unidades de atividade arbitrárias definidas por halo de inibição). A solução padrão de nisina 25 µg/ml foi preparada em 1L de PBS estéril, pH 7. Para a incorporação do antimicrobiano, cada membrana previamente esterilizada foi imersa em 10 ml da solução de 25 µg/ml de nisina em ambiente asséptico. Os frascos foram mantidos em agitação de 100 rpm a 25 °C por 4 horas. Após esse período as membranas foram removidas e mantidas a 4 °C, em protocolo adaptado de Dos Santos *et al.* (2018).

Delineamento do estudo e caracterização dos animais

Este é um estudo experimental com animais da espécie bovina em que o procedimento de descorna cirúrgica foi idealizado como modelo para avaliação e comparação do comportamento macroscópico e microscópico de feridas cirúrgicas em relação à fase inflamatória do processo cicatricial. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba – CEUA/UNISO, Sorocaba, SP, e aprovado sob os protocolos 162/2019 e 149/2019.

Para a realização desse estudo foram utilizadas 24 vacas aneloradas ou mestiças, provenientes da propriedade Estância Hortência, localizada na cidade de Salto de Pirapora, SP. Esses animais possuíam entre dois e dez anos de idade, e residiam há no mínimo 12 meses na propriedade, portanto, estavam devidamente adaptados ao sistema de produção e manejo realizado.

Os animais foram mantidos desde 60 dias pré cirurgia até 60 dias pós cirurgia em Sistema Intensivo a Pasto. As vacas, nesse tipo de sistema, são periodicamente trocadas de piquete de acordo com o consumo da forragem existente, em sistema de rotação; esse manejo garante aos animais excelentes condições alimentares e de Bem-Estar Animal, pois prioriza o uso de tecnologias para manejo eficiente e produtivo. Além disso, durante todo o tempo de permanência nos piquetes, os animais recebem água *ad libitum* e suplementação mineral.

Os animais foram selecionados pela avaliação de Escore de Condição Corporal (ECC), realização de diagnóstico de gestação negativo e pela avaliação prévia do cirurgião responsável pelo procedimento de descorna a partir do diâmetro do corno em relação à base cornual, para que houvesse a garantia de realização da dermorrafia com baixa tensão da linha de sutura.

O estudo foi dividido em dois experimentos: I e II. Para o experimento I, foram utilizados 12 animais; as dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado esquerdo receberam tratamento controle, composto neste estudo por limpeza com gaze e antissepsia com solução de polivinilpirrolidona iodada (PVPI) tópica seguida de repelente larvicida a cada 48 horas. As dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado direito receberam a aplicação da Membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal sucedida de tratamento controle.

Para o experimento II, foram utilizados outros 12 animais; as dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado esquerdo receberam a Membrana de NCB na base do processo cornual do osso frontal; as dermorrafias relacionadas às feridas cirúrgicas de 12 cornos do lado direito receberam a aplicação da Membrana de NCB impregnadas com nisina. Em ambos os cornos houve também aplicação do tratamento controle.

Procedimento cirúrgico e pós operatório

A preparação da cirurgia foi conduzida de forma individual, assim como os procedimentos de descorna e dermorrafia, que foram realizados por apenas um profissional, experiente e devidamente capacitado na técnica proposta. Cada animal foi previamente contido em tronco de contenção e submetido à sedação com Cloridrato de Xilazina 2% na dose de até 0,2 mg/kg via intramuscular (IM). Para a cirurgia, a contenção ocorreu pelo derrubamento do animal com cordas utilizando a técnica Almeida Barros e a manutenção sob decúbito esternal com a cabeça fletida à esquerda para realização do procedimento. Para obtenção de analgesia local infiltrativa foi administrado Cloridrato de Lidocaína 2% sem vasoconstritor para bloqueio sensitivo do ramo zigomático temporal do nervo cornual, além de aplicação subcutânea de 30 ml do mesmo anestésico local na região caudal da base de cada corno.

O procedimento cirúrgico realizado teve como base a técnica proposta por Cunha *et al.* (2002). Essa técnica consiste na formação de duas meia-elipses na região da base do corno e posterior liberação através da divulsão por toda a base do corno entre pele e subcutâneo. A base do corno é então serrada e o corno e as meia-elipses são retirados, facilitando a dermorrafia pela diminuição da tensão da sutura de pele. Para a dermorrafia utilizou-se fio de náilon número 0,60 com padrão de sutura "Sultan" (sutura em X).

O protocolo de tratamento pós-operatório imediato foi realizado com aplicação única de soro antitetânico, administração de anti-inflamatório não esteroidal Flunixin Meglumine 2,2 mg/kg via intramuscular (IM), assim como antibioticoterapia com Penicilina Benzatina na dose de 40.000 UI/animal. Para a sequência do tratamento pós-operatório, em todos os animais foi administrado anti-inflamatório não esteroidal Diclofenaco Sódico na dose de 5 mg/kg, uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos, além de Penicilina Benzatina na dose de 40.000 UI/animal, com intervalo de aplicação de 48 horas, totalizando mais duas aplicações. Esses protocolos terapêuticos são fundamentais para o Bem-Estar Animal.

A dinâmica do tratamento controle, em todas as feridas, ocorreu com limpeza com gaze e antissepsia com solução de PVPI tópica seguida de repelente larvicida a cada 48 horas ou mediante avaliação do cirurgião responsável, com o animal contido

em tronco de contenção. Os pontos da cirurgia foram retirados somente após 15 dias após a realização das biópsias.

Avaliação macroscópica

Para análise macroscópica das feridas cirúrgicas foi estabelecido um protocolo de registro de imagens das lesões a cada 48 horas a partir do procedimento cirúrgico até a realização das biópsias com os animais devidamente contidos em tronco de contenção. Após contenção procedia-se a antissepsia e higienização das feridas cirúrgicas com solução de PVPI tópica e água destilada e em seguida as feridas eram secas com gaze.

Para unificação da obtenção das imagens, um cartão retangular (30x15 cm) em papel milimetrado com recorte central (15x7cm) foi desenvolvido para posicionamento da ferida. O cartão era posicionado de modo que a ferida permanecesse na área do recorte. As imagens eram então capturadas utilizando-se câmera fotográfica de smartphone (Samsung Galaxy Note10 Plus) a uma distância aproximada de 15 cm das feridas, paralelamente ao cartão.

A partir desse protocolo estabeleceu-se uma dinâmica de comparação macroscópica entre as feridas nos dias 2, 6, 10 e 14 após o procedimento cirúrgico, havendo exclusão, nessa avaliação, dos animais que foram submetidos às biópsias nos dias 3 e 7 após as cirurgias.

As 48 imagens foram compiladas e organizadas em um arquivo de PowerPoint para a avaliação comparativa das feridas cirúrgicas. Com base nas fotos obtidas os pesquisadores do grupo elaboraram um Escore de Classificação das condições das feridas cirúrgicas, com notas variando entre 1 e 4, sendo 1) Moderada inflamação; ausência de epitelização; 2) Leve inflamação; início de epitelização; 3) Ausência de inflamação; epitelização presente e 4) Crescimento de pelos; evidência de epitelização.

As 48 imagens foram arranjadas de forma aleatória quanto aos dias e ao tipo de tratamento. Essas imagens foram enviadas via arquivo de PowerPoint para seis avaliadores cegos, sendo três médicos veterinários (docentes da UNISO sem envolvimento com o projeto) e três estudantes de Medicina Veterinária (discentes da UNISO matriculados no 9º semestre do curso, sem envolvimento com o projeto). Os avaliadores precisaram levar em consideração o processo de inflamação local e a

condição do processo de cicatrização das bordas das feridas. Para conhecimento e alinhamento as fotos com as padronizações dos escores foram enviadas aos avaliadores, previamente à avaliação.

A avaliação clínica dos animais foi realizada concomitantemente ao registro das imagens; a cada 48 horas as feridas eram avaliadas quanto à presença de alterações que pudessem indicar toxicidade ou rejeição aos novos tratamentos propostos, como reações inflamatórias exuberantes, processos infecciosos mucopurulentos, abscessos ou até mesmo expulsão das membranas de NCB. Além disso, procedimentos de verificação da qualidade da sutura, percussão de seios paranasais, auscultação traqueal, avaliação de Escore de Condição Corporal (ECC) e pesagem dos animais foram feitos nos mesmos intervalos.

Avaliação microscópica

Nos dias 03, 07, 14 e 21 após os procedimentos cirúrgicos de ambos os Experimentos (I e II) foram realizadas biópsias por meio de *punchs*. Os *punchs* são cilindros com superfície cortante, introduzidos rotatoriamente para remoção dos tecidos. Neste estudo, *punchs* de 8 mm de diâmetro foram utilizados e as biópsias foram realizadas pelo médico veterinário responsável. As amostras de tecidos obtidas através dos *punchs* foram utilizadas para as análises microscópicas das lesões. Em cada dia estabelecido, um número amostral de 03 (três) animais de cada experimento foi submetido à biópsia, sem repetição de biópsia no mesmo animal (uma vez que a biópsia *per se* induz lesão e novo processo de cicatrização). Com isso, evitou-se interferência na análise microscópica pelo possível processo inflamatório oriundo do *punch*. Após a biópsia as amostras dos tecidos eram colocadas em formalina tamponada e seguiam para análise histológica.

