

Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais - POSMAT

“Estudo dos componentes não isoprênicos do látex de  
*Hevea brasiliensis* indutores de angiogênese”

Deuber Lincon da Silva Agostini

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente  
2013

Deuber Lincon da Silva Agostini

“Estudo dos componentes não isoprênicos do látex  
de *Hevea brasiliensis* indutores de angiogênese”

**Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração de Materiais Poliméricos, Híbridos e Nano-Estruturados, sob orientação do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.**

Presidente Prudente  
2013

Agostini, Deuber Lincon da Silva.

Estudo dos componentes não isoprênicos do látex de  
Hevea brasiliensis indutores de angiogênese / Deuber  
Lincon da Silva Agostini, 2013  
114 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

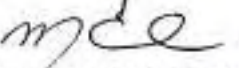
Tese (Doutorado)-Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Presidente Prudente, 2013.

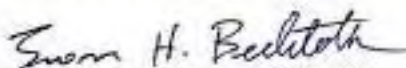
1. Hevea brasiliensis. 2. Proteínas. 3. Látex  
centrifugado. I. Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências. II. Título.


**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DEUBER LINCON DA SILVA AGOSTINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.**

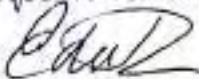
Aos 05 dias do mês de julho do ano de 2013, às 10:00 horas, no(a) Anfiteatro I da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Profa. Dra. MARISELMA FERREIRA do(a) Universidade Federal do ABC, Prof. Dr. IVAN HELMUTH BECHTOLD do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de Santa Catarina, Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO MALMONGE do(a) Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de DEUBER LINCON DA SILVA AGOSTINI, intitulado "ESTUDO DOS COMPONENTES NÃO ISOPRÊNICOS DO LÁTEX DE HEVEA BRASILIENSIS INDUTORES DE ANGIOGÊNESE". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB

  
Profa. Dra. MARISELMA FERREIRA

  
Prof. Dr. IVAN HELMUTH BECHTOLD

  
Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO MALMONGE

  
Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ

## Agradecimentos

Agradeço a minha família, Dourival, Fátima “Fá”, Flávia e Diego por acreditarem que seria capaz de chegar a esta etapa, e pelos intensos conflitos que encontrei durante esta jornada. A Jéssyka por todo amor e paciência dispensada.

Ao Prof. Dr. Aldo Eloizo Job pela orientação neste trabalho e grande amizade e capacidade de mudar a vida das pessoas. A Ângela, esposa do Prof. Aldo, que sempre dava conselhos e motivação para seguir este caminho. Agradeço também aos seus filhos Neto e Pepe.

Ao Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho pela dedicação e paciência em analisar com sentimento paternal todos os problemas do dia-a-dia que ocorrem em um programa de pós-graduação.

Aos professores que se dispuseram a avaliar este trabalho: Prof. Dra. Mariselma Ferreira, Prof. Dra. Clarissa de Almeida Olivati, Prof. Dr. Eduardo Rene Perez, Prof. Dr. Ivan H. Bechtold, Prof. Dr. Jose Antonio Malmonge, Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha, Prof. Dr. Sergio Antonio Marques de Lima, Prof. Dr. Ricardo José Mendonça. Muito obrigado pelo tempo dedicado à correção e contribuição na melhoria da qualidade deste trabalho. Toda a minha consideração, admiração e amizade.

As secretárias Andressa (POSMAT) e Juvanir (DFQB) pela alta eficiência e rapidez quando precisávamos de algum documento, sempre de última hora.

Ao Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino (Casé) pela amizade, contribuição em minha formação desde a iniciação científica e pelo suporte técnico nas medidas de Raman.

Ao Prof. Dr. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva pela liofilização das amostras.

Ao Prof. Dr. Edgardo Alfonso G. Pineda, da UEM de Maringá, pelo auxílio nas medidas de RMN.

Ao Prof. Dr. Silvio Rainho Teixeira pelas medidas e discussões dos resultados de difração de raios x.

Aos Professores do DFQB que tornaram o dia-a-dia no departamento muito melhor.

A Ana Cristina Messas e ao Marcos Ruiz pela amizade e imensa ajuda nas análises bioquímicas.

A todos os pesquisadores “borracheiros” que investem na pesquisa deste material complexo mudou o progresso da humanidade e ainda possui uma gama de aplicações que ainda estão adormecidas.

Aos amigos Flavinho, Pirapó, “Pedro e Sabrina”, Julio, “Caito e Érika”, Rafael da Ponta, Jaguar, Carol, Elton, Felipe, Makoto, Priscila, Maiza, Natália, e outros igualmente importantes, pela amizade e convivência. Aos amigos da imensa Lucélia, Botim, “Duzão e Fernanda”, “Dudu e Carla”, “Paulinho e Uli”, Zé Roberto, Bocão, Negão. Pelos vários churrascos que valeram a pena para fugir do estresse e tornar a vida mais amena e menos competitiva.

Agradeço a CAPES, POSMAT, FAPESP, NanobioMed, NanobioTec e ao CNPq pelo apoio financeiro, pois sem estas instituições este trabalho não poderia ser realizado.

*“Valeu a pena ter passado  
por esta vida e conhecido  
todas estas pessoas  
maravilhosas.”*

## HOMENAGEM ESPECIAL



Gabriel Pinto de Souza, 53 anos, físico.  
† 13/01/2011

*"A sua ausência nos causa profunda tristeza,  
mas lembrar as alegrias que você gerou entre  
nós é como se você aqui estivesse presente."*

Muito obrigado por toda contribuição deixada em nosso grupo.

Só para lembrar: *"Tudo é um problema de massa."*

Senhor...

Ajuda-me a dizer a verdade diante dos fortes  
e a não dizer mentiras para ganhar o aplauso dos fracos.  
Se me dás fortuna, não me tires a razão.  
Se me dás o sucesso, não me tires a humildade.  
Se me dás humildade, não me tires a dignidade.  
Ajuda-me a enxergar o outro lado da moeda.  
Não me deixes acusar o outro por traição aos demais,  
apenas por não pensar igual a mim.  
Ensina-me a amar aos outros como a mim mesmo.  
Não deixes que me torne orgulhoso se triunfo,  
nem cair em desespero se fracasso.  
Mas recorda-me que o fracasso  
é a experiência que precede ao triunfo.  
Ensina-me que perdoar é um sinal de grandeza  
e que a vingança é um sinal de baixeza.  
Se não me deres o êxito, dá-me forças para aprender com o  
fracasso.  
Se eu ofender as pessoas, dá-me a coragem para desculpar-me,  
e se as pessoas me ofenderem, dá-me a grandeza de perdoá-las.  
Senhor , se eu me esquecer de ti , nunca te esqueças de mim.

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho aos meus pais: Dourival  
e Fátima, aos meus irmãos Flávia e Diego e a  
minha esposa Jessyka.....Amo vocês.....



Um pouco de Brasil,

Neste mês de junho de 2013 o povo brasileiro parece ter acordado, indo para as ruas, estando dispostos a resolver o principal problema que assola, feri e mata toda a nossa nação. A CORRUPÇÃO.

Espero que esta vontade de mudar dure e possa afetar não só a esfera política, mas sim toda a população. Que possamos esquecer o tal do “Jeitinho brasileiro”.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
RESUMO v	
ABSTRACT .....	VI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
1.1 - Polímeros .....	6
1.2 - Látex e Borracha natural.....	7
1.2.1 - Composição do látex centrifugado .....	10
1.2.1.1 - Partículas de borracha .....	12
1.2.1.2 - Soro C e Complexo de Frey-Wyssling.....	14
1.2.1.3 - Lutóides e Soro B .....	15
1.2.2 - Estruturas proteicas.....	15
1.2.3 - Clone RRIM 600 .....	18
1.3 - Biomateriais .....	19
1.3.1 - Utilização do látex como biomaterial .....	20
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	24
2.1 - Materiais .....	24
2.2 - Coleta do Látex .....	24
2.3 - Látex Centrifugado.....	25
2.4 - Liofilização e tratamento térmico.....	26
2.5 - Métodos de Caracterização.....	28
2.5.1 - Teor de Nitrogênio, Proteína Bruta e Lipídios .....	28
2.5.2 - Espectroscopia por FT-IR modo ATR.....	31
2.5.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	34
2.5.4 - Difração de raios X (DRX) .....	34
2.5.5 - TG acoplado com infravermelho (TG/FT-IR).....	35
2.5.6 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	35
2.5.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	36
2.5.8 - Dosagem de citocinas .....	36
2.5.8.1 - Obtenção de células peritoneais “ex-vivo”.....	37
2.5.8.2 - Processo de dosagem de IL-1 e IL-6.....	38
2.5.8.3 - Processo de dosagem de IL-8 e IL-10.....	39
2.5.8.4 - Processo de dosagem de TNF- $\alpha$ .....	39

2.5.9 - Síntese de Óxido Nítrico (NO).....	40
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 - Teor de Nitrogênio e Proteína bruta.....	42
3.2 - Espectroscopia no infravermelho (FT-IR) no modo ATR.....	43
3.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	51
3.4 - Difração de raios X (DRX).....	53
3.5 - Termogravimétrica (TG).....	55
3.6 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	73
3.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	77
3.8 - Dosagem de citocinas.....	79
3.9 - Síntese de Óxido Nítrico (NO).....	84
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Estrutura supramolecular para a borracha natural [37].</i>	9
<i>Figura 2 - Frações do látex obtidas por centrifugação.</i>	10
<i>Figura 3 - Modelo de uma partícula de borracha envolvida por uma camada proteína-fosfolipídio [53].</i>	13
<i>Figura 4 - Novo modelo proposto de uma partícula de borracha envolvida por uma camada proteína-fosfolipídio [54].</i>	13
<i>Figura 5 - Estrutura de um peptídeo.</i>	16
<i>Figura 6 - Níveis de organização das estruturas proteicas.</i>	17
<i>Figura 7 - Coleta do Látex.</i>	24
<i>Figura 8 - Três frações constituintes do látex centrifugado.</i>	26
<i>Figura 9 - Frações F2 e F3 tratadas termicamente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C.</i>	28
<i>Figura 10 - Reações para determinação de proteína bruta: (a) digestão; (b) destilação e (c) titulação das amostras.</i>	30
<i>Figura 11 - Modos vibracionais de Amida I e II.</i>	32
<i>Figura 12 - Espectro de FTIR deconvoluído da fração 2060 juntamente com os componentes individuais de ajuste.</i>	33
<i>Figura 13 - Imagem do látex centrifugado (a) estabilizado e (b) sem estabilizante.</i>	43
<i>Figura 14 - Espectros de FTIR para a fração F2.</i>	44
<i>Figura 15 - Espectros de FTIR para a fração F3.</i>	45
<i>Figura 16 - Comportamento das conformações proteicas <math>\alpha</math> hélice e <math>\beta</math> folha, em relação à região de amida I, para as frações F2 e F3.</i>	48
<i>Figura 17 - Comportamento da conformação proteica <math>\alpha</math> hélice, em relação à região de amida II, para as frações F2 e F3.</i>	49
<i>Figura 18 - Comportamento das conformações proteicas <math>\alpha</math> hélice e <math>\beta</math> folha, em relação à região de amida III, para as frações F2 e F3.</i>	50
<i>Figura 19 - Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> CPMAS para as amostras da fração F2.</i>	51
<i>Figura 20 - Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> CPMAS para as amostras da fração F3.</i>	52
<i>Figura 21 - Difratograma de raios X para as amostras da fração F2.</i>	54
<i>Figura 22 - Difratograma de raios X para as amostras da fração F3.</i>	55
<i>Figura 23 - Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F2 em atmosfera de Nitrogênio.</i>	57
<i>Figura 24 - Perda de massa associada à formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos.</i>	58
<i>Figura 25 - Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F3 em atmosfera de Nitrogênio.</i>	58

<i>Figura 26 – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F2 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 27 – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F3 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 28 – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 29 – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 30 – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 31 – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 32 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 33 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 34 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 35 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de ar sintético.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 36 – Curva de DSC para as amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 37 – Curva de DSC para as amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 38 – Variação da entalpia (<math>\Delta H</math>) em função da temperatura de tratamento térmico para as frações F2 e F3 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 39 – Perfis eletroforéticos para as frações F2 e F3.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 40 – Concentração de citocinas em relação a interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 41– Concentração de citocinas em relação a interleucinas anti-inflamatórias IL-8 e IL-10.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 42 - Análise individual da dosagem de citocinas para interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 43 - Análise individual da dosagem de citocinas para interleucinas anti-inflamatórias IL-8 e IL-10.....</i>	<i>84</i>

<i>Figura 44 – Síntese de NO para a fração F2.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 45 - Síntese de NO para a fração F3.....</i>	<i>85</i>

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Distribuição média das proteínas nas frações do látex [31].</i> .....	11
<i>Tabela 2 – Identificação das amostras.</i> .....	27
<i>Tabela 3 – Valores obtidos para o cálculo do teor de nitrogênio e proteína bruta.</i> .....	42
<i>Tabela 4 – Valores obtidos para o teor de lipídios.</i> .....	43
<i>Tabela 5 - Atribuições das bandas nos espectros de FTIR para grupos funcionais observados nas frações do látex.</i> .....	46
<i>Tabela 6 – Atribuições para absorções no FTIR para as amidas.</i> .....	47

AGOSTINI, Deuber Lincon da Silva. “**Estudo dos componentes não isoprênicos do látex de *Hevea brasiliensis* indutores de angiogênese**”: 2013. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2013.

## RESUMO

Atualmente é comprovado o poder de indução de angiogênese e neoformação tecidual através de membranas de borracha natural de *Hevea brasiliensis*. Este trabalho apresenta um estudo sobre as propriedades e a caracterização das frações não isoprênicas, separadas por centrifugação do látex, utilizado como biomaterial na indução de angiogênese e de neoformação. As frações constituintes, F2 e F3 sem o tradicional agente estabilizante de hidróxido de Amônio (NH<sub>4</sub>OH), foram liofilizadas para a redução da quantidade de água e estabilização, em seguida tratadas termicamente a temperatura de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C e novamente liofilizadas, sendo caracterizadas através das técnicas de Kjeldahl, Soxhlet, de espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN-<sup>13</sup>C), Difração de raios x (DRX), termogravimetria (TG) acoplado ao FT-IR (TG/FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), eletroforese, dosagens de citocinas e síntese de óxido nítrico considerando o fator limitante do uso do látex como um material bioativo, que é a temperatura de tratamento térmico, realizado para a obtenção das membranas de borracha natural, em torno de 85 °C. Foi possível verificar que a fração F3 constituinte do látex tem propriedades anti-inflamatórias e que a fração F2 possui propriedades pró-inflamatórias.



**ABSTRACT**

Currently it is proven the ability of inducing angiogenesis and tissue neof ormation through membranes of natural rubber *Hevea brasiliensis*, so this work presents a study on the properties and characterization of non-isoprene fractions, separated by centrifugation, the latex used as biomaterial for induction and neof ormation of angiogenesis and lyophilized without the traditional stabilizing agent, ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH). The fractions constituents, F2 and F3 fractions were lyophilized to reduce the amount of water and stabilization, and then heat treated at temperature of 40, 60, 80, 100, 120 and 140 °C being characterized by the techniques of Kjeldahl, Soxhlet, of absorption spectroscopy infrared (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR-<sup>13</sup>C), X-ray Diffraction (XRD), thermogravimetry (TG) coupled to FT-IR (TG / FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), electrophoresis, serum cytokines and oxide nitric (NO) considering the limiting factor in the use of latex as a bioactive material, which is the thermal treatment temperature, held for obtaining membranes of natural rubber, about 85 °C. It was possible to verify that the fraction F3 constituent latex has anti-inflammatory and the fraction F2 take inflammatory properties.

## **INTRODUÇÃO**

As primeiras informações que se têm sobre a descoberta da Borracha Natural, datam de 1743, quando em sua segunda viagem à América do Sul Cristóvão Colombo viu nativos do Haiti brincando com bolas que eles faziam com uma seiva de cor branca leitosa extraída de árvores, que os nativos chamavam de “Cau-uchu”, que na língua nativa significa a árvore que chora. Em 1745, Charles de La Condamine apresentou e publicou os primeiros documentos referentes à borracha natural, depois de fazer muitas observações nas amostras do material trazido do Peru em 1736.

A reação de vulcanização foi descoberta por Charles Goodyear em 1839 que percebeu uma sensível mudança no estado físico da borracha natural, de muito plástica para elástica quando a esta era adicionado enxofre. Após a descoberta da vulcanização, rapidamente a demanda de artigos feitos de borracha cresceu muito, sendo que basicamente os produtos eram produzidos a partir da borracha natural vinda da região Amazônica no Brasil.

Em 1876 Henry Wiekham em sua viagem a América do Sul coletou aproximadamente 70.000 sementes das árvores produtoras do látex de borracha natural, *Hevea brasiliensis*, levando-as para a Europa e em seguida para a Ásia, sendo que dez anos depois já produziam sementes em abundância e látex de ótima qualidade [1].

A borracha natural é obtida por coagulação do látex por árvores do gênero *Hevea brasiliensis*, originária da região setentrional da América do Sul, é uma árvore com cerca de 10 á 15 metros de altura, tronco retilíneo, com diâmetro aproximado de 30 centímetros. As plantações de seringueiras apresentam uma

densidade de aproximadamente 450 árvores por hectare e começam a produzir após 7 a 8 anos de plantio. A obtenção de espécies de alta produtividade é conseguida através de processos de enxertia de borbulhas, de árvores reconhecidas como de alta produção, em mudas obtidas a partir de sementes; estas mudas, assim enxertadas, são denominadas clones [2].

Atualmente, a borracha natural é uma importante matéria-prima agrícola renovável essencial para a manufatura de um amplo espectro de produtos em todos os ramos da atividade humana. Considerado um produto estratégico, é ao lado do aço e do petróleo (matérias-primas não renováveis), um dos alicerces que sustentam o progresso da humanidade [3].

No âmbito dos países produtores, observa-se que o governo da Malásia investe maciçamente em borracha natural e a qualidade da borracha natural produzida atende aos padrões tecnológicos mais exigentes das indústrias de pneumáticos e de artefatos, conferindo alta qualidade aos artefatos.

Já se sabe que o látex de seringueira apresenta algumas propriedades únicas, superiores a qualquer outro polímero, mesmo seu análogo sintético. A boa elasticidade, combinada com a baixa histerese mecânica, faz da borracha natural um material importante na produção de pneus, elementos de suspensão e pára-choques [4] e produtos leves com alta resistência como balões, luvas cirúrgicas, preservativos [5] e em inovações tecnológicas como o seu uso em argamassas para construção civil, indústria aeronáutica e naval, tubos para usos em hospitais e centros cirúrgicos, compósitos condutores e materiais de alta precisão como válvulas e retentores. Existem inúmeras patentes registradas a respeito de artefatos de borracha natural, várias dessas patentes são de propriedades de empresas líderes mundiais [6].

Embora a borracha natural seja conhecida há muitos anos, muitos de seus componentes voláteis e não voláteis, bem como suas proporções não são bem conhecidas. O látex de borracha natural extraído da *Hevea brasiliensis* é um sistema complexo, de partículas coloidais polidispersas suspensas em um soro [7]. Dois tipos de partículas predominam: as de borracha e os lutóides. Destacam-se ainda os complexos de Frey-Wyssling e o soro C, que contém proteínas aniônicas e sais minerais que conferem estabilidade coloidal ao sistema [7,8].

Desde a década de 90 a borracha natural está sendo utilizada na área biomédica, no qual a membrana de borracha natural obtida do látex de *Hevea brasiliensis* atua em tecidos humanos através da sua capacidade de indução de angiogênese e neoformação, sendo um material inócuo e não rejeitado pelo organismo, não apresentando toxicidade e manifestações alérgicas. A borracha natural vem sendo estudada e utilizada em forma de membranas e em gel [9], com sucesso, também em outras áreas da medicina, no processo de cicatrização de úlceras flebopáticas, arteriais e diabéticas e em áreas queimadas do corpo [10].

Os resultados obtidos pelo Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo-USP de Ribeirão Preto através da equipe de pesquisadores coordenados pelo Professor Dr. Joaquim Coutinho Netto indicam, entre outras vantagens, elasticidade, resistência e capacidade de induzir a neoformação de tecidos [11], de baixo custo e de fácil aquisição, não promovendo reação alérgica ou rejeição pelo organismo humano. Por ser um material vegetal não existe a preocupação com possível transmissão de vírus patogênicos para o homem como os das hepatites B e C e HIV, pois não necessitam de “células doadoras humanas” [10].

A princípio, as borrachas usadas pela equipe do Professor Coutinho

foram processadas em diferentes temperaturas, mas os resultados mostraram que somente as preparadas com temperaturas abaixo de 85 °C contribuem para a formação de angiogênese e de neoformação. Portanto, a temperatura de tratamento do látex na obtenção da borracha natural é o fator mais importante na preparação desta borracha, pois a temperaturas elevadas podem ocorrer evaporação ou reações químicas envolvendo o princípio ativo fazendo com que a borracha deixe de ter a propriedade de cura.

Neste trabalho, estão sendo apresentados estudos de caracterização de duas frações não isoprenicas do látex obtidas por centrifugação, posteriormente liofilizadas e tratadas termicamente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C. Utilizou-se as técnicas Kjeldahl, Soxhlet, espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) no modo de Reflectância Total Atenuada (ATR), ressonância magnética nuclear (RMN), difratometria de raios X (DRX), análise termogravimétrica acoplada ao espectrômetro de absorção no infravermelho (TG/FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), eletroforese, dosagem de citocinas e síntese de óxido nítrico. No Capítulo 1 temos a revisão bibliográfica sobre os conceitos que serão discutidos nos resultados presentes no Capítulo 3, no Capítulo 2 a descrição dos métodos experimentais empregados, bem como os materiais utilizados e concluindo no Capítulo 4.

**OBJETIVOS**

Atualmente é comprovado o poder de indução de angiogênese e neoformação tecidual através de membranas de borracha natural de *Hevea brasiliensis*. O objetivo deste trabalho é caracterizar os compostos não isoprênicos presentes no látex considerando o fator limitante do uso da borracha natural como um material bioativo, que é a temperatura de tratamento térmico, realizado para a obtenção das membranas de borracha natural, em torno de 85 °C.

O látex de *Hevea brasiliensis*, sem a adição de estabilizantes, é inicialmente centrifugado para a separação das frações constituintes, frações F2 e F3, e liofilizadas para a redução da quantidade de água, em seguida tratadas termicamente a temperatura de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C e novamente liofilizadas, sendo caracterizadas através das técnicas de Kjeldahl e Soxhlet, espectroscopia no infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Difração de raios-X, termogravimetria (TG) acoplado com FT-IR (TG/FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), eletroforese, dosagens de citocinas e óxido nítrico com objetivo de conhecer e dominar seus componentes indutores de angiogênese e de neoformação tecidual.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 - Polímeros**

O termo polímeros deriva do grego, *Polys* = muitos; *Meros* = unidades de repetição, portanto significa muitas unidades de repetição, foi criada por Berzelius, em 1832, para designar compostos de pesos moleculares múltiplos [12]. Polímeros são substâncias de alto peso molecular proveniente de reações de polimerização. Isto é, são provenientes da combinação química de um grande número de moléculas idênticas ou similares (monômeros) para formar uma molécula complexa de elevado peso molecular (macromolécula). Podem ser homopolímeros, polímeros formados por monômeros de um único tipo de substância, ou copolímeros, polímeros formados por duas ou mais substâncias [13].

Há diversas formas de classificação dos polímeros, que geralmente são apresentados em três grandes categorias: termoplásticos, termofixos e elastômeros. Esses materiais são usados amplamente em todas as áreas da engenharia, devido à sua extrema versatilidade. Como exemplo de aplicação de polímeros, citamos o uso em bases de tintas, adesivos, pneus, pára-choques de automóveis, fibras e recobrimentos de fibras óticas, de fios de alta tensão e esta multiplicidade de aplicações derivam essencialmente da sua facilidade de processamento, aliado ao seu relativo baixo custo [14].

Em termos de materiais para implantes, os polímeros apresentam uma boa alternativa, visto que, possuem propriedades mecânicas desejáveis. Por exemplo, Fukada *et al.* trabalhando com teflon implantado no fêmur de coelhos, constataram a formação de calo ósseo em apenas duas semanas [15]. No entanto,

apesar de apresentar qualidades desejáveis para agir como um biomaterial, se o polímero apresentar toxicidade, o processo inflamatório se mostrará muito acentuado provocando necrose no tecido receptor. Geralmente a toxicidade dos polímeros é considerada maior que a dos metais e das cerâmicas [16]. A presença de cargas superficiais no polímero é outro fator que influencia a formação do tecido fibroso. No caso de carga superficial positiva pode atrair eritrócitos, que possuem carga superficial negativa; e o contato das células com o material potencialmente citotóxico pode destruí-las [16].

## **1.2 - Látex e Borracha natural**

O látex ocorre no reino vegetal em mais de 12.000 espécies pertencentes a cerca de 900 gêneros. Destas plantas laticíferas, cerca de 1.000 espécies contêm borracha [17]. Entretanto, a única espécie que gera borracha de alta qualidade e em condições econômicas é a *Hevea brasiliensis*. Originária da região setentrional da América do Sul foi climatizada em 1890 no Sri Lanka (antigo Ceilão) e na Malásia [18].

O Brasil já foi o principal produtor e exportador de borracha no mundo, até os anos cinquenta, hoje produz apenas cerca de 1% da produção mundial, o que é insuficiente para o consumo interno, sendo necessária a importação de aproximadamente 60% da borracha consumida no país [19-22]. Contudo, o interesse pela produção de borracha natural está sendo recuperado, com o Estado de São Paulo atuando como o maior produtor do país [23,24]. Atualmente a Ásia é a principal produtora de látex de *Hevea brasiliensis*, sendo cultivada nas regiões tropicais, onde 90% da produção mundial é extraída [25].



O termo látex e borracha natural, ou coágulo de borracha natural, é muitas vezes confuso, sendo geralmente empregado o termo látex para o líquido extraído da árvore e o termo borracha ou coágulo para o sólido extraído do látex.

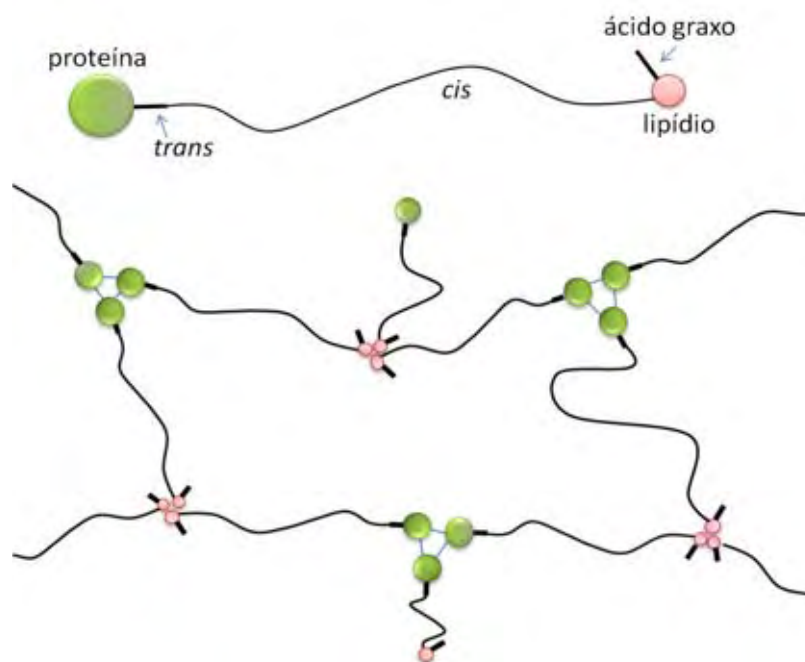
O látex é um sistema coloidal polifásico, sendo a parte dispersa constituída de micelas de borracha, proteínas, fosfolipídios, lutóides e partículas Frey-Wyssling e o meio dispersivo constituído do soro aquoso [26]. Obtido por meio de corte em meia espiral da casca da árvore, tendo seu rendimento melhorado pela colheita no período da manhã, em dias alternados. Novas estratégias para melhorar a produtividade de látex que incluem a criação seletiva e o tratamento com hormônios [27]. Sendo esta última, juntamente com a sangria frequente da árvore, susceptíveis de aumentar o teor de proteínas como as heveínas, quitinase e b-1,3-glucanase [28,29].

O látex de *Hevea brasiliensis*, com estabilizante, contém cerca de 35% em peso de partículas de borracha, inclui também cerca de 0,5% de proteínas, 0,6% de fosfolipídios e 0,09% de tocotrienóis como componentes não borracha. Proteínas representam cerca de 1-2% do peso do látex de *Hevea brasiliensis* sem estabilizante [30,31]. O látex não é um fluido homogêneo, cerca de 30% as proteínas do látex não estão homogeneamente dispersas, sendo encontrados no soro do látex e também estão associadas com organelas do látex que podem ser separadas por centrifugação [17].

