

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

ESTUDO DA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DE PEPTÍDEOS HORMONAIS
UTILIZANDO MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL COMO CARREADOR

Natan Roberto de Barros

Dissertação de Mestrado

2016

NATAN ROBERTO DE BARROS

Estudo da incorporação e liberação de peptídeos
hormonais utilizando membranas de látex natural como
carreador

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

Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano

Coorientador: Eduardo Maffud Cilli

Coorientador: Ricardo José de Mendonça

Araraquara

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B277e	<p>Barros, Natan Roberto de</p> <p>Estudo da incorporação e liberação de peptídeos hormonais utilizando membranas de látex natural como carreador / Natan Roberto de Barros. – Araraquara: [s.n], 2016 69 f.: il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano Coorientador: Eduardo Maffud Cilli Coorientador: Ricardo José de Mendonça</p> <p>1. Látex. 2. Materiais biomédicos. 3. Peptídeos. 4. Preparações de liberação controlada. 5. Elastômeros.</p> <p>I. Título</p>
-------	---

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

NATAN ROBERTO DE BARROS

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

Araraquara, 25 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto / UNAERP / Ribeirão Preto - SP

Agradecimentos

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. Ao meu pai, por me ensinar que não se deve desistir de seus sonhos. À minha mãe, amor incondicional. Mãe, você que me gerou e me alfabetizou, ensinando-me a ler, viu como aprendi direitinho? A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

A todos os meus familiares, irmãs, primos, tios, sobrinhos. Não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Mas há aquelas pessoas especiais que diretamente me incentivaram.

Aos modelos em que procuro me espelhar sempre: vô José Roberto (in memoriam) e vô Celso de Barros (in memoriam), amor incondicional eterno, e por me terem ensinado a ser humilde, na essência da palavra. Que falta vocês me fazem! Vó Zilda Roberto e vó Rosenei de Barros pela garra, perseverança e por todo o amor.

Às minhas irmãs, por todo o amor, carinho e força que me deram durante esta importante etapa de minha vida.

À minha companheira Camila dos Reis, por toda paciência e compreensão durante meus momentos de desequilíbrio emocional, e principalmente por todo o amor e carinho, demonstrações de afeto estas que me mantiveram firme em minha luta.

Aos amigos que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver incluindo todos os integrantes dos laboratórios de Síntese de Peptídeos e o laboratório de Proteômica, não citarei nomes para não esquecer de ninguém.

Ao meu mais que amigo, um verdadeiro irmão, Matheus Miranda por incontáveis momentos em que sua amizade foi de suma importância em diversos aspectos de minha vida, tanto profissional quanto pessoal.

Aos Professores Dr.^o Rondinelli Donizetti Herculano, Dr.^o Eduardo Maffud Cilli e Dr.^o Ricardo José de Mendonça, meus orientadores e exemplos, tanto profissional quanto social, e principalmente por toda confiança e paciência que tiveram comigo. Quando “crescer”, eu quero ser como vocês.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todas as almas boas e espíritos de luz.

Meus sinceros agradecimentos.

ABSTRACT

The latex extracted from *Hevea brasiliensis* rubber tree have shown promising results in biomedical applications, where membranes produced from this material have been used as medical implants and grafts, due to its biocompatibility and natural stimulation of angiogenesis. The aim of this work was to incorporate peptides into natural latex membranes and the study of its release. We look forward to the results, enabling the use of natural latex as Controlled Release System of peptides and/or proteins.

The rate of peptide release were monitored and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in an analytical way. The peptides incorporation into latex membranes followed different characterizations, such as: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) which identified the stability of peptides after incorporation into the natural latex by the preservation of characteristic bands for peptides, among them, 1643 - 1638 cm^{-1} NH strain of amines and amides C=O; 1524 - 1514 cm^{-1} strain C=C aromatic; and 542 - 498 cm^{-1} strain S-S, fluid absorption capacity, the loss in weight in aqueous solutions, HPLC and Scanning Electron Microscopy (SEM).

During the release tests of peptides by the natural latex membranes, it was observed instability of the peptides in solution, with total extinction in periods that ranged between 48 and 120 hours in pH 7.4; 12.0; and distilled water (pH 5.6 - 6.4). However, for acetate buffer solution (pH 4.0) was not observed instability of peptides. Therefore, these results suggest that there are possible interferences caused by alkaline proteases present in the natural latex.

Additionally, in order to remove the causative agent of degradation, were prepared new membranes subjected to washing treatment, and the peptides posteriorly adsorbed on the membranes. During the release tests, it was possible to observe the release and stability of peptides with 60% released at 96 hours for the peptide desmopressin; 90% in 24 hours for somatostatin; 45% in 8 hours for oxytocin; and 80% at 24 hours for octreotide.

From these results we can say that the natural latex can be used as solid matrix in the topical & transdermal delivery of peptides, however, it is necessary further research into the proteolytic enzymes present in the natural latex extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis*.

Keywords: natural rubber latex, peptide, controlled release, biomaterial.

RESUMO

O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* têm mostrado promissores resultados em aplicações biomédicas, onde membranas produzidas deste material têm sido utilizadas como próteses e enxertos médicos devido às suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese. O objetivo desse trabalho consiste na incorporação de peptídeos em membranas de látex natural e no estudo de suas liberações. Esperamos com os resultados, viabilizar o uso do látex natural como sistema de liberação sustentada de peptídeos e/ou proteínas.

A taxa de liberação dos peptídeos foi monitorada e quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em modo analítico. A incorporação do peptídeo às membranas de látex acompanhou diferentes caracterizações, dentre elas: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) que identificou a estabilidade dos peptídeos após incorporação ao látex natural pela preservação de bandas características para os peptídeos, dentre elas, as bandas 1643 – 1638 cm^{-1} deformação NH de aminas e C=O de amidas; 1524 - 1514 cm^{-1} deformação C=C de aromáticos; e 542 – 498 cm^{-1} deformação S-S, Capacidade de absorção de fluídos, Perda de massa em soluções aquosas, CLAE e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Durante os ensaios de liberação dos peptídeos pelas membranas de látex natural, observou-se a instabilidade dos peptídeos em solução, com degradação total em períodos que variaram de 48 a 120 horas nos valores de pH 7,4; 12,0; e água destilada (pH 5,6 – 6,4). Entretanto, para a solução de tampão acetato pH 4,0 não houve instabilidade dos peptídeos em solução. Desta forma, estes resultados sugerem a possível interferência causada por proteases alcalinas presentes no látex natural.

Adicionalmente, com o propósito de eliminar das membranas o agente causador da degradação dos peptídeos, foram confeccionadas novas membranas submetidas ao tratamento de lavagem, e posteriormente os peptídeos foram adsorvidos às membranas. Durante os ensaios de liberação foi possível observar a liberação e a estabilidade dos peptídeos com liberação de 60% em 96 horas para o peptídeo desmopressina; 90% em 24 horas para somatostatina; 45% em 8 horas para ocitocina; e 80% em 24 horas para octreotida.

A partir destes resultados podemos afirmar que o látex natural pode ser utilizado como matriz sólida na liberação tópica de peptídeos, no entanto, se faz necessária maior investigação sobre as enzimas proteolíticas presentes no látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*.