Para análise histológica as amostras foram mantidas em formalina tamponada 10% por 24h. Ao fim deste tempo foram colocadas em recipiente com água *overnight* e, após essa etapa, as amostras foram deixadas em etanol 70% até o momento do processamento. Finalizando a etapa de fixação o processamento dos tecidos foi realizado pelo equipamento automatizado Processador Automático de Tecidos e as peças foram emblocadas em parafina histológica.

Os cortes histológicos dos *punchs* das feridas foram realizados em micrótomo padrão com quatro micrômetros de espessura. A seguir, as lâminas foram coradas

por técnica de hematoxilina e eosina e montadas com resina histológica (TOLOSA et al., 2003). As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico por patologista (condição de cegamento simples). Uma análise semiquantitativa das lâminas foi realizada por meio de escores de Graus de Inflamação (GI): GI 1 (inflamação leve), GI 2 (inflamação moderada) e GI 3 (inflamação severa).

Análise estatística

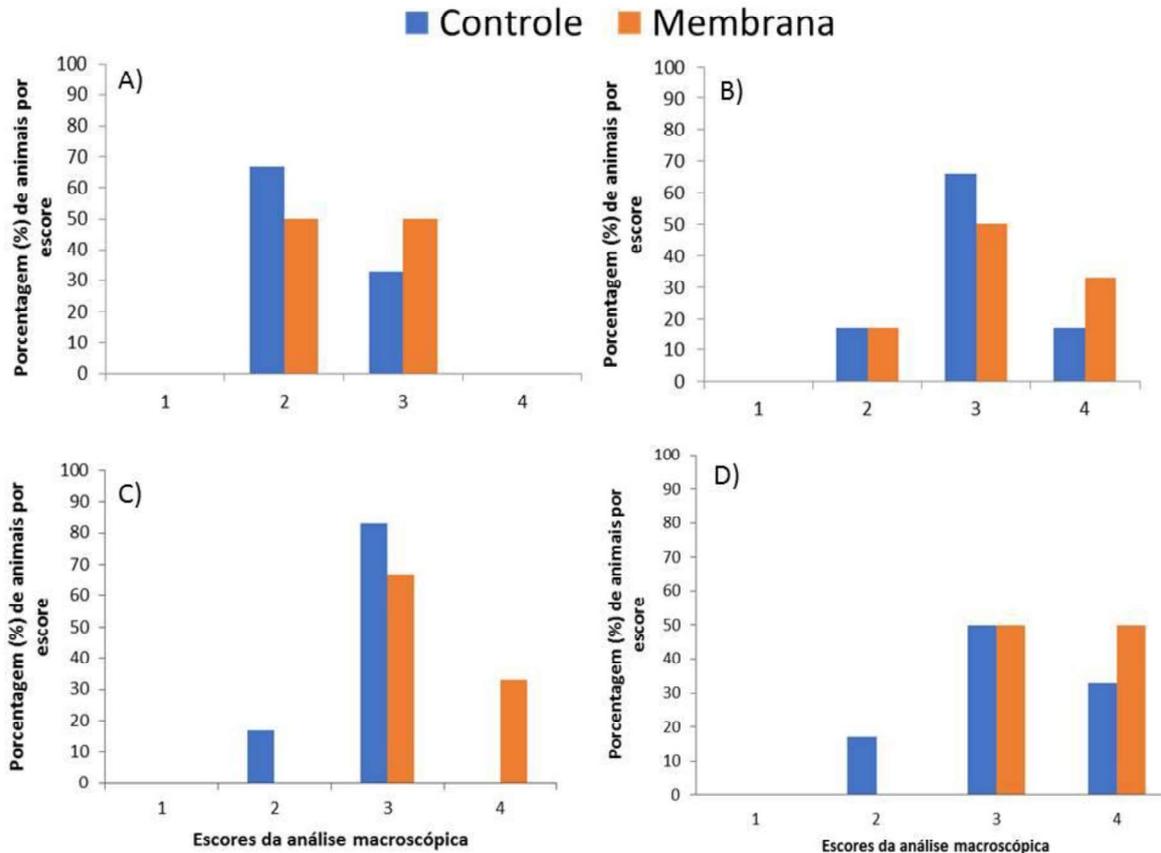
Uma vez que os dados estão reportados como escores, os resultados foram apresentados como porcentagem (%) de animais em cada escore. Quando são comparados os grupos ou ainda os tempos de cicatrização, teste de Wilcoxon ou teste de Qui quadrado foram utilizados, valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Stata® 11.

Resultados

Para o acompanhamento macroscópico das feridas, quatro momentos distintos pós-cirúrgicos foram avaliados em ambos os experimentos. A evolução da cicatrização dos animais pertencentes ao Experimento I está reportada na Figura 1.

Fazendo uma análise descritiva, pode-se observar que no dia 02 (Figura 1A) uma maior porcentagem de animais do grupo Controle – 67% – estava representada pelo escore 2, enquanto 50% dos animais que receberam a membrana de NCB acrescida do tratamento controle estavam já no escore 3. No dia 06 (Figura 1B), 33% dos animais do grupo Membrana de NCB estavam com escore de cicatrização 4, comparado a 17% do grupo Controle. No dia 10 (Figura 1C) houve uma regressão no processo de cicatrização no grupo Controle, com 83% dos animais dentro do escore 3, comparado a 33% dos animais com membrana de NCB em escore 4. Por último, no dia 14 (Figura 1D), 33% dos animais do grupo Controle apresentaram crescimento de pelos e evidência de epitelização (escore 4) comparado a 50% dos animais do grupo Membrana de NCB.

Figura 1. Avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento I, por escore, nos tempos 02 dias (A), 06 dias (B), 10 dias (C) e 14 dias (D) pós-cirurgia.



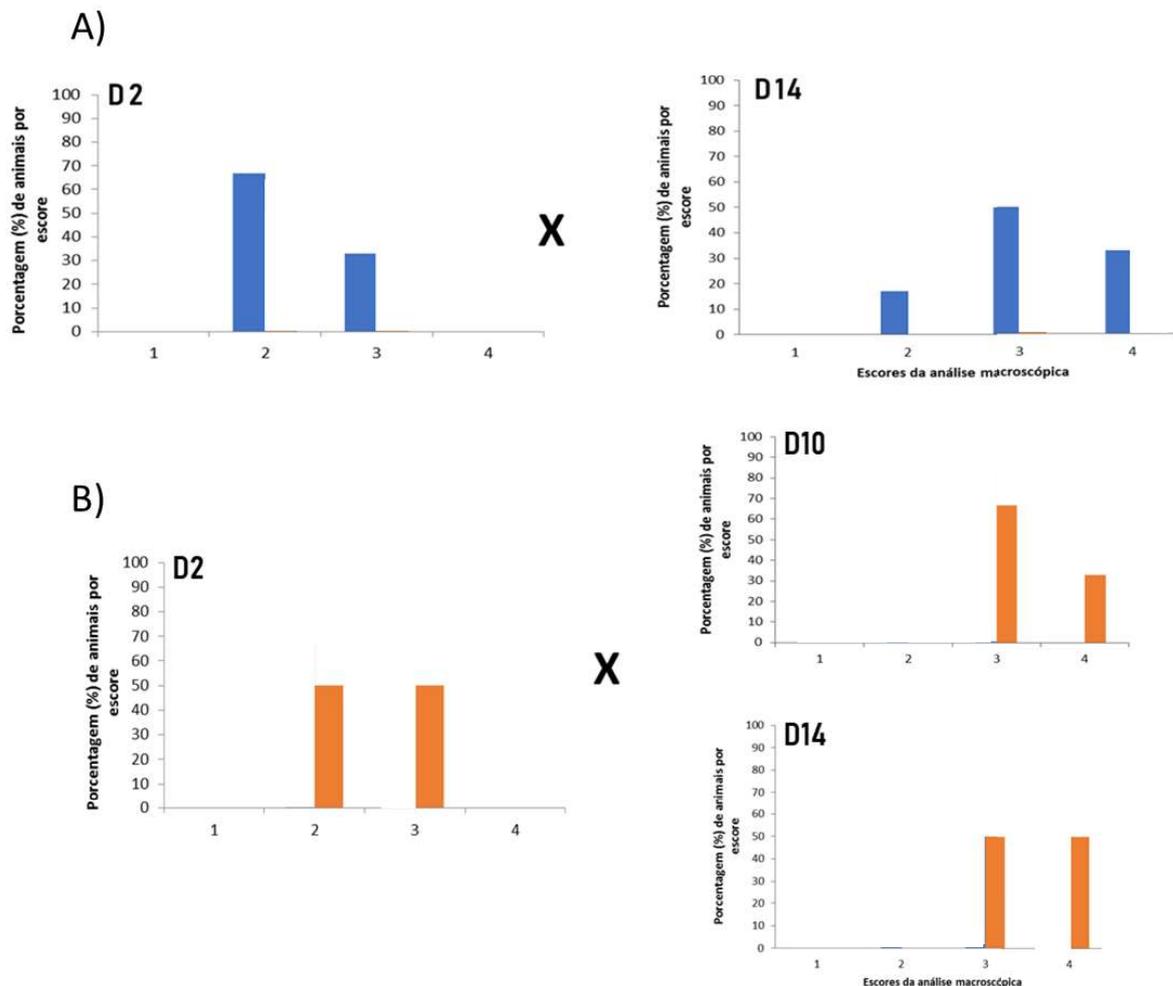
Escore 1- Moderada inflamação, ausência de epiteliação; 2- Leve inflamação, início de epiteliação; 3- Ausência de inflamação, epiteliação presente; 4- Crescimento de pelos, evidência de epiteliação.