O coágulo de borracha natural contém aproximadamente 6% de produtos não isoprênicos, como proteínas, lipídios, carboidratos e cerca de 0,2% de cinzas (principalmente de magnésio e fosfatos de potássio), restando de 93-95% de isopreno [32]. Outros compostos também têm sido relatados como, ésteres [33], aldeídos [34] e epóxidos [35].

A borracha natural é também matéria prima essencial para a fabricação de vários artefatos em transportes, indústrias e materiais bélicos [23,36]. Embora a borracha sintética obtida do petróleo possua composição química semelhante a da borracha natural, suas propriedades físicas são inviáveis para alguns manufaturados, como por exemplo: para luvas cirúrgicas, preservativos, pneus de automóveis e revestimentos diversos [19], além de ser uma fonte não renovável.

Segundo Marinho & Tanaka, [37] os compostos não isoprênicos presentes na borracha natural coagulada formam uma estrutura supramolecular que envolve interações do tipo ligação de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas, região com característica hidrofílica, ligadas a uma extremidade do poliisopreno e ésteres complexos, região com características hidrofóbicas, na outra extremidade do polímero [38], produzindo uma estrutura macromolecular complexa, conforme apresentado na Figura 1, podendo explicar o comportamento mecânico diferenciado em relação ao seu análogo sintético [39].



**Figura 1** - Estrutura supramolecular para a borracha natural [37].

A propriedade amorfa da borracha natural vem da longa cadeia isoprênica na forma *cis*, sendo a região na forma *trans* responsável pela cristalinidade deste material, como temos cerca de 10.000 unidades de repetição *cis* para cada unidade na forma *trans* na cadeia de borracha natural, o mesmo possui uma característica predominantemente amorfa.

### 1.2.1 - Composição do látex centrifugado

O número de frações obtidas por centrifugação é motivo de controvérsia, por exemplo, Moir [40] chegou a distinguir até nove frações de *Hevea brasiliensis* por ultracentrifugação do látex, porém através de centrifugação de alta velocidade três frações foram observadas por Cook e Sekhar [41,42]. Como mostrado na Figura 2, o látex de *Hevea* centrifugado, é separado em quatro frações, sendo:

- 1) a camada superior, que contém partículas de borracha;
- 2) complexo de Frey-Wyssling
- 3) soro C;
- 4) um sedimento amarelo acinzentado gelatinoso chamado de “fração de fundo” que consiste principalmente de lutóides.



**Figura 2** - Frações do látex obtidas por centrifugação.

As proteínas estão presentes em todas as frações do látex centrifugado, desempenhando as mais diversas funções e participando ativamente na biossíntese do látex [17]. Dos vários constituintes não isoprênicos do látex, a qual recebe a maior atenção são as proteínas. O mais antigo relato da presença de proteínas em látex foi realizado por Spencer em 1908 [43], que detectou a peroxidase e catalase em dialisados de extrato aquoso de folhas de látex [44].

Há diferenças na distribuição das proteínas entre as principais frações do látex [29]. Archer e McMullen relataram que 20% das proteínas totais adsorvidos pelas partículas de borracha, 66% presentes no soro C e de 14% na fração inferior [30]. Mais tarde, os relatórios variaram com uma distribuição de 20%, 60% e 20% [45] e de 27,2%, 47,5% e 25,3% [46] para a fração borracha, soro C e inferior, respectivamente. A Tabela 1 mostra a distribuição média de proteínas nas frações do látex segundo Tata [31].

**Tabela 1** - *Distribuição média das proteínas nas frações do látex [31].*

Distribuição das proteínas nas frações do látex	
Fração do Látex	% Proteica
Partículas de borracha	25
Complexo de Frey-Wyssling	-
Soro C	43
Fração de fundo	32
Total	100

A fração de fundo embora seja considerada pela predominância de lutóides há também a presença de um soro, denominado soro B constituído de derivados menores e outras pequenas organelas [17,29]. Considerando que praticamente todas as proteínas presentes nas partículas de borracha e no soro C são

geralmente proteínas ácidas, o soro B tem uma mistura de proteínas ácidas e básicas [47].

#### 1.2.1.1 - Partículas de borracha

As partículas de borracha, que constituem entre 25-45% do volume de látex fresco de *Hevea brasiliensis* com diâmetro entre 50 Å e 3 µm [48]. As partículas são geralmente esféricas, mas partículas presentes em árvores maduras são muitas vezes irregulares [49,50].

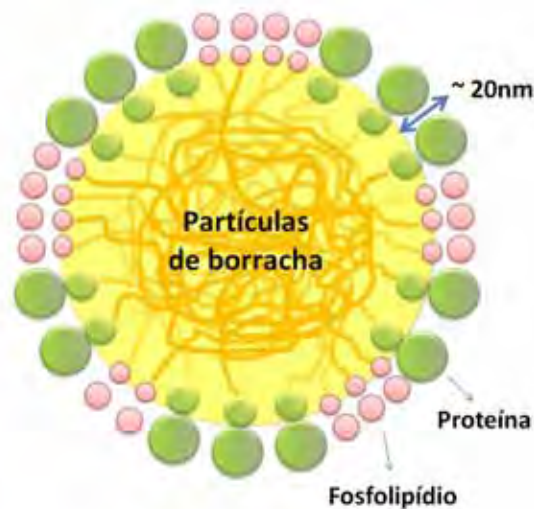
As moléculas hidrofóbicas de borracha são separadas do meio hidrofílico por um filme complexo de proteínas e lipídios [51]. Hev b 1 e Hev b 3 são as principais proteínas localizadas na superfície das partículas de borracha [29]. Hev b 1 é encontrada sobretudo nas partículas de borracha maiores (geralmente acima de 0,4 µm de diâmetro), enquanto que Hev b 3 é mais abundante em partículas de borracha menores [17,52].

Como mostra a Figura 3, as partículas de borracha compreendem uma esfera que consiste em partículas de borracha e estão rodeadas por invólucros esféricos compostos por fosfolípidos e proteínas [48]. A existência de proteínas, em associação com os fosfolípidos na superfície das partículas de borracha foi reconhecida já em 1953 por Bowler [53]. Ele atribuiu que esta camada proteína-fosfolípido confere uma carga negativa para a partícula de borracha, contribuindo assim para a estabilidade coloidal das partículas de borracha [29].



**Figura 3** - Modelo de uma partícula de borracha envolvida por uma camada proteína-fosfolipídio [53].

Um novo modelo foi recentemente proposto para elucidar a nanoestrutura da superfície de partículas de borracha natural, conforme mostrado na Figura 4. Foi evidenciado uma estrutura de núcleo-invólucro de partículas de borracha natural formando um núcleo hidrofóbico rodeado por moléculas de proteínas e fosfolipídios, com cerca de 20 nm de espessura [54].



**Figura 4** - Novo modelo proposto de uma partícula de borracha envolvida por uma camada proteína-fosfolipídio [54].

Todos os modelos anteriores sobre a estrutura da superfície de partículas de borracha têm sido incapazes de proporcionar qualquer medição direta

da espessura desta camada de superfície e do arranjo molecular das proteínas e dos fosfolípidos. Com base na análise estrutural anterior em conjunto com esta constatação, o novo modelo proposto sugere que a camada de superfície da borracha natural composta principalmente por proteínas, que constituem 84% da superfície, com fosfolípidos que constituem apenas 16% [54]. A distribuição do tamanho das partículas tem sido relatadas entre 0,30 e 0,70  $\mu\text{m}$  [55].

### **1.2.1.2 - Soro C e Complexo de Frey-Wyssling**

O soro C do látex natural contém diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. O soro C refere-se ao meio aquoso no qual todas as organelas presentes no látex estão suspensas, contendo uma grande variedade de proteínas associadas com o metabolismo celular [17]. Várias enzimas específicas para o látex, tais como as enzimas associadas com a via de biossíntese de borracha, também são encontradas no soro C. As proteínas presentes no soro C são numerosas, provavelmente na casa das centenas [29].

O principal carboidrato encontrado é o quebrachitol (ou 1-metil inositol) e até o momento não se sabe qual a sua função biológica no látex. A principal implicação dos carboidratos no látex é que estes são oxidados microbiologicamente a ácidos voláteis (fórmico, acético e propiônico) se o látex não é adequadamente preservado, sendo uma medida da qualidade do látex [56].

Os complexos Frey-Wyssling são esféricos, com diâmetro entre 4 e 6  $\mu\text{m}$  e ligados com uma membrana dupla [57]. A partícula é uma organela contendo pequenas partículas de lípidos e os carotenóides, a cor amarela é devida à presença de pigmentos carotenóides. A estrutura altamente complexa destes componentes sugere que têm uma função importante no metabolismo do látex. Uma

vez que as partículas contêm plastoquinona e plastochromanol em que o  $\beta$ -caroteno é sintetizado.

### 1.2.1.3 - Lutóides e Soro B

Os lutóides são os componentes não isoprênicos mais abundantes no látex de *Hevea brasiliensis*, são membranas com vacúolos esféricos limitados por corpos com diâmetro entre 0,5 e 3  $\mu\text{m}$  [57]. Possuem um dos fatores que conduzem à interrupção do fluxo de látex, porque a reação de diluição que ocorre no interior dos vasos pode causar inchaço dos lutóides osmoticamente sensíveis [42,58].

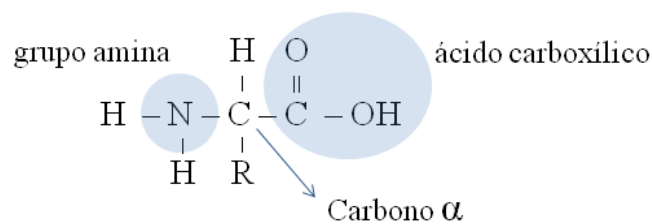
Dentro dos lutóides existe um meio aquoso, denominado soro B contendo substâncias dissolvidas tais como ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas e açúcares. Organelas menores, por exemplo ribossomos e retículo endoplasmático, também estão presentes [59]. O látex soro B pode ser obtido por congelamentos e descongelamentos repetidas da fração inferior do látex centrifugado [60]. Em comparação com o soro C, há um pequeno número de proteínas (menos de 20 peptídios maiores), com uma única proteína, heveína, tornando-se de 50-70% do total do soro B das proteínas solúveis [17,31,61].

### 1.2.2 - Estruturas proteicas

As proteínas possuem uma conformação estrutural bastante diversificada devido à característica anfótera dos aminoácidos (podem ser cátions ou ânions) e também pela capacidade de modificação das interações eletrostáticas do grupamento R observada em vários aminoácidos.

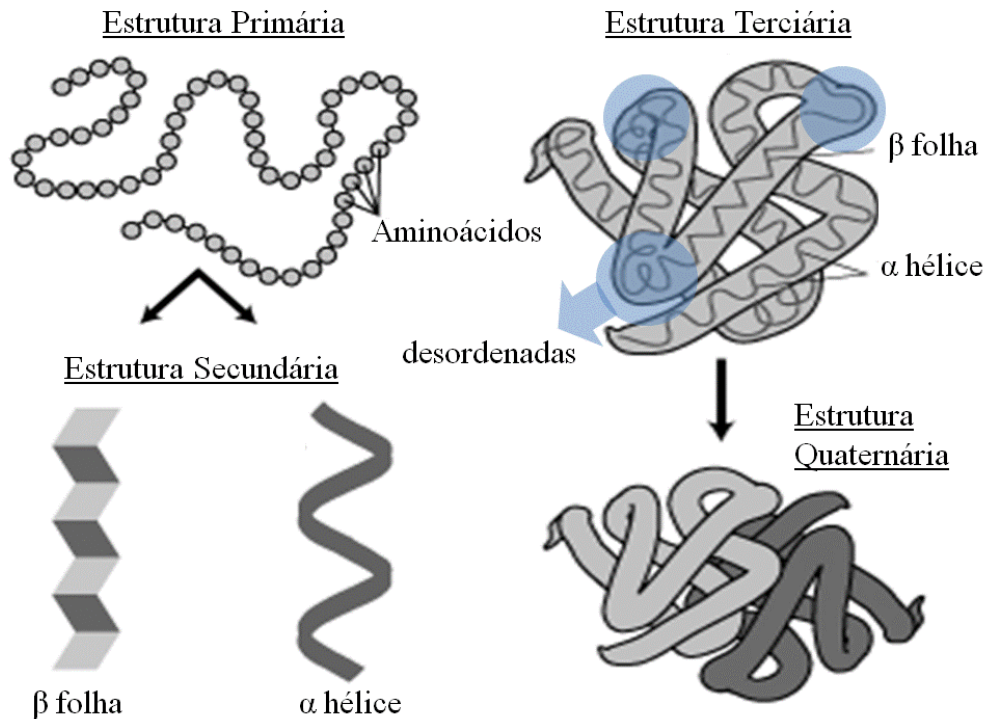


O carbono  $\alpha$  ( $C\alpha$ ), por ser quiral, garante livre rotação em seu eixo, dando flexibilidade da molécula proteica, conferindo uma grande versatilidade à proteína, o que faz de sua estrutura tridimensional o ponto chave para sua função. Esta flexibilidade pode ser limitada pelas interações químicas entre os grupamentos do grupo R e as cadeias peptídicas, seja intermolecular ou com compostos químicos presentes na composição original da proteína. A Figura 5 mostra uma estrutura de um peptídeo.



**Figura 5** - *Estrutura de um peptídeo.*

As estruturas tridimensionais existentes nas proteínas são determinadas pela sequência de aminoácidos e pelo ângulo entre as ligações intermoleculares [62]. Devido à complexidade das estruturas moleculares das proteínas, é conveniente dividi-la em níveis distintos de organização, como mostrado na Figura 6.



**Figura 6** – Níveis de organização das estruturas proteicas.

A estrutura primária diz respeito à sequência de aminoácidos, dada pelos nucleotídeos da molécula. Nesta estrutura são encontradas ligações peptídicas e eventualmente, dependendo da proteína, podem ser encontradas ainda as pontes de dissulfeto.

A estrutura secundária é a forma que a cadeia polipeptídica assume no espaço, que pode ser de  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -folha. A conformação em  $\alpha$ -hélice é conferida através do ângulo de torção que os resíduos de aminoácidos apresentam na ligação peptídica, estabilizada por ligações de hidrogênio. Estruturas  $\beta$ -folha são possíveis graças a ligações de hidrogênio que ocorrem entre duas partes das cadeias polipeptídicas dentro da molécula proteica [63]. Uma proteína pode apresentar os dois tipos de organização secundária dentro de sua molécula.

Estruturas terciárias correspondem às relações da cadeia polipeptídica no sentido de estabilizar a conformação tridimensional. Muitos tipos

de interações químicas podem ocorrer dentro de uma molécula protéica para garantir a estabilidade das cadeias polipeptídicas. As mais fortes são as ligações covalentes. Há ainda a formação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações fracas de van der Waals.

A perda das estruturas secundária, terciária, quaternária da proteína ou rompimento de ligações peptídicas é denominada desnaturação da proteína [64]. O calor, radiações eletromagnéticas, ácidos e bases, solventes orgânicos, íons de metais pesados são fatores que provocam a desnaturação.

### **1.2.3 - Clone RRIM 600**

O látex usado neste trabalho foi colhido de árvores da seringueira *Hevea brasiliensis*, clone RRIM 600, o mais plantado na região do Planalto do Estado de São Paulo, por apresentar bom desempenho e vigor na produção. É um clone secundário desenvolvido pelo *Rubber Research Institute of Malaysia* – RRIM. Apresenta árvores altas, com caule vertical e de rápido crescimento quando jovem. A alta produção é seu ponto de destaque, sendo um dos que apresenta maior produtividade de borracha seca [23].

Todas as árvores de um mesmo clone, sob as mesmas condições ambientais, apresentam baixa variabilidade. Outro ponto importante a considerar no clone é a uniformidade das propriedades do látex [23].

### 1.3 - Biomateriais

Um biomaterial é definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de origem sintética ou orgânica, capaz de ser utilizado por um período de tempo, como parte ou todo de um sistema, para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente tecidos, órgãos ou funções do corpo humano [65,66]. A classificação dos biomateriais depende da sua natureza química, dividindo-se em biomateriais naturais que se subdividem homólogos (quando originados do próprio indivíduo, como é o caso das pontes de safena), autólogos (quando originados de outras pessoas) e heterólogos (quando originados de animais e aproveitados em implantes ou cirurgias) ou biomateriais sintéticos que incluem implantes cirúrgicos, e que se dividem em metálicos (ferrosos e não ferrosos), cerâmicos, polímeros e compósitos, e que venham a substituir parcial ou integralmente a função original dos materiais biológicos [67].

As principais características dos biomateriais são biocompatibilidade, não ser tóxico nem carcinogênico, apresentar bioestabilidade, propriedades mecânicas adequadas, peso e densidade adequados, ter custo relativamente baixo, ser reprodutível e de fácil fabricação. Com a experiência no uso destes materiais através dos anos, chegou-se a conclusão que biomateriais modernos não devem ter apenas a função de preenchimento de espaço [67]. Devem estar associados a uma resposta biológica particular, disparada por sinais originados em nível molecular que incluem: correntes elétricas, distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação ou propriedades físico-químicas locais particulares [68], características estas que podem ser introduzidas por arranjos

especiais de grupos funcionais sobre uma estrutura polimérica, reações de reticulação, propriedades particulares de superfície e arranjos macromoleculares.

### 1.3.1 - Utilização do látex como biomaterial

A atividade angiogênica encontrada em alguns trabalhos que estudaram as membranas de borracha natural de *Hevea brasiliensis* é de grande importância, já que nas últimas décadas vários estudos foram realizados, com diversos materiais [69-78], no sentido de identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo e também a busca de substâncias com atividade angiogênica.

Fátima Mrué, em 1994, na Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP) iniciou testes de membranas de borracha natural em cães, no qual perceberam que a borracha natural era capaz de induzir a angiogênese e a neoformação. Em dez dias, os animais tinham seus esôfagos totalmente reparados e expeliam a prótese junto com as fezes.

Desde sua descoberta como biomaterial, as membranas de borracha natural, tem sido objeto de vários estudos, sendo suas propriedades físicas, microarquiteturais e de biocompatibilidade determinadas [79]. Este biomaterial mostrou-se inovador com excelentes resultados na cicatrização de úlceras crônicas e na reconstituição de esôfagos e tímpanos perfurados, observando a neoformação vascular evidente ao redor das próteses, mostrando a possibilidade de neoformação tecidual [10,80], sendo que a biocompatibilidade do látex natural, em forma de prótese esofágica, foi investigada e constatada, não demonstrando qualquer indício de manifestação alérgica [79,81]. Estudos mostraram, clínica e imunologicamente pela dosagem de IgE sérica, que a biomembrana é segura como curativo para

úlceras cutâneas, não induzindo reações de hipersensibilidade entre os voluntários de baixo e alto risco, nem entre os pacientes ulcerados [82].

A biomembrana de borracha natural foi utilizada em 420 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, portadores de perfuração de tímpano, com sucesso em 98% versus 70% quando comparado com a cirurgia convencional (implante da fáschia do músculo temporal) [83].

Em estudos onde foi implantada a membrana de borracha natural no esôfago e na parede abdominal de cães, sendo removida uma área de 6 a 10 cm<sup>2</sup> de tecido e substituído cirurgicamente por esta membrana, foi observado o poder de indução da angiogênese, bem como a promoção da adesão celular e a formação de matriz extracelular provisional favorecendo o processo de reparação tecidual, não sendo observado o desenvolvimento de fibrose em qualquer dos casos estudados [84].

O comportamento da membrana de borracha natural também foi estudado como substituto parcial do pericárdio em 16 cães. Os animais foram observados por 345 dias, e após este período ocorreu a regeneração do pericárdio nativo, demonstrando que o material mostrou-se adequado para a substituição parcial do pericárdio [85].

Próteses de borracha natural foram utilizadas em diferentes tecidos, apresentando resultados satisfatórios como prótese arterial [86]. Com o êxito das aplicações da membrana em modelos animais, sua utilização em humanos foi iniciada em lesões cutâneas, onde foram realizados tratamentos de úlceras de perna com a utilização da membrana de borracha natural [79]. Os pacientes eram portadores de úlceras com mais de 2 meses de instalação e maiores que 1 cm. Os

autores observaram sinais evidentes de estímulo à granulação visualizada sob o aspecto clínico e com confirmação histopatológica, associada à redução dos sintomas, especialmente da dor nas úlceras crônicas de perna.

Pesquisas desenvolvidas no Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP apontaram, depois de testes feitos em animais, que é possível a recuperação de artérias cardiovasculares por meio de utilização de membranas de borracha natural [87]. Recentemente descobriram que o látex de borracha natural pode ser aplicado como um poderoso gel antirugas e possível aplicação para estimular a produção de cabelos. Neste tratamento houve uma redução em cerca de 80% das rugas na região da testa e dos olhos, em apenas um mês [88].

Foi observado que membrana de borracha natural favorece a cicatrização conjuntival e a angiogênese quando submetida a testes “in vivo” utilizando a conjuntiva ocular em coelhos, demonstrando que o material é potencialmente um promissor recurso terapêutico de reconstrução da conjuntiva ocular [89].

A liberação controlada de drogas também foi estudada utilizando a borracha natural como matriz polimérica, no qual pode ser eficaz no processo de encapsulamento do fármaco. A membrana de borracha natural foi utilizada para entregar óxido nítrico [90] e metronidazole, um poderoso agente anti-protozoários. O tempo de liberação de metronidazole da membrana *in vitro* foi aumentada de 6 para 8 horas [91].

Em 2003 foi fundada a empresa Pele Nova Biotecnologia S/A, para que após um ano torna-se disponível a produção e comercialização do Biocure, primeiro produto em base da tecnologia biomembrana de borracha natural, com aprovação de registro e comercialização pela Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA), merecendo o primeiro lugar no Prêmio Finep de Inovação Tecnológica 2005.

Estudos, obtidos pelo Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo-USP de Ribeirão Preto através da equipe de pesquisadores coordenados pelo Professor Dr. Joaquim Coutinho Netto, mostraram que as membranas de borracha natural obtidas a temperaturas inferiores a 85°C contribuem para a formação de angiogênese e de neoformação [92]. Portanto, a temperatura de tratamento do látex, na obtenção das membranas, é o fator mais importante, pois a evaporação a baixa temperatura preserva a conformação nativa das proteínas e uma reorganização dos constituintes fosfolipídicos [93].



## **CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

### **2.1 - Materiais**

Toda a vidraria utilizada neste trabalho foi, primeiramente, lavada com água e detergente neutro e enxaguada com água destilada, em seguida água deionizada e seca em estufa a 85 °C.

### **2.2 - Coleta do Látex**

O látex de borracha natural está contido no sistema de vasos lactíferos situados no córtex da árvore formando um feixe helicoidal ascendente, que leva o alimento para as partes superiores da árvore. Este sistema encontra-se logo abaixo da casca da árvore, e os vasos apresentam uma inclinação para o lado direito, no sentido vertical ascendente [3]. A Figura 7 mostra uma imagem da sangria em meio espiral para a coleta do látex.



Crédito/Mariselma Ferreira

**Figura 7 - Coleta do Látex.**

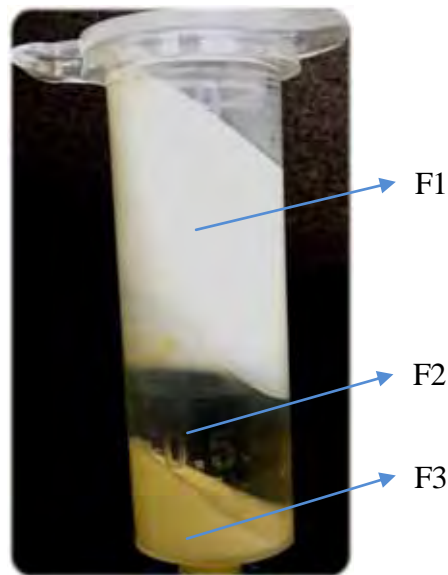
A sangria da árvore foi realizada com uma faca em forma de U, a partir de uma altura de 1,20 m do solo, de maneira a atingir convenientemente os vasos lactíferos; o ângulo é de 30° para baixo, em relação a horizontal e, a cada corte remove-se cerca de 1,5 mm de córtex.

O látex foi extraído de diferentes árvores de seringueira, clone RRIM 600, na Fazenda Indiana (-22° 9' 30.22", -51° 15' 28.80") localizada na região de Presidente Prudente-SP.

O látex é diretamente armazenado em frascos envolvidos por gelo desde o momento da coleta para reduzir sua velocidade de coagulação, pois o mesmo não é estabilizado com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) ou outro agente estabilizador.

### **2.3 - Látex Centrifugado**

O látex foi centrifugado, para separação de suas fases, em uma centrífuga da marca Fanem, tipo Microhemato, modelo 2410. A centrífuga possui 24 tubos de 1,5 mL cada, uma inclinação fixa de 45° e rotação máxima de 14000 rpm. A fração de menor densidade (F1), no qual é predominantemente composta por partículas de borracha (isopreno) [94]. Há também uma fração aquosa intermediária composta por um soro (F2) que contém íons, proteínas, carboidratos, açúcares e outras substâncias solúveis [94,95]. A fração de fundo (F3) contém os lutóides, organelas ricas em soro catiônico, que promovem a coagulação do látex, além de funções bioquímicas como o controle do pH e de patógenos [4,96]. Portanto existem três frações distintas resultantes da centrifugação do látex, estas frações são mostradas na Figura 8.



**Figura 8** – *Três frações constituintes do látex centrifugado.*

F1 – Fração superior, contendo partículas de borracha;

F2 – Fração intermediária, sendo o soro C e complexo de Frey Wyssling do látex;

F3 – Fração de fundo, contendo os lutóides e soro B.

O látex foi centrifugado inicialmente por uma hora, em seguida retirada a fração superior e novamente centrifugado por meia hora para a retirada das outras frações.

#### **2.4 - Liofilização e tratamento térmico**

Após centrifugação as frações do látex foram liofilizadas utilizando um liofilizador Edwards modelo E-C modolyo, gentilmente disponibilizado pela Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva, do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT - UNESP de Presidente Prudente. As amostras foram expostas ao ar seco e congeladas pela exposição a uma corrente de ar frio. A seguir, a água do material é removida por sublimação em uma

câmara de vácuo. O método consiste no congelamento do produto sob vácuo, quando ocorre sublimação.

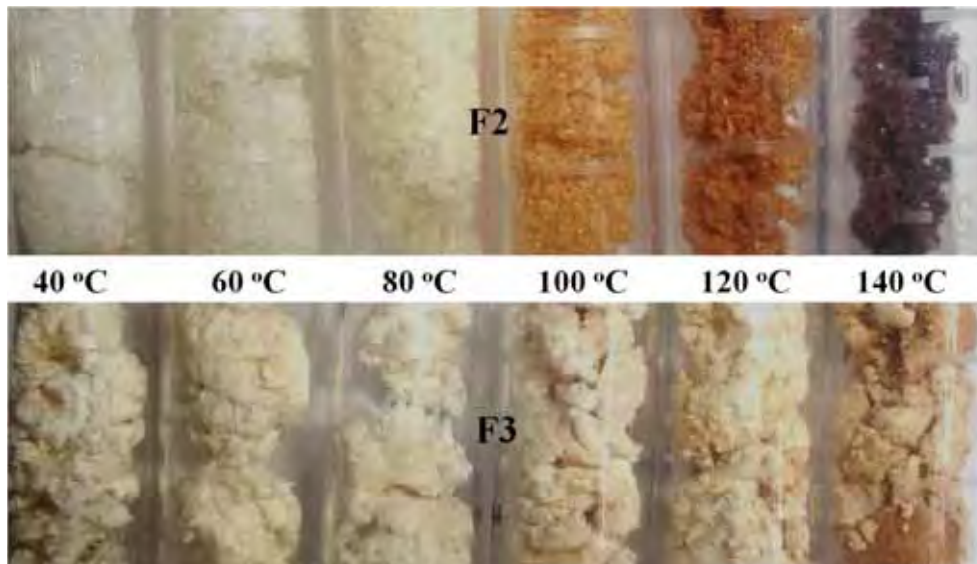
Após a liofilização as frações, F2 e F3, foram tratadas termicamente, em estufa no tempo de 6 horas, 60, 80, 100, 120 e 140 °C e novamente liofilizadas. As amostras a 40 °C não foram tratadas termicamente em estufa, esta temperatura é resultado do processo de centrifugação. Para facilitar a discussão neste trabalho estas frações e suas variações termicamente tratadas foram identificadas conforme a Tabela 2, adotando o seguinte critério:

- Fração XABC, sendo X a fração a ser mencionada, ou seja, 2 ou 3 e ABC o valor da temperatura de tratamento térmico. Assim a amostra 2060, refere-se à amostra da fração F2 tratada termicamente a 60 °C e a amostra 3060, referindo-se a amostra da fração F3 termicamente tratada a 60 °C.