Palavras-Chaves: látex natural, peptídeo, liberação sustentada, biomaterial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sangria realizada na seringueira para coleta do látex.....	17
Figura 2: A - Monômero de poli(<i>cis</i> -1,4-isopreno); B - Partícula de borracha envolta por fina camada de fosfolipídios e proteínas.	18
Figura 3: Indução da angiogênese causada por membranas de látex natural.	19
Figura 4: Sétimo dia pós-operatório: a) Grupo membrana; b) Grupo controle.	20
Figura 5: Evolução da cicatrização da úlcera através da aplicação da membrana de látex: A - Aspecto inicial da ferida apresentando grande quantidade de tecido fibroso necrosado; B - Aplicação da membrana de látex natural; C - Ferida apresentando redução do tecido fibroso necrosado; D - Ferida em estágio avançado de cicatrização.....	21
Figura 6: Membrana de látex natural utilizada como barreira mecânica: A - Esquema com o local da cirurgia e as regiões. B - Radiografias digitais do grupo tratado (A) e grupo controle (B).	22
Figura 7: Estrutura molecular do peptídeo Desmopressina.	25
Figura 8: Estrutura molecular do peptídeo Ocitocina.	26
Figura 9: Estrutura molecular do peptídeo Somatostatina.	27
Figura 10: Estrutura molecular do peptídeo Octreotida.	28
Figura 11: Aplicação do sistema liberador de peptídeos na pele.	28
Figura 12: Passos realizados durante a confecção das membranas de látex natural.	31
Figura 13: Membranas de látex natural confeccionada em liofilizador.	31
Figura 14: Processo de remoção das substâncias naturais fracamente ligadas ao látex natural: A – Membrana antes do tratamento; B – Membrana após o tratamento.	37
Figura 15: Adsorção da solução de peptídeos pelas membranas de látex.	38
Figura 16: Espectro de FTIR da membrana de látex natural.....	41

Figura 17: Espectros de FTIR dos peptídeos: A - desmopressina; B - ocitocina; C - somatostatina; D - octreotida.....	42
Figura 18: Espectros de FTIR comparativos entre o látex natural (NRL), peptídeos, e membranas de látex natural carregadas com peptídeos: A – Desmopressina; B – Ocitocina; C – Somatostatina; D – Octreotida.	44
Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura (x300): A – Peptídeo desmopressina liofilizado; B – Membrana de látex natural (pura); C – Membrana de látex natural carregada com peptídeo desmopressina.	46
Figura 20: Microscopia Eletrônica de Varredura (x300) em corte transversal: A – Membrana de látex natural (pura); B – Membrana de látex natural carregada com peptídeo desmopressina.	47
Figura 21: Cinéticas de liberação dos peptídeos em diferentes valores de pH:	49
Figura 22: Análise de degradação do peptídeo desmopressina: A - Cromatograma padrão para o peptídeo desmopressina; B - Comparação da liberação da membrana de látex natural pura e membrana de látex natural contendo o peptídeo desmopressina. Onde <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> e <i>e</i> são produtos de degradação do peptídeo, e <i>d</i> é o pico característico para o peptídeo.....	53
Figura 23: Liberação de desmopressina seguida pela degradação do pico característico do peptídeo e o surgimentos de picos para os produtos de degradação.	54
Figura 24: Cinéticas de liberação dos peptídeos: A - Desmopressina; B - Somatostatina; C - Ocitocina; D - Octreotida.....	56
Figura 25: Liberação e estabilidade do peptídeo desmopressina quando incorporado em membranas tratadas.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros analisados no látex natural pela BDF – Comércio de Produtos Agrícolas LTDA.	30
Tabela 2: Tempos de coleta e volume total no sistema de liberação.	35
Tabela 3: Condições utilizadas durante as análises de degradação dos peptídeos.	36
Tabela 4: Valores obtidos para a capacidade de absorção de soluções aquosas por 24 horas a 37°C e perda de massa das membranas por 7 dias a 37°C... ..	40
Tabela 5: Resultados obtidos durante os ensaios de degradação dos peptídeos hormonais.....	52
Tabela 6: Valores das constante obtidas a partir da função bi-exponencial aplicada as cinéticas de liberação dos peptídeos.....	58
Tabela 7: Valores obtidos para os modelos matemáticos semi-empíricos.	61

SUMÁRIO

1. OBJETIVOS	14
2. INTRODUÇÃO	15
2.1. Liberadores poliméricos	15
2.2. Látex natural	16
2.2.1. Importância comercial.....	16
2.2.2. Extração e composição.....	16
2.2.3. Aplicações biológicas.....	18
2.2.4. Matriz sólida na liberação controlada.....	22
2.3. Peptídeos	24
2.3.1. Desmopressina	24
2.3.2. Ocitocina.....	25
2.3.3. Somatostatina	26
2.3.4. Octreotida	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Obtenção dos peptídeos	29
3.2. Obtenção do látex para a preparação das membranas	29
3.3. Confeção das membranas	30
3.4. Capacidade de absorção de soluções aquosas após 24 horas	31
3.5. Perda de massa após exposição a soluções aquosas	32
3.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ..	33
3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
3.8. Ensaio de liberação	34
3.9. Análise de degradação dos peptídeos	35
3.10. Ensaio de liberação dos peptídeos por membranas lavadas	36

3.11. Análise estatística	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Capacidade de absorção e perda de massa	39
4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ..	40
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
4.4. Ensaio de liberação dos peptídeos	47
4.5. Ensaio de degradação dos peptídeos.....	51
4.6. Ensaio de liberação dos peptídeos pelas membranas tratadas (lavadas)	54
5. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	65

1. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver um sistema de liberação sustentada a base de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* capaz de liberar peptídeos sem que haja a degradação destes.

Para isto, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Confecção de membranas de látex natural carregadas com peptídeos cíclicos (desmopressina, somatostatina, ocitocina e octreotida) pelo método de liofilização proposto por Miranda (2014). Em resultados apresentados por Miranda (2014), os peptídeos incorporados ao látex natural estariam, possivelmente, sendo degradados por enzimas proteolíticas presentes no material. Logo, os peptídeos utilizados neste trabalho foram selecionados estritamente pela presença de uma ligação dissulfeto, ligação esta que mantém a cadeia destes peptídeos em estrutura cíclica, protegendo-os da clivagem enzimática pela diminuição da especificidade das enzimas pelo substrato.
- Desenvolvimento de membranas de látex natural submetidas ao tratamento de lavagem com o objetivo de eliminar as enzimas proteolíticas presentes na matriz polimérica e posterior adsorção dos peptídeos.
- Caracterização estrutural das membranas obtidas por meio da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), capacidade de absorção de soluções aquosas após 24 horas, perda de massa após exposição a soluções aquosas e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Estudo da cinética de liberação dos peptídeos em diferentes soluções (água deionizada (pH 5,6 – 6,4); tampão acetato pH 4,0; tampão fosfato salino pH 7,4; tampão carbonato pH 12,0). O estudo da liberação dos peptídeos pelas membranas de látex natural em diferentes valores de pH foi proposto com o objetivo de avaliar a taxa de peptídeo liberado em determinado pH, e principalmente identificar os valores de pH em que os peptídeos não fossem degradados pelas enzimas proteolíticas liberadas pela matriz polimérica.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Liberadores poliméricos

Os polímeros têm desempenhado um papel fundamental no avanço da tecnologia de liberação de fármacos, proporcionando a liberação sustentada de agentes terapêuticos em doses constantes durante longos períodos, além da dosagem cíclica e liberação ajustável de fármacos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos (LIECHTY et al., 2010). De início com a utilização de materiais já disponíveis o campo têm crescido muito, impulsionado pelas inovações nas áreas da engenharia química, engenharia de materiais e bioengenharia. Atualmente, os modernos avanços na liberação de fármacos visam o desenvolvimento dos polímeros para aplicações específicas (LIECHTY et al., 2010).

Diversos polímeros sintéticos e naturais são utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada. Esses dispositivos são projetados para terem propriedades cada vez mais específicas e adequadas ao fármaco a ser empregado e ao sítio a ser atingido (KANG et al., 2006).

Um dos polímeros naturais amplamente utilizados no estudo da liberação sustentada de fármacos é o látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. O látex natural ganhou seu espaço em meio aos estudos sobre o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada devido às suas características físicas e de atividade biológica. A seguir, apresentamos um breve histórico das atividades biológicas do látex natural, e que despertaram o interesse de pesquisadores em sua utilização.