Com relação à análise estatística, primeiramente avaliou-se a influência no tempo no processo cicatricial, sem comparar tratamentos. Para isso, as feridas cirúrgicas do grupo Controle foram avaliadas ao longo dos tempos 6, 10 e 14 dias em relação ao dia 02 (os mesmos cornos ao longo do tempo). Não houve diferença significativa para o processo cicatricial entre os dias 2 e 6. Comparando os dias 2 e 10, também não foi observada diferença significativa na cicatrização, a despeito de $p=0.0833$. Porém, comparando os dados entre os dias 2 e 14, ficou evidenciada diferença estatística significativa ($p=0.0495$) entre as cicatrizações final e inicial.

Por outro lado, avaliando somente as feridas do Grupo Membrana ao longo dos dias, entre os dias 2 e 6 não houve diferença significativa para o processo cicatricial. Porém, na comparação entre os dias 2 e 10, já se observou diferença significativa

($p=0.0495$) entre as cicatrizações, evidenciando a aceleração do processo cicatricial com a membrana, enquanto no Grupo Controle essa cicatrização só ocorreu no dia 14. A análise entre os dias 2 e 14 também mostrou diferença significativa ($p=0.0495$) entre as cicatrizações final e inicial. A Figura 2 ilustra as diferenças entre os dias 2 e 14 para o grupo Controle e entre os dias 2 e 10 e 2 e 14 para o grupo Membrana.

Figura 2. Influência do tempo para o processo cicatricial intragrupos. Avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento I. Em A) Comparação dos dados entre os dias 2 e 14 para o grupo Controle, com diferença estatística significativa; em B) Comparação dos dados entre os dias 2 e 10 e 2 e 14 para o grupo Membrana, com diferença significativa.

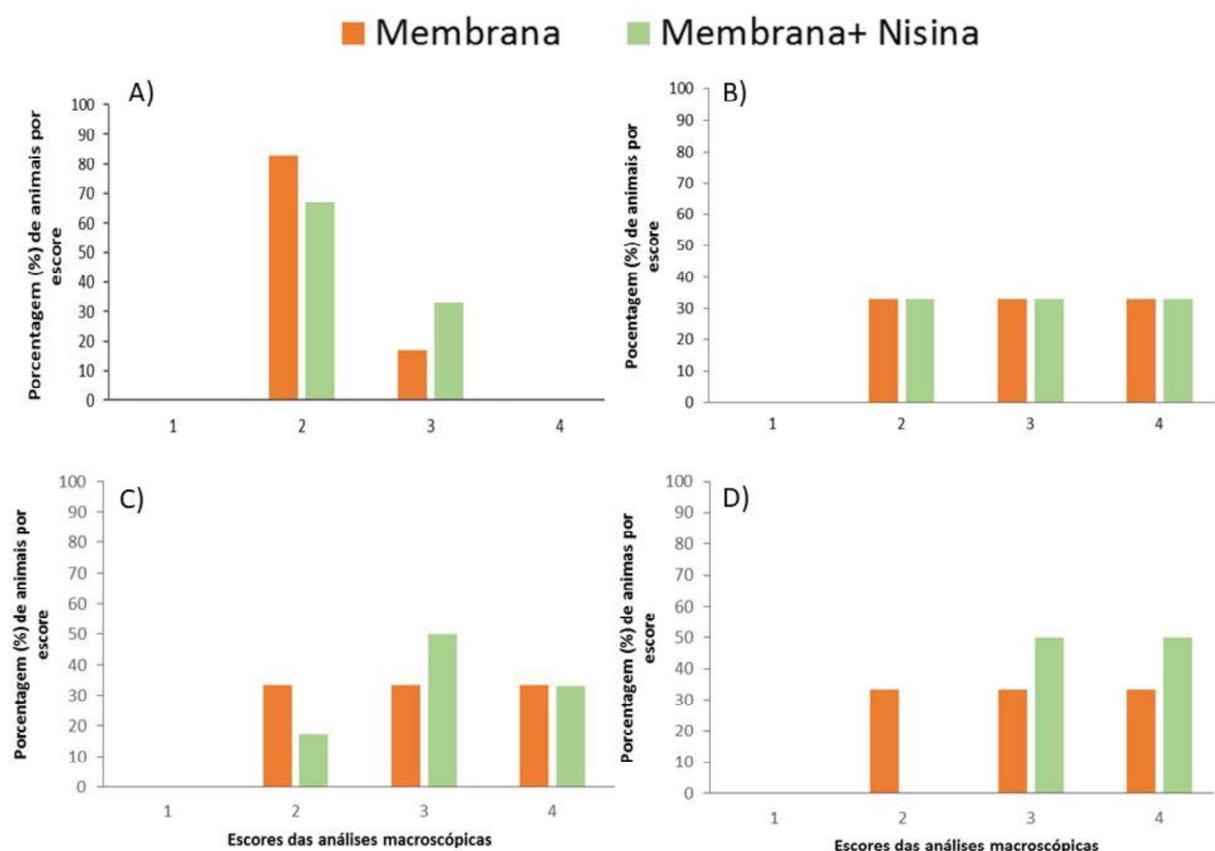


Finalmente, a avaliação comparativa entre as feridas dos Grupos Controle e Membrana também foi realizada. No dia 2 não houve diferença significativa entre os grupos, assim como na avaliação realizada no dia 6. As análises dos dias 10 e 14 também não evidenciaram diferença estatística em relação à cicatrização, ou seja, na

avaliação pareada o uso ou não da membrana não representou melhora no processo cicatricial. Mas quando as feridas de cada grupo são controle delas mesmas, as feridas cirúrgicas com membrana cicatrizaram mais rapidamente.

Com relação ao Experimento II (Membrana e Membrana+nisina), a evolução da cicatrização dos animais está reportada na Figura 3.

Figura 3. Avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento II, por escore, nos tempos 02 dias (A), 06 dias (B), 10 dias (C) e 14 dias (D) pós-cirurgia.



Escore 1- Moderada inflamação, ausência de epiteliação; 2- Leve inflamação, início de epiteliação; 3- Ausência de inflamação, epiteliação presente; 4- Crescimento de pelos, evidência de epiteliação.

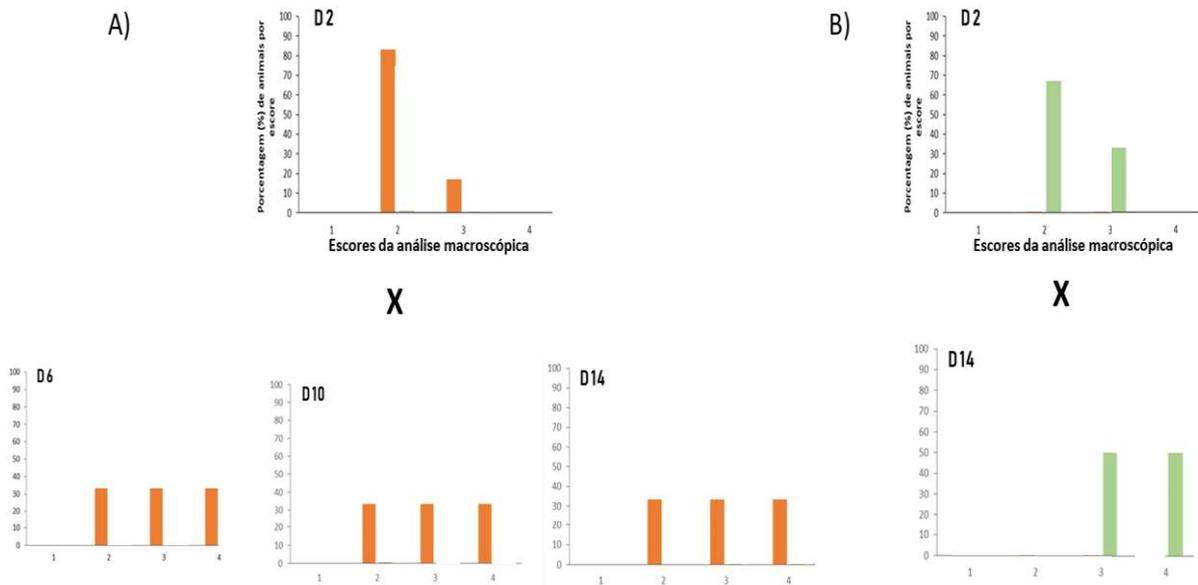
Pode-se observar que no dia 02 (Figura 3A) 33% dos animais do grupo Membrana de NCB+nisina estavam com escore 3 de cicatrização comparado a 17% dos animais do grupo membrana de NCB. No dia 06 (Figura 3B) os dois grupos apresentaram as mesmas porcentagens de animais/escore. No dia 10 (Figura 3C), a

mesma porcentagem de animais estava com escore 4 de cicatrização, e no dia 14 (Figura 3D), 50% dos animais do grupo Membrana de NCB+nisina estavam com escore 4, comparado a 33% do grupo Membrana de NCB.