**Tabela 2** – Identificação das amostras.

Temperatura	Frações	
	F2	F3
40 °C	2040	3040
60 °C	2060	3060
80 °C	2080	3080
100 °C	2100	3100
120 °C	2120	3120
140 °C	2140	3140

A Figura 9 apresenta uma imagem das frações, F2 e F3, tratadas termicamente. Nota-se uma grande variação na coloração destes materiais, indicando que algum tipo de degradação ou reação química está ocorrendo, principalmente para a fração F2.



**Figura 9** - Frações F2 e F3 tratadas termicamente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C.

Os componentes do soro e da fração de fundo são motivos de controvérsia, pois a literatura reporta sobre látex de *Hevea brasiliensis* estabilizados o que pode promover a ruptura de lutóides que estão presentes na fração de fundo assim migrando para a fração do soro [97].

## 2.5 - Métodos de Caracterização

Neste item são apresentados os métodos utilizados para investigar as propriedades e características das frações do látex centrifugado.

### 2.5.1 - Teor de Nitrogênio, Proteína Bruta e Lipídios

A análise do teor de proteína bruta foi baseada no método Kjeldahl. Este método consiste de três etapas:

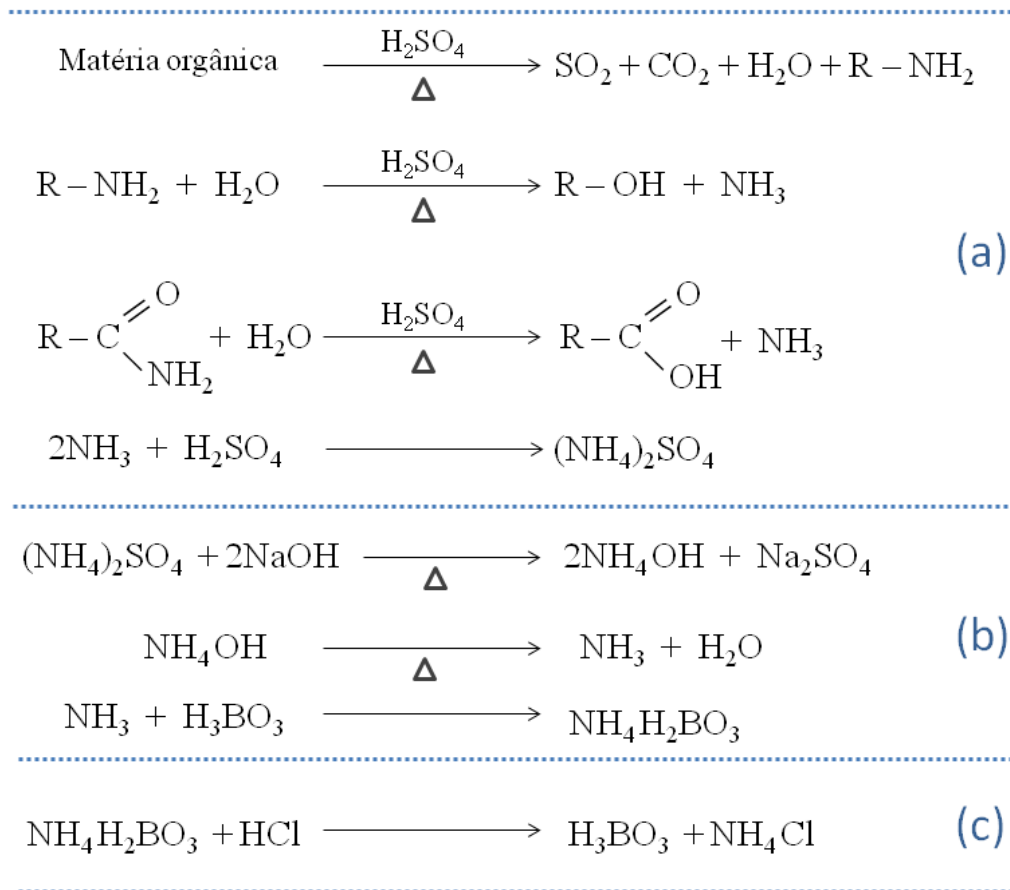
(1) digestão das amostras, onde o nitrogênio orgânico é transformado em amônia e os componentes orgânicos são convertidos em gás carbônico e água;

(2) destilação, onde a amônia é separada e recolhida em uma solução receptora;

(3) titulação, que é a determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

Foram adicionadas massas das frações F2 e F3, entre 0,1 e 0,25 g, em tubos digestores, nos quais foram adicionados cerca de 2g de mistura catalítica (100,0 partes de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro; 1,0 parte de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; e 0,8 parte de selênio metálico em pó) e 10,0mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, os tubos foram levados ao digestor Büchi B-412 (Büchi, Suíça), no qual utilizou patamares de aquecimento, iniciando a 50 °C e aumentando 50 °C após 20 minutos, até atingir o patamar a temperatura de 350 °C, formando uma solução amarelo-incolor.

A solução foi resfriada à temperatura ambiente e realizou-se uma destilação, em destilador Büchi B-323 (Büchi, Suíça) reagindo com hidróxido de sódio 40%, sendo todo nitrogênio contido na amostra convertido em amônia, em seguida coletada em erlenmeyer contendo solução de ácido bórico 4% e indicador (mistura de verde de bromocresol e vermelho de metila). A solução resultante foi titulada com ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> padrão (fc: 0,83). As reações das etapas de digestão, destilação e titulação são apresentadas na Figura 10.



**Figura 10** - Reações para determinação de proteína bruta: (a) digestão; (b) destilação e (c) titulação das amostras.

A quantidade de nitrogênio total da amostra foi obtida através da seguinte equação:

$$\%N = \frac{V \cdot M \cdot f \cdot 14 \cdot 100}{m}$$

onde:

$\%N$  = porcentagem de nitrogênio total da amostra;

$V$  = Volume de HCl gasto na titulação ;

$M$  = Molaridade da solução padrão de HCl;

$f$  = Fator de correção do padrão;

$m$  = massa da amostra (mg).

Na determinação da proteína bruta, multiplicou-se o valor do nitrogênio total (%N) encontrado pelo método de Kjeldahl por um fator que converte o nitrogênio em proteína (FE), sendo de 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém cerca de 16% de nitrogênio em sua cadeia [98]. A expressão abaixo é utilizada para determinar a proteína bruta:

$$\%PB = \%N \times FE$$

onde:  $\%PB$  = porcentagem de proteína bruta contida na amostra;

$$FE = \text{Fator específico (6,25)}.$$

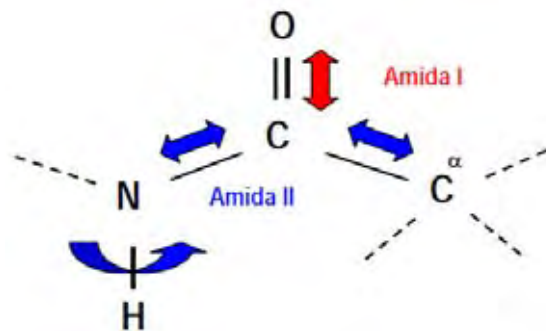
Foi utilizado o método descrito por Franz Von Soxhlet, em 1879 que é um processo contínuo de extração de lipídios, com éter de petróleo como solvente para que, por repetidas lavagens, o óleo e a gordura constituintes das frações fossem extraídos. Foram utilizadas cerca 4 g de cada fração e fixada uma quantidade de 20 sifonagens, sendo que cada uma levava cerca de 5 minutos a temperatura constante. Após o término do período de extração e arrefecimento das frações lipídicas das amostras, estas foram concentradas, a vácuo, em evaporador rotativo.

### **2.5.2 - Espectroscopia por FT-IR modo ATR**

Os dados espectrais de absorção no infravermelho de polímeros são geralmente interpretados em termos de vibrações de uma unidade de repetição estrutural [99]. As bandas de Amida I e II são as bandas mais proeminentes da cadeia de uma proteína, no qual nove bandas são características, sendo as Amidias A e B e Amidias I-VII.



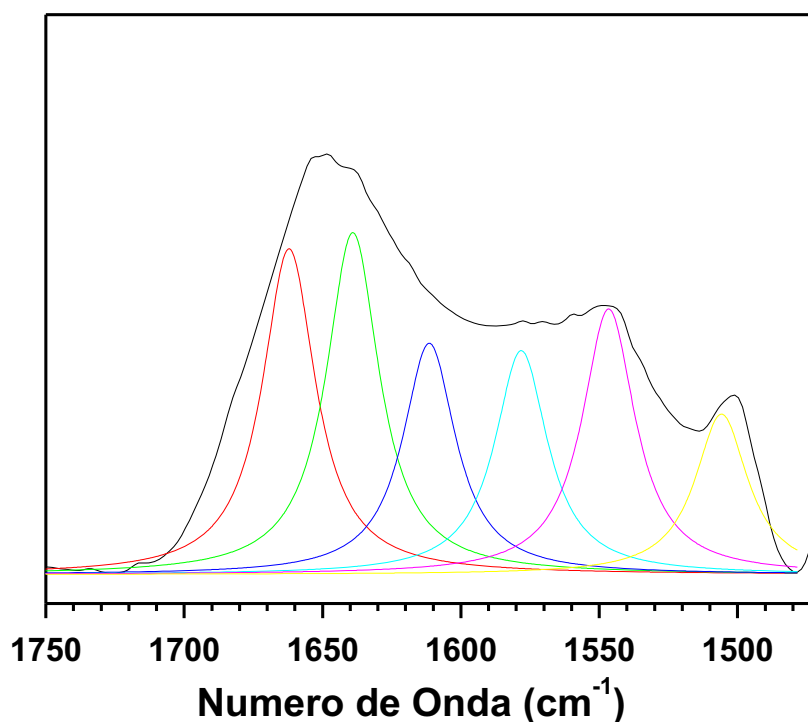
A região espectral de Amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), é devido quase inteiramente a vibrações de estiramento  $\text{C} = \text{O}$  de ligações peptídicas. A banda de Amida II, por outro lado, deriva principalmente no plano de flexão  $\text{NH}$  e a partir da vibração de alongamento  $\text{CN}$ , que mostra menor sensibilidade conformacional da proteína a sua homóloga de amida I [100], conforme mostra a Figura 11. Outras bandas de amidas vibracionais são muito complexas, dependendo dos detalhes do campo de força, a natureza das cadeias laterais e de ligação de hidrogênio, que, por conseguinte, são de pouca utilidade prática nos estudos conformacionais da proteína [101].



**Figura 11** - Modos vibracionais de Amida I e II.

Em geral, proteínas e polipeptídios têm bandas fortes e largas, que devido à sobreposição de picos, são difíceis de diferenciar. A razão para isto é o grande número de diferentes aminoácidos que formam uma proteína complexa. Em geral, as alterações espectrais são observadas para acompanhar a desnaturação de proteínas. As estruturas secundárias de proteínas podem adotar uma forma em espiral ( $\alpha$ -hélice), uma cadeia estendida ( $\beta$ -folha) e uma disposição aleatória (estrutura desordenada). As regiões espectrais das Amidas I, II e III são afetadas pelo arranjo estrutural da proteína [102]. O ajuste de curva (*curve fitting*) foi utilizado para as bandas de Amida I e II para determinar o arranjo estrutural de uma proteína. A quantidade relativa de cada arranjo estrutural de um domínio é

diretamente proporcional à área do seu componente equipada, conforme mostra a Figura 12.



**Figura 12** – Espectro de FTIR deconvoluído da fração 2060 juntamente com os componentes individuais de ajuste.

Atualmente, a tarefa de ajuste de curva pode ser facilmente realizada por meio da utilização de programas de computador. Neste trabalho foi utilizado o programa *ORIGIN*<sup>®</sup> para o ajuste de curva. Esta abordagem pode ser utilizada para outras bandas, tais como a banda de amida III [102].

As frações, F2 e F3, do látex foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), com módulo de reflexão total atenuada, marca Bruker modelo Vector 22, na região entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras.

### **2.5.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro VARIAN INOVA de 9.4 T, operando na frequência de 100.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Em todos os experimentos utilizou-se uma sonda equipada com rotação em torno do ângulo mágico de 5 mm modelo Jackobsen. Os espectros de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando a técnica de polarização cruzada (CPMAS) com tempo de contato de 1 ms. Nos espectros CPMAS o sinal da parte rígida do sistema é evidenciado (tipo sólido), enquanto que o sinal de moléculas com mobilidade molecular mais alta (tipo líquido) é suprimida. As medidas de RMN foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá (UEM) no Estado do Paraná, cedido através do Prof. Dr. Edgardo Alfonso Gomez Pineda.

### **2.5.4 - Difração de raios X (DRX)**

As medidas foram feitas num equipamento Shimadzu, modelo XRD-6000, radiação  $K\alpha$  do Cu com comprimento de onda  $\lambda = 0,154060$  nm, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. A varredura foi feita num intervalo de ângulos  $2\theta$  de  $10^\circ$  a  $40^\circ$ , em modo de varredura contínua, com passo de  $0,02^\circ$  e velocidade de varredura de  $0,2^\circ/\text{min}$  com uma acumulação de 1s/ponto. Os picos de difração de cada composto foram indexados usando as fichas cristalográficas do banco de dados JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards – International Center for Diffraction Data) disponíveis no software Crystallographica Search-Match versão 2.1. O equipamento de difração de raios X foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Silvio Rainho Teixeira.

### **2.5.5 - TG acoplado com infravermelho (TG/FT-IR)**

Esta é uma técnica dinâmica na qual a perda de massa de uma amostra é medida continuamente, enquanto a temperatura é aumentada a uma taxa constante. Nestas análises utilizou-se o equipamento da marca NETZSCH modelo 209, na faixa de temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) até  $600^{\circ}\text{C}$ , para verificar o comportamento térmico dos compostos envolvidos nas frações F2 e F3, bem como as amostras destas frações aquecidas a 40, 60, 80, 100, 120 e  $140^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma massa de aproximadamente 10 mg, com uma razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , em um cadinho de alumina em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$  e ar sintético (20%  $\text{O}_2$  e 80  $\text{N}_2$ ), com fluxo de 25 mL/min. Os gases evaporados nos estudos termogravimétricos são canalizados, para uma câmara que faz as medidas de absorção no infravermelho (FTIR) simultaneamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.5.6 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial foi utilizada para verificar o comportamento térmico dos compostos envolvidos nas frações, F2 e F3, bem como as amostras destas frações aquecidas a 40, 60, 80, 100, 120 e  $140^{\circ}\text{C}$ . Para a desnaturação de proteínas, tais mudanças são endotérmicas e estão associadas com a quebra de ligações de hidrogênio, expondo os grupos hidrofóbicos da proteína, que é refletida pela área do pico endotérmico, representado pela mudança da entalpia ( $\Delta H$ ) e correlacionado com a extensão da estrutura requisitada de uma proteína [103,104].

Foi utilizado um equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial DSC, marca Netzsch, modelo DSC 204 – Phoenix. Para realização das

medidas foi utilizado cadinho de alumínio com tampa furada no centro, razão de aquecimento de 5°C/min num intervalo de temperatura de -40°C a 200°C em atmosfera inerte de N<sub>2</sub>, e de atmosfera oxidante de ar sintético (80% N<sub>2</sub> e 20% O<sub>2</sub>), com fluxo de 25 mL/min e massa de aproximadamente 10 mg. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.5.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida é poderosa na separação de proteínas pelo peso molecular. Foi utilizado o gel de poliacrilamida a 12% para a separação das proteínas solúveis do extrato bruto das frações F2 e F3, aquecidas a 40, 60, 80 e 100°C e assim observar, previamente, as alterações do padrão de resposta para as proteínas contidas nestas frações. Os géis obtidos foram com coomassie blue [105]. O cálculo da massa molecular das proteínas diferencialmente expressas foi através de comparação com o marcador de proteínas SM 0441, que possui proteínas de tamanhos que variam de 6,5 a 212 kDa.

A corrida eletroforética foi realizada a 150 V e a 149 mA no tempo de 120 minutos, após a corrida o gel foi corado por 18 horas.

### **2.5.8 - Dosagem de citocinas**

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídios que regulam a atividade celular, principalmente do sistema imune. As interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF), produzidos por células do sistema imunitário, desempenham o papel de estabelecer a comunicação e uma resposta biológica entre células de defesa. O efeito biológico depende da citocina, as pró-inflamatórias

participam de reações inflamatórias agudas, crônicas e reparo tecidual, contribuindo para que a inflamação aconteça e as interleucinas anti-inflamatórias agem impedindo que a inflamação se prolongue. Além disso, elas iniciam e controlam o processo de cicatrização, com estimulação da repitalização, angiogênese e deposição de colágeno [106].

Para a caracterização das frações F2 e F3 foram utilizadas as principais interleucinas reconhecidas por participar do processo pró-inflamatório: a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e as que participam do processo anti-inflamatório são: IL-8 e IL-10.

#### **2.5.8.1 - Obtenção de células peritoneais “ex-vivo”**

As células peritoneais foram obtidas para a realização das dosagens de citocinas, no qual os camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com 3 mL de solução de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%. Após três dias, os animais foram sacrificados em câmara de vidro contendo clorofórmio. Após a morte e exposição do peritônio, abrindo-se a pele do animal, injetou-se 5,0 mL de tampão fosfato estéril (PBS pH 7,2), com seringa e agulha estéreis, realizando-se leve massagem manual. As células foram coletadas do peritônio com a mesma seringa e agulha e acondicionadas em um tubo estéril (Corning, Inc), sendo mantidas em banho de gelo. Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se três vezes a 200 g durante 5 minutos em centrífuga à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram resuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1U/mL de estreptomicina, 1U/mL de penicilina e  $5 \times 10^{-2}$  M.  $\beta$ -mercaptoetanol e assim designado como RPMI completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo

Neubauer (Boeco, Germany), utilizando-se corante vital líquido de Lázarus, sendo ajustado para a concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. As células assim ajustadas foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , com tensão constante 5 %  $\text{CO}_2$  para formação do tapete celular, ou seja, cultura de macrófagos peritoneais.

#### **2.5.8.2 - Processo de dosagem de IL-1 e IL-6.**

O método habitualmente utilizado é o *ELISA* (Imunoensaio enzimático), do tipo sanduiche e em geral a resposta gerada é em pg/mL (picogramas de interleucina por mililitro de sangue).

O método de ELISA do tipo sanduíche é feito seguindo os seguintes passos: Efetua-se a incubação de  $2 \mu\text{g/mL}$  de anticorpo IL-1 $\beta$  (anticorpo de captura – S5/B3) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8,2) –  $100 \mu\text{L/poço}$  (placa de 96 poços) por 16 – 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Depois efetua-se a lavagem da placa com solução salina 0,1% v/v. Bloqueia-se a reação com o anticorpo IL-1 $\beta$ , com uma solução de albumina bovina a 1% (diluída em solução salina). Adiciona  $100 \mu\text{L}$  por poço, durante 2 horas.

Adiciona-se o anticorpo anti-interleucina IL-1 $\beta$  (anticorpo de detecção – S329/B4) numa concentração de 1:1000 em uma solução tampão contendo 1% de soro de carneiro, por uma hora à temperatura ambiente.

Incubou-se uma solução de avidina-peroxidase e dihidroclorato de ortofenilenediamina em solução tampão,  $100 \mu\text{L/poço}$  por 5 a 20 minutos, à temperatura ambiente, respectivamente. Esta reação é parada com uma solução de um molar de ácido sulfúrico. A leitura é feita por espectrofotometria com filtro de 490 nm.

**2.5.8.3 - Processo de dosagem de IL-8 e IL-10.**

Os procedimentos para a dosagem de IL-8 e 10 são os mesmos utilizados no ELISA-sanduíche para dosagem de IL-1 e 6, o diferencial é a substância reveladora que é outra peroxidase (é a estreptavidina-peroxidase) que usa como substrato a biotina associada à IL-8 e 10.

A placa de microtitulação deve ser revestida com um anticorpo monoclonal específico para IL-8 e 10. As amostras são adicionadas aos poços de microtitulação adequadas juntamente com uma preparação de anticorpos policlonais específicos para IL-8 e 10 conjugados à biotina. Em seguida, A estreptavidina-peroxidase (HRP) é adicionada a cada microplaca e deixa-se incubar. Então, uma solução de substrato TMB (um cromógeno) é adicionada a cada poço. Somente aqueles poços que contêm IL-8 e 10, o anticorpo conjugado com biotina e estreptavidina conjugado vai apresentar uma alteração na cor. A reação enzima-substrato é encerrada pela adição de uma solução de ácido sulfúrico e mudança de cor é medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 450 nm.

**2.5.8.4 - Processo de dosagem de *TNF- $\alpha$* .**

A suspensão celular de  $5 \times 10^6$  células/mL foi incubada com a concentração ideal de cada amostra e fração. Após incubação de 24 horas em estufa a 37°C, com tensão constante 5% CO<sub>2</sub>, a placa foi centrifugada a 4°C por 20 min a 1000 g e os sobrenadantes estocados em freezer a -20°C até o momento da determinação do TNF- $\alpha$ .



O ensaio baseia-se na capacidade do TNF- $\alpha$  em lisar células tumorais [107]. As células utilizadas foram da linhagem L929, cultivadas em meio Eagle, com 7,5% de soro fetal bovino inativado.

As células L929 foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma densidade de  $4 \times 10^5$  cels/mL de meio RPMI-1640C e acondicionadas em uma placa (100  $\mu$ L/cavidade) e incubadas 18 h a 37°C, em tensão constante de CO<sub>2</sub> 5%. Após incubação, 100  $\mu$ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados com os extratos, obtidos anteriormente, foram adicionados em cada cavidade e novamente incubados por 24 horas, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram então desprezados e as células coradas com cristal violeta (0,2% em metanol 20%), por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado lauril-sulfato de sódio para solubilizar as células coradas e a absorbância de cada orifício foi obtida a 495nm em leitor de ELISA (Multiskan Ascent Labssystem).

### **2.5.9 - Síntese de Óxido Nítrico (NO)**

A suspensão celular de macrófagos peritoneais de camundongos ajustada a  $5 \times 10^6$  células/mL e as amostras foram diluídas em meio RPMI completo (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular). Com uma concentração de 100  $\mu$ L da suspensão celular/cavidade e 100  $\mu$ L da diluição de cada amostra em placa estéril de 96 cavidades planas. Em outras cavidades são acondicionados 100  $\mu$ L de LPS (lipopolissacarídeo) de *E. coli* soro tipo 0111: B4 a 10  $\mu$ g/mL em meio RPMI-1640C, como controle positivo ou 100  $\mu$ L de meio sem a presença de amostras, como controle negativo. Incuba-se a placa em estufa a 37°C, com exaustão constante de CO<sub>2</sub> a 5% por 24 horas. Após esse período, foram transferidos 50  $\mu$ L para nova

placa e adicionados, em cada cavidade, mais 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess, composto de N-(1-naftil)-etilenodiamino, sulfonilamida e ácido ortofosfórico [108]. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura é feita em espectrofotômetro UV/Visível, com filtro de 540nm. As concentrações de nitrito são obtidas a partir de uma curva padrão prévia, preparada com concentrações micromolares conhecidas de  $\text{NaNO}_2$ .

### CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados os resultados de caracterização das frações, F2 e F3, do látex de *Hevea brasiliensis* tratados termicamente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140 °C, através das técnicas de Kjeldahl, Soxhlet, espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Difração de raios X, termogravimetria (TG) acoplado com FT-IR (TG/FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), eletroforese, dosagens de citocinase síntese de óxido nítrico.

#### 3.1 - Teor de Nitrogênio e Proteína bruta

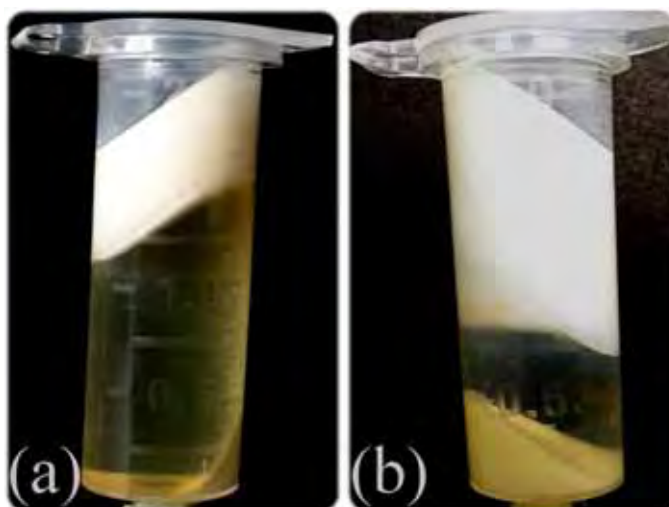
Os resultados obtidos através do método Kjeldahl e da análise do teor de proteína bruta, utilizando as equações descritas no item 2.5.1 são mostrados na Tabela 3. Nota-se que há uma porcentagem maior de proteína bruta na fração F3.

**Tabela 3** – Valores obtidos para o cálculo do teor de nitrogênio e proteína bruta.

	m (g)	V (mL)	%N	Média (%)	%PB	Média (%)
F2	0,1326	0,66	0,4	0,4±0,1	2,6	2,4±0,2
	0,2005	0,85	0,3		2,2	
F3	0,1021	0,76	0,6	0,6±0,1	3,9	3,7±0,3
	0,1986	1,33	0,6		3,5	

Os resultados obtidos pela literatura [31,40,42] mostram que a fração F2 apresenta maior porcentagem de proteínas, porém estes resultados são de amostras de látex estabilizados com hidróxido de amônia. Quando ocorre a adição de estabilizantes ao látex a fração de fundo diminui à medida que ocorre a ruptura de lutóides e o soro B é libertado para o soro C, portanto na armazenagem, a fração de fundo tende a reduzir drasticamente o seu conteúdo proteico, no qual podemos

facilmente evidenciar através da Figura 13 do látex centrifugado (a) estabilizado com hidróxido de amônio e (b) sem adição de estabilizante.



**Figura 13** – Imagem do látex centrifugado (a) estabilizado e (b) sem estabilizante.

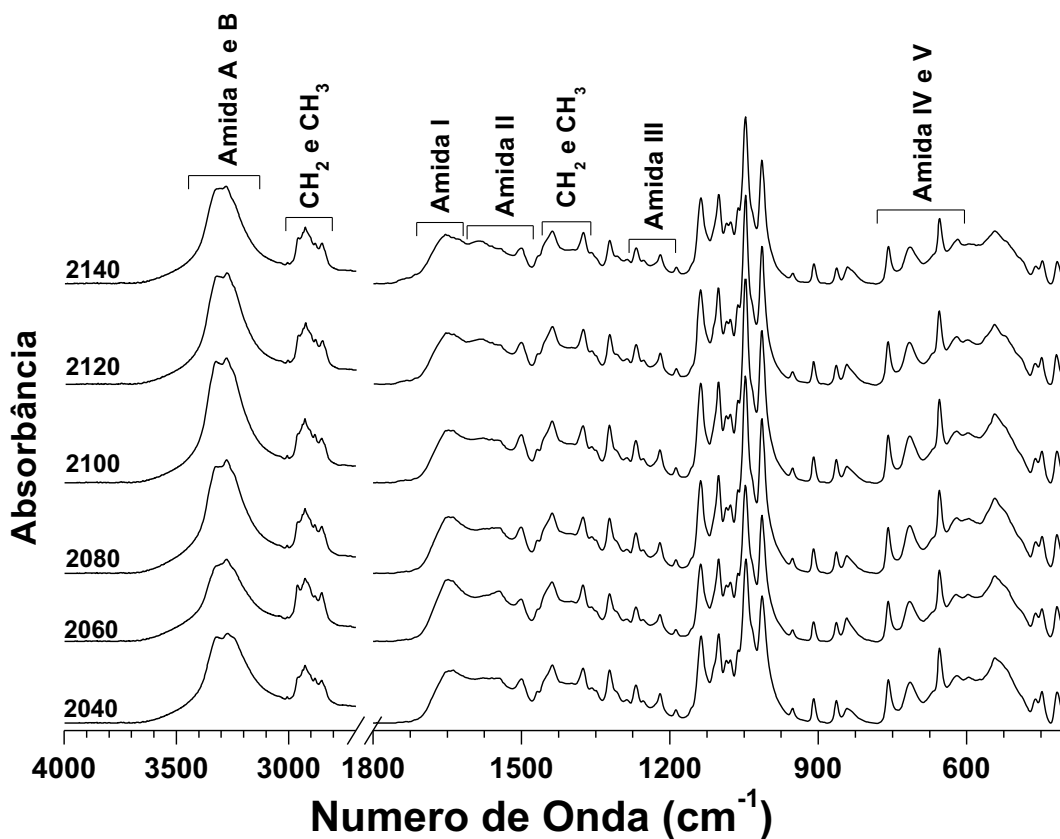
O teor de lipídios obtidos através do método de Soxhlet são apresentados na Tabela 4 para as frações F2 e F3.