2.2. Látex natural

2.2.1. Importância comercial

A borracha natural obtida da seringueira *Hevea brasiliensis* apresenta um grande espectro de aplicações industriais, tais como a fabricação de pneus, luvas, balões, peças para equipamentos médicos e odontológicos.

O Brasil desfrutou da condição de principal produtor e exportador mundial do látex natural no final do século XIX e início do século XX, passando a ser importador desta matéria-prima a partir de 1950 (MORENO et al., 2003). Apesar de o Brasil ser o berço da *H. brasiliensis*, o país contribuiu com apenas 1,30% da produção mundial no ano de 2002, porém sua participação no consumo mundial foi ao redor de 3,5% (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2002).

A importância comercial do látex natural e sua utilização em diversas aplicações industriais se devem principalmente às suas características físicas tais como elasticidade, plasticidade, resistência e propriedades de isolamento elétrico.

2.2.2. Extração e composição

O látex de borracha natural é extraído manualmente da seringueira *H. brasiliensis* (Figura 1), uma árvore originária da bacia hidrográfica do Rio Amazonas. Após esta extração, hidróxido de amônio (NH_4OH) é adicionado ao látex natural para mantê-lo em sua forma líquida, pois este material coagula em valores de pH próximos da neutralidade (HERCULANO, 2009).

Figura 1: Sangria realizada na seringueira para coleta do látex.

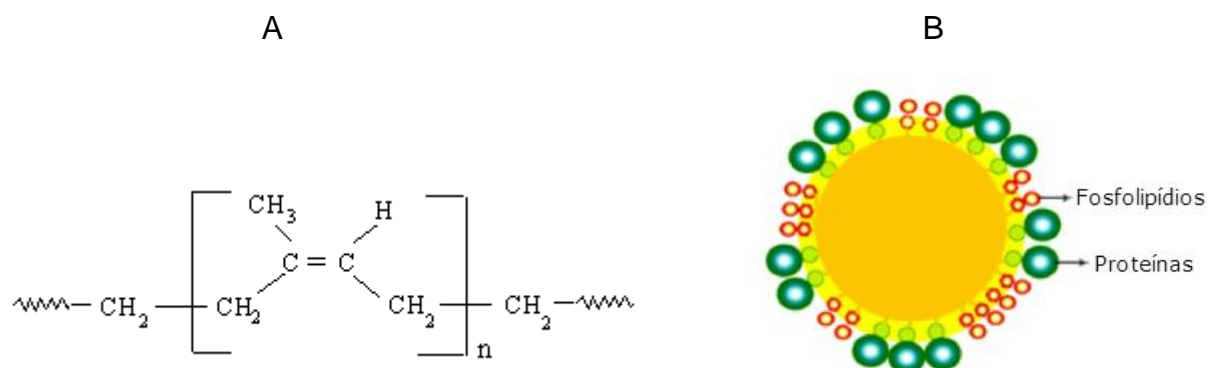


Fonte: Herculano (2009).

O látex natural é uma mistura coloidal de partículas de borracha estabilizadas por uma fina camada de fosfolipídios e proteínas. Estas partículas são constituídas principalmente de:

- Poli(*cis*-1,4-isopreno) (Figura 2A), um polímero de elevada massa molecular: 500 - 2000 kDa (D'AUZAC, JACOB e CHRESTIN, 1989).
- Geralmente são esféricas e ovóides, mas também podem apresentar formato de pera, e variar consideravelmente em tamanho entre 60 Å e ~ 5-6 µm (NAWAMAWAT et al., 2011).
- Representam valores entre 30 e 45% do volume total do látex líquido, e 90% de sua massa seca (HASMA e SUBRAMAUIAN, 1986).
- São envolvidas por uma fina camada de fosfolipídios e proteínas (Figura 2B). As cargas negativas dos fosfolipídios e proteínas presentes nesta camada asseguram a estabilidade coloidal do meio (NAWAMAWAT et al., 2011). Os lipídios e fosfolipídios que formam esta camada constituem 1,4 - 3,2% da massa da borracha e contêm 0,4 - 1,2% de lipídeos neutros (HASMA e SUBRAMAUIAN, 1986).

Figura 2: A - Monômero de poli(*cis*-1,4-isopreno); B - Partícula de borracha envolta por fina camada de fosfolipídios e proteínas.



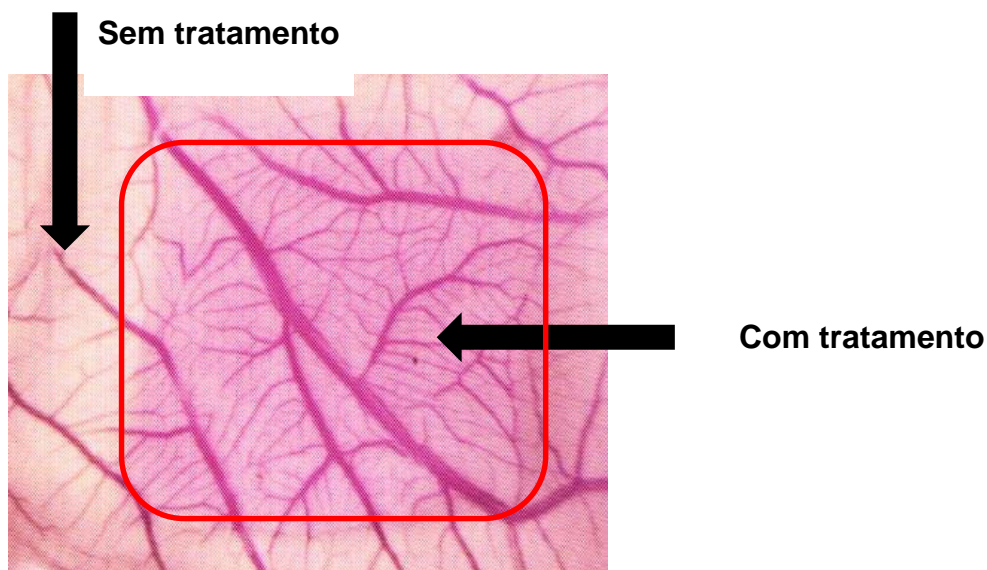
Fonte: Cavaleiro e Martins (2010) e Nawamawat et al. (2011).

2.2.3. Aplicações biológicas

Além das aplicações industriais citadas anteriormente, alguns trabalhos vêm utilizando o látex extraído da seringueira *H. brasiliensis* em aplicações biomédicas. Neste tipo de aplicação o método de fabricação do látex utilizado é o NRLb (Natural Rubber Latex Biomedical), que evita a utilização de produtos químicos como os carbamatos e o enxofre (PINHO et al., 2004). O NRLb foi proposto porque o NRL (utilizado anteriormente) apresentava reações alérgicas e citotóxicas (ALLARCON et al., 2003).

Alves (2003) analisou o estímulo da atividade angiogênica na biomembrana cório-alantóide de embriões de galinha por diferentes clones de membranas de látex natural. Os resultados mostraram que nos locais onde as membranas estavam presentes houve um grande estímulo da formação de novos vasos sanguíneos (Figura 3), confirmando que o látex natural extraído da seringueira *H. Brasiliensis* possui a capacidade de induzir a angiogênese.