As mesmas análises estatísticas de tempo e de comparação entre grupos também foram realizadas para o Experimento II. A influência do tempo no processo cicatricial foi avaliada com as feridas do mesmo grupo ao longo do tempo 6, 10 e 14 dias em relação ao dia 02. No Grupo Membrana, uma diferença significativa foi observada desde o dia 06 comparado ao dia 02 ($p=0.0495$). A diferença estatística manteve-se entre os dias 2 e 10 ($p=0.0495$) e dias 2 e 14 ($p=0.0495$), ou seja, houve melhora no processo cicatricial já no 6º dia de avaliação.

Com relação ao grupo Membrana de NCB+nisina, não houve diferença estatística para o processo cicatricial entre os dias 2 e 6. Entre os dias 2 e 10 também não foi observada diferença significativa entre as cicatrizações. Já entre os dias 2 e 14, uma melhora significativa ($p=0.0495$) foi observada. Tal achado sugere que a nisina incorporada na NCB não foi capaz de melhorar o tempo de cicatrização, já que a membrana de NCB sozinha apresentou resultados de cicatrização mais rápida. A Figura 4 mostra os dados das diferenças estatísticas a partir do dia 2 no grupo Membrana e entre os dias 2 e 14 no grupo Membrana+nisina.

Figura 4. Influência do tempo para o processo cicatricial intragrupos. Avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento II. Em A) Comparação dos dados desde o dia 6 para o grupo Membrana, com diferença estatística significativa; em B) Comparação dos dados entre os dias 2 e 14 para o grupo Membrana+nisina, com diferença significativa.

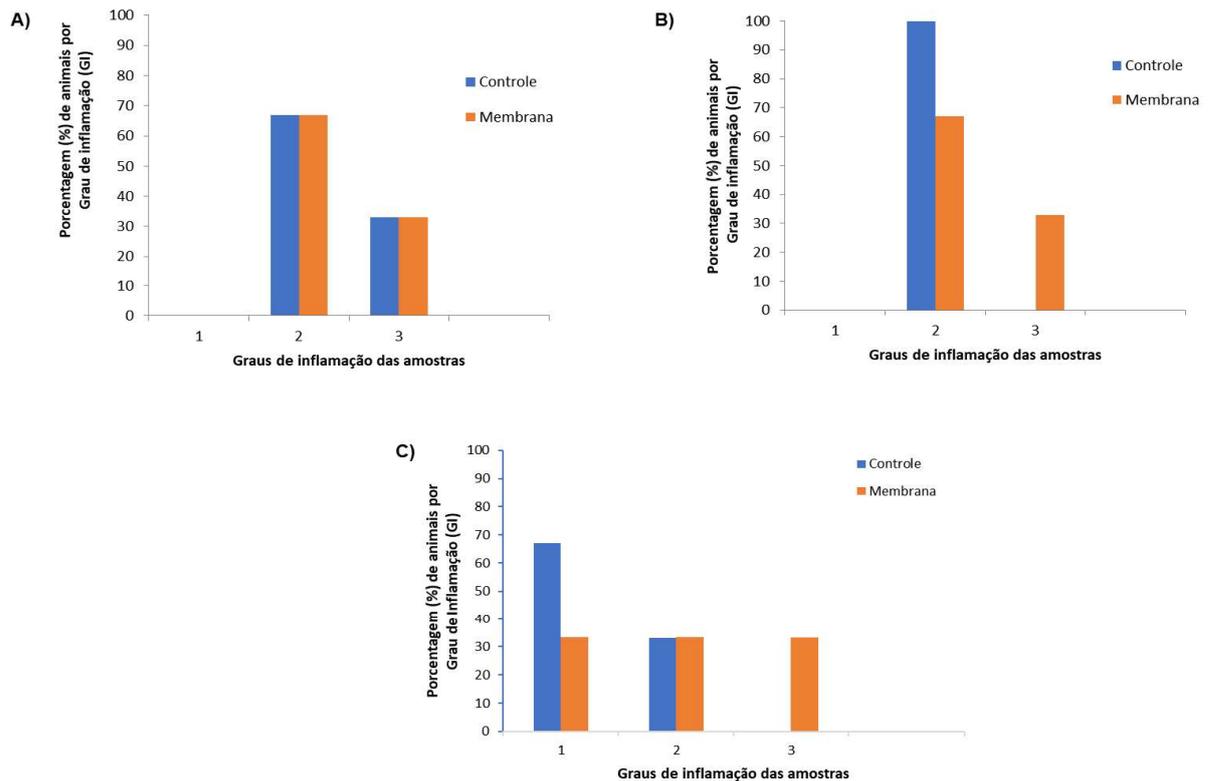


Com relação à avaliação pareada entre as feridas cirúrgicas dos Grupos Membrana de NCB e Membrana de NCB+nisina, no dia 2 não houve diferença significativa entre os grupos, assim como na avaliação realizada nos dias 6, 10 e 14 (todos $p > 0.05$). Esses resultados indicam que, independentemente do tempo ambos os tratamentos tiveram evolução pareada semelhante.

Para a avaliação microscópica das feridas cirúrgicas, três momentos distintos foram analisados em ambos os experimentos e avaliados em Graus de Inflamação (GI) (não foi possível processar as amostras do terceiro dia). A evolução da cicatrização dos animais pertencentes ao Experimento I está reportada na Figura 5. Fazendo uma análise descritiva, pode-se observar que no dia 07 (Figura 5A) 67% dos animais do grupo Controle estavam representados por GI moderada, mesma porcentagem dos animais que receberam a aplicação de membrana de NCB. No dia 14 (Figura 5B), 100% dos animais do grupo controle estavam com GI moderada, comparado a 67% do grupo NCB nesse dia. No dia 21 (Figura 5C), houve uma evolução no processo de cicatrização no grupo controle, com 67% dos animais em GI leve, comparado a 33% dos animais com NCB no mesmo grau de inflamação.

Independente do grupo, pode-se observar que, em até 21 dias, a inflamação, apesar de leve em alguns casos, se mostrava ainda muito presente.

Figura 5. Avaliação microscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento I, por Grau de inflamação (GI), nos tempos 07 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) pós cirurgia.