**Tabela 4** – Valores obtidos para o teor de lipídios.

	F2	F3
massa da amostra (g)	4,64 g	4,25 g
massa do balão vazio (g)	114,31 g	102,14 g
massa (balão + lipídios) (g)	114,48 g	102,28 g
massa lipídios (g)	0,16±0,05 g	0,14±0,03 g
% de lipídios	3,5±0,2 %	3,3±0,3 %

### 3.2 - Espectroscopia no infravermelho (FT-IR) no modo ATR

Os espectros de FTIR no modo ATR, Figuras 14 e 15, mostram bandas de absorção características de polipeptídios e proteínas, para as frações F2 e F3, respectivamente, sendo que para as amostras da fração F2 são mais proeminentes as bandas referentes à Amida A e B e para a fração F3 as bandas de Amida I e II.



**Figura 14** – Espectros de FTIR para a fração F2.

A região entre 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  está associada a contribuições dos mais diversos compostos existentes nas frações do látex, como grupos metílicos, carbonílicos, fosfolipídios, proteínas e também ao isopreno que pode estar interagindo com os compostos citados, tanto para as amostras da fração F2, como para F3.

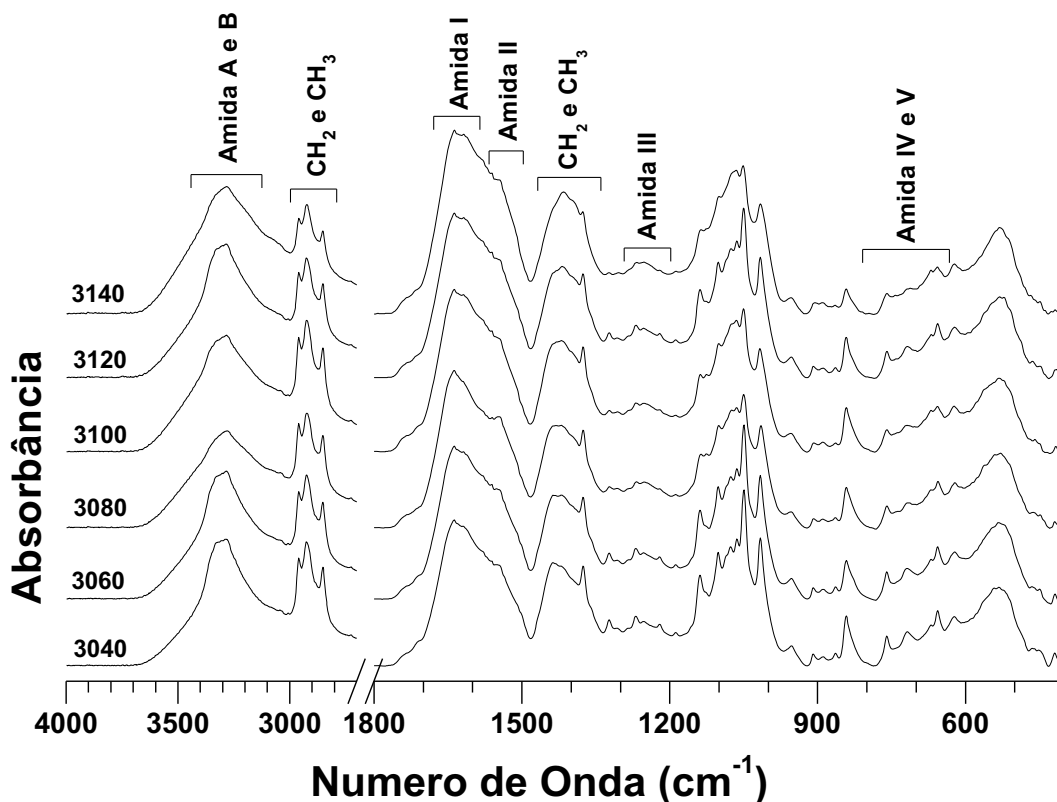


Figura 15 - Espectros de FTIR para a fração F3.

Nota-se pequenas diferenças entre os picos, presentes na banda, de Amida A e B para as amostras 2040, 2060, 2080, 2100, 2120 e 2140, como também é notado para as regiões de Amida I e II. As amostras 3040, 3060, 3080, 3100, 3120 e 3140 apresentam além das diferenças citadas para F2, como também nas regiões de Amida III, IV e V. As diferenças apresentadas nos espectros de ambas as frações são sutis, porém fornecem informações de altíssima relevância a cerca da conformação das estruturas secundárias de proteínas.

Os picos, atribuições e designações são apresentados na Tabela 5 para melhor compreensão e visualização dos compostos presentes nas frações não isoprênicas, F2 e F3, do látex de *Hevea brasiliensis*.

**Tabela 5** - Atribuições das bandas nos espectros de FTIR para grupos funcionais observados nas frações do látex.

Designação	F2 (cm <sup>-1</sup> )	F3 (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
Amida A e B	3327	3326	estiramento NH/OH
	3279	3280	
	3237		
CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>	2962	2960	estiramento simétrico e assimétrico
	2929	2926	
	2884		
	2850	2851	
Amida I	1663		estiramento C=O
	1638	1637 1614	
Amida II	1586		CN estiramento, NH flexão
		1560	
	1542	1543	
CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>	1499		CH flexão no plano
	1438	1437	
		1414	
	1375	1374	
Amida III	1322		CN estiramento, NH flexão
	1268	1267	
		1252	
Amida II	1219	1219	CN estiramento
	1138	1139	
CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>	1101	1101	C - O
	1086		
	1075	1074	CN/C-O estiramento
	1062	1063	
	1047	1050	
	1013	1015	
CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>	952	953	Estiramento -C-CH <sub>3</sub>
	840	841	δ C=C-H
Amida IV e V	757	757	NH e C=O flexão fora do plano
	715	715	
	653	653	

Para melhor elucidar o comportamento das frações F2 e F3, devido ao tratamento térmico realizado, utilizou-se o método de ajuste de curva (*curve fitting*) Lorentziana para identificar bandas sobrepostas para as regiões de Amida I,

II e III com o objetivo de analisar possíveis alterações na conformação das suas estruturas secundárias, conforme mostrado na Figura 12.

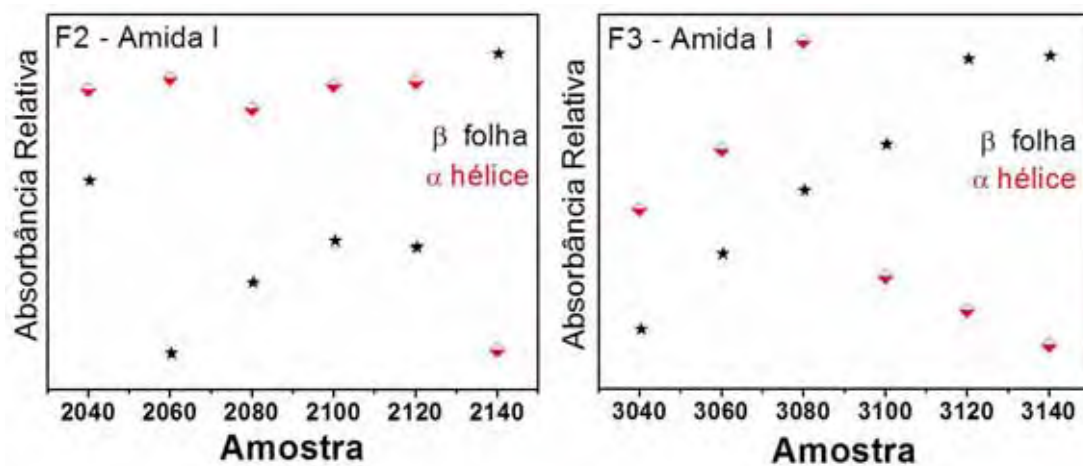
Foram analisadas as conformações do tipo  $\alpha$  hélice,  $\beta$  folha e estruturas desordenadas, os valores dos picos utilizados no ajuste das curvas são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Atribuições para absorções no FTIR para as amidas [101].

Designação	Pico (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
Amida I	1657	$\alpha$ hélice
	1637	desordenada
	1619	$\beta$ folha
Amida II	1585	desordenada
	1544	$\alpha$ hélice
Amida III	1268	$\alpha$ hélice
	1253	desordenada
	1220	$\beta$ folha

A Figura 16 apresenta o comportamento das frações F2 e F3 em relação à região de Amida I. Os resultados foram obtidos através da área do pico da estrutura  $\alpha$  hélice ou  $\beta$  folha dividida pela área do pico das estruturas desordenadas. Deste modo é possível analisar as mudanças conformacionais entre as estruturas proteicas, tendo um aumento das estruturas desordenadas, bem como uma diminuição das estruturas  $\alpha$  hélice e  $\beta$  folha, fatores considerados na desnaturação proteica [102].

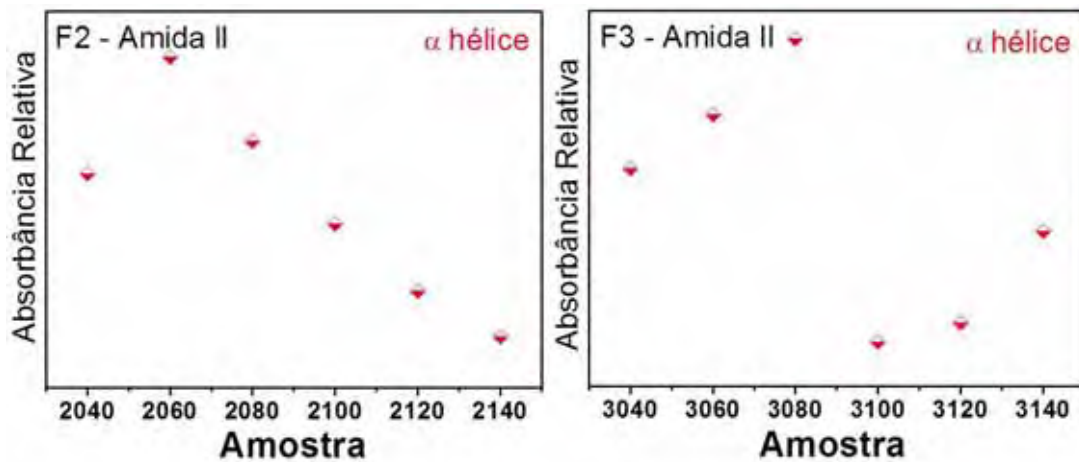




**Figura 16** – Comportamento das conformações proteicas  $\alpha$  hélice e  $\beta$  folha, em relação à região de amida I, para as frações F2 e F3.

Na região de Amida I, a estrutura  $\alpha$  hélice permanece estável reduzindo abruptamente para a amostra 2140, já para a fração F3, temos duas regiões distintas, sendo uma crescente para as amostras 3140, 3160 e 3180, e outra decrescente para as amostras 3100, 3120 e 3140, evidenciando que conformações  $\alpha$  hélice, sofrem maior interferência devido ao tratamento térmico para a fração F3. Estruturas  $\beta$  folha crescem em relação a estruturas desordenadas, possivelmente por sofrerem agregação com o tratamento térmico ou devido à perda de estrutura terciária e quaternária as estruturas  $\beta$  folha são evidenciadas na técnica de espectroscopia no infravermelho.

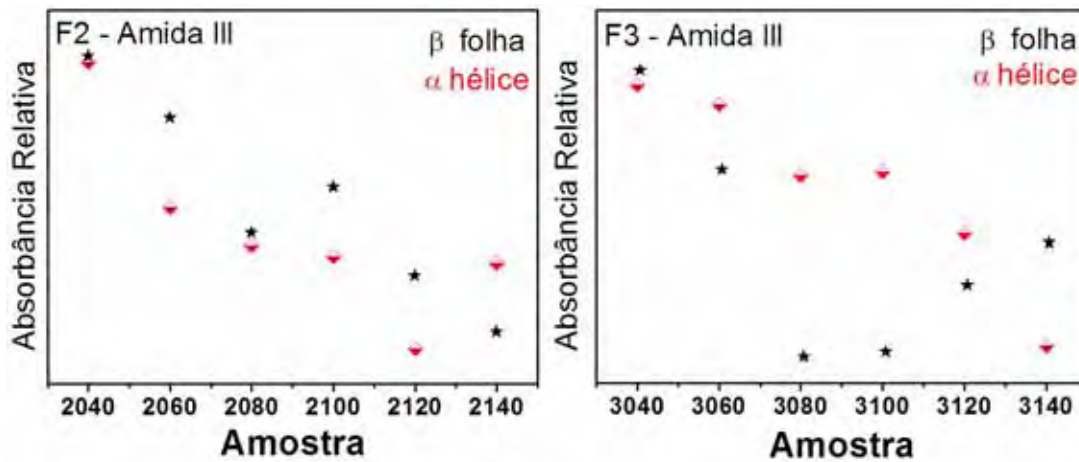
Na Figura 17 tem-se o comportamento da estrutura  $\alpha$  hélice em relação a estruturas desordenadas na região de Amida II. O comportamento da estrutura  $\beta$  folha não foi evidenciado nesta região.



**Figura 17** - Comportamento da conformação proteica  $\alpha$  hélice, em relação à região de amida II, para as frações F2 e F3.

Nota-se que na fração F2 ocorre um aumento na absorbância relativa da amostra 2040 para 2060 reduzindo significativamente para as amostras posteriores, pela contribuição no aumento de estruturas desordenadas. Na fração F3 o comportamento é semelhante ao analisado para a região de Amida I, com duas regiões distintas, sendo uma formada pelas amostras 3040, 3060 e 3080 e outra região com absorbância relativa reduzida, mas crescente, composta pelas amostras 3100, 3120 e 3140.

A Figura 18 apresenta o comportamento das frações F2 e F3 para a absorbância na região de Amida III. Esta região apresentou um comportamento decrescente em relação à estrutura  $\alpha$  hélice em relação às estruturas desordenadas para ambas as frações.



**Figura 18** - Comportamento das conformações proteicas  $\alpha$  hélice e  $\beta$  folha, em relação à região de amida III, para as frações F2 e F3.

A estrutura  $\beta$  folha também apresentou um comportamento decrescente, semelhante ao ocorrido com a estrutura  $\alpha$  hélice, porém para a fração F3 tal comportamento é notado nas amostras 3040, 3060 e 3080, tornando crescente para as amostras 3100, 3120 e 3140, mas não superior as amostras tratadas termicamente a 40 e 60 °C.

Analisando o comportamento das estruturas proteicas podemos observar que as estruturas  $\alpha$  hélice sofrem diminuição em sua concentração em relação às estruturas desordenadas, já as estruturas  $\beta$  folha podem sofrer agregação ou diminuição do seu conteúdo em relação às estruturas desordenadas. As estruturas primárias proteicas presentes no látex de *Hevea brasiliensis* são preservadas, porém ocorrem mudanças em relação a suas conformações,  $\alpha$  hélice,  $\beta$  folha e estruturas desordenadas.

O aumento das estruturas desordenadas fazendo com que as estruturas  $\alpha$  hélice,  $\beta$  folha tenham sua contribuição reduzida nas frações F2 e F3 pode ser um fator de grande importância para a redução do poder angiogênico do látex utilizado como biomaterial.

### 3.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As Figura 19 e 20 apresentam os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações F2 e F3 nas diferentes temperaturas de tratamento térmico. Ambas as frações apresentaram regiões de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em 185-163, 130-120, 90-65, 60-50, 35-15 ppm demonstrando a semelhança entre a natureza química dos compostos presentes nas frações do látex.

As ressonâncias entre 185-160 ppm são devido aos grupos carbonílicos de peptídios e cadeias laterais, sendo mais proeminentes para a fração F3, Figura 20. Os sinais entre 130-120 ppm podem ser devido a grupos aromáticos em cadeias laterais de aminoácidos. Esta observação coincide com o esperado para carbonos insaturados de ácidos graxos [6,109].

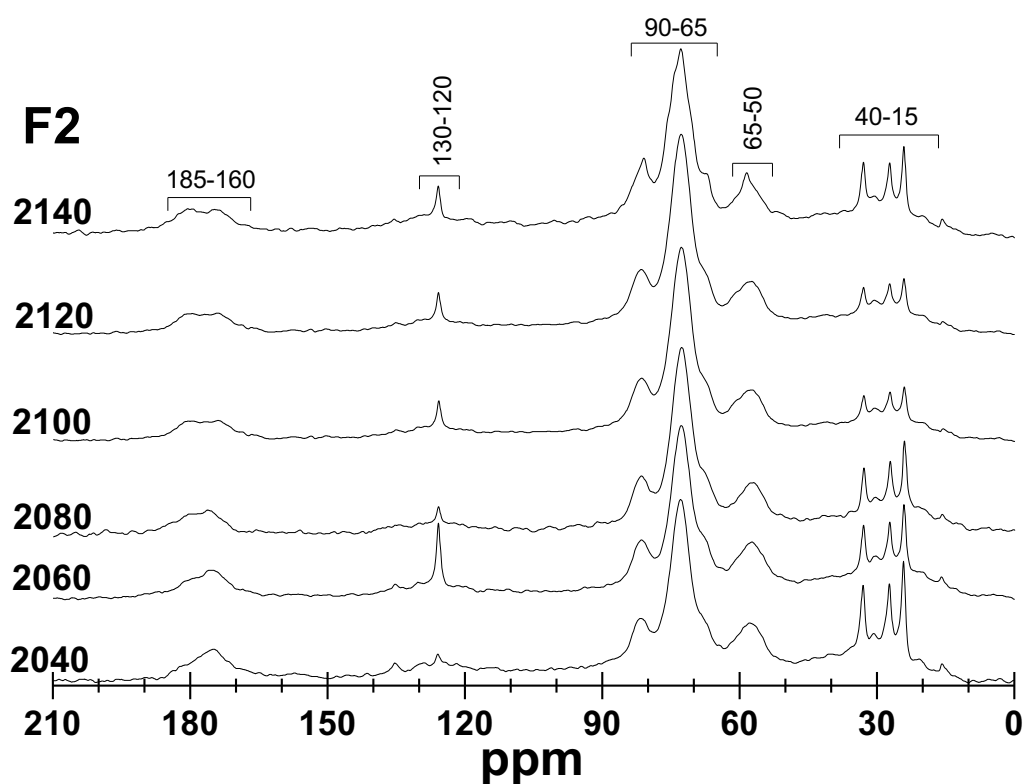
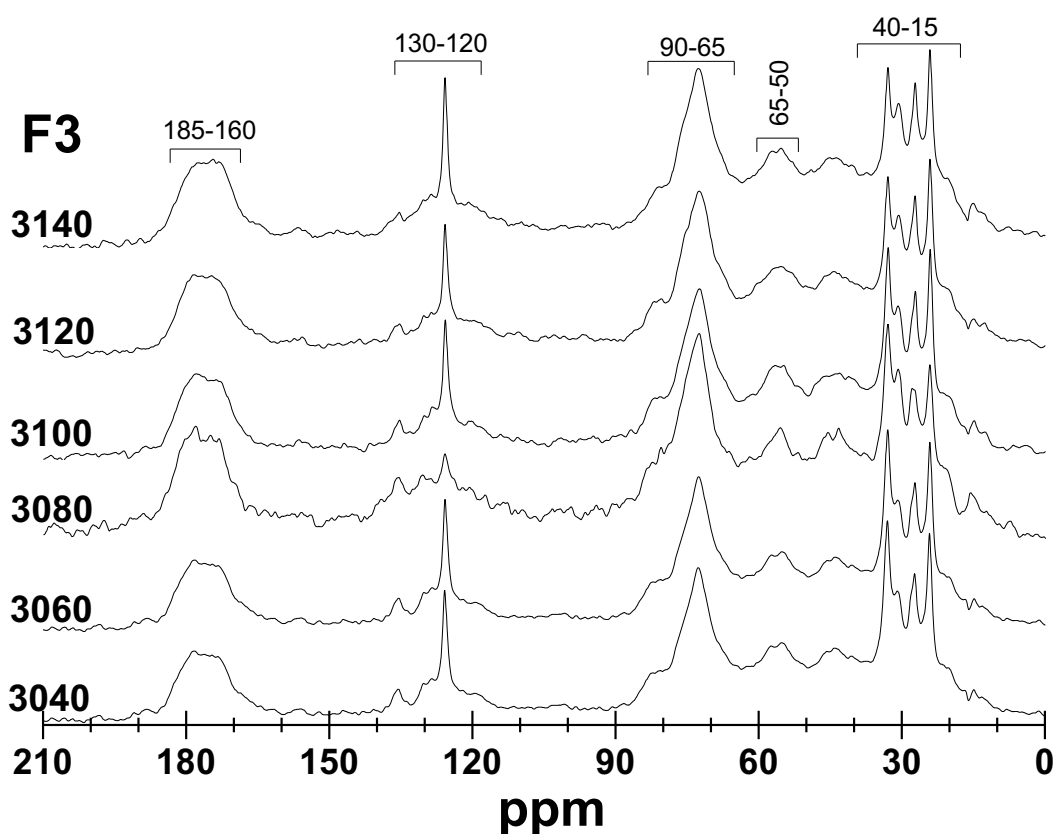


Figura 19 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS para as amostras da fração F2.

Vários picos largos na região de deslocamentos químicos entre 90-60 ppm estão associados a grupos químicos como  $-\text{CH}_2\text{N}^+$  e  $\text{R-CH-O-}$  [6], de diversos compostos presentes nestas frações, devido a sua largura e em grande concentração, sendo o pico de maior intensidade no espectro. A região entre 60-50 ppm também está associada a compostos com ligações do tipo  $\text{R-CH-O-}$ . A fração F3 apresentou um deslocamento químico em 137 ppm que tem sua intensidade diminuída de acordo com o tratamento térmico sofrido pela amostra este deslocamento está associado a grupos  $-\text{C}=\text{C}-$  [110].



**Figura 20** - Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  CP-MAS para as amostras da fração F3.

A região entre 40-15 ppm apresentam deslocamentos químicos bem definidos em 33, 27 e 24 ppm para a fração F2 e para a fração F3 deslocamentos em 33, 30, 27 e 24 ppm originam-se de carbono metilênico a grupos

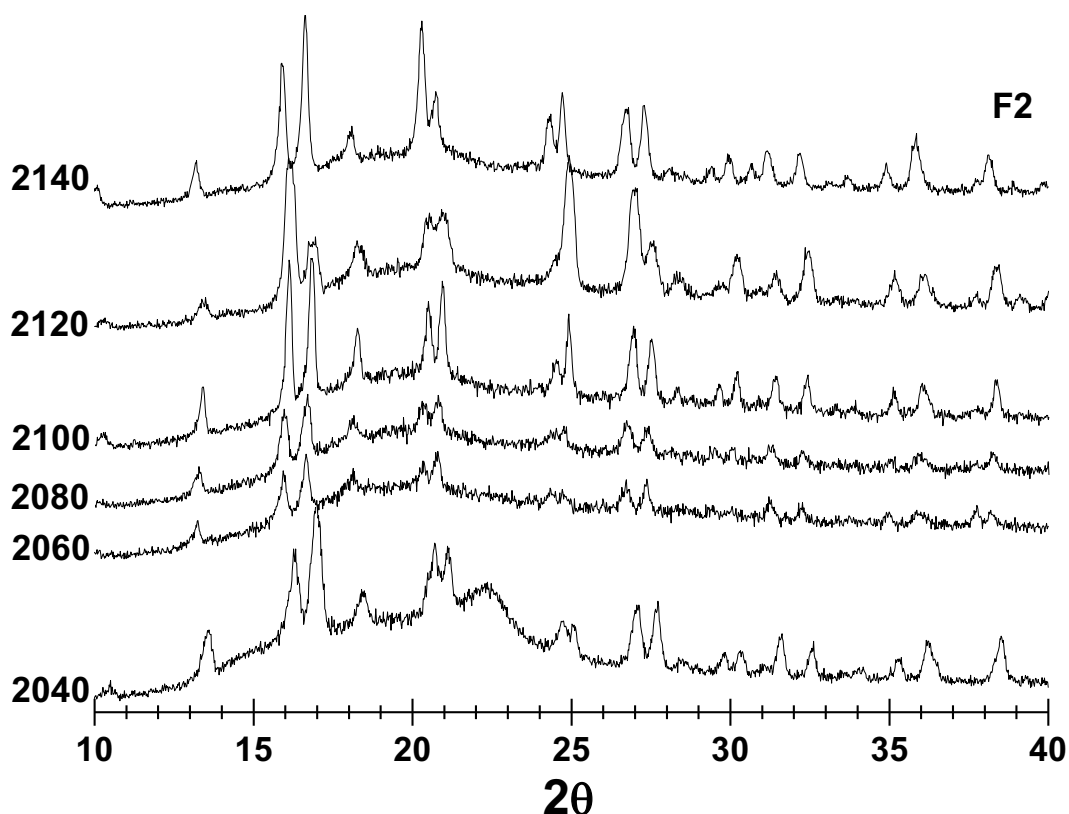
ligados a CH<sub>2</sub>, CH e CH<sub>3</sub> em longas cadeias alifáticas de origem variada, como ácidos graxos, lipídios, cadeias poliméricas e outros biopolímeros alifáticos.

A posição do sinal de 30 ppm, observada na fração F3, é consistente com os grupos metileno das porções dos componentes de ácidos graxos de fosfolipídios no corpo de membrana proteica. Na fração F2 ocorre uma diminuição da intensidade do pico conforme o aumento da temperatura utilizado no tratamento térmico. A técnica de RMN/CPMAS possui alta sensibilidade para regiões da cadeia de menor mobilidade, por este motivo os compostos como, proteínas e aminoácidos, identificados nos espectros, encontram-se em regiões de maior rigidez.

### **3.4 - Difração de raios X (DRX)**

Os resultados obtidos por difração de raios X foram comparados com dados existentes na base de dados contida no programa *Crystallographica Search-Match*. A fração F2 apresentou picos, Figura 21, no qual mostram que há compostos com certa organização de médio a longo alcance.

Os compostos presentes na fração F2 estão associados a sulfatos, fosfatos, nitratos e a compostos orgânicos, tais como estruturas carbônicas e compostos proteicos. Nota-se também a perda de estrutura amorfa, no qual os picos tornam-se mais bem definidos de acordo com o aumento da temperatura de tratamento térmico, esta perda de estrutura amorfa pode afetar o comportamento de compostos com atividades biológicas como a angiogênese.



**Figura 21** - Difratoograma de raios X para as amostras da fração F2.

Os picos centrados em  $2\theta = (16,3^\circ), (17^\circ), (24,8^\circ), (27,7^\circ), (30,3^\circ), (31,6^\circ), (36,2^\circ)$  e  $(38,5^\circ)$  estão associados a compostos com grupo amida [111,112]. Já os picos centrados em  $2\theta = (25,1^\circ)$  e  $(35,3^\circ)$  estão associados a compostos com a periodicidade de cadeia carbônica organizada [113]. Em  $(10,5^\circ)$  e  $(32,6^\circ)$  há picos característicos de óxidos de potássio, sódio e cálcio, em  $(18,4^\circ)$  e  $(21,2^\circ)$  associado a sulfato de bário, em  $(27,2^\circ)$  e  $(29,8^\circ)$  a grupos fosfatos, sendo predominantemente atribuídos a fosfatos de sódio. Tais compostos também foram evidenciados por Rippel em estudos do látex de *Hevea brasiliensis* sem a presença de hidróxido de amônio como estabilizante [114].

A Figura 22 apresenta, para a fração F3, um pico largo centrado em  $(20,8^\circ)$  e outro de baixa intensidade em  $(37,6^\circ)$ .