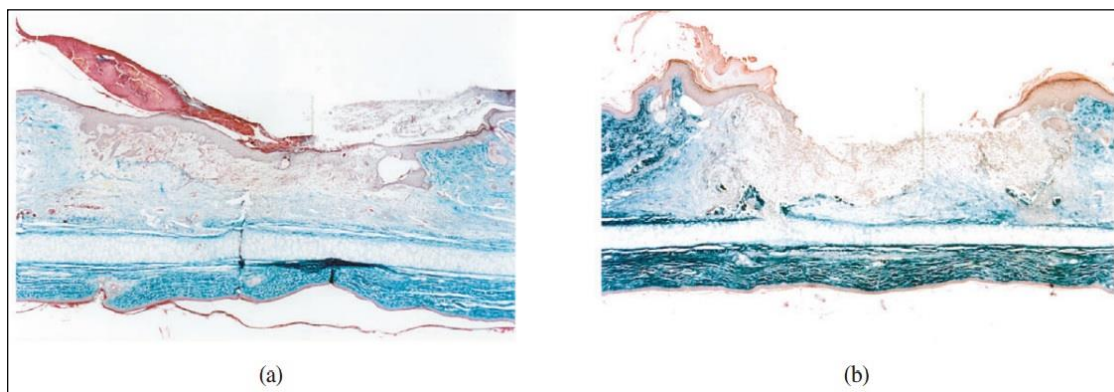
Figura 3: Indução da angiogênese causada por membranas de látex natural.



Fonte: Alves (2003).

Mrué et al. (1996) empregou a membrana de látex natural pela primeira vez como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. Neste estudo o látex funcionaria apenas como uma prótese. No entanto, os resultados mostraram que o látex teve propriedade indutora da reconstituição tecidual, sendo totalmente eliminado nas fezes dos animais dez dias após o implante. No lugar da prótese formou-se um “neo-esôfago”. A Figura 4 mostra que 7 dias após o implante houve uma reconstituição tecidual muito mais organizada no grupo membrana, quando comparada ao grupo controle (grupo que a membrana de látex não foi utilizada).

Figura 4: Sétimo dia pós-operatório: a) Grupo membrana; b) Grupo controle.

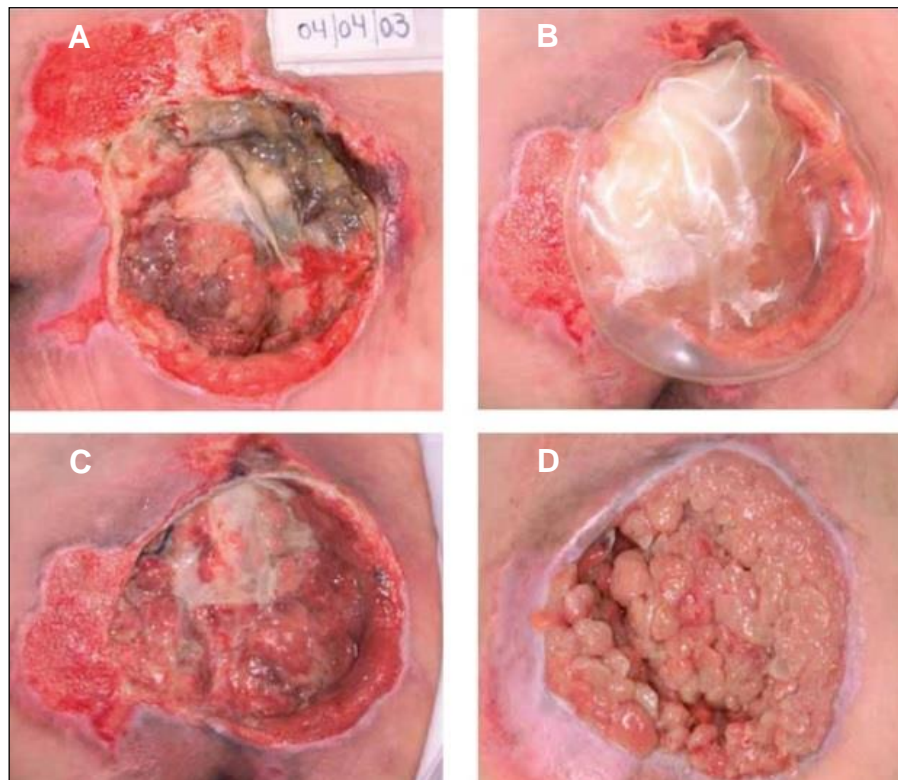


Fonte: Mrué et al. (1996).

Sader et al. (2000) avaliou o comportamento da membrana de látex natural como substituto parcial do pericárdio de cães. Durante a pesquisa foram avaliados três grupos: grupo A, onde o pequeno pedaço do pericárdio foi removido e reimplantado imediatamente; grupo B, em que o pequeno pedaço foi removido e substituído por um de látex natural com 0,3 mm de espessura; grupo C, no qual o pequeno pedaço de látex tinha 0,7 mm de espessura. Em 50% dos animais do grupo B e C houve completa regeneração do pericárdio. Nos cães do grupo A foi observado um quadro de regeneração irregular do pericárdio. Os resultados obtidos mostraram que as membranas de látex foram eficientes na substituição parcial do pericárdio de cães.

Frade et al. (2004) realizou um estudo de grande impacto social, onde membranas de látex natural foram empregadas como material indutor da cicatrização de úlceras diabéticas. A Figura 5 mostra uma ferida em estágio avançado de cicatrização após 2 meses de uso contínuo da membrana.

Figura 5: Evolução da cicatrização da úlcera através da aplicação da membrana de látex: A - Aspecto inicial da ferida apresentando grande quantidade de tecido fibroso necrosado; B - Aplicação da membrana de látex natural; C - Ferida apresentando redução do tecido fibroso necrosado; D - Ferida em estágio avançado de cicatrização.



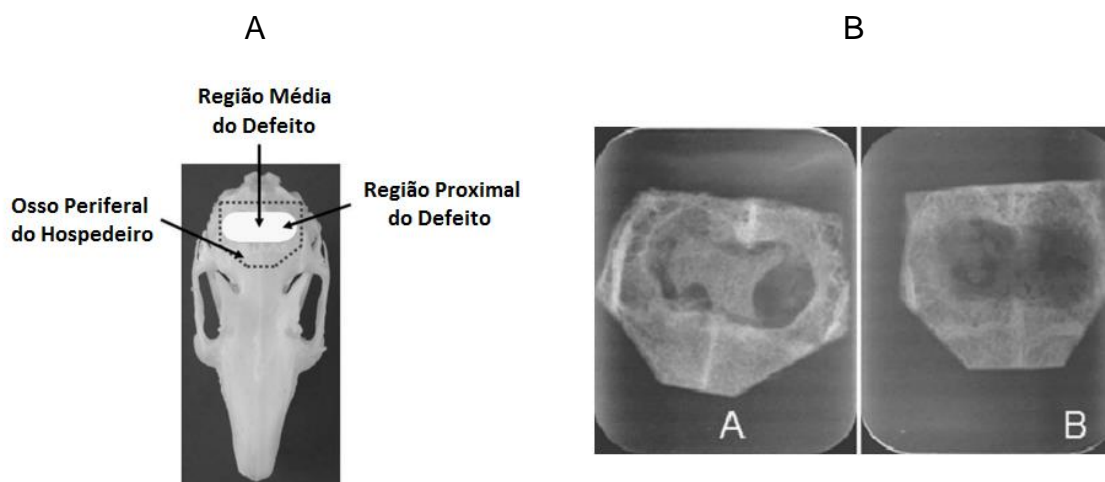
Fonte: Frade et al. (2004).

Ereno et al. (2010) utilizaram membranas de látex natural na regeneração óssea. Neste experimento, as membranas foram aplicadas sobre a fratura óssea impedindo a migração do tecido epitelial e conjuntivo, facilitando a migração de células ósseas regenerativas. A Figura 6A, mostra o esquema da cirurgia e suas regiões, e a Figura 6B mostra as radiografias digitais do grupo tratado (A) e do grupo controle (B) 120 dias após a cirurgia.