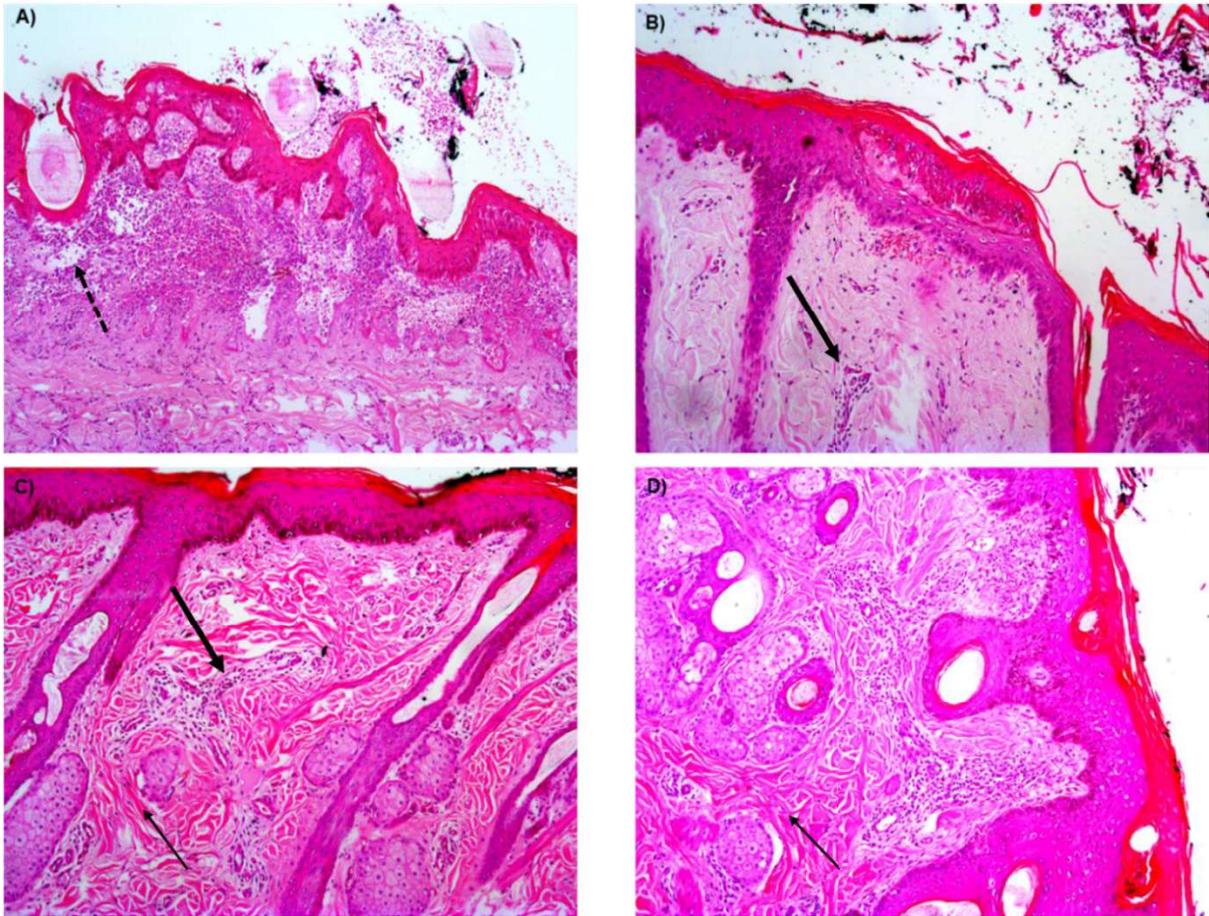


Grau 1) Inflamação leve; 2) Inflamação moderada; 3) Inflamação severa.

A influência do tempo no processo cicatricial na histologia foi avaliada com as feridas do mesmo grupo ao longo do tempo em relação ao dia 07. Para o grupo Controle, não houve qualquer melhora significativa no 14^o ou no 21^o dia quando comparados ao dia 07 ($p=0.3173$ e 0.1655 , respectivamente). No grupo Membrana, da mesma forma, também não houve diferença significativa na análise histológica nos dias 14 e 21 ($p=1.0$ e 0.7815 , respectivamente) quando comparados ao dia 07.

Nas análises pareadas entre grupos, nenhuma diferença estatística foi encontrada em nenhum dos tempos avaliados. Observou-se que esses tempos de coleta não foram suficientes para uma melhora no processo inflamatório inicial, e conseqüentemente para se avaliar a cicatrização. A Figura 6 representa a análise microscópica realizada em ambos os experimentos a partir das biópsias realizadas.

Figura 6. Fotomicrografias das lâminas nos diferentes tempos de biópsias de pele coradas por hematoxilina e eosina em aumento de 100x.



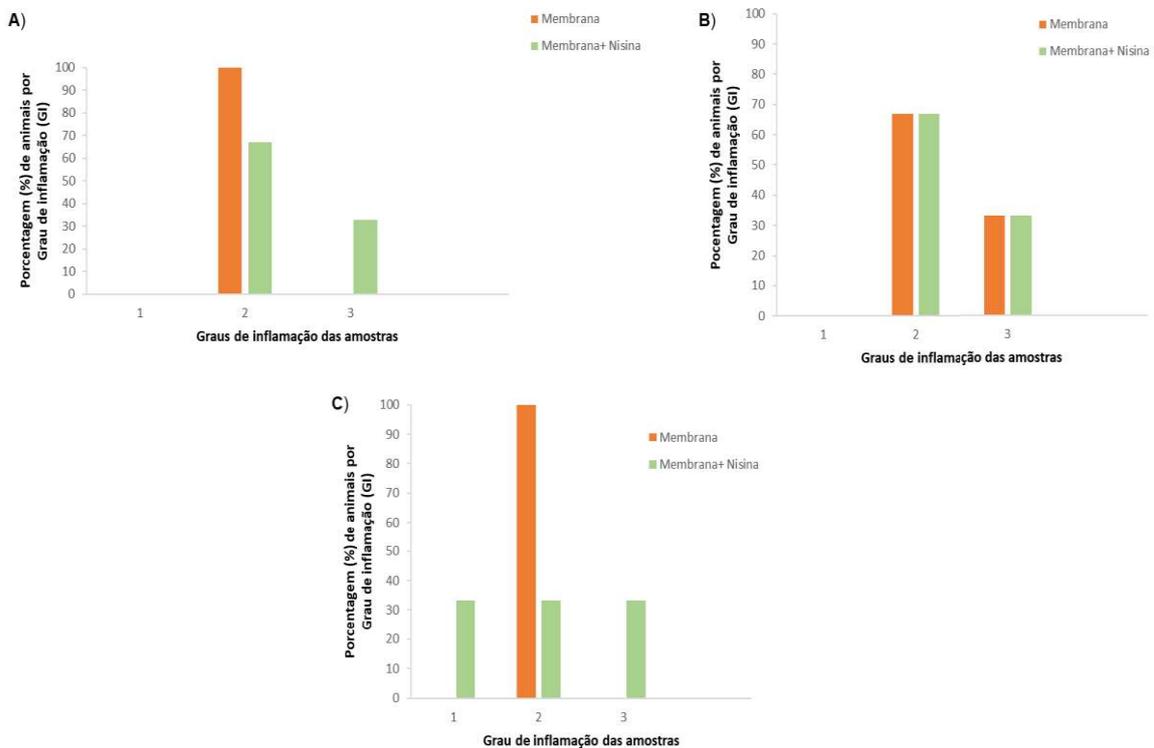
Nota: em A) animal do grupo Controle em tempo 7 dias, com inflamação ativa, caracterizada por marcante infiltrado inflamatório; em B) animal do grupo Membrana, 7 dias, com inflamação crônica; percebe-se início de reorganização tecidual e diminuição de células inflamatórias; em C, animal do grupo Membrana, 14 dias, com inflamação crônico-ativa, áreas de fibrose e edema; em D, animal de grupo Membrana+nisina, 21 dias, com inflamação crônico-ativa, com maior reorganização tecidual, áreas de fibrose e acumulado celular de reestruturação. A seta pontilhada indica área de edema; a seta grossa indica área de infiltrado inflamatório; a seta fina indica área de fibrose.

As lâminas, em sua maioria, apresentavam inflamação que variavam entre ativas e crônico-ativas, apresentando infiltrados inflamatórios discretos, moderados ou intensos de células mononucleares, polimorfonucleares ou mistos. As áreas de edemas ou congestão em derme superficial descritas nas amostras do dia 7 foram diminuindo de acordo com os dias das biópsias, como esperado. As lâminas relacionadas aos *punchs* realizados no dia 21 pós procedimento mostraram, em grande parte, áreas de calcificação e fibrose em derme profunda associadas a

infiltrados inflamatórios mononucleares. A avaliação das lâminas levou em consideração as características inflamatórias descritas acima, assim como os graus de inflamação (GI 1, GI 2 e GI 3).

A evolução da cicatrização dos animais pertencentes ao Experimento II, pela análise microscópica, está reportada na Figura 7. Descritivamente pode-se observar que no dia 07 (Figura 7A), 100% dos animais do grupo membrana de NCB estavam em GI moderada, comparado a 67% dos animais NCB+nisina. No dia 14 (Figura 7B), houve regressão do processo inflamatório no grupo NCB, com 67% dos animais em GI moderada e 33% em GI severa. No dia 21 (Figura 7C), o grupo NCB voltou a 100% dos animais em GI moderado, e 33% dos animais do grupo membrana de NCB+nisina evoluíram para GI leve.

Figura 7. Avaliação microscópica das feridas cirúrgicas dos animais do Experimento II, por Grau de Inflamação (GI), nos tempos 07 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) pós-cirurgia.



Grau 1) Inflamação leve; 2) Inflamação moderada; 3) Inflamação severa.

A influência do tempo no processo cicatricial na histologia foi avaliada com as feridas cirúrgicas do mesmo grupo, ao longo do tempo, em relação ao dia 07. Não houve qualquer diferença estatística significativa para o grau de inflamação em nenhum dos tempos avaliados (14 e 21 dias) comparado ao dia 07, tanto no grupo NCB quanto no grupo NCB+nisina. Da mesma forma, nas análises pareadas entre grupos, nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Novamente, observou-se que esses tempos de coleta não foram suficientes para avaliação do processo de cicatrização. As lâminas apresentavam características inflamatórias crônico-ativas nos dois grupos, com casos de inflamação associada à neutrofilia na maior parte das lâminas, que evidenciavam infiltrados inflamatórios discretos, moderados ou intensos de células mononucleares, polimorfonucleares ou mistos com áreas de calcificação e neovascularização e fibrose multifocal.

Discussão

A celulose bacteriana se apresenta em forma de hidrogel altamente hidratado. Sua estrutura fibrosa se apresenta como uma rede tridimensional de nanofibras. Essa morfologia nanométrica confere à celulose bacteriana ampla superfície, grande capacidade de retenção e absorção de líquidos, elasticidade e maleabilidade (FU; ZHANG; YANG, 2013; KLEMM *et al.*, 2011). Além disso, esse biopolímero é biodegradável, atóxico e não alergênico (KLEMM *et al.*, 2005), com elevado grau de biocompatibilidade (SANCHAVANAKIT *et al.*, 2006).