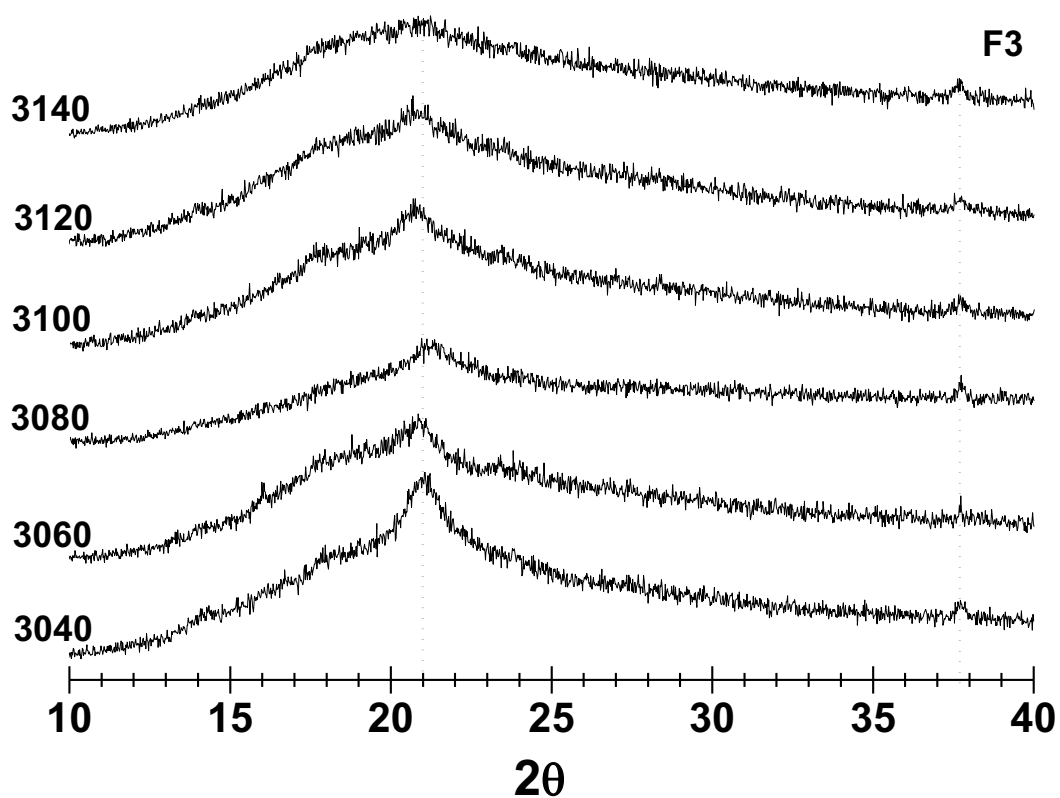


Figura 22 - Difratoograma de raios X para as amostras da fração F3.

A presença de um pico largo nesta região está associado a compostos com estrutura amorfa. Já o pico em  $(20,8^\circ)$  e em  $(37,6^\circ)$  mostra a presença de estruturas organizadas de grupo amida. Estas estruturas podem perder sua organização de acordo com o tratamento térmico realizado, visto que a estrutura amorfa é mantida perdendo somente a definição dos picos relacionados a compostos que podem estar associados a componentes bioativos e que também foram evidenciados por espectroscopia na região do infravermelho.

### 3.5 - Termogravimétrica (TG)

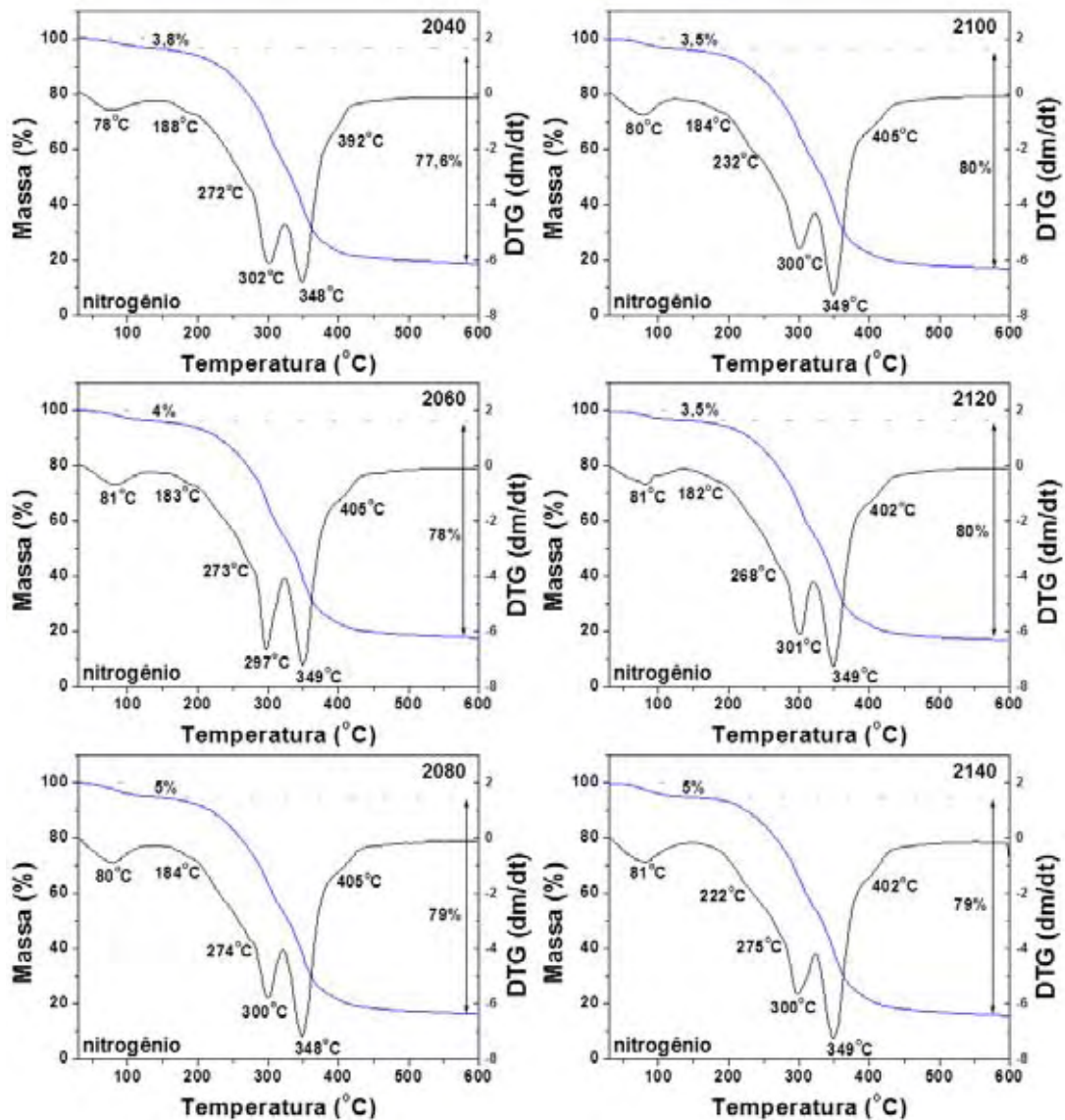
As Figuras 23 e 25 apresentam as curvas de TG e DTG das frações F2 e F3 em atmosfera de nitrogênio, respectivamente. No intervalo entre 30-150  $^\circ\text{C}$ , com picos variando entre 78-81  $^\circ\text{C}$  para a fração F2 e entre 58-76  $^\circ\text{C}$  para a



fração F3, mostrados nas curvas de DTG, nota-se uma perda entre 3,5-5%, em massa, distribuída irregularmente, para a fração F2, em relação a temperatura de tratamento térmico prévio, sendo que na fração F3 houve perdas entre 2,3-4,7%, em massa, reduzindo gradualmente em relação ao tratamento térmico.

Nas Figuras 26 e 27 são apresentadas as curvas de TG e DTG, em atmosfera de ar sintético, para as frações F2 e F3, respectivamente. As amostras apresentaram perdas entre 2,5-5%, distribuídas irregularmente, porém nota-se diminuição dos compostos presentes em relação ao tratamento térmico, no intervalo de temperatura entre 73-81 °C, observados nas curvas de DTG.

As perdas apresentadas para ambas às frações e atmosferas estão associadas à liberação de subprodutos de baixa estabilidade térmica dos componentes não borracha presentes no látex (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos) e a vapor d'água.



**Figura 23** – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F2 em atmosfera de Nitrogênio.

As perdas de massa, entre 180 e 290 °C, apresentadas para ambas as frações nas atmosferas de nitrogênio e ar sintético, podem estar associadas simultaneamente a reticulação e cisão de cadeias. No caso da reticulação ocorre uma perda muito pequena associada à formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos [115], a Figura 24 apresenta uma possível rota de reação [116].

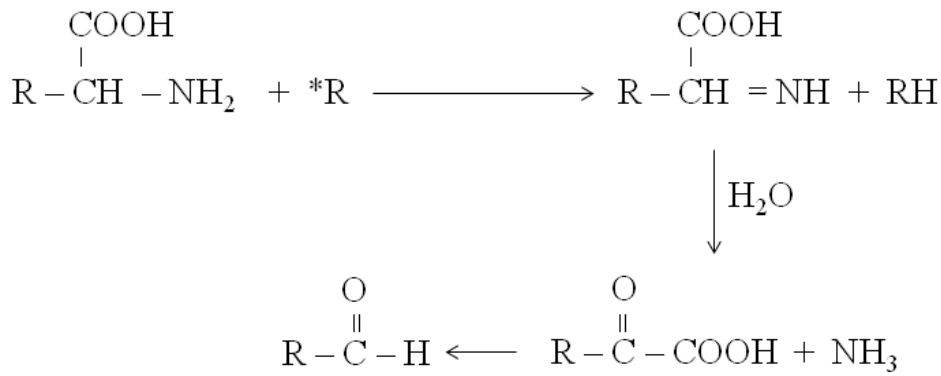


Figura 24 – Perda de massa associada à formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos.

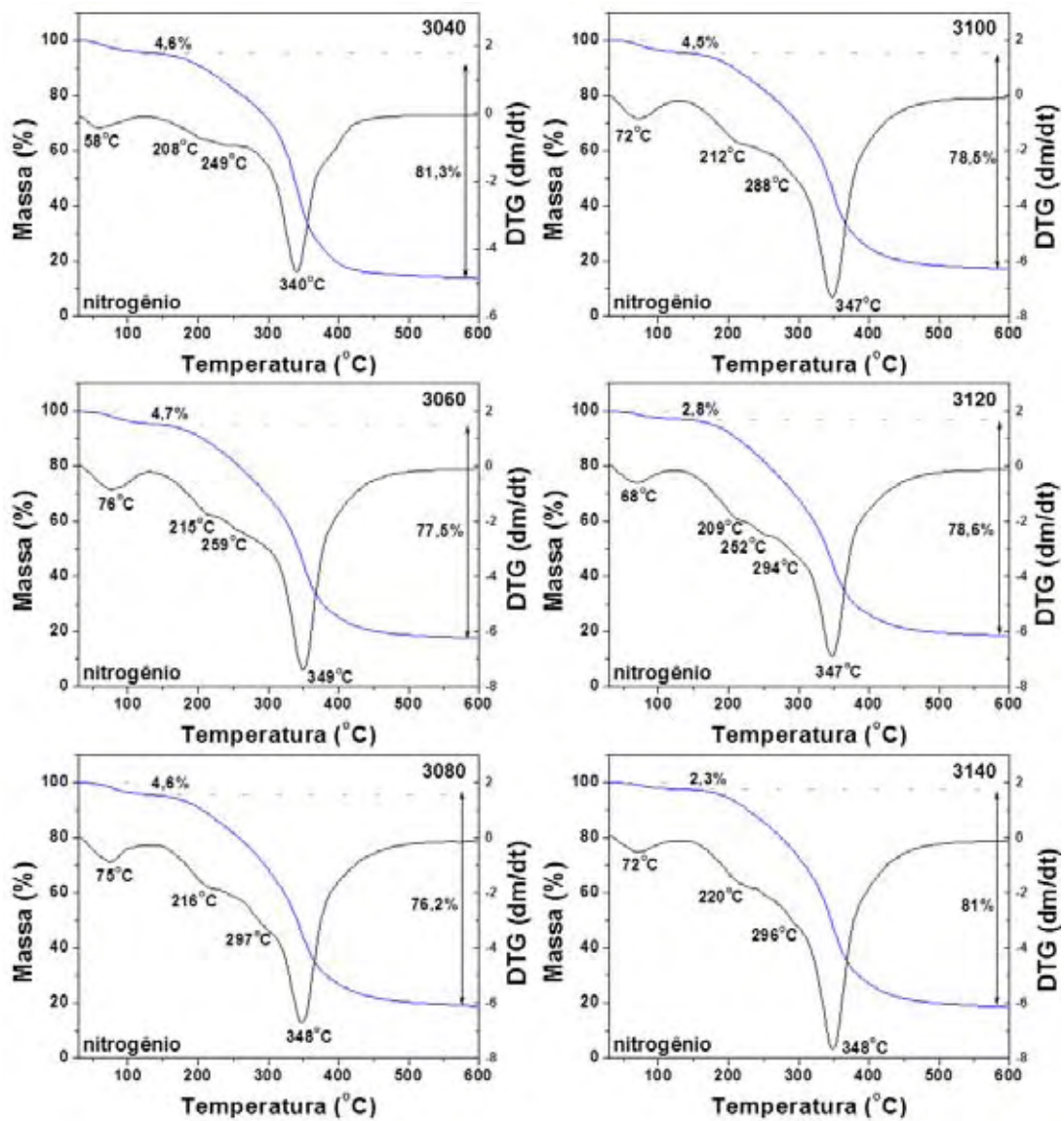
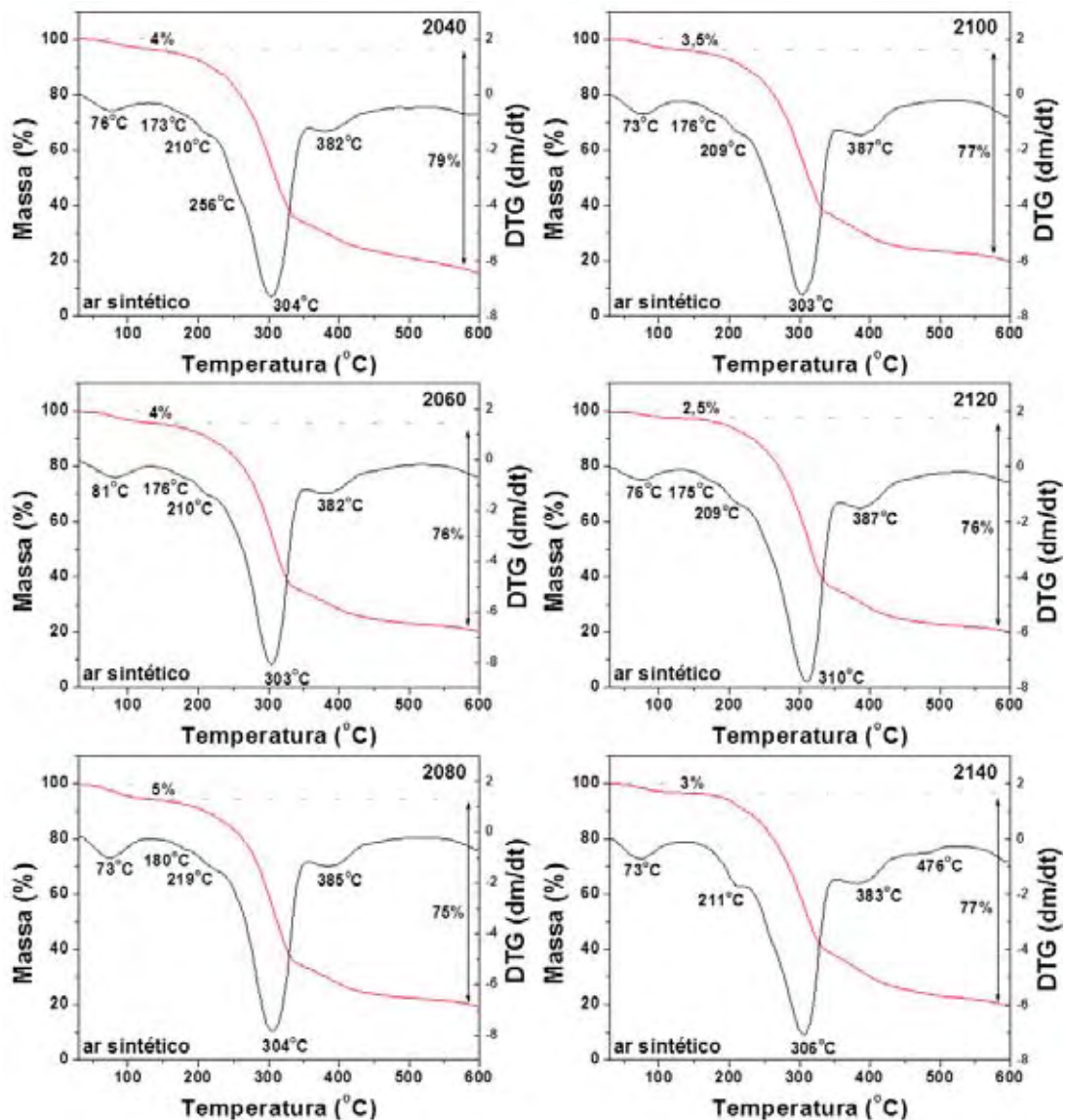


Figura 25 – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F3 em atmosfera de Nitrogênio.

As perdas a temperaturas superiores a 300 °C podem estar associadas a triglicerídeos, esteróis, ésteres de esteróis e outros lipídeos. Estes constituintes ocorrem predominantemente dentro das partículas de borracha, portanto podem haver partículas de borracha também nas frações F2 e F3.



**Figura 26** – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F2 em atmosfera de ar sintético.

As amostras da fração F2 apresentaram comportamento distinto entre 300-350 °C em relação a atmosfera utilizada, no qual apresentou duas perdas,

uma a temperatura em torno de 300 °C e outra em torno de 350 °C, sendo uma perda única em torno de 305 °C para a atmosfera de ar sintético.

As amostras da fração F3 apresentaram maior estabilidade térmica em atmosfera de nitrogênio, estando em torno de 347 °C e em 260 °C para as amostras em atmosfera de ar sintético, apresentando uma disparidade para a amostra 3140 com um pico de degradação em torno de 307 °C.

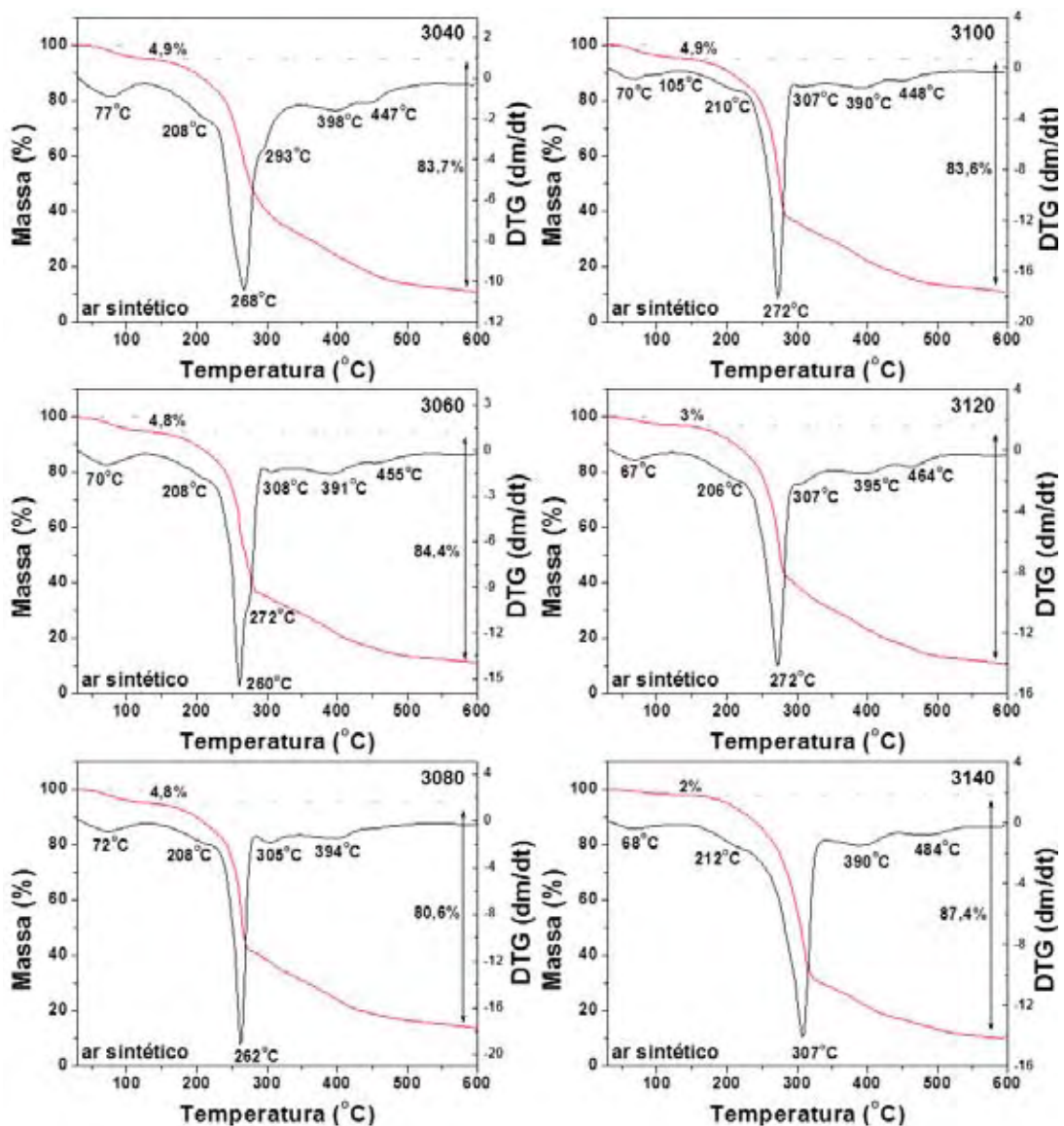
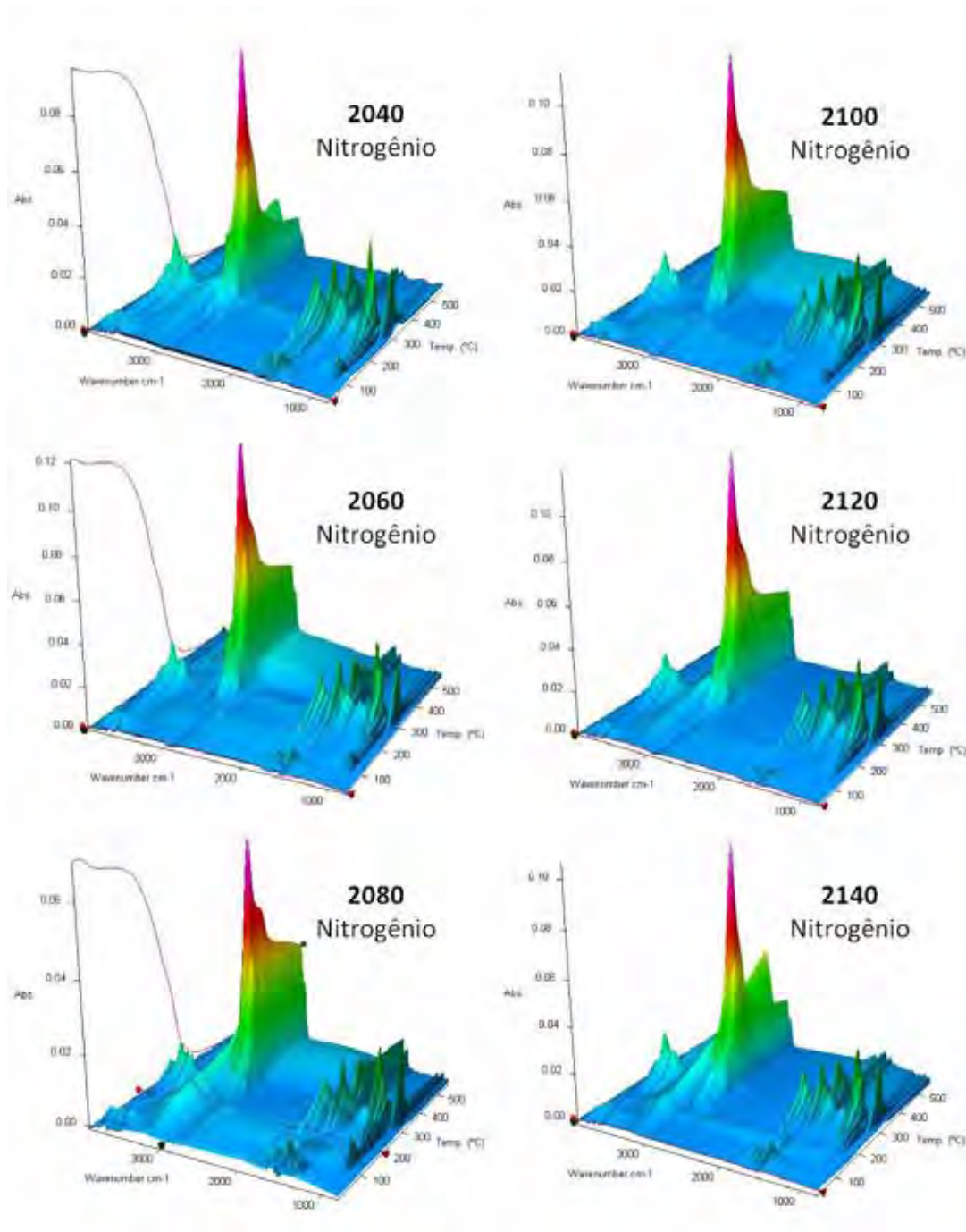


Figura 27 – Curvas de TG e DTG para as amostras da Fração F3 em atmosfera de ar sintético.

A massa residual apresentada, pelas frações F2 e F3, está associada a ânions inorgânicos, compostos por fosfatos e carbonatos, sais minerais e outros de rubídio, manganês, sódio, potássio, cobre, magnésio, ferro e zinco, pois estes produtos são constituintes do soro.

As Figuras 28 e 29 apresentam as imagens resultantes do acoplamento entre a termogravimetria e o espectrômetro de absorção no infravermelho para as frações F2 e F3, respectivamente, em atmosfera de nitrogênio e as Figuras 30 e 31 para as frações F2 e F3, respectivamente, em atmosfera de ar sintético.



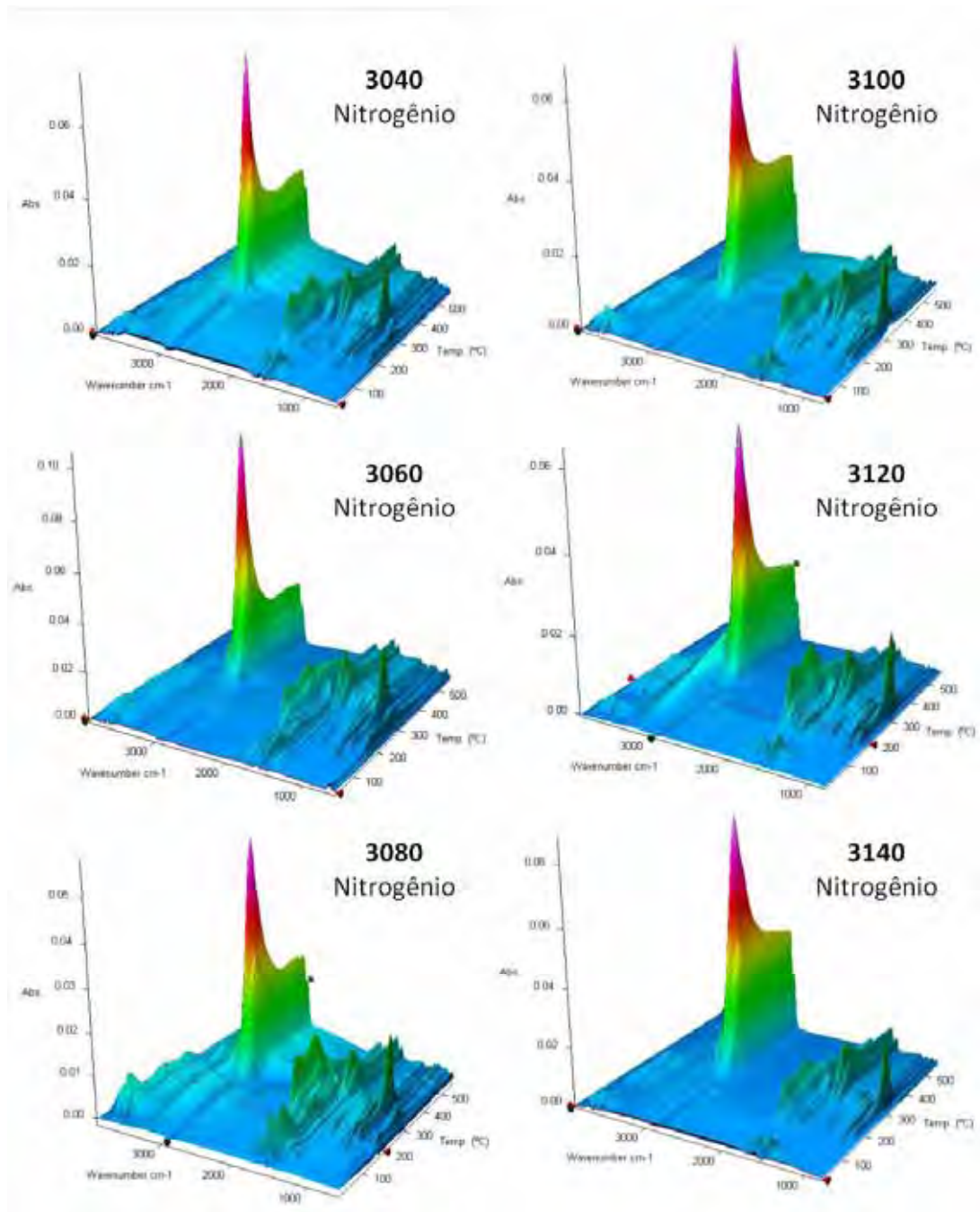
**Figura 28** – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio.