Figura 6: Membrana de látex natural utilizada como barreira mecânica:

A - Esquema com o local da cirurgia e as regiões.

B - Radiografias digitais do grupo tratado (A) e grupo controle (B).



Fonte: Ereno et al. (2010).

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

2.2.4. Matriz sólida na liberação sustentada

O látex natural tornou-se alvo de grande interesse no estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de substâncias de interesse farmacológico. Murbach (2014) estudou a utilização do látex natural como matriz sólida na liberação sustentada do antibiótico ciprofloxacina, com objetivo de desenvolver uma matriz capaz de liberar o composto em doses constantes, diminuindo os efeitos dos picos de concentração do fármaco no sangue pela administração periódica comumente realizada. Durante os experimentos realizados a matriz polimérica foi capaz de liberar o fármaco por um período de até 170 horas.

Borges, et al. (2014) estudou a liberação de extrato natural da *Casearia sylvestris* empregando o látex natural, pois este extrato apresenta atividades antiinflamatórias, analgésicas, anticépticas e antitumorais provenientes das casearinas e fenóis presentes neste. Neste estudo foi identificado a liberação de mais de 80% de todo o extrato incorporado ao látex.

Pichayakorn, et al. (2012) realizou um estudo da liberação tópica de nicotina por membranas de látex natural para utilização no tratamento contra o uso do tabaco. Este trabalho mostra que o látex é eficaz na liberação de nicotina por períodos de 24 horas.

Guidelli, et al. (2013), utilizou o látex natural como suporte sólido na liberação de nanopartículas de prata para o desenvolvimento de uma matriz que além de proporcionar uma cicatrização acelerada, proporciona também o controle microbiológico na ferida. Neste trabalho foi observada a liberação das nanopartículas por até 48 horas.

Herculano et al. (2009) demonstrou a utilização do látex natural como matriz para um sistema de liberação controlada de metronidazol. Neste estudo a quantidade de fármaco liberada foi variada pelo controle da densidade de poros na superfície da membrana, esta modificação da densidade de poros foi obtida a partir da utilização de baixas temperaturas durante a confecção das membranas carregadas com o fármaco. Assim, Herculano et al. (2009) propôs a utilização do látex natural como sistema de liberação sustentada variável às necessidades de cada paciente.

A partir destas referências podemos concluir que o látex natural extraído da seringueira *H. brasiliensis* pode ser utilizado como matriz sólida na liberação de diferentes tipos de substâncias. “Mas será que toda e qualquer substância poderia ser incorporada ao látex natural, e posteriormente liberada por este material?”

Miranda (2014) realizou testes de liberação do peptídeo antimicrobiano hylina a1 utilizando membranas de látex natural polimerizadas por liofilizador. No entanto, não foi possível observar a liberação do peptídeo pelas membranas. Com o objetivo de entender a não liberação do composto, foram realizados testes de incubação do peptídeo em presença de solução liberada pelas membranas. Assim, durante estes testes foi observada a degradação do peptídeo. Segundo o autor esta degradação pode ter sido causada, possivelmente, pela ação de enzimas proteolíticas presentes no látex natural.

O objetivo do presente trabalho foi a utilização do látex natural como suporte na liberação de peptídeos cíclicos. Estes peptídeos foram selecionados, pois sua estrutura cíclica é mantida por ligações dissulfeto, que por sua vez, protegem estes peptídeos da ação enzimática. Para isto, foram selecionados 4 (quatro) peptídeos cíclicos obtidos pela síntese em fase sólida, já disponíveis em nosso laboratório: desmopressina, ocitocina, somatostatina e octreotida.

2.3. Peptídeos

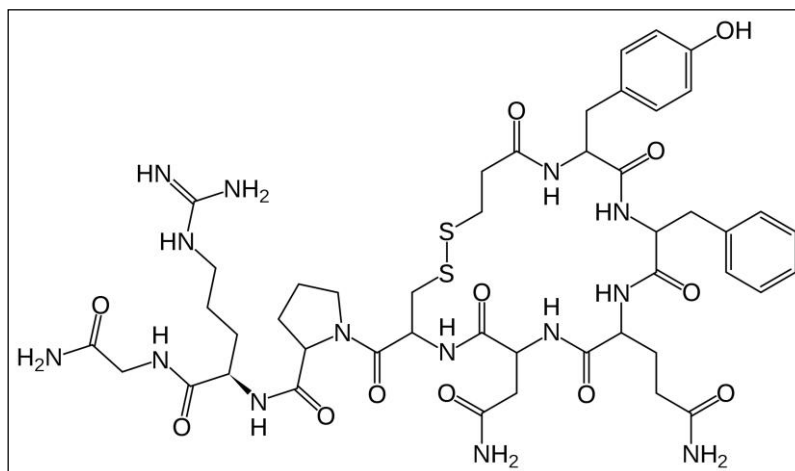
2.3.1. Desmopressina

A desmopressina é um peptídeo sintético análogo do peptídeo natural vasopressina (ADH ou hormônio antidiurético), um hormônio que reduz a produção de urina (REZAKHANIHA, ARIANPOUR e SIROOSBAKHAT, 2011). Ela pode ser administrada por via nasal, intravenosa, ou como um comprimido oral ou sublingual. Os médicos prescrevem a desmopressina mais frequentemente para o tratamento de diabetes insipidus, enurese noturna ou noctúria (CVETKOVIC e PLOSKER, 2005).

A disponibilidade biológica da desmopressina é variável entre 0,08 – 0,16% (administração oral), possuindo tempo de meia vida entre 1,5 - 2,5 horas, sua taxa de ligação às proteínas do plasma sanguíneo é de 50%, e sua eliminação é realizada por excreção renal.

A desmopressina (Figura 7) possui fórmula molecular $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$, massa molecular de 1069,22 g/mol e sequência de aminoácidos: Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-Gly-NH₂. [Ligação dissulfeto Mpr¹-Cys⁶] (POLYPEPTIDE GROUP, 2014b).

Figura 7: Estrutura molecular do peptídeo Desmopressina.



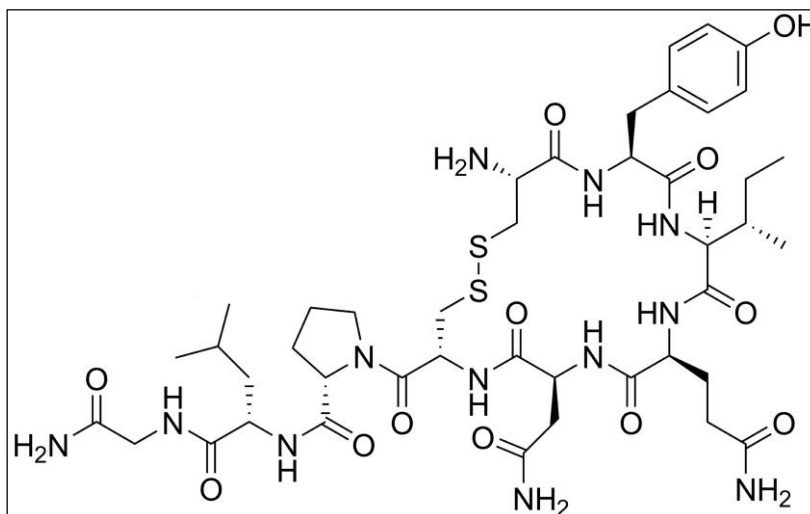
Fonte: Polypeptide group (2014b).

2.3.2. Ocitocina

Ocitocina ou oxitocina é um peptídeo hormonal - produzido pelo hipotálamo, armazenado e secretado pela glândula pituitária posterior - que tem as funções de promover as contrações musculares uterinas e reduzir o sangramento durante o parto, estimular a liberação do leite materno, desenvolver apego e empatia entre pessoas, produzir parte do prazer do orgasmo, mas que também produz medo do desconhecido (SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2010; LEE et al., 2009). Além disso a ocitocina possui disponibilidade biológica próxima de zero, com tempo de meia vida entre 1 - 6 minutos na corrente sanguínea, sua taxa de ligação às proteínas do plasma sanguíneo é de 30%, e sua eliminação é biliar e renal.