Devido a essas propriedades supracitadas, a nanocelulose bacteriana apresenta-se como uma matriz ideal para utilização em muitos campos relacionados a aplicações biomédicas e biotecnológicas. Em nosso estudo, a utilização da membrana de NCB acelerou o processo cicatricial macroscópico quando as feridas são comparadas no mesmo grupo ao longo do tempo. A celulose bacteriana pode criar uma barreira entre a ferida e o ambiente, graças à sua estrutura reticulada e porosa, prevenindo infecções bacterianas (SULAEVA *et al.*, 2015).

Apesar dos dados microscópicos não demonstrarem diferença entre os grupos ou mesmo ao longo dos 21 dias de análise, Fu, Zhang, Yang (2013) sugerem que a membrana tem alta capacidade de absorção de exsudato durante a fase inflamatória de cicatrização, e por isso tem grande potencial para a aplicação na cicatrização de

feridas. Lin *et al.* (2013), em estudos com ratos, obtiveram epitelização mais rápida das feridas cirúrgicas tratadas com NCB em relação ao grupo controle, e fechamento completo da lesão em torno de 15 após a aplicação.

Park *et al.* (2014) compararam o efeito da aplicação de membranas de NCB, curativos com vaselina e alginato em ratos através de excisões cirúrgicas de pele e aplicação em região dorsal; observaram diminuição da fase inflamatória da cicatrização com a utilização da membrana pelo menor infiltrado neutrofílico e maior atividade fibroblástica para contração da ferida, acelerando o processo de cicatrização. Nossos dados nos permitem sugerir que a aplicação da membrana de NCB no experimento I revelou, macroscopicamente, aceleração da cicatrização quando comparada às feridas controle, pois em 10 dias pós procedimento, no grupo Membrana, as feridas estavam visualmente cicatrizadas, e no grupo controle a cicatrização só ocorreu após a avaliação em 14 dias.

Para o experimento II não podemos estabelecer a mesma relação, tampouco na avaliação microscópica. Alguns fatores podem ser levados em consideração para que nosso estudo tenha revelado dados semelhantes na avaliação macroscópica aos apresentados pelos autores supracitados, mas sem corroborar com os resultados na microscopia. Para realização dos experimentos, a descorna cirúrgica foi utilizada como modelo experimental de ferida cirúrgica; a escolha desse procedimento ocorreu devido à necessidade de realização dos procedimentos para melhoria de manejo dos animais e diminuição das disputas traumáticas em cochos, que provocavam lesões e queda de produção nos animais da propriedade. Além disso, a realização da remoção dos cornos nos animais nos permitiu realizar uma comparação, no mesmo animal, de diferentes tratamentos (controle, membrana de NCB e membrana de NCB impregnada com nisina).

De forma inédita, buscamos realizar a aplicação dos biopolímeros em animais de produção e avaliar a eficácia dos tratamentos em situação real de manejo dos animais, enquanto os estudos realizados com NCB geralmente estão associados à utilização de cobaias. Complementando essa informação, nos estudos de Lin *et al.* (2013) e Park *et al.* (2014) os curativos foram aplicados após excisões cirúrgicas de pele e periodicamente trocados durante as avaliações, fato que não ocorreu em nosso estudo, pois a aplicação das membranas ocorreu durante os procedimentos cirúrgicos, com sua colocação na base do processo cornual do osso frontal, sendo

esse modo de avaliar a ação das membranas também inédito, sem trocas ao longo da recuperação do animal.

Wouk *et al.* (1998) avaliaram a ação de diferentes agentes terapêuticos para cicatrização em suínos, produzindo lesões experimentais de pele com realização de biópsias em dias determinados, assim como Lin *et al.* (2013) e Park *et al.* (2014) fizeram em ratos. Tais procedimentos ocorreram em ambiente controlado, sugerindo que essas divergências, principalmente no aspecto microscópico, podem estar relacionadas à característica invasiva da cirurgia de descorna, em que se estabelece um desafio muito maior para a membrana quando se compara sua aplicação com curativos tópicos ou em excisões de pele, utilizando procedimentos de manipulação da ferida cirúrgica para remoção dos cornos e divulsão da pele afim de garantir adequada tensão da linha de sutura. Esses fatores podem ter contribuído para a dificuldade de atuação do potencial de aceleração da fase inflamatória da cicatrização pela NCB, assim como possível contaminação, relativamente comum em cirurgias realizadas a campo. Outro ponto importante está relacionado ao fato de que os animais, assim que recuperados das cirurgias, retornavam aos piquetes para pastejo, para manter a característica de manejo natural dos animais.

No experimento II houve a incorporação do antimicrobiano natural nisina, produzido por bactérias como o *Lactococcus lactis* (ARAUZ *et al.*, 2009). O potencial terapêutico da nisina tem sido bastante explorado (ALLEN *et al.*, 2014; BEHRENS *et al.*, 2017) tanto em humanos (VAN HEEL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011) quanto para a Medicina Veterinária, com atividade da nisina em agentes como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) (CINTAS *et al.*, 2001; FIELD *et al.*, 2016; PIPER *et al.*, 2009).

A liberação dessa bacteriocina em membranas de nanocelulose bacteriana para verificação de aceleração do processo de cicatrização de feridas de pele em ratos foi avaliada por Heunis, Smith, Dicks (2013). Os autores observaram diferença significativa no fechamento de feridas em curativos tópicos cutâneos de polímeros impregnados com nisina quando comparados ao controle com curativos de gaze entre os dias 4 e 7 da excisão cirúrgica. Bowe *et al.* (2006) relatam a nisina e outras bacteriocinas como eficazes em tratamentos de lesões de pele causadas por *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Listeria monocytogenes*.

Segundo Mastromatteo *et al.* (2010), a atividade da nisina contra bactérias Gram negativas ocorre de forma satisfatória quando associada a agentes quelantes. A atividade antioxidante da nisina foi estudada por Dos Santos *et al.* (2018) que sugerem sua utilização associada a biopolímeros como a membrana de NCB, por agirem como plataforma de liberação gradual de nisina e controle de crescimento microbiano. No estudo, os autores realizaram imersão de membranas de NCB em concentrações entre 15 a 550 µg/ml de nisina com e sem EDTA, e observaram atividade antimicrobiana (restrita a *Staphylococcus aureus*) somente em concentrações a partir de 63 µg/ml sem EDTA. Em nosso estudo, não tivemos diferença significativa quando comparamos a utilização das membranas com e sem nisina nas feridas cirúrgicas de descorna. A concentração utilizada foi de 25 µg/ml, fato que corrobora com os resultados encontrados pelos autores citados.

Conclusão

Na forma como foi conduzido o presente estudo é possível concluir que, clinicamente, houve uma melhora na resposta cicatricial com a utilização da membrana de NCB quando comparado ao controle. Entretanto, não houve diferença significativa entre o uso da membrana de NCB quando comparada com a membrana de NCB+nisina.

Histologicamente, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. O tempo avaliado foi precoce, e a cicatrização microscópica não acompanhou o observado macroscopicamente. Mais estudos são necessários para a avaliação do uso das membranas de NCB impregnadas por lantibióticos no processo cicatricial da pele de bovinos, com outras doses de nisina e com maior tempo de análise.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, H. K. *et al.* Finding alternatives to antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 91–100, 2014.
- ARAUZ, L. J. DE *et al.* Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3–4, p. 146–154, 2009.
- ATAIDE, J. A. *et al.* Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.
- BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3941–3951, 2005.
- BEHRENS, H. M. *et al.* The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 65–74, 2017.
- BOWE, W. P. *et al.* Inhibition of *Propionibacterium acnes* by bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. **Journal of Drugs in Dermatology : JDD**, v. 5, n. 9, p. 868–870, 2006.
- BRAWN, K. Guidelines for the assessment & management of wounds. **Northamptonshire Healthcare**, p. 1–37, 2015.
- CANGUL, I. T. *et al.* Evaluation of the effects of topical tripeptide-copper complex and zinc oxide on open-wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2006.
- CINTAS, L. M. *et al.* Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology International**, v.7, n. 4, p. 281-305, 2001.
- CUNHA, O. *et al.* Nova técnica para descorna em bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 5, n. 1, p. 59-63, 2002.
- CZAJA, W. K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.
- DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3553–62, 2005.
- DOS SANTOS, C. A. *et al.* Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, v. 25, n. 11, p. 6681–6689, 2018.
- FIELD, D. *et al.* Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–7, outubro

2016.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

HEUNIS, T. D. J.; SMITH, C.; DICKS, L. M. T. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3928–3935, 2013.

HUZZEY, J. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; WEARY, D. M. Changes in Feeding, Drinking, and Standing Behavior of Dairy Cows During the Transition Period. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2454–2461, jul. 2005.

JEBEL, F. S.; ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 8–19, 2016.

JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D. *et al.* Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

LIN, W. C. *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

LIYASKINA, E. *et al.* International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016). **Journal of Physics: Conference Series**, v. 784, n. 1, p. 1-7, 2017.

MAIA, N. *et al.* Nisin Activity Against Contaminant Bacteria Isolated From Bioethanol Fermentation Tanks, v.1, p. 137–138, 2014. *In*: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS - MICROAL, 12, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014**. Foz do Iguaçu, Blucher, 2014.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43–51, 2008.