Duas regiões podem ser notadas com a evolução da temperatura, uma abaixo de 150 °C e outra acima de 200 °C. A primeira região, abaixo de 150 °C, é fortemente influenciada pela presença de vapor d'água, podendo estar associada a água presente na amostra na forma livre ou interagindo com compostos presentes nestas frações que não são removidos com o processo de liofilização.

Outra hipótese está na água presente na atmosfera do laboratório que no início do ensaio pode ficar presa na câmara onde se obtém os espectros de absorção no infravermelho. Devido à presença de água nas mais diversas formas esta região torna-se complexa para análise.

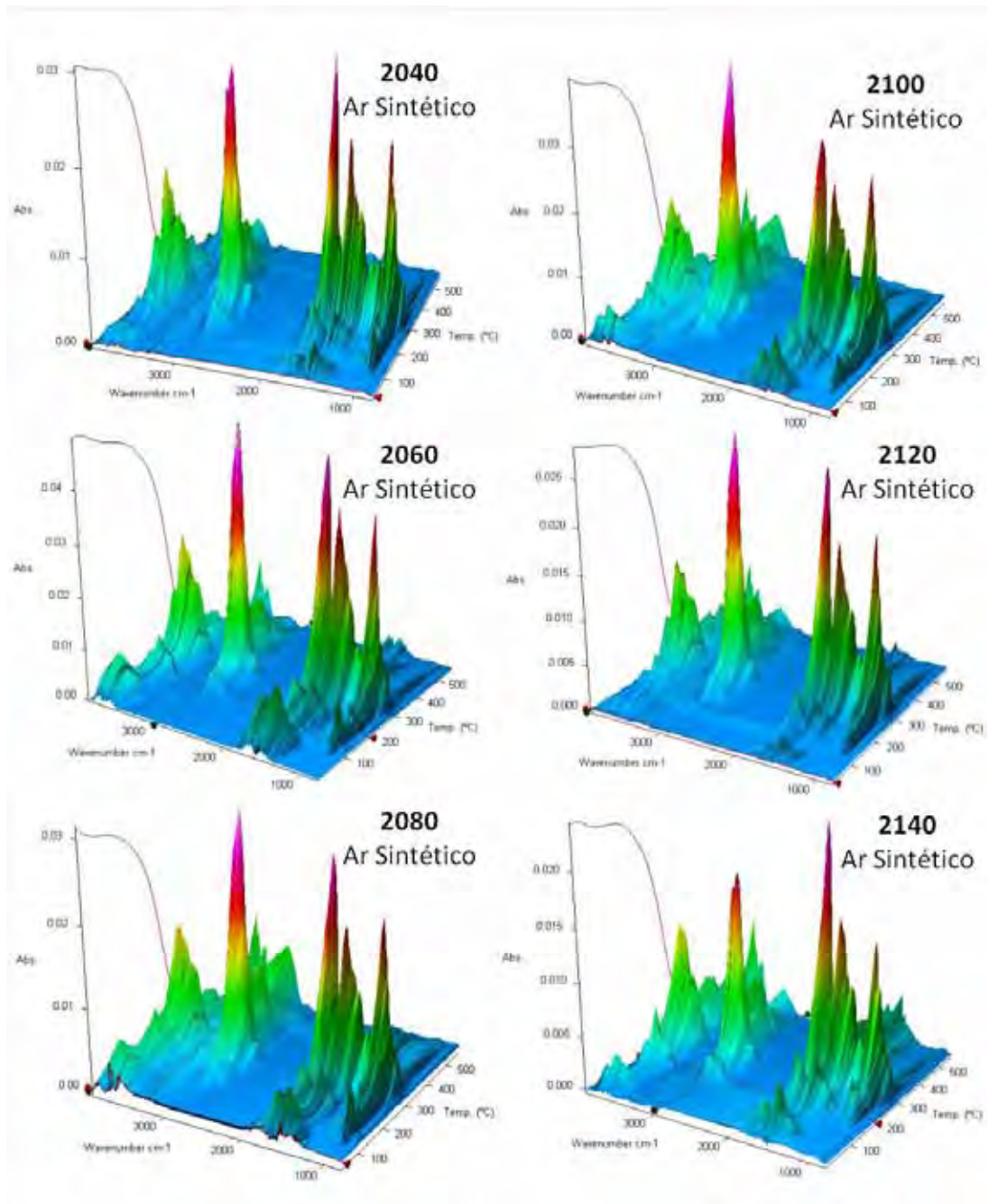
Nota-se que com o aumento da temperatura de tratamento térmico das amostras ocorre uma diminuição da absorbância na região abaixo de 150 °C, porém não são observados deslocamentos ou mudanças nos espectros de FTIR nesta região.





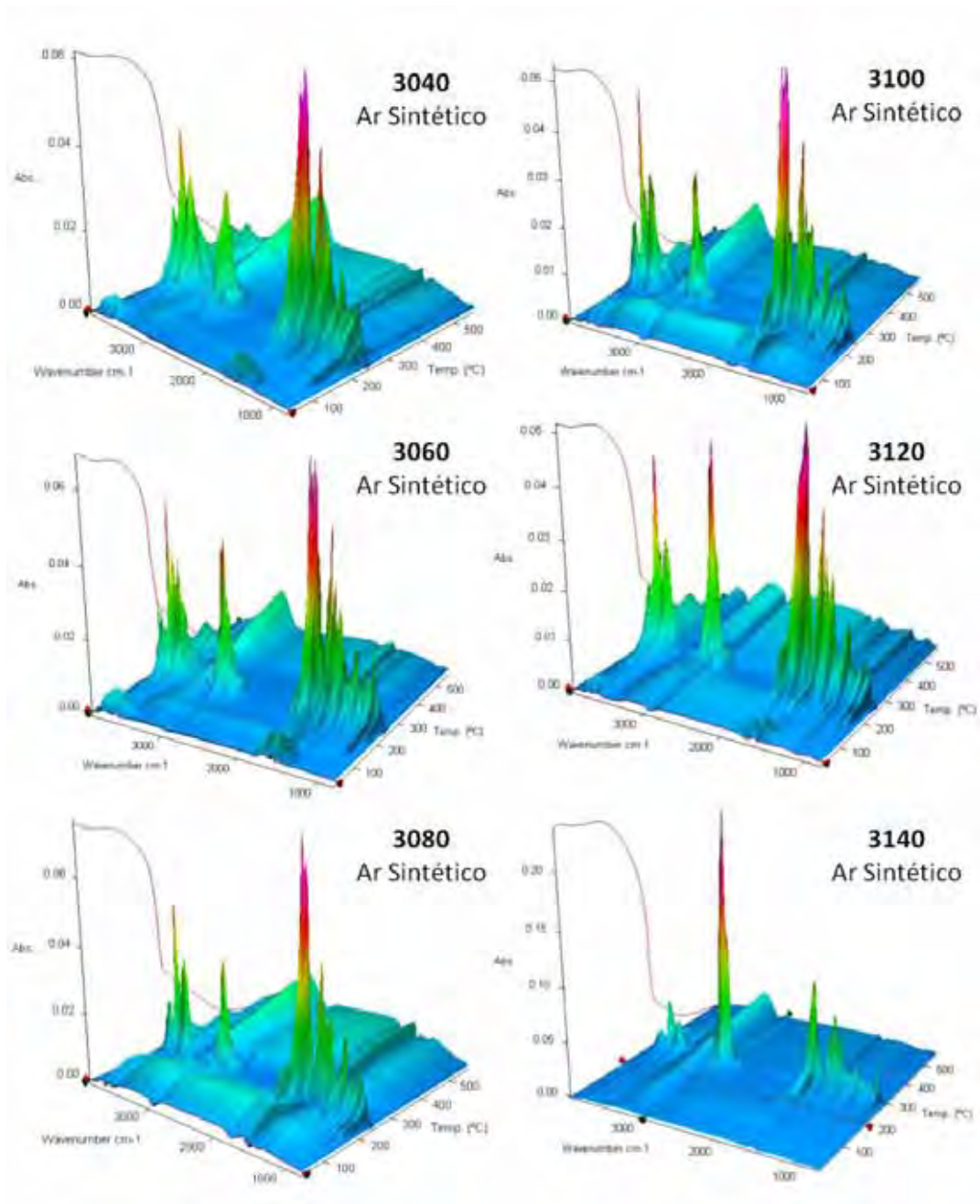
**Figura 29** – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio.

Nota-se que para os ensaios realizados em atmosfera de nitrogênio a região de maior absorvância esta em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$  e para ensaios realizados em atmosfera de ar sintético a região mais proeminente esta na região entre  $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 30** – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de ar sintético.

A região de 3900-3500 cm<sup>-1</sup> característicos de vapor de água mostra-se presente em todos os espectros. A região de 1800-1400 cm<sup>-1</sup> apresenta vários picos referentes aos grupos funcionais constituintes da parte proteica-fosfolipídica que compõe o látex de *Hevea brasiliensis*.



**Figura 31** – Imagem de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de ar sintético.

Abaixo de 300 °C, para as frações analisadas em atmosfera de ar sintético ocorre formação de ligação cruzada, cisão de cadeia e a reação principal pode ser a oxidação e reticulação. Neste caso, não há perda de massa, ou a perda de massa é mais lenta. Durante a degradação final (após 300 °C), a reação principal é a degradação oxidativa e a perda de massa é acentuada.

As Figuras 32 e 33 apresentam os espectros extraídos das imagens de TG/FTIR para as amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético, respectivamente. Todos os espectros apresentaram modos vibracionais acima de  $3500\text{ cm}^{-1}$  atribuídos a vapor d'água. Os espectros extraídos das imagens TG/FTIR para as amostras da fração F3, Figuras 34 e 35, em nitrogênio e ar sintético, respectivamente, também apresentaram tais modos vibracionais.

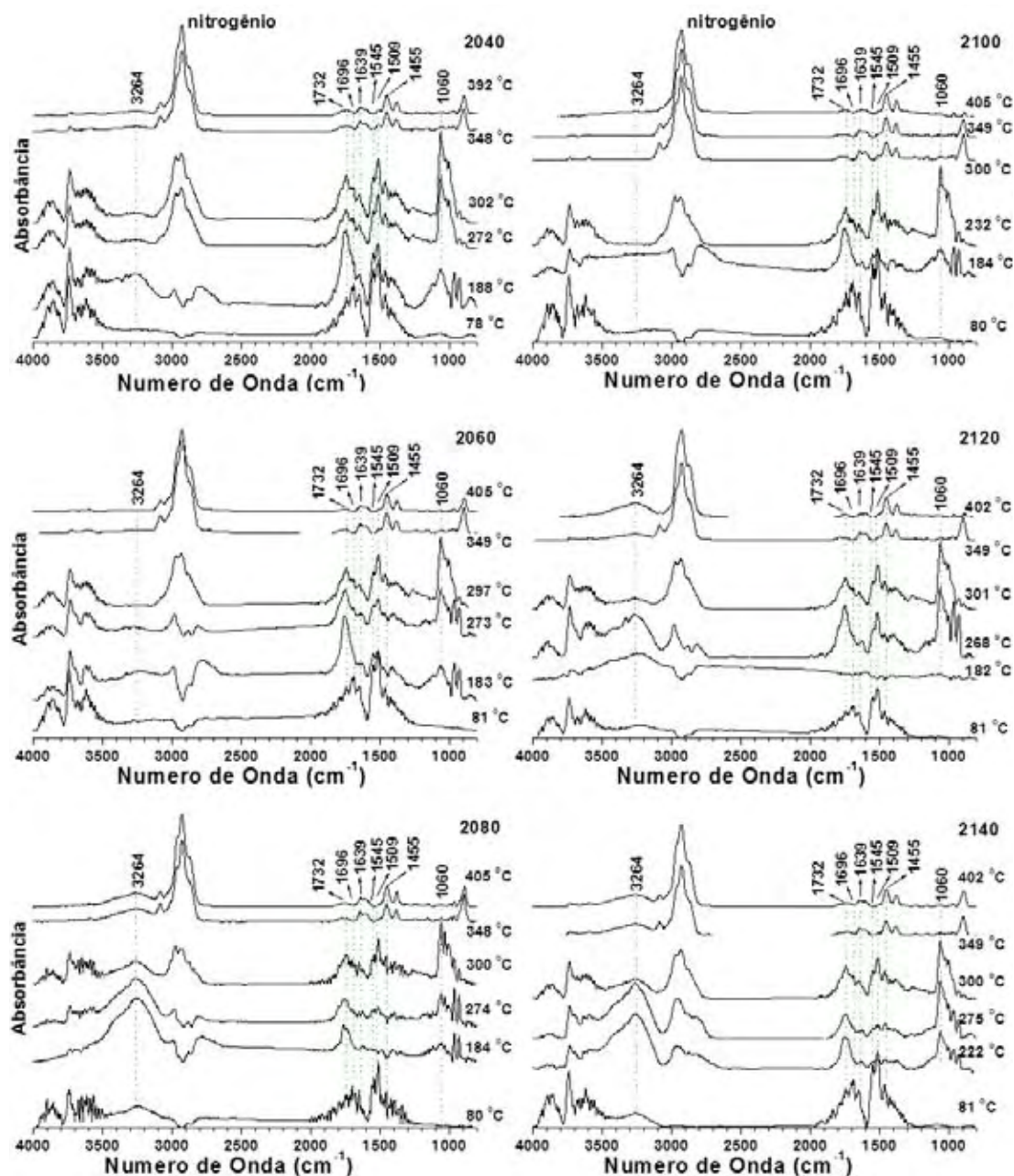


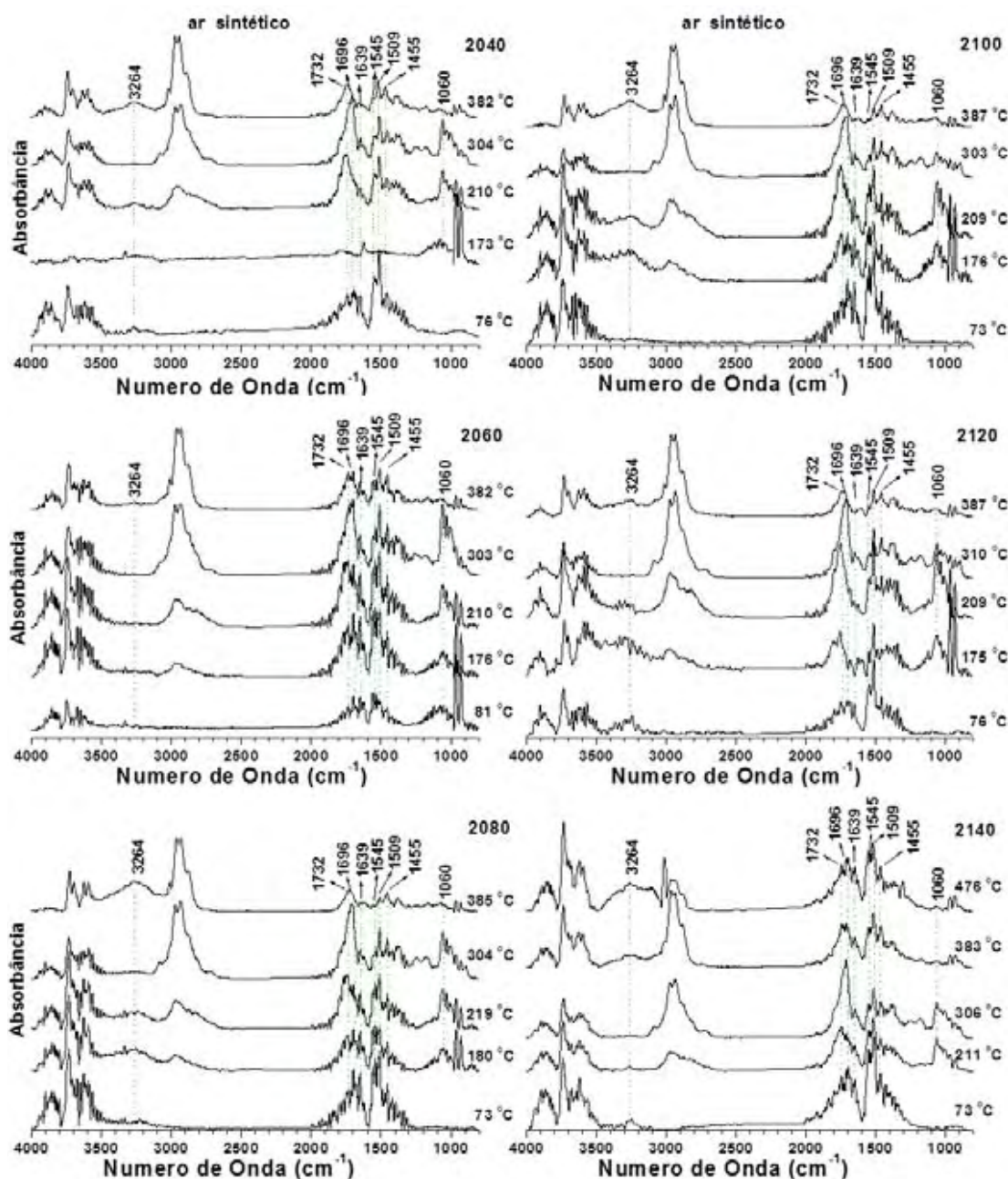
Figura 32 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio.

As amostras da fração F2 apresentaram um pico em  $3264\text{ cm}^{-1}$ , oriundo de aminoácidos e proteínas [39], associado a estiramento simétrico em NH/OH formando ligação de hidrogênio, exceto para as amostras 2060 e 2100 em atmosfera de nitrogênio e com baixa absorbância em atmosfera de ar sintético. Os espectros extraídos em temperaturas superiores a  $200\text{ °C}$  apresentaram uma região com picos entre  $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  referentes a ligações do tipo  $\text{-CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

O pico em  $1732\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao grupo carbonila de éster, decorrente do processo de transesterificação [39], com maior absorbância a temperaturas inferiores a  $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

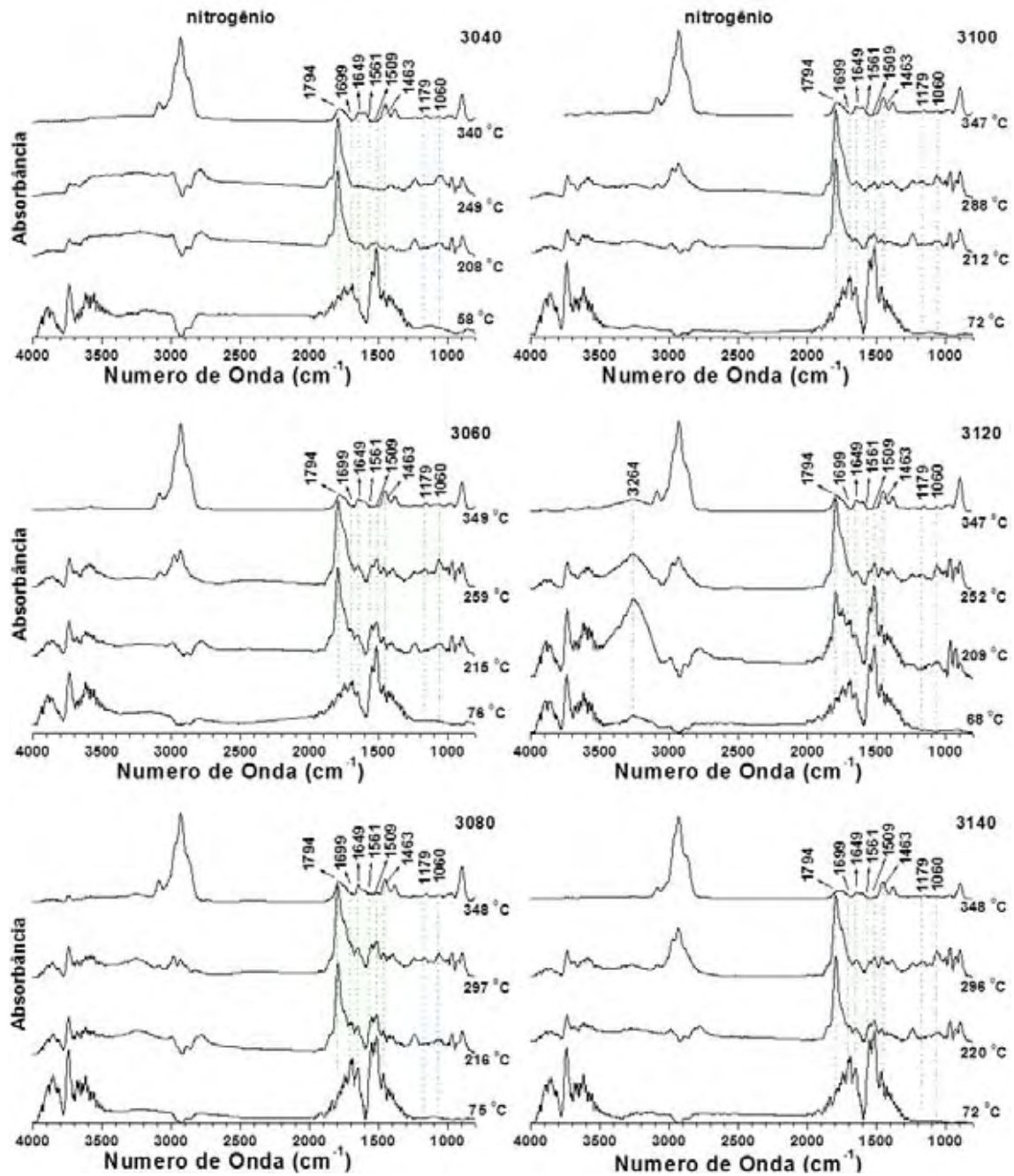
Os espectros apresentaram picos de degradação em  $1639\text{ cm}^{-1}$ , de Amida I em estrutura desordenada, pelo estiramento de C=O. Em  $1545\text{ cm}^{-1}$ , de amida II em  $\alpha$ -hélice, com estiramento CN e/ou flexão NH assim como em  $1509\text{ cm}^{-1}$ . A liberação de amidas da cadeia polimérica pode ser atribuída a hidrólise de polímeros em água [117,118] possivelmente realizada nos grupos  $\alpha$ -terminais compostos por mono- ou di-fosfatos ligados a fosfolipídios [6,119].

Em  $1455\text{ cm}^{-1}$  observa-se um pico característico da deformação de  $-\text{CH}_2-$  e em  $1060\text{ cm}^{-1}$  associado ao estiramento de C-O de éster.



**Figura 33** – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F2 em atmosfera de ar sintético.

Os espectros extraídos das imagens de TG/FTIR para as amostras da fração F3, Figuras 34 e 35, em atmosfera de nitrogênio e ar sintético, respectivamente, apresentaram uma região entre 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$ , associada a ligações tipo  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ , para temperaturas superiores a 250  $^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de nitrogênio, para os espectros entre 200-350  $^{\circ}\text{C}$  e para a amostra 3140 a temperaturas superiores em atmosfera de ar sintético.



**Figura 34** – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio.

Em  $1794\text{ cm}^{-1}$  há uma alta absorção entre os espectros obtidos no intervalo de temperatura entre 200-300 °C, em ambas as atmosferas, característico de vibrações do tipo C-O, C-O-H e OH de ácido carboxílico e éster. Em  $1699\text{ cm}^{-1}$  tem-se o estiramento simétrico de C=O de ácido dimérico, ocorrendo em baixa



absorbância para as amostras em atmosfera de nitrogênio e com absorbância elevada para atmosfera de ar sintético, para temperaturas entre 310-250 °C.

A degradação de amidas é monitorada através dos picos em 1649, 1561 e 1509  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos ao estiramento de C=O, estiramento CN/flexão NH e de amida II, respectivamente, com baixa absorbância em atmosfera de nitrogênio e picos mais evidentes em atmosfera de ar sintético nos espectros entre 200-300 °C.

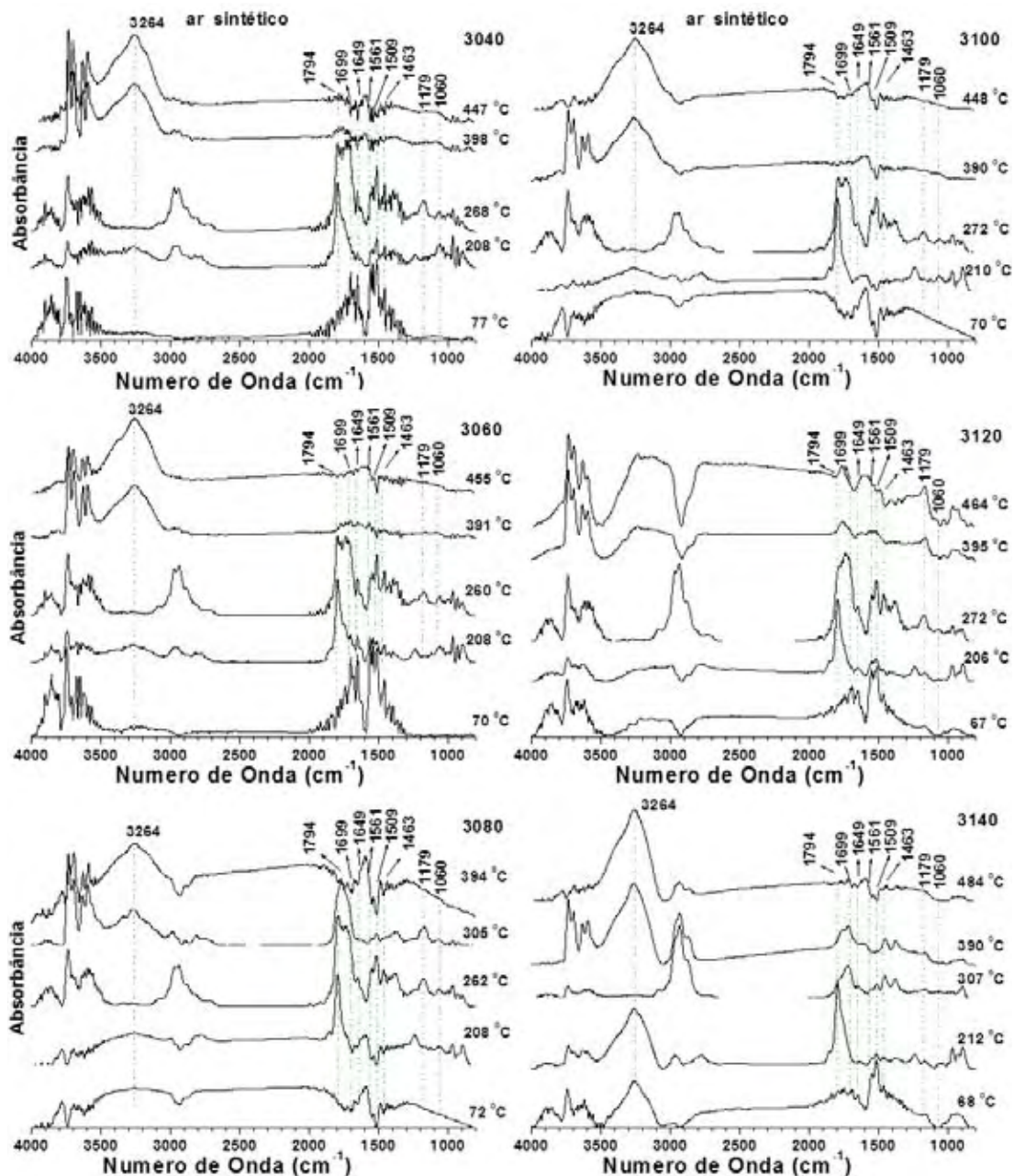


Figura 35 – Espectros extraídos das imagens de TG/FTIR das amostras da fração F3 em atmosfera de ar sintético.