A ocitocina (Figura 8) possui fórmula molecular $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$, massa molecular de 1007,19 g/mol e sequência de aminoácidos: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂. [Ligação dissulfeto Cys¹-Cys⁶] (POLYPEPTIDE GROUP, 2014d).

Figura 8: Estrutura molecular do peptídeo Ocitocina.



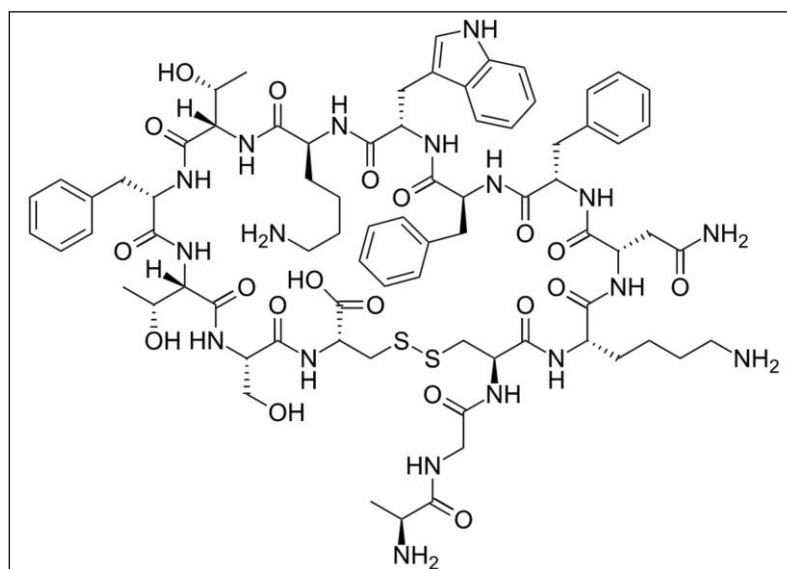
Fonte: Polypeptide group (2014d).

2.3.3. Somatostatina

A somatostatina é um hormônio peptídico que regula o sistema endócrino e afeta a neurotransmissão e a proliferação celular através da interação com a G protein–linked receptors (GPLR), uma grande família de proteínas de receptores que detectam moléculas fora da célula e ativam as vias de transdução de sinal para dentro e as respostas celulares, além de ocasionar a inibição da liberação de vários hormônios secundários. Também possui a capacidade de inibir a secreção de outros hormônios como insulina e glucagon.

A somatostatina possui duas formas ativas produzidas por clivagem alternativa de uma única pré-proteína: uma de 14 aminoácidos e outra de 28 aminoácidos (DICKINSON et al., 1996). A somatostatina (Figura 9) utilizada neste trabalho (14 aminoácidos) apresenta tempo de meia vida entre 2 - 3 minutos, fórmula molecular $C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$, massa molecular de 1637,88 g/mol e sequência de aminoácidos: Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH . [Ligação dissulfeto Cys³-Cys¹⁴] (POLYPEPTIDE GROUP, 2014a).

Figura 9: Estrutura molecular do peptídeo Somatostatina.



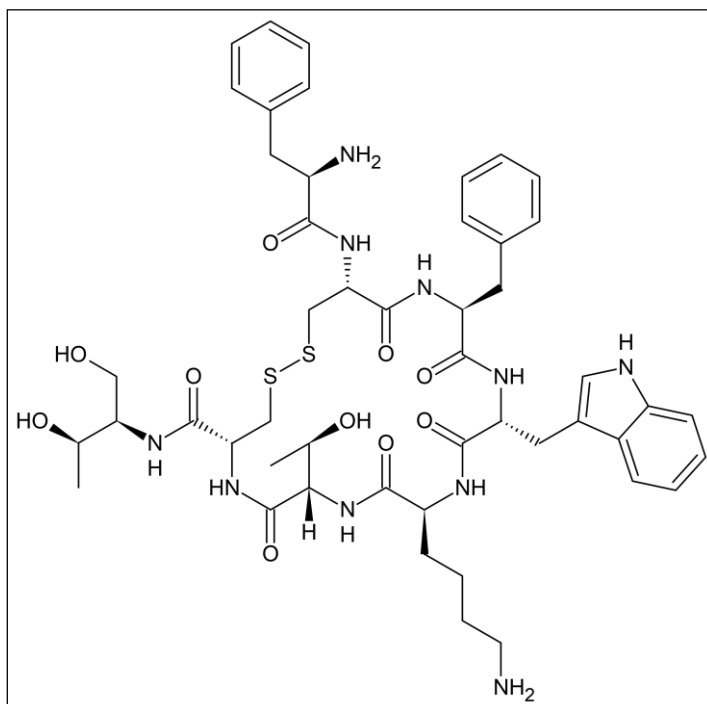
Fonte: Polypeptide group (2014a).

2.3.4. Octreotida

Octreotida é um octapeptídeo que farmacologicamente imita a somatostatina natural, possuindo tempo de meia vida de aproximadamente 90 minutos (PANUS et al., 2009). Além disso, é um inibidor mais potente do hormônio de crescimento, glucagon e insulina do que o hormônio natural (somatostatina). Este peptídeo foi sintetizado pela primeira vez em 1979 pelo químico Wilfried Bauer (DRUGSUPDATE, 2011).

A octreotida (Figura 10) possui fórmula molecular $C_{49}H_{66}N_{10}O_{10}S_2$, massa molecular de 1019,24 g/mol e sequência de aminoácidos: D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH . [Ligação dissulfeto Cys²-Cys⁷] (POLYPEPTIDE GROUP, 2014c).

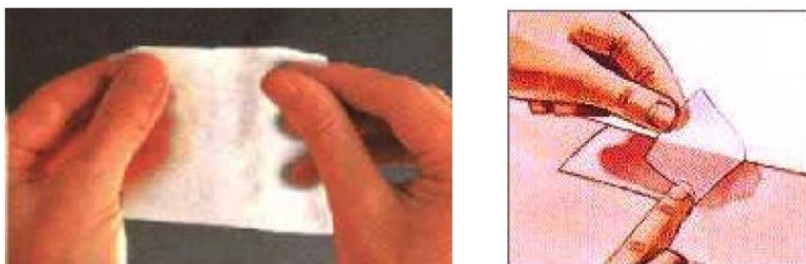
Figura 10: Estrutura molecular do peptídeo Octreotida.



Fonte: Polypeptide group (2014c).

A Figura 11 mostra uma das possíveis aplicações do látex natural carregado com estes peptídeos hormonais, sob a forma de emplastos ou ataduras oclusivas. A proposta é produzir um novo tipo de *“band aid”* contendo peptídeos em membranas de látex, que ao ser exposto com a pele reage com a liberação dos compostos. Assim, este adesivo dérmico poderia ser empregado em todo o espectro de ação destes peptídeos, como por exemplo, no tratamento da incontinência urinária e na estimulação da liberação de leite materno (em humanos e em outros animais), possibilitando assim, aplicações de grande interesse comercial e social.

Figura 11: Aplicação do sistema liberador de peptídeos na pele.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos peptídeos

Os peptídeos (desmopressina, somatostatina, ocitocina e octreotida) utilizados no presente trabalho, foram cedidos pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. Os peptídeos foram previamente sintetizados na Unidade de síntese, estrutura e aplicação de peptídeos e proteínas (USEAPP) pelo uso do método de síntese de peptídeos em fase sólida, purificados e caracterizados por CLAE e espectroscopia de massas, para a obtenção dos peptídeos com 97% de pureza.