MASTROMATTEO, M. *et al.* Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 591–598, 2010.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS - OIE. Animal welfare and beef

cattle Production Systems. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 1–10, 2019.

PARK, S. U. *et al.* The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**, v. 11, n. 1, p. 35–43, 2014.

PIPER, C. *et al.* Discovery of medically significant lantibiotics. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2009.

RAHMATI, M.; MOZAFARI, M. Biocompatibility of alumina-based biomaterials-A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 3321–3335, abr. 2019.

RAMBO, C. R. *et al.* Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 549–554, 2008.

ROLAIN, J. M. *et al.* Do we need new antibiotics? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 408–415, 2016.

SANCHAVANAKIT, N. *et al.* Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 4, p. 1194–1199, 2006.

SILVA, L. A. F. *et al.* Epidemiological aspects of sinusitis after plastic or burning iron dehorning in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 357–362, 2009.

STAFFORD, K. J.; MELLOR, D. J. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 337–349, 2005.

SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment : Properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SYLVESTER, S. P. *et al.* Acute cortisol responses of calves to four methods of dehorning by amputation. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 123–126, 1998.

TOLOSA, E. M. C. *et al.* **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2003. 331p.

TROVATTI, E. *et al.* *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1417–1420, 2011.

VAN HEEL, A. J.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 7, n. 6, p. 675–680, 2011.

WEAVER, A. D.; ST. JEAN G; STEINER, A. Head and Neck Surgery. *In*: WEAVER, A. D.; ST. JEAN G, STEINER, A. **Bovine Surgery and Lameness**. 2. ed. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005, p. 1-269.

WOUK, A. F. P. D. F. *et al.* Membrana biológica (biofill) - estudo comparativo com

outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 31–37, 1998.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo teve como proposta avaliar dois novos tipos de tratamentos para avaliação da cicatrização de feridas cirúrgicas utilizando membranas de nanocelulose bacteriana (NCB) e NCB impregnadas com a bacteriocina nisina como potenciais aceleradores da fase inflamatória da cicatrização. O modelo experimental utilizado foi a descorna cirúrgica em bovinos e os resultados mostraram que quando as feridas cirúrgicas de cada grupo são controles delas mesmas, as feridas com membrana cicatrizaram mais rapidamente, porém quando comparados entre grupos não há melhoria no processo inflamatório que sugira aceleração da cicatrização. A utilização da nisina na concentração proposta no experimento parece não ter sido adequada para promover atividade antimicrobiana.

Além disso a histologia revelou grande diferença nas amostras coletadas pelas biópsias; os *punchs* realizados nos dias 7, 14 e 21 não sustentaram as características de cicatrização macroscópicas, pois a cicatrização microscópica não acompanhou o observado macroscopicamente. Estudos futuros com diferentes concentrações de nisina e períodos maiores de realizações de biópsias podem trazer informações relevantes para as pesquisas com esses biopolímeros.

A membrana de NCB, assim como a nisina, tem suas propriedades terapêuticas reconhecidas; nossos experimentos sugerem desdobramentos para a utilização desses biomateriais com a possibilidade de impregnação de substâncias ativas naturais ou não para auxiliar no tratamento de feridas cirúrgicas. Pesquisas com membranas de NCB impregnadas com solução de polivinilpirrolidona iodada (PVPI) ou repelentes larvicidas de liberação controlada podem ser desenvolvidas utilizando modelos como os apresentados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ALGAR, I. *et al.* Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 1, 2015.
- ALLEN, H. K. *et al.* Finding alternatives to antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 91–100, 2014.
- ARANHA, C.; GUPTA, S.; REDDY, K. V. R. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: *In vitro* and *in vivo* studies. **Contraception**, v. 69, n. 4, p. 333–338, 2004.
- ARAUZ, L. J. DE *et al.* Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3–4, p. 146–154, 2009.
- ARAUZ, L. J. DE *et al.* Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 419–426, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Perfil da Pecuária no Brasil**, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Perfil da Pecuária no Brasil – beefREPORT**, 2019.
- ATAIDE, J. A. *et al.* Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.
- BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3941–3951, 2005.
- BARBOSA, B. S. **Efeitos da fototerapia no processo de cicatrização de queimaduras em bezerros**. 2016. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- BASHA, M. A. *et al.* Care and management of wound in animals. **Livestock line**, v. 12, n. 12, p. 3–7, 2019.
- BEHRENS, H. M. *et al.* The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 65–74, 2017.
- BERRY II, D. B.; SULLINS, K. E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 1, p. 88–92, 2003.

- BIERBAUM, G.; SAHL, H.G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2-18, 2009.
- BONINI, M.; NETO, J. R.; MARINGONI, A. C. Produção e sensibilidade de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à bacteriocinas. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 232–234, 2012.
- BOWE, W. P. *et al.* Inhibition of *Propionibacterium acnes* by bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. **Journal of Drugs in Dermatology : JDD**, v. 5, n. 9, p. 868–870, 2006.
- BRAWN, K. Guidelines for the assessment & management of wounds. **Northamptonshire Healthcare**, p. 1–37, 2015.
- BRETT, D. A review of collagen and collagen-based wound dressings. **Wounds**, v. 20, p. 347-356, 2008.
- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 31 2004.
- BROWN, A. J. XLIII - On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, p. 432–439, 1886.
- BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, n. 4, p. 457–65, 2008.
- CACICEDO, M. L. *et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016.
- ÇAKAR, F. *et al.* Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 7–13, 2014.
- CALIN, M. A.; COMAN, T.; CALIN, M. R. Effect of low level laser therapy on the surgical wound healing in hamster. **Romanian Reports in Physics**, v. 62, n. 3, p. 617–627, 2010.
- CANGUL, I. T. *et al.* Evaluation of the effects of topical tripeptide-copper complex and zinc oxide on open-wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2006.
- CHAO, Y. *et al.* Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 12, p. 345-352, 2000.
- CHEN, L. *et al.* Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464–468, 2013.
- CINTAS, L. M. *et al.* Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and**

Technology International, v.7, n. 4, p. 281-305, 2001.

CLARK, R. A. F. Fibrin and Wound Healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, n. 1, p. 355–367, 2006.

CONCEIÇÃO, M. L. DA *et al.* Aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP) em ferida acometida de deiscência após laparotomia exploratória em equino: relato de caso. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, p. 227, 21 julho 2017.

COZZI, G. *et al.* Dehorning of cattle in the EU Member States: A quantitative survey of the current practices. **Livestock Science**, v. 179, p. 4–11, 2015.

CUNHA, O. *et al.* Nova técnica para descorna em bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 5, n. 1, p. 59-63, 2002.

CZAJA, W. K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

DAHMAN, Y. Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial Cellulose nanofibers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.9, n. 9, p. 5105-5122, 2009.

DAL SECCO, D. *et al.* Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: Role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2006.

DEEGAN, L. H. *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3553–62, 2005.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 4, p. 283–289, 2004.

DONINI, Í. A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DOS SANTOS, C. A. *et al.* Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, v. 25, n. 11, p. 6681–6689, 2018.

DUBEY, S. *et al.* From rotten grapes to industrial exploitation: *Komagataeibacter europaeus* SGP37, a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 52–60, 2017.

DUFFIELD, T. Current Data on Dehorning Calves. **The AABP Proceedings**, v. 41, p. 25–28, setembro 2008.

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, D. Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 451–457, 2013.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 237, p. 97–132, 1999.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 21, p. 4368–80, 2002.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 26, n. 2, p. 37–42, setembro 2005.

FAVERO, E.; SARRIERA, J. C. Impactos da seca no bem-estar psicológico de agricultores familiares do sul do Brasil. **Temas em Psicologia**, v. 22, n. 4, p. 809–822, 2014.

FIELD, D. *et al.* Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–7, outubro 2016.

FIORAVANTI, M. C. S. *et al.* Descorna de bovinos utilizando grampos de metal na dermorráfia. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 507–510, 1999.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

GAO, C. *et al.* Protective effect of Schizandrin B against damage of UVB irradiated skin cells depend on inhibition of inflammatory pathways. **Bioengineered**, v. 8, n. 1, p. 36–44, 2017.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Influência do laser arseneto de gálio-alumínio em feridas cutâneas de ratos. **Fisioterapia em Movimento**, v. 23, n. 3, p. 381–388, 2010.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E.; GÓMEZ-TREVIÑO, M.; JIMÉNEZ-SALAS, Z. Bacteriocinas de probióticos . **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 4, n. 2, p. 1–4, 2003.

GONZALEZ, A. C. D. O. *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GOTTARDO, F. *et al.* The dehorning of dairy calves: Practices and opinions of 639 farmers. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5724–5734, 2011.

GUPTA, S. M. *et al.* Interaction of contraceptive antimicrobial peptide nisin with target cell membranes: implications for use as vaginal microbicide. **Contraception**, v. 80, n.

3, p. 299–307, 2009.

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

HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. **Surgery (United Kingdom)**, v. 32, n. 9, p. 445–450, 2014.