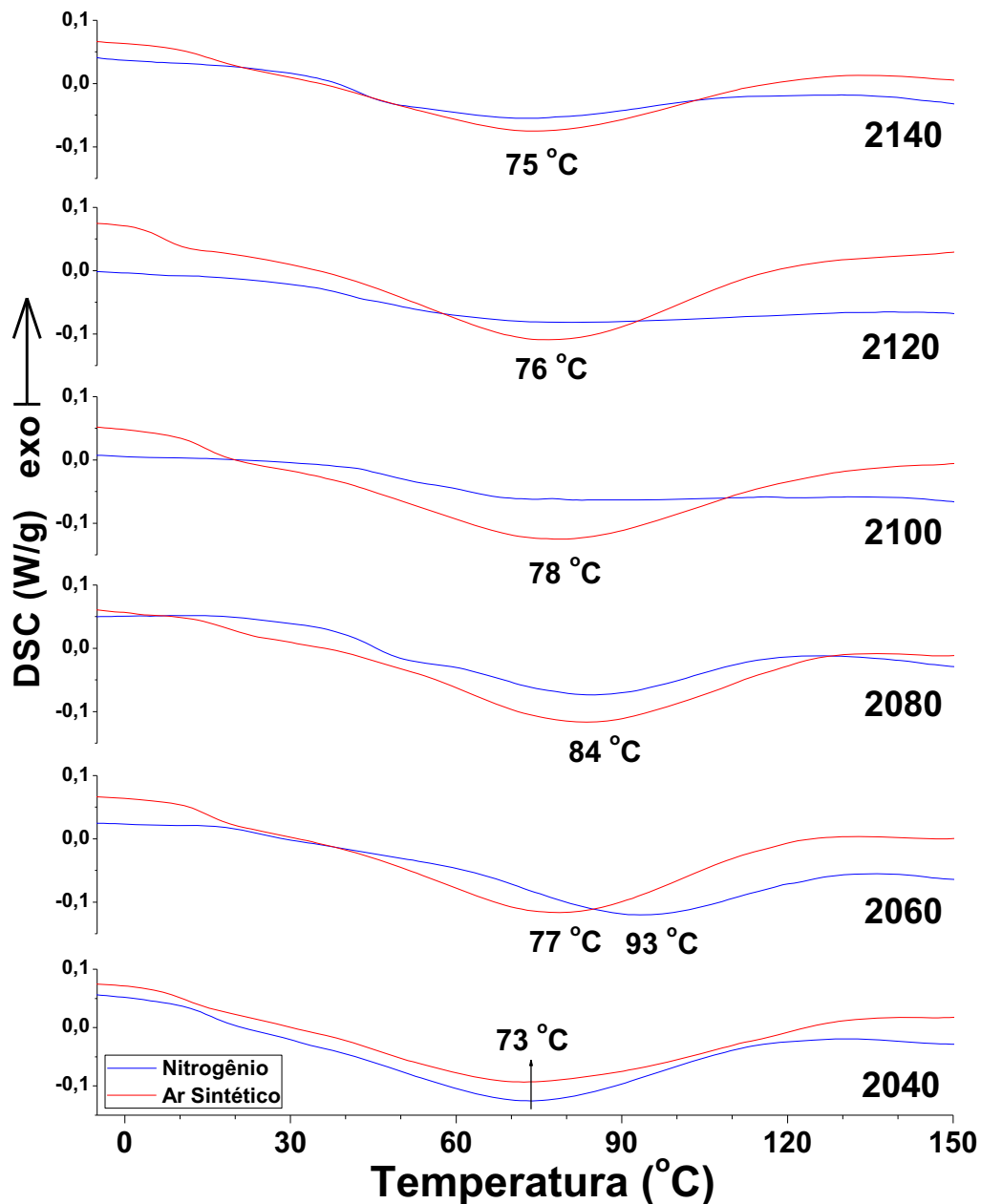
O pico em  $1463\text{ cm}^{-1}$  característico do estiramento assimétrico de  $\text{CH}_3$ , no plano, em  $1179\text{ cm}^{-1}$  a flexão do  $-\text{CH}_2$  e em  $1060\text{ cm}^{-1}$  característico do estiramento de  $\text{CN/C-O}$ , apresentaram baixa absorbância para ambas as atmosferas.

### 3.6 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 36 apresenta as curvas de DSC para a fração F2 e a Figura 37 para a fração F3 do látex centrifugado. O principal fenômeno observado por DSC, durante o aquecimento destas frações é a desnaturação de proteína, que são eventos endotérmicos, que correspondem a mudanças em sua estrutura secundária e/ou terciária, pelo desdobramento das estruturas proteicas, sendo que a perda da estrutura secundária pode envolver a redução de ligações de hidrogênio, seja por liberação de água ou subprodutos do látex de baixo peso molecular, podendo estar associada também a outros componentes presentes nas fases do látex centrifugado, como lipídios/proteínas e ácido nucléicos [120].

Os processos que envolvem a desnaturação de proteínas das frações do látex são complexos ocorrendo em estados intermediários e também por se tratar de um biomaterial natural sofre interferências externas, como clima e solo onde são cultivadas. Segundo Lumry-Eyring a desnaturação irreversível da proteína é analisada para ter pelo menos dois passos: (1) desdobramento reversível da proteína nativa; (2) alteração irreversível da proteína desdobrada para estado final que é incapaz de dobrar de volta ao estado nativo [121].

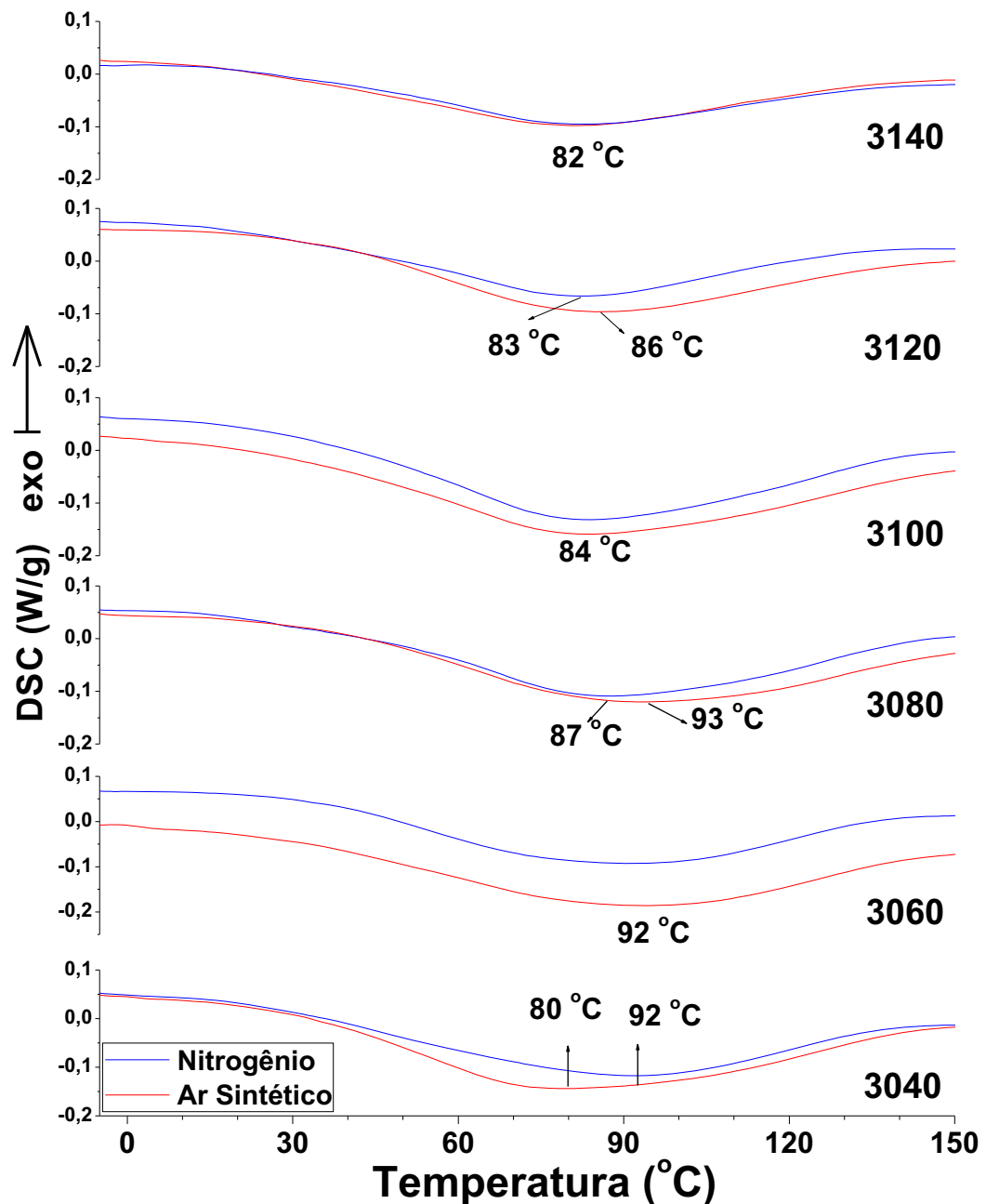
A fração F2 apresentou as maiores diferenças entre os ensaios realizados em atmosfera de nitrogênio e ar sintético, portanto esta fração pode sofrer processos oxidativos além da mudança de conformação proteica.



**Figura 36** – Curva de DSC para as amostras da fração F2 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.

A fração F3 apresentou curvas de DSC semelhantes para as atmosferas de nitrogênio e ar sintético, mas nada podemos afirmar sobre o grau de pureza, pois temos um pico endotérmico muito largo, associado tanto para os diferentes compostos envolvidos, como para o grande número de estados intermediários que podem envolver processo de desnaturação [122], além da perda

de água estrutural dos componentes que envolvem esta fração, reduzindo assim sua função biológica.

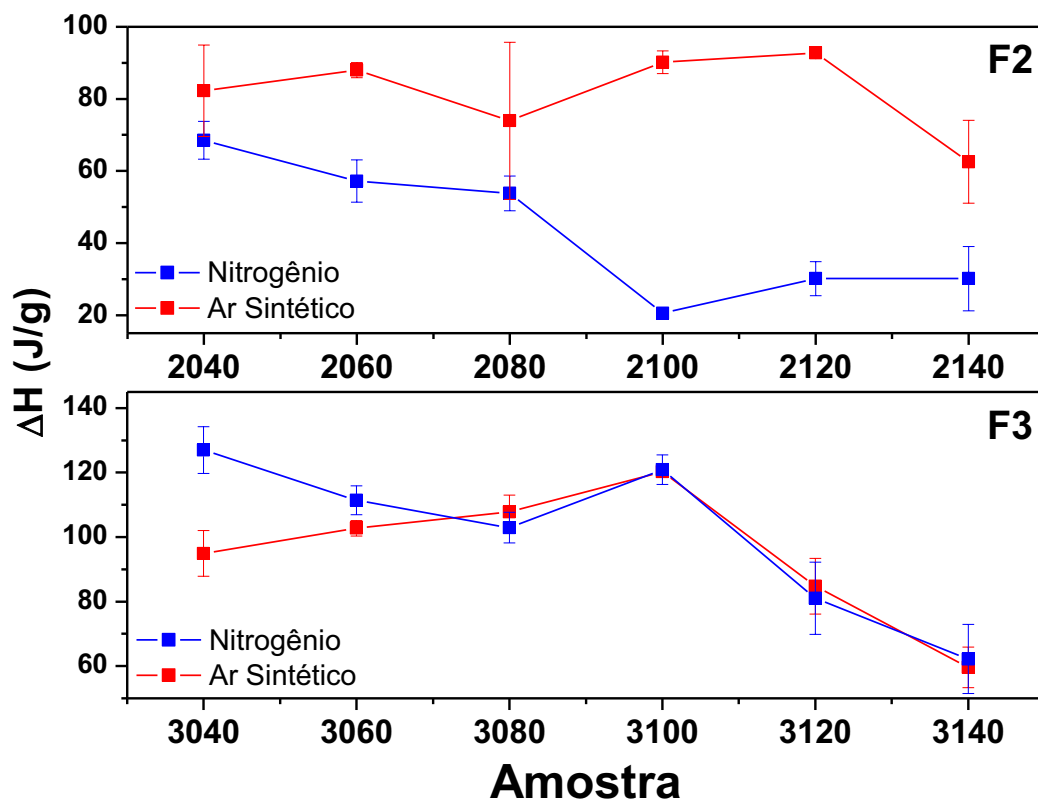


**Figura 37** – Curva de DSC para as amostras da fração F3 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.

Os resultados obtidos por DSC podem ser mais bem avaliados em termos de entalpia envolvida. A calorimetria exploratória diferencial permitiu verificar a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) para as frações F2 e F3, Figura 31, no qual foi calculada a área da curva de DSC.

Os valores de temperatura de desnaturação, Figuras 36 e 37, e entalpia ( $\Delta H$ ), Figura 38, observados são atribuídos a vários fatores, denominados estabilizantes, relacionados com a composição de aminoácidos e proteínas, forma de empacotamento devido à interação proteína/proteína, ligação com metais e outros grupos proteicos ou ligações e interações intramoleculares [123].

Ocorre a diminuição de  $\Delta H$ , em ambas as frações, exceto no ensaio realizado na fração F2 em atmosfera de ar sintético, tal fato decorre da fração F2 sofrer oxidação, além de mudar sua conformação estrutural proteico de nativo para inativo e também perda de água presentes em ligações de hidrogênio com proteínas que não são removidas com o processo de liofilização.



**Figura 38** – Variação da entalpia ( $\Delta H$ ) em função da temperatura de tratamento térmico para as frações F2 e F3 em atmosfera de nitrogênio e ar sintético.

Na fração F2 em atmosfera de nitrogênio nota-se uma diminuição gradual da  $\Delta H$  até a amostra 2100 estabilizando-se em 2120 e 2140, mostrando dois

patamares, antes da amostra 2080 e após a amostra 2100, tal fato decorre que as amostras sofreram uma desnaturação térmica, diminuindo cada vez mais a concentração de proteínas no estado nativo.

A fração F3 mostrou mesmo comportamento em relação a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) para ambas as atmosferas, mostrando que a mudança conformacional na estrutura proteica independe deste fator e que esta associado somente ao calor fornecido.

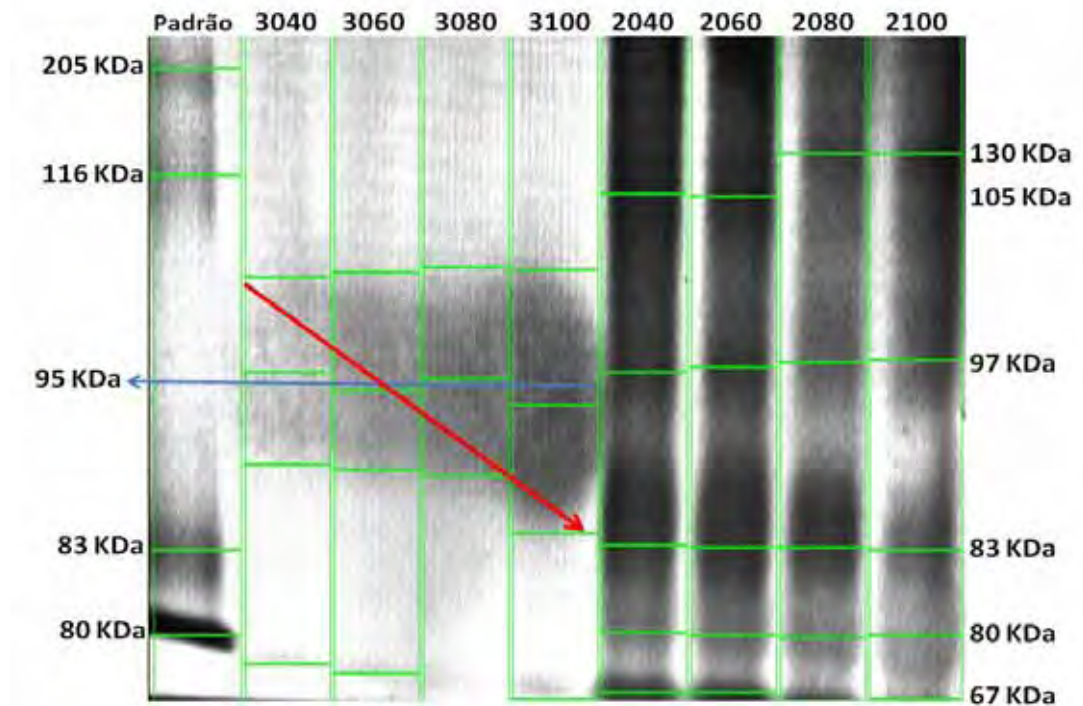
O valor da  $\Delta H$  diminui conforme o tratamento térmico realizado na amostra, exceto em 3100, nota-se a perda de função das proteínas que envolvem esta fração de nativo para inativo. Não foi observado qualquer fenômeno de agregação de proteínas devido a ausência de picos exotérmicos nesta região [115,117].

Nota-se que para ambas as frações existem compostos com propriedades térmicas reversíveis e irreversíveis, pois mesmo nas frações aquecidas a 140 °C (2140 e 3140) é possível verificar uma variação de entalpia ( $\Delta H$ ), mas estes valores tendem a decrescer com o aumento da temperatura de tratamento térmico.

### **3.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os resultados obtidos através dos perfis eletroforéticos para as frações F2 e F3, Figura 39, mostram que a fração F2 possui maior variedade de proteínas e que a fração F3 possui proteínas com peso molecular médio em torno de 95 kDa (kilo Daltons), mostrando certa similaridade entre os compostos desta fração.

Nota-se que para a fração F2 ocorre uma diminuição no tom escuro em relação ao peso molecular médio conforme o aumento no aquecimento prévio das mesmas, tal fato mostra que estas frações possam estar perdendo fragmentos de sua cadeia ou reduzindo sua carga com a diminuição de seus sítios polares.



**Figura 39** – Perfis eletroforéticos para as frações F2 e F3.

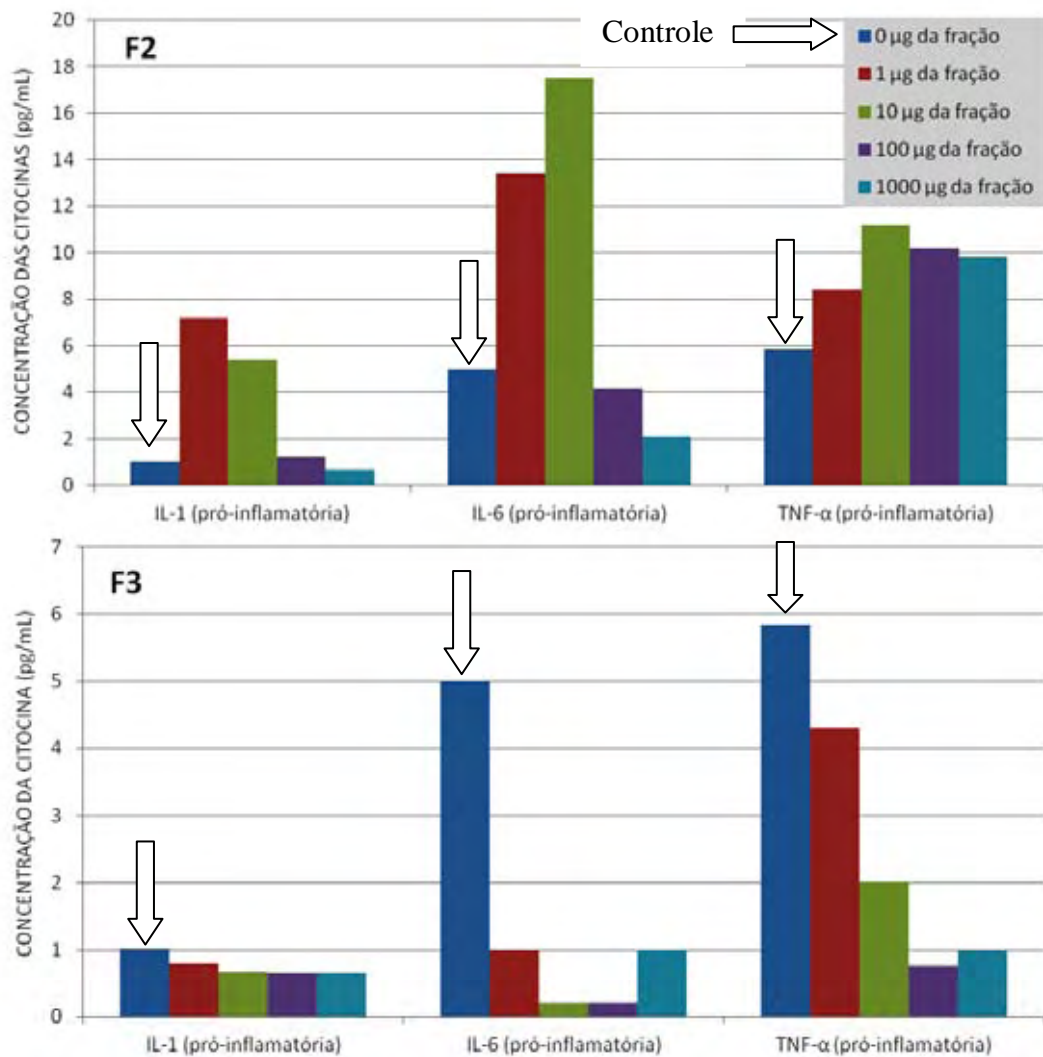
A fração F3 apresentou uma redução da massa molecular das proteínas com massa média de 95 kDa, seta vermelha, esta redução é gradual conforme o aquecimento prévio da amostra, fato que pode explicar a perda da função angiogênica com o aumento da temperatura desta fração.

### **3.8 - Dosagem de citocinas**

As dosagens de citocinas pró-inflamatórias foram analisadas em termos de diferentes concentrações, para as frações F2 e F3, medidas após seis horas de incubação.

A fração F2 apresentou um comportamento pró-inflamatório, em meio de células macrofágicas, apresentando maiores concentrações de citocinas em relação à solução controle em que não havia a fração F2 (0 µg/mL da fração), conforme pode ser visto na Figura 40. A amostra com diluição de 1000 µg/mL da fração F2 apresentou menores valores de concentrações de citocinas em relação a amostra sem a fração F2 para as interleucinas pró-inflamatórias 1 e 6, porém o fator de crescimento tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a concentração das citocinas foram sempre maiores.



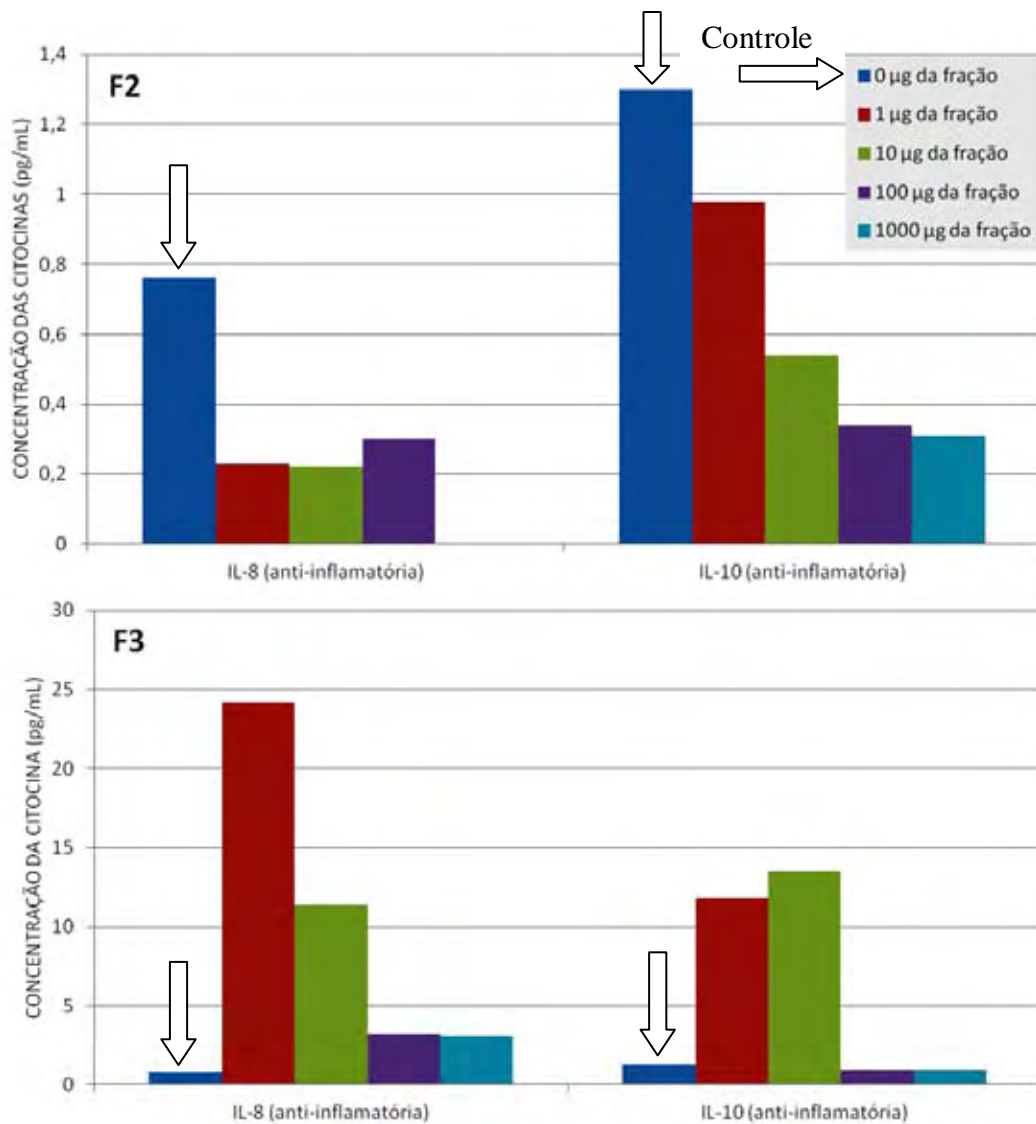


**Figura 40** – Concentração de citocinas em relação a interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

A Figura 40 mostra que a fração F3 apresentou para as três interleucinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , redução da concentração de citocinas quanto à presença de diferentes diluições. Isso significa que essa fração não estimula e/ou inibe o desencadeamento do processo inflamatório. Especialmente na diluição de 100  $\mu\text{g/mL}$  mostra que a ação desta fração sobre as células de defesa até de evitar a síntese das interleucinas, pois tais níveis estão abaixo do esperado mesmo para os controles experimentais (0  $\mu\text{g/mL}$  da fração).

Foram analisadas também o comportamento de citocinas anti-inflamatórias em termos de diferentes diluições das frações F2 e F3, medidas após seis horas de incubação, estes resultados apresentados na Figura 41, confirmam o comportamento analisado em termos das interleucinas pró-inflamatórias apresentados na Figura 40, contribuindo de maneira significativa para a investigação de que fração induz a angiogênese.

Nota-se que para a fração F2 ocorre uma redução da atividade anti-inflamatória, em relação às interleucinas 8 e 10, quanto maior a concentração desta fração. O comportamento anti-inflamatório não pode ser observado para amostra com concentração de 1000 µg/mL. Portanto a fração F2 apresenta um poder pró-inflamatório demonstrado através das interleucinas 1, 6 e TNF- $\alpha$ , como também uma redução do processo anti-inflamatório mostrando que há uma alta especificidade química dos componentes dessa fração que faz com que ela interfira no mecanismo de defesa imunológica.

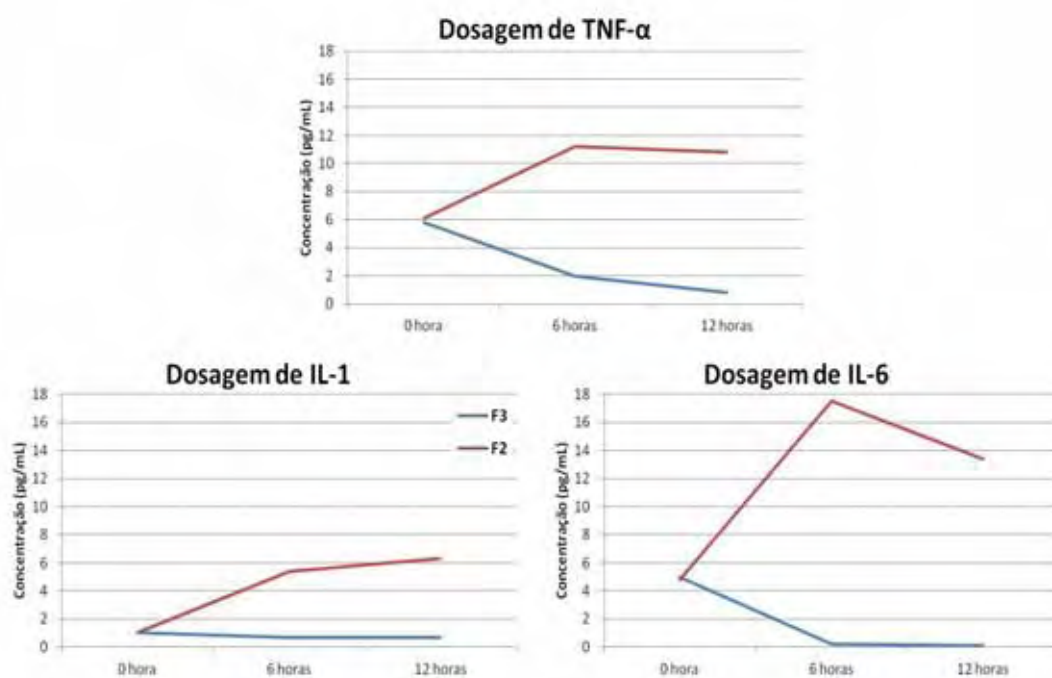


**Figura 41**– Concentração de citocinas em relação a interleucinas anti-inflamatórias IL-8 e IL-10.

Para as diferentes concentrações da fração F3 nota-se um aumento da atividade anti-inflamatória, sendo que nas concentrações de 1 e 10 µg/mL ocorre uma superprodução das interleucinas 8 e 10, em relação ao controle experimental. Observa-se ainda que em altas concentrações da fração F3 a síntese desses componentes passa a ser muito baixa, provavelmente mostrando que existe uma dose limítrofe para agir sobre o sistema imunológico.