3.2. Obtenção do látex para a preparação das membranas

O látex natural utilizado neste projeto de pesquisa foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã - SP. Este látex é obtido da mistura de dois clones: RRIM 600 e PB 235 (Lote: 01703/13). Depois da extração, o látex é mantido em fase líquida através da adição de hidróxido de amônio corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,20. Após adição do hidróxido de amônio, o material é então centrifugado a 8000g para retirar o excesso de proteínas contidas no látex natural, esta etapa de centrifugação é importante, pois elimina as proteínas causadoras das reações alérgicas inconvenientes para o uso do látex natural como biomaterial.

O látex natural empregado seguiu os padrões de controle de qualidade da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA. Os resultados das análises realizadas pela empresa para o Lote nº 01703/13 utilizado neste trabalho, estão listados na Tabela 1.

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

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

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

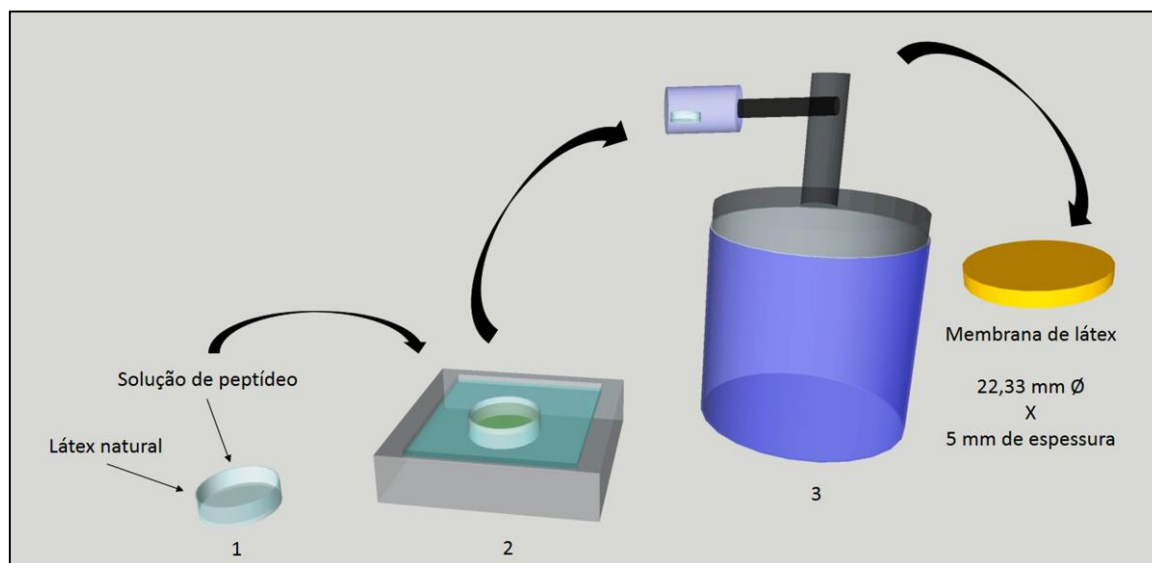
* Unidades não informadas.

3.3. Confeção das membranas

A confeção das membranas contendo os peptídeos foi realizada pelo método desenvolvido por Miranda (2014), com pequenas modificações (Figura 12):

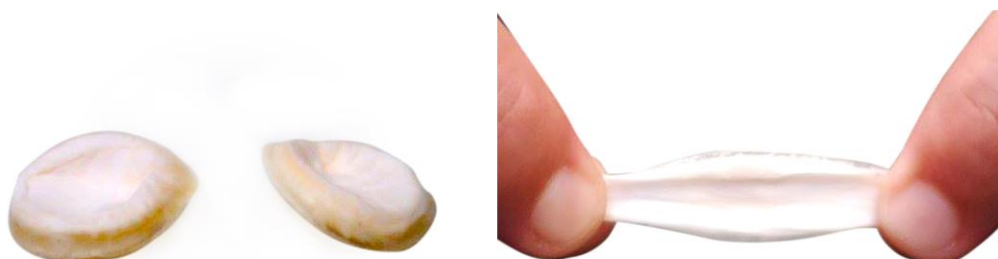
1. As misturas de 1 mL de látex natural e 1 mL das soluções de peptídeo (1 mg.mL^{-1}) foram vertidas em placas de vidro (22,33 mm Ø);
2. As placas contendo as misturas foram submetidas a uma lâmina de nitrogênio líquido durante 2 minutos;
3. E por fim, liofilizadas por 48 horas para a obtenção das membranas.

Figura 12: Passos realizados durante a confecção das membranas de látex natural.



Na Figura 13 são apresentadas fotografias das membranas confeccionadas pelo método de liofilização.

Figura 13: Membranas de látex natural confeccionada em liofilizador.



3.4. Capacidade de absorção de soluções aquosas após 24 horas

A capacidade das membranas de absorver diferentes meios aquosos (água deionizada (pH 5,6 – 6,4); tampão fosfato salino pH 7,4; tampão acetato pH 4,0; e tampão carbonato pH 12,0) foi determinada para prever o volume de fluido absorvido pelo biomaterial quando em contato com feridas exsudativas, além de fornecer

informações quanto ao volume de solução a ser utilizado durante a etapa de adsorção dos peptídeos (**Seção 3.10**). Os ensaios foram realizados empregando membranas de 22,33 mm de diâmetro e 5 mm de espessura (sem a presença dos peptídeos).

Estas membranas foram pesadas para a determinação da massa inicial e posteriormente hidratadas com 5 mL das soluções por 24 horas a 37°C. Após este período as membranas foram novamente pesadas para a determinação da massa final. A capacidade de absorção de água neste período, C_w , foi determinada pela Equação 1:

$$C_w = \frac{(M_i - M_o) \times 100\%}{M_o} \quad \text{Equação 1}$$

Onde M_i refere-se à massa úmida no tempo i e M_o refere-se à massa inicial das membranas.

3.5. Perda de massa após exposição a soluções aquosas

Os ensaios de perda de massa foram realizados para prever a porcentagem em massa (em relação a massa inicial das membranas) das substâncias liberadas pelo látex natural quando em solução. Os resultados provenientes destes ensaios nos indicam um perfil inicial quanto a liberação das substâncias naturalmente presentes no material.

As membranas de látex natural (sem a presença dos peptídeos) foram pesadas e posteriormente expostas a 10 mL de água deionizada (pH 5,6 – 6,4); tampão fosfato salino pH 7,4; tampão acetato pH 4,0; e tampão carbonato pH 12,0 por 7 dias a 37°C. Após o período de exposição, cada amostra foi imersa em 20 mL de água deionizada por 5 min e agitado vigorosamente para remover compostos fracamente ligados (esta etapa foi repetida 5 vezes). Posteriormente as membranas foram secas por 24 horas a 37°C, mantidas em dessecador por 24 horas e novamente pesadas para a

determinação da massa final. A perda de massa em água, M_p , foi determinada através da Equação 2:

$$M_p = \frac{M_i - M_f \times 100\%}{M_i} \quad \text{Equação 2}$$

Onde M_i refere-se à massa inicial da membrana e M_f refere-se à massa final da membrana após o período de exposição às diferentes soluções.