HEUNIS, T. D. J.; SMITH, C.; DICKS, L. M. T. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3928–3935, 2013.

HUANG, C. *et al.* Evaluating the possibility of using acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation wastewater for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 491–496, maio 2015.

HUEBNER, K. L. *et al.* Evaluation of horn bud wound healing following cauterization and disbudding of preweaned dairy calves treated with aluminum-based aerosol bandage. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3922–3929, 2017.

HUZZEY, J. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; WEARY, D. M. Changes in Feeding, Drinking, and Standing Behavior of Dairy Cows During the Transition Period. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2454–2461, jul. 2005.

IBGE. Censo Agropecuário 2017 - resultados preliminares. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 7, n. 01036157, p. 1–180, 2017.

IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo Agropecuário: resultados definitivos**, v. 8, p. 1–105, 2019.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

ISAAC, C. *et al.* Physiological wound healing. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 89, n. 04, p. 125–131, 2010.

JACKSON, J. R. *et al.* Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 6, p. 1572–1581, 2010.

JEBEL, F. S.; ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 8–19, 2016.

JOZALA, A. F. *et al.* Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 515–528, 2007.

JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by

employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Characteristic of bacteriocines and their application. **Polish Journal of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 223–235, 2013.

KESHK, S. M. A. S.; RAZEK, T. M. A.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 17, p. 1519–1523, 2006.

KIM, J. *et al.* Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. **Journal of Polymer Research**, v. 18, n. 4, p. 739-744, 2011.

KIM, T. S. *et al.* Antagonism of *Helicobacter pylori* by Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 1, p. 3–12, 2003.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D. *et al.* Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

KUROSUMI, A. *et al.* Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, mar. 2009.

KWAK, M. H. *et al.* Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 387–398, 2015.

LEE, K. Y. *et al.* More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.

LI, Z. *et al.* Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 115–9, 20 abr. 2015.

LIN, W. C. *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

LIYASKINA, E. *et al.* International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016). **Journal of Physics: Conference Series**, v. 784, n. 1, p. 1-7, 2017.

LUAN, J. *et al.* Impregnation of silver sulfadiazine into bacterial cellulose for antimicrobial and biocompatible wound dressing. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 7, n. 6, p. 1-11, 2012.

MAIA, N. *et al.* Nisin Activity Against Contaminant Bacteria Isolated From Bioethanol Fermentation Tanks, v.1, p. 137–138, 2014. *In*: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS - MICROAL, 12, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014**. Foz do Iguaçu, Blucher, 2014.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources - Part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43–51, 2008.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.

MARTINS, N. L. P. *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 66–75, 2006.

MARTINS, P. S. *et al.* Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2003.

MASTROMATTEO, M. *et al.* Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 591–598, 2010.

MEDRADO, A. *et al.* Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 26, n. 4, p. 192–197, 2010.

MEDRADO, A. R. A. P. *et al.* Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2003.

MENDONÇA, A. C. *et al.* Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 152–157, 2006.

MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, jul. 2009.

- MEYER, A. C. J.; REIS, E. M.; PORTO, L. M. Imobilização de colágeno humano tipo I em membranas de nanocelulose bacteriana. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 12, 2017, São Carlos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. São Carlos, Blucher, 2017. p. 651-656.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.
- MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.
- MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter Xylinus* from agricultural waste. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 94–101, 2011.
- NAKAGAITO, A. N.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Bacterial cellulose: The ultimate nanoscalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 80, n. 1, p. 93-97, 2005.
- NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351–356, 2009.
- NOBLES, D. R.; ROMANOVICZ, D. K.; BROWN, J. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? **Plant Physiology**, v. 127, n. 2, p. 529–542, 2001.
- NÚÑEZ, S. C. *et al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633–41, 23 fev. 2013.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS - OIE. Animal welfare and beef cattle Production Systems. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 1–10, 2019.
- PARK, S. U. *et al.* The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**, v. 11, n. 1, p. 35–43, 2014.
- PIPER, C. *et al.* Discovery of medically significant lantibiotics. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2009.
- PURNA, S. K.; BABU, M. Collagen based dressings-a review. **Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 26, n. 1, p. 54–62, 2000.
- RAHMATI, M.; MOZAFARI, M. Biocompatibility of alumina-based biomaterials-A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 3321–3335, abr. 2019.
- RAJAN, T. S. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of a combination of cannabidiol and moringin in LPS-stimulated macrophages. **Fitoterapia**, v. 112, p.

104–115, 2016.

RAMBO, C. R. *et al.* Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 549–554, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. *et al.* Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 151–157, 2011.

REVIN, V. *et al.* Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 151–159, 2018.

REZENDE, S. B. *et al.* Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 87, n. 3, p. 145–153, 2007.

ROLAIN, J. M. *et al.* Do we need new antibiotics? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 408–415, 2016.

SANCHAVANAKIT, N. *et al.* Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 4, p. 1194–1199, 2006.

SCHEIBE, C. L. *et al.* *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira) and *Orbignya phalerata mart.* (Babassu) effect in cecorahphy healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 402–410, 2016.

SCHERER, K. *et al.* Aggregates of nisin with various bactoprenol-containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2628–2636, 2013.

SCHWACHA, M. G. Macrophages and post-burn immune dysfunction. **Burns**, v. 29, n. 1, p. 1–14, 2003.

SERRANO, A. L. *et al.* Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 96, p. 167–201, 2011.

SHAH, N. *et al.* Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.

SHAO, W. *et al.* Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 351–358, 2015.

SHAO, W. *et al.* Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 145, p. 114–120, 2016.

SHIN, E. H. *et al.* Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal

- muscle healing. **Wound Repair and Regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 22, p. 18–24, 2014.
- SILVA, L. A. F. *et al.* Epidemiological aspects of sinusitis after plastic or burning iron dehorning in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 357–362, 2009.
- SILVEIRA, P. C. L. *et al.* Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1395-1404, 2016.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.
- SOLÓRZANO, O. T. *et al.* Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crónica erosiva. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, v. 44, n. 1, p. 8–11, 2001.
- STAFFORD, K. J.; MELLOR, D. J. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3. p. 337-349, 2005.
- STILWELL, G. G.; LIMA, M. S.; BROOM, D. M. Comparing the effect of three different disbudding methods on behaviour and plasma cortisol of calves. **Animal Welfare**, v. 102, p. 281–288, 2007.
- STOCK, M. L. *et al.* Bovine Dehorning. Assessing Pain and Providing Analgesic Management. **Veterinary Clinics Food Animals**, v. 29, p. 103–133, 2013.
- SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment : Properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.
- SYLVESTER, S. P. *et al.* Acute cortisol responses of calves to four methods of dehorning by amputation. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 123–126, 1998.
- TOLOSA, E. M. C. *et al.* **Manual de Técnicas para Histología Normal e Patológica**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2003. 331p.
- TONG, Z. *et al.* Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 2003–2008, 2010.
- TONKS, A. J. *et al.* Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. **Cytokine**, v. 21, n. 5, p. 242–247, 2003.
- TROVATTI, E. *et al.* Novel bacterial cellulose-acrylic resin nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 7, p. 1148–1153, 2010.
- TROVATTI, E. *et al.* *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1417–1420, 2011.

TSOUKO, E. *et al.* Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 14832–14849, 1 jul. 2015.

VAN HEEL, A. J.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 7, n. 6, p. 675–680, 2011.

WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 63–76, maio 2019.

WEAVER, A. D.; ST. JEAN G; STEINER, A. Head and Neck Surgery. *In*: WEAVER, A. D.; ST. JEAN G; STEINER, A. **Bovine Surgery and Lameness**. 2. ed. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005, p. 1-269.

WIEGAND, C. *et al.* Antimicrobial functionalization of bacterial nanocellulose by loading with polihexanide and povidone-iodine. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 10, 2015.

WOUK, A. F. P. D. F. *et al.* Membrana biológica (biofill) - estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 31–37, 1998.

WU, J.-M.; LIU, R.-H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 116–121, 2012.

XIAO, L.; MIWA, N. Hydrogen-rich water achieves cytoprotection from oxidative stress injury in human gingival fibroblasts in culture or 3D-tissue equivalents, and wound-healing promotion, together with ROS-scavenging and relief from glutathione diminishment. **Human Cell**, v.30, n. 2, p.72-87, 2017.

ZABOROWSKA, M. *et al.* Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2540–2547, 2010.

ZANOTI, M. D. U. **Membranas de celulose bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

ANEXO A

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – UNISO
162/2019UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO
PARECER

Protocolo nº 162/2019
Interessado (a): Fábio Andre Ferreira Custódio/Denise Grotto
Orientador (a): o mesmo
Título do Projeto: Uso da membrana de nanocelulose bacteriana na cicatrização de feridas cirúrgicas de dermorráfia em bovinos

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

--

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 31/10/2019

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO B

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – UNISO
149/2018UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO
PARECER

Protocolo nº 149/2019
Interessado (a): Ana Carolina Rusca Correa Porto
Orientador (a): o mesmo
Título do Projeto: USO DE MEMBRANA DE NANOCELULOSE BACTERIANA CONTENDO NISINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS DE DERMORRAFIA EM BOVINOS

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

--

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 15/04/2019