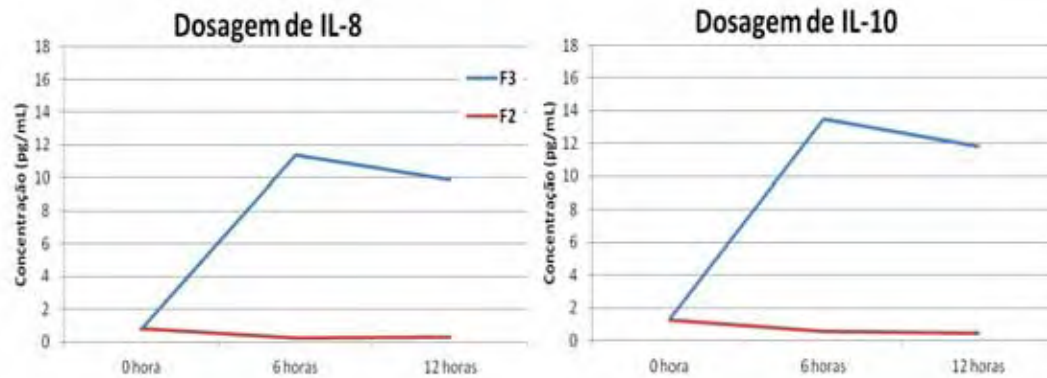
A Figura 42 apresenta a análise individual da dosagem de citocinas por um ciclo de 12 horas para interleucinas pró-inflamatórias. Na análise da

dosagem destas interleucinas observa-se que com o passar do tempo ocorre uma redução da concentração quando as células foram estimuladas pela fração F3. No caso específico da IL-1 nem sequer ocorreu variação significativa, mostrando que ela é a menos sensível à presença dos componentes dessa fração do látex. Já a resposta das células ao contato com a fração F2 mostra que a IL-6 é a mais sensível a presença deste componente e que as concentrações continuam altas mesmo depois do período estudado, mostrando que há um fator cumulativo.



**Figura 42** - Análise individual da dosagem de citocinas para interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Quando analisado o comportamento de citocinas em relação às frações F2 e F3, Figura 43, ocorre uma inversão no comportamento das frações em relação ao processo inflamatório. A fração F2 é praticamente inócua no impedimento do processo inflamatório, enquanto que a fração F3 atua fortemente tentando evitar a ocorrência desse fenômeno de defesa.



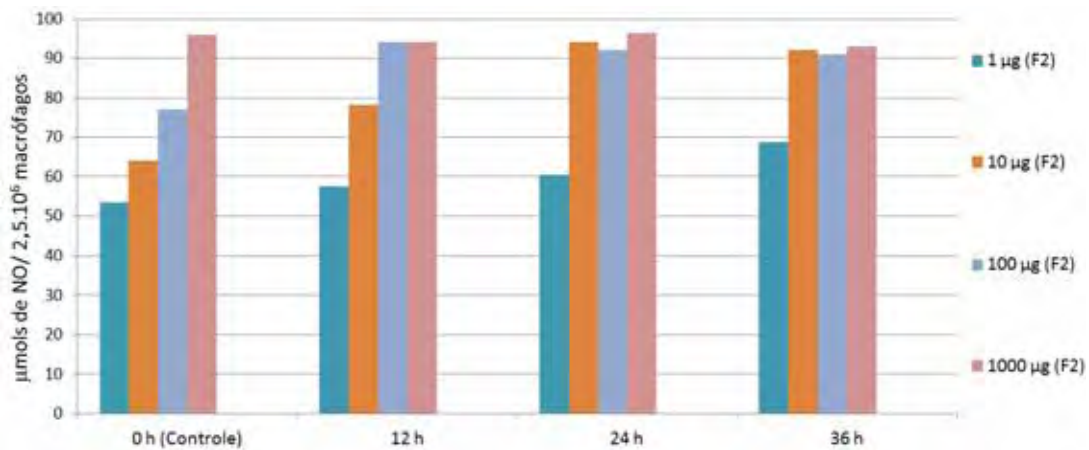
**Figura 43** - Análise individual da dosagem de citocinas para interleucinas anti-inflamatórias IL-8 e IL-10.

Os valores próximos observados entre as concentrações dos dois tipos de interleucinas anti-inflamatórias, IL-8 e IL-10, mostra que as duas são igualmente influenciadas pela presença da fração F3 do látex.

### 3.9 - Síntese de Óxido Nítrico (NO)

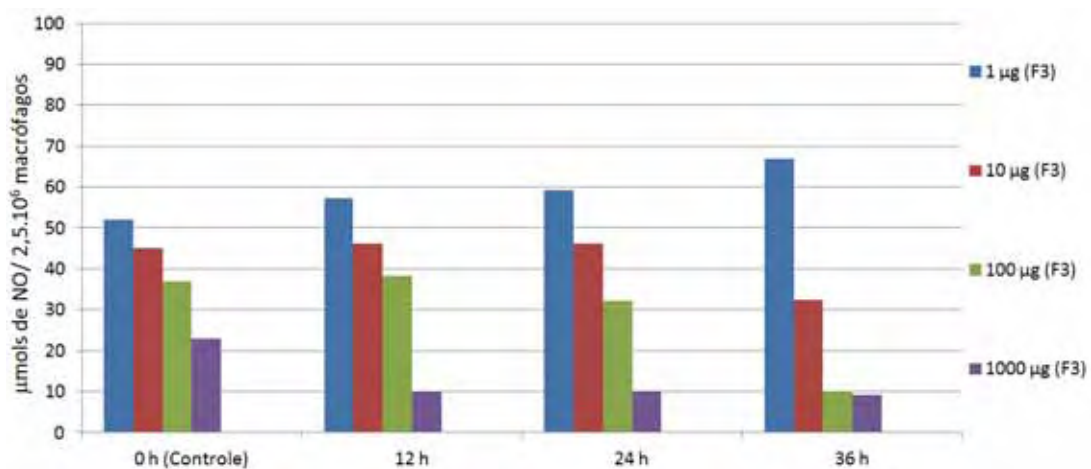
O óxido nítrico produzido por macrófagos desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa anti-microbiana, inflamação e angiogênese, porém produção descontrolada de NO pode levar a uma resposta maciça tóxica, levando a uma série de doenças inflamatórias.

A Figura 44 mostra a síntese de NO em relação à quantidade de fração F2 e seu comportamento em relação ao tempo. A amostra com 1  $\mu\text{g}$  de fração F2 apresentou um crescimento com o tempo na síntese de NO, efeito também notado para a amostra com 10  $\mu\text{g}$  até o tempo de 24 horas e para a amostra com 100  $\mu\text{g}$ , este crescimento deu-se nas primeiras 12 horas, mantendo-se constante para as amostras com 1000  $\mu\text{g}$  de fração F2.



**Figura 44** – Síntese de NO para a fração F2.

Para a fração F3, a síntese de NO para as amostras com 1 µg de fração apresentaram um crescimento de NO e relação ao tempo, conforme mostrado na Figura 45. A amostra com 10, 100 e 1000 µg de fração apresentaram um decréscimo na produção de NO, a partir de 24, 12 e zero horas, respectivamente.



**Figura 45** - Síntese de NO para a fração F3.

De acordo com o comportamento apresentado para as frações na síntese de NO, nota-se que a fração F3 apresenta melhor relação entre, em um primeiro momento, aumentar a produção de NO para ativar o processo de defesa anti-microbacteriana e de inflamação e com o decorrer do tempo reduzir esta produção para favorecer o processo de indução da angiogênese. Portanto a fração

F3 com 100  $\mu\text{g}$  apresentou um comportamento mais adequado para a utilização como biomaterial.

## CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

A presença de estruturas proteicas e lipídicas nas frações do látex foram evidenciadas pelas técnicas de Kjeldahl, Soxhlet, FTIR, RMN, TG/FTIR, DSC e eletroforese. Através da técnica de FTIR foi possível verificar alterações nas estruturas secundárias, tipo  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, das proteínas de ambas as frações, modificando os estados conformacionais fazendo com que estes compostos tenham atividade biológica reduzida.

A fração F2 apresentou estruturas cristalinas, pouco comuns em amostras de borracha natural, observadas por DRX atribuídas a compostos proteicos com organização de longo alcance. Já a fração F3 apresentou uma alo amorfo comumente notado em amostras de borracha natural.

As medidas de DSC confirmaram a desnaturação térmica através da análise da entalpia envolvida no processo. A fração F3 apresentou um processo de desnaturação gradual em relação à temperatura de tratamento térmico, sendo que tal fato só foi notado para a fração F2 em atmosfera de ar sintético, quando tratada termicamente a 140 °C.

Os perfis eletroforéticos mostraram que a fração F2 apresenta diversos compostos proteicos e que estes compostos são desnaturados em função do aquecimento prévio e que a fração F3 apresentou uma região em torno de 93 kDa rica em proteínas, possivelmente com estruturas semelhantes.

As dosagens de citocinas mostraram que a fração F3 tem a propriedade de induzir a produção de interleucinas anti-inflamatórias auxiliando assim a angiogênese. Já a fração F2 apresentou um comportamento pró-inflamatório que não contribui no processo de cicatrização.



A fração F3 também apresentou um aumento na produção de óxido nítrico (NO) nas primeiras horas de contato com células de defesa do tipo macrófagos murinos, tendo esta produção reduzida no decorrer do tempo, fato não observado para a fração F2, no qual só houve um aumento na produção de NO.

Estes fatores supracitados permitem a conclusão de que a fração F3 possui o composto ativo desencadeador da angiogênese, porém estudos no sentido de testar esta fração “in vivo” e a busca para purificar este material é de fundamental importância para que se descubra o princípio ativo que induz o processo de cicatrização.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 
- [1] Portal da vulcanização, <http://www.vulcanizar.com.br>, consultado em 20/12/07.
- [2] BRASIL, Ministério da Indústria e do Comércio. Superintendência da Borracha. Curso básico em tecnologia de elastômeros, v. 1-6, 1993.
- [3] IAPAR – INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, <http://www.iapar.br>, consultado em 13/12/07.
- [4] BIKALES, N.M.; MARK, H.F.; GAYLORD, N.G. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York: American Chemical Society, 1973.
- [5] DALL'ANTONIA, A.C. *et al.* Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica. Polímeros: Ciência e Tecnologia. vol. 16, nº 3, p. 239-245, 2006.
- [6] RIPPEL, M.M. “Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural”, Tese (Doutorado em Ciências na área de Físico-Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química-UNICAMP – Campinas-SP, 2005.
- [7] SETHURAJ, M.R. Natural Rubber, Biology, Cultivation and Technology. Elsevier Sci., Netherlands, 1992.
- [8] SOUTHORN, W.A.; YIP, E. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 1968.
- [9] <http://www2.far.fiocruz.br/redesfito/v2/?p=3460> consultado em 10/02/2013.
- [10] OLIVEIRA, J. A. A. *et al.* Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. Vol. 69, nº5. São Paulo, 2003.
- [11] NETTO, J.C. Revista Univerciência. Ano 1. nº1, p. 58-61, jan-abril, 2002.
- [12] CARRAHER Jr., C.E. Polymer chemistry: an introduction, 4<sup>th</sup> ed., p.348, 1996.
- [13] MANO, E.B.; MENDES, L.C. Introdução a polímeros, Ed. Edgar Blücher, 2 ed., Cap 1, 1999.
- [14] LUNARDI, G.; BRETAS, R.E.S., Polímeros Intrinsecamente Condutores Elétricos. Rev. Bras. de Engenharia Química. Vol. 10, nº 3, p. 34-40, 1987.
- [15] FUKADA, E.; TAKAMATSU, T.I. “Callus formation by electret”, J. Appl. Phys., 14, 2079, 1975.
- [16] MARIOLANI, J.R.L.; BELANGERO, W.D.; ARRUDA, A.C.F. “Resposta interfacial provocada pelas interações biológicas e mecânicas entre material de implante e tecido receptor” Acta. Orthop. Bras. 6, 48, 1993.
- [17] YEANG, H.Y. Allergenic proteins of natural rubber latex. Methods 27, 32–45, 2002.

- 
- [18] LEELA, E.P.; MUHAMED, A. Assessment of biodeterioration of rubber wood exposed to field conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 31–36, 2006.
- [19] FERREIRA, M.; MORENO R.M.B.; GONÇALVES, P.S.; MATTOSO, L.H.C. Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos do Látex de Clones de Seringueiras da Região de Presidente Prudente (SP) Embrapa – Boletim de Pesquisa 8/99, 1999.
- [20] FERREIRA, M. Estudo da Qualidade e Produtividade do Látex de Seringais da Região de Presidente Prudente. Relatório de Atividades. FAPESP - Proc. 97/09688-8, 1998.
- [21] International Rubber Study Group - Natural Rubber Statistical Bulletin, 58, p.9, 2004.
- [22] MORENO, R.M.B. *et al.* Monitoramento e Avaliação da Borracha Natural Crua Utilizando a Técnica de Análise Térmica Dinâmico-Mecânica Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 16, n° 3, p. 235-238, 2006.
- [23] Instituto Agrônomo de Campinas. <http://www.iac.br>. Consultado em 15/01/2001.
- [24] JOB, A.E. Avaliação da Qualidade do Látex e da Borracha Seca de Seringueira e Preparação de Blenda Condutora com Polianilina. Relatório de Pós-Doutorado. FAPESP – Proc. 97/14460-9, 2000.
- [25] ADIWILAGA, K.; KUSH, A. Cloning and characterization of dna encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Plant. Mol. Biol.*, **30**, 935 1996.
- [26] WITITSUWANNAKUL R. *et al.* A rubber particle protein specific for Hevea latex lectin binding involved in latex coagulation. *Phytochemistry*, 69, 1111–1118, 2008.
- [27] CULLINAN P, et al. Latex allergy. A position paper of the British Society of Allergy and Clinical Immunology. *Clin Exp Allergy*; 33, 1484–99, 2003.
- [28] D’AUZAC, J.J. The composition of latex as a lactiferous cytoplasm. In: d’Auzac J, Jacob J, Chrestin H, eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1989.
- [29] ROLLAND, J.M.; O’HEHIR, R.E. Latex allergy: a model for therapy. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02984.x, *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 898–912, 2008.
- [30] ARCHER, B.L.; MCMULLEN, A.I. in: *Proceedings, Nat. Rubb. Conf. 1960*, Kuala Lumpur, Rubber Research Institute of Malaya, Kuala Lumpur, pp. 787–795. 1961.
- [31] TATA, S.J. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia* 28, 77–85, 1980.

- 
- [32] BACKHAUS, R. A. Rubber formation in plants. *Israel J Bot* 34, 283–293, 1985.
- [33] ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES J.R. III. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5, 976–989, 1994.
- [34] TAN, H.; SUBRAMANIAN, S.A. A Five-parent diallel cross analysis for certain characters of young *Hevea* seedlings. International Rubber Conference, 1975, Kuala Lumpur. Proceedings. RRIM, V. 2, 13-16, 1976..
- [35] BURFIELD, D. R. - *Journal of Natural Rubber Research*, 1, p.202, 1986.
- [36] SEMEGEN, T. & FAH, C. 5., Natural Rubber. In: BABBIT, R. O. The Vanderbilt Rubber Handbook, Vanderbilt Co. Iric. Publi., p. 18-41, 1978.
- [37] MARINHO, J.R.D.; TANAKA, Y. Structural characterization of wild rubber: gel content. *Journal of Rubber Research*, V.2, 231-238, 1999.
- [38] TARACHIWIN *et al*, Structural cracterization of  $\alpha$ -Terminal Group of Natural Rubber. 2. Decomposition of Branch-Points by Phospholipase and Chemical Tretments. *Biomacromolecules*, 6, 1858-1863, 2005.
- [39] DASNOY, M.J.R. *Macromoléculas e polímeros*. Ed. Manole. (ISBN 85-204-1822-8) P. 189-193, 2005.
- [40] MOIR, G.F.J. *Nature (London)* 184, 1926–1928, 1959.
- [41] COOK, A.S.; SEKHAR, B.C. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 14, 163–168, 1953.
- [42] SOUTHORN, W. A. Complex Particles in *Hevea* Latex. *Nature* 188, 165 – 166, 1960.
- [43] SPENCER, D. On the presence of oxidases in India Rubber, with a theory in regard to their function in the látex. *Biochemical Journal*. V.3, 165, 1908.
- [44] PRIYADARSHAN, P.M. *Biology of Hevea rubber*. (ISBN 978-1-84593-666-2), UK ; Cambridge, MA : CABI, 2011.
- [45] ARCHER, B.L.; *et al*. The biosynthesis of rubber: Incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis* latex fractions. *Biochem. J.*, 89: 565, 1963.
- [46] TATA, S.J. Studies on the lysozyme and components of microhelices of *Hevea brasiliensis* latex, Ph.D. thesis, University of Malaya, 1980.
- [47] MOIR, G.F.J.; TATA S.J. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 16, 155– 165, 1960.
- [48] GOMEZ, J.B.; MOIR, G.K.J. The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. Monograph No. 4. Malaysian Rubber Research and Development Board, Kuala Lumpur, 1979.
- [49] SCHOON, T.H.G.F.; PHOA, K.L. Morphology of the rubber particles in natural latices. *Arch. v.d. Rubberc.*, 33, 195, 1956.

- 
- [50] DICKENSON, P.B. In *The Chemistry and Physics of the Rubber-Like Substances* (Bateman, L. ed.), Maclaren and Sons Ltd., London, p. 43, 1963.
- [51] HO, C.C., SUBRAMANIAM, A.; YONG, Y.M. Lipids associated with the particles in *Hevea* latex. *Proc. Int. Rubb. Conf. 1975 Kuala Lumpur*, Vol.II: 441-456, 1976.
- [52] YEANG, H.Y. J. *Allergy Clin. Immunol.* 98, 628–639, 1996.
- [53] BOWLER, W.W. Electrophoretic mobility of fresh *Hevea* latex. *Ind. Eng. Chem.*, 45, 1790, 1953.
- [54] NAWAMAWAT, K. *et al.* *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 390, 157–166, 2011.
- [55] PENDLE, T. D.; SWINYARD, P. E. “The Particle Size of Natural Rubber Latex Concentrates by Photon Correlation Spectroscopy”, *Journal of Natural Rubber Research*, 6(1), 1-11, 1991.
- [56] M.M. RIPPEL *et al.* Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation *Journal of Colloid and Interface Science* 268, 330–340, 2003.
- [57] DICKENSON, P.B. Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 543-559, 1969.
- [58] BOATMAN, S.G. Preliminary Physiological Studies on the Promotion of Latex Flow by Plant Growth Regulators. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 19(5), 243–258, 1966.
- [59] HAMZAH, S. GOMEZ, J.B. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia* 31, 117–129, 1983.
- [60] HSIA, R.C.H. *Trans. Inst. Rubb. Ind.* 34, 267–290, 1958.
- [61] ARCHER, B.L. *et al.* *Rubb. Res. Inst. Malaya* 21, 560–569, 1969.
- [62] National Human Genome Research Institute [Public domain], via Wikimedia Commons consultado dia 10/02/2013.
- [63] CAMPBELL, M.K.; FARREL S.O. **Bioquímica**. Versão COMBO. São Paulo: Cengage Learning, 2007.
- [64] STRYER, L. *Bioquímica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.
- [65] WILLIAMS, D.F. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- [66] SANTOS, F.P. “Desenvolvimento de Cerâmicas de Dióxido de Titânio para utilização como biomaterial”, Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica na área de Projetos e Materiais) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, UNESP – Guaratinguetá, 2002.
- [67] PARK, J.B. “Biomaterials: an introduction”, New York: Plenum Press, 1980.
- [68] TUREG, S.L. “Ortopedia, princípios e aplicações”, Flórida, Manole, 1991.

- 
- [69] NAKAYAMA, Y. *et al.* Surface microarchitectural design in biomedical applications: *In vivo* analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51, 520-528, 2000.
- [70] NAKAYAMA, Y.; MATSUDA T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: Preparation of microporus polymer surfaces by an excimer laser ablation technique. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 1295-1301, 1995.
- [71] NAKAYAMA, Y.; MATSUDA T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: *In vitro* transmural endothelialization on microporus segmented polyurethane films fabricated using an excimer laser. *Journal of Biomedical Materials Research*, 31, 235-242, 1996.
- [72] DOI K. *et al.* Novel compliant tissue-permeable microporous polyurethane vascular prosthesis fabricated using excimer ablation technique. *Journal of Biomedical Materials Research*, 31, 27-33, 1996.
- [73] NEVES Jr., W.F.P. *et al.* Influence of Fabrication Process on the Final Properties of Natural-Rubber Latex Tubes for Vascular Prosthesis ,*Brazilian Journal of Physics*, vol. 36, 2006.
- [74] ARIYOSHI, H. *et al.* Expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) vascular graft loses its thrombogenicity six months after implantation. *Thrombosis Research*, 88, 427-433, 1997.
- [75] AOMATSU, Y. *et al.* Efficacy of agarose/polystyrene sulfonic acid microencapsulation for islet xenotransplantation, *Transplant Proc.*, 32, 1071-1072, 2000.
- [76] ABALOVICH, A. *et al.* Pancreatic islets microencapsulation with polylactide-co-glycolide, *Transplant. Proc.* 33: 1977-1979, 2001.
- [77] PETERSEN, P. *et al.* Improved diffusion properties of a new polysulfone membrane for the development of a bioartificial pâncreas, *Transplant Proc.*, 33, 1952-1953, 2001.
- [78] GUPTA, B. S.; KASYANOV, V. A. Biomechanics of human commom carotid artery and design of novel hybrid textile compliant vascular grafts – *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 341-349, 1997.
- [79] FRADE, M. A. C. *et al.* Cronic phlepopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int. J. Dermatol.* 40, 3, 238-240, 2001.
- [80] MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomenbrana de látex natural com polilisina. [tese] – Ribeirão Preto (SP): Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, 2000.

- 
- [81] THOMAZINI, J. A *et al.* J. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. *Acta Microscopica*, v.6, suppl. B, p.798-799, 1997.
- [82] FRADE, M.A.C. *et al.* Natural-biomembrane dressing and hypersensitivity. *An Bras Dermatol.* 86 (5): 885-91, 2011.
- [83] ARAUJO, M.M.; MASSUDA, E.T.; HYPPOLITO, M.A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 27* (8) 2012.
- [84] MRUE, F. *et al.*, Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane, *Materials Reasearch*, Vol 4l. 7, N<sup>o</sup>. 2, 277-283, 2004.
- [85] SADER, S. L. *et al* Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana do látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovas.*, 15, 338-344, 2000.
- [86] FREITAS, M. A. S. Uso de próteses do composto de látex natural em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães. Tese de doutorado aprovado na área de Pós Graduação em Cirurgia da FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2001.
- [87] ERENO, D. Curativo de Borracha. *Pesquisa FAPESP*, n.88, p.66-69, Jun, 2003.
- [88] FIORAVANTI, C. Marcas Esmacidas, *Revista FAPESP*, Seção Tecnologia, 157, 76-79, 03/2009.
- [89] PINHO, E. C. C. M, *et al.* Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.67, p.27-32, 2004.
- [90] HERCULANO, R.D. Nitric Oxide Release Using Natural Rubber Latex as Matrix. *Materials Research.* 14(3): 355-359, 2011.
- [91] HERCULANO, R.D. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. *Materials Science and Engineering C* 31, 272–275, (2011).
- [92] FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, vol. 39, n<sup>o</sup>. 3, 2009.
- [93] MENDONÇA, R.J. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2004.
- [94] GAZELEY, K.F., GORTON, A.D.T., and PENDLE, T.D. In *Natural Rubber Science and Technology*; ROBERTS, E.D., Ed., Oxford University: New York, 1988.
- [95] BLACKLEY, D.C. *Polymers Latices*; Chapman & Hall: Glasgow, vol. 2, 1997.

- 
- [96] COCKBAIN, E.G.; PHILPOTT, M.W. Colloidal Properties of Latex. In: The Chemistry and Physics of Rubber-like Substances. Maclaren, London, 73-95, 1963.
- [97] PUJARNISCLE, S. Étude Biochimique des Lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis, Mull. Arg. Différences ET analogies avec Lex lysosomes. ORSTOM, Paris, 1971.
- [98] AOAC International, Official Methods of Analysis, 17th edition, AOAC International, Gaithersbourg, 2000.
- [99] LIANG, C.Y.; KRIMM, S. SUTHERLAND G.B.B.M. Infrared spectra of high polymers, I. Experimental methods and general theory. J Chem Phys. 25: 534-549, 1956.
- [100] KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. Adv Protein Chem. 38: 181-364, 1986.
- [101] KONG, J.; SHAONING, Y.U. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 39(8): 549-559, 2007.
- [102] SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies, 3<sup>rd</sup> Edition. ISBN: 978-0-470-09307-8. P 330-335. 2004.
- [103] LI-CHANG, E.C.Y.; MA, C.Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. Food Chemistry, v.77, p.495-502, 2002.
- [104] CAVALCANTI, .M. T. *et al.* . Avaliação da estabilidade térmica das proteínas das amêndoas de Faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart) Pax. Et K. Hoffm). Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.37-43, 2010.
- [105] NEUHOFF, V., N. AROLD, D. TAUBE e W. EHRHARDT. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis, v.9, n.6, Jun, p.255-62. 1988.
- [106] TYSON, J.J.; CHEN, K.; NOVAK, B. Network dynamics and cell physiology. Nat Rev Mol Cell Biolec, v. 2, p. 908-916, 2001.
- [107] CARSWELL, E. A.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. – An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 72, p. 3666-3670, 1975.



- [108] GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNERNBAUN, S.R. – Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, vol. 126, p. 131-138, 1982.
- [109] FORATO, L.A. *et al.* Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified  $\alpha$  zeins by <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543, 106-114, 2000.
- [110] [http://wlu.ca/docsnpubs\\_detail.php?grp\\_id=366&doc\\_id=9753](http://wlu.ca/docsnpubs_detail.php?grp_id=366&doc_id=9753) consultado em 16/04/2012.
- [111] KEDROVA, N. *et al.* *Russ. J. Inorg. Chem. (Engl. Transl.)*. 21, 1249, 1976.
- [112] WALLEN, J., BROSSET, C., VANNERBERG, N.G. *Ark. Kemi*, 18, 541, 1961.
- [113] KAMBARA, T. Polymers from isobutylene oxide and its analogs. *Makromol. Chem.* 58, 226, 1962.
- [114] RIPPEL, M. M. *et al.* Formation of calcium crystallites in dry natural rubber particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 288, 449–456, 2005.
- [115] LI, S-D., YU, H-P., ZHU, C-S., LI, P-S. Study on thermal degradation of sol and gel of natural rubber. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 75, 1339-1344.
- [116] ABAD, L. V. The effect of Proteins on the Aging Properties of Radiation Vulcanized NR Latex- Thesis – University of Santo Tomas, 1993.
- [117] SEAGER, S. L.; SLABAUGH, M. R.; *Organic and Biochemistry for Today*, Ed. 4th, 1999.
- [118] DE PAOLI, M. A.; DEGRADAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE POLÍMEROS, 2ª versão on-line (revisada), 2008.
- [119] AMNUAYPORNTRI, S.; SAKDAPIPANICH, J.; TANAKA, Y.; Highly Purified Natural Rubber by Saponification of Latex: Analysis of Green and Cured Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, V. 118, 3524 – 3531, 2010.
- [120] PRIVALOV, P.L.; POTEKHIN, S.A. Scanning microcalorimetry in studying temperature - induced changes in proteins. *Methods Enzymol*, 131: 4 – 51, 1986.
- [121] AMANI, M. *et al.* Two-state irreversible thermal denaturation of Euphorbia characias látex amine oxidase. *Biophysical Chemistry* 125, 254–259, 2007.
- [122] FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, Oxford, doi:10.1016/j.foodhyd.2006.07.007, 2006.

- 
- [123] MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plant II. Structure characterization. Food Chemistry, v. 63, n. 2, p. 265-274, 1998.