3.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi utilizada por permitir a identificação de grupos funcionais (aminas, amidas, anéis aromáticos, álcoois, fenóis, entre outros), além de proporcionar o estudo de possíveis interações entre o látex natural e os peptídeos utilizados. O equipamento opera mediante a técnica de transformada de Fourier. Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , pelo método ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR - VERTEX 70 / BRUKER; fonte: Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS) localizado no laboratório multiusuário do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para o estudo da morfologia da superfície e do interior das membranas, e a distribuição dos compostos no material. Esta caracterização foi realizada em 2000 KV e 300x de magnificação, todas as amostras foram recobertas com ouro (Au) durante 20 segundos. O interior das membranas, para a obtenção da imagem transversal, foi exposto pela fratura das

amostras após congelamento em nitrogênio líquido por 2 minutos. Os ensaios foram realizados em um Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) no prédio multiusuários do Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

3.8. Ensaio de liberação

Os ensaios de liberação foram realizados adaptando para nossas condições o método de dissolução para comprimidos de venlafaxina descrito por Salamon (2011) de acordo com a normativa USP 34 – NF 29 da Farmacopeia Americana de 2011, utilizando de tubos de cintilação contendo o volume de 5 mL de solução (água deionizada (pH 5,6 – 6,4); tampão acetato pH 4,0; tampão fosfato pH 7,4; e tampão carbonato pH 12,0). As membranas de látex natural contendo os peptídeos foram adicionadas, e o conjunto foi mantido sob agitação branda e temperatura ambiente (25°C). Foram retiradas alíquotas de 100 µL nos períodos pré-determinados (sem reposição do meio) até a identificação da liberação máxima e/ou degradação total dos peptídeos. As amostras foram analisadas por CLAE em modo analítico, seguindo as seguintes condições cromatográficas: Solventes A (0,045% TFA em H₂O) e B (0,036% TFA em ACN) em um gradiente de 5 - 95% de solvente B em 30 minutos com fluxo 1 mL.min⁻¹ utilizando uma coluna C18 KROMASIL - 15,0 x 0,46 cm. A identificação dos peptídeos nas amostras foi realizada em 220 nm, comprimento de onda característico para ligações peptídicas. As áreas dos picos característicos foram comparadas com as áreas dos padrões (solução 1 mg.mL⁻¹ de peptídeo) para o cálculo da porcentagem de peptídeo liberados.

Os valores em porcentagem de peptídeo liberado pelas membranas em função do tempo foram obtidos a partir da equação 3 utilizando a Tabela 2:

$$C_{p \cdot n} = \frac{[(V_n \times C_{a \cdot n}) + M_{a \cdot n - 1}] \times 100}{M_{pm}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$C_{p \cdot n}$ = porcentagem de peptídeo liberado no tempo T_i

V_n = volume no tempo T_i

$C_{a \cdot n}$ = concentração de peptídeo em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ no tempo T_i

$M_{a \cdot n - 1}$ = massa de peptídeo na alíquota no tempo $T_i - 1$

M_{pm} = massa de peptídeo incorporada na membrana

Tabela 2: Tempos de coleta e volume total no sistema de liberação.

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T_i (horas)	0,0	1	3	6	10	24	48	72	96	120
V_i (mL)	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1

3.9. Análise de degradação dos peptídeos

Com objetivo de entender a diminuição da concentração dos peptídeos durante os experimentos de liberação, foram realizadas análises de degradação dos peptídeos em diferentes condições conforme a Tabela 3:

Tabela 3: Condições utilizadas durante as análises de degradação dos peptídeos.

Solvente
1 - Água deionizada pH 5,6 – 6,4
2 - Tampão acetato pH 4,0
3 - Tampão fosfato salino pH 7,4
4 - Tampão carbonato pH 12,0
5 - Água deionizada + Solução liberada pelo látex
6 - Tampão acetato pH 4,0 + Solução liberada pelo látex
7 - Tampão fosfato salino pH 7,4 + Solução liberada pelo látex
8 - Tampão carbonato pH 12,0 + Solução liberada pelo látex

Para as análises de degradação dos peptídeos em soluções tampão (ausentes de solução liberada por membranas látex), foram utilizados 4,0 mL do solvente e 0,5 mL de solução de peptídeo (1 mg.mL^{-1}). Enquanto para as análises de degradação dos peptídeos na presença de solução liberada pelo látex, foram utilizados 4,0 mL do solvente, 0,5 mL de solução de peptídeo (1 mg.mL^{-1}) e 1 mL de solução liberada pelo látex (48 horas em água deionizada a 25°C). O sistema foi mantido sob agitação branda, temperatura ambiente (25°C), e alíquotas de 100 μL foram analisadas por CLAE.

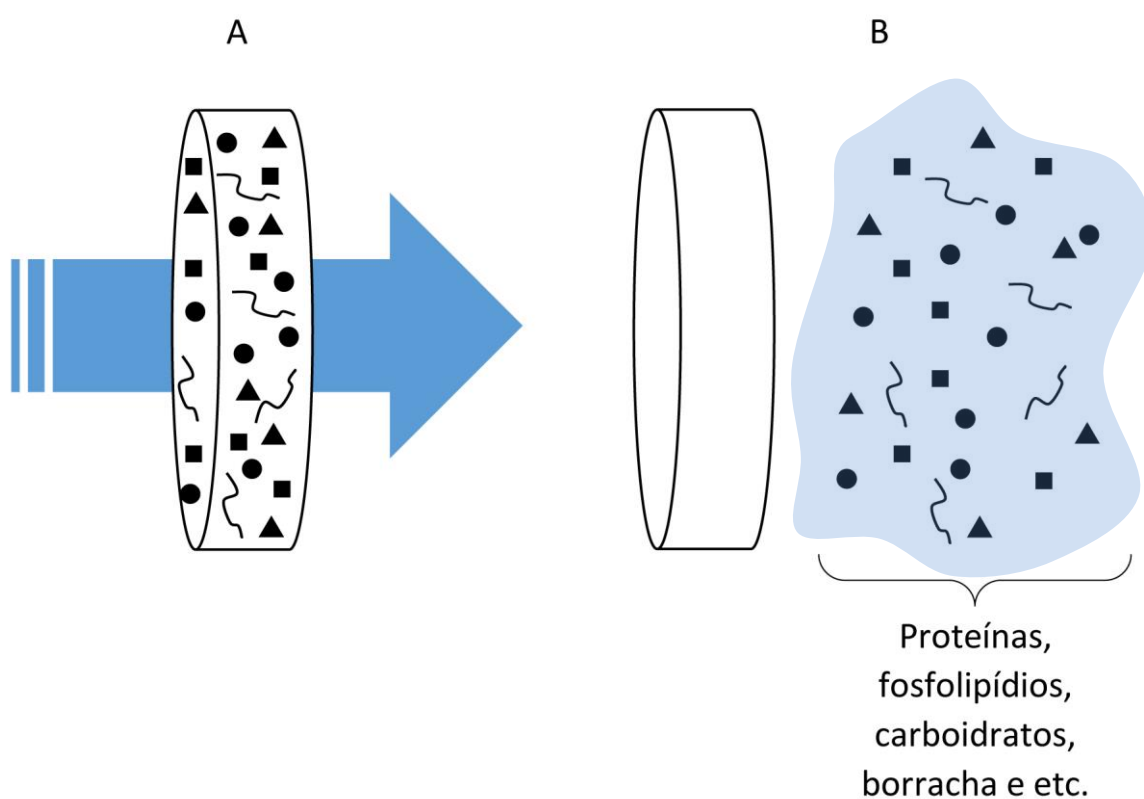
3.10. Ensaio de liberação dos peptídeos por membranas lavadas

Nesta etapa do trabalho foram confeccionadas membranas de látex natural seguindo a mesma metodologia de acordo com a **Seção 3.3**. Após produzidas, as membranas foram submetidas a um tratamento de lavagem com finalidade de diminuir a concentração de fatores que estariam ocasionando a degradação dos peptídeos em solução.

As membranas foram submersas em 20 mL de água deionizada (pH 5,6 – 6,4) sob agitação constante por 7 dias, a água deionizada foi trocada a cada 24 horas. Após o tratamento de lavagem as membranas foram liofilizadas para retirar a água absorvida pelas membranas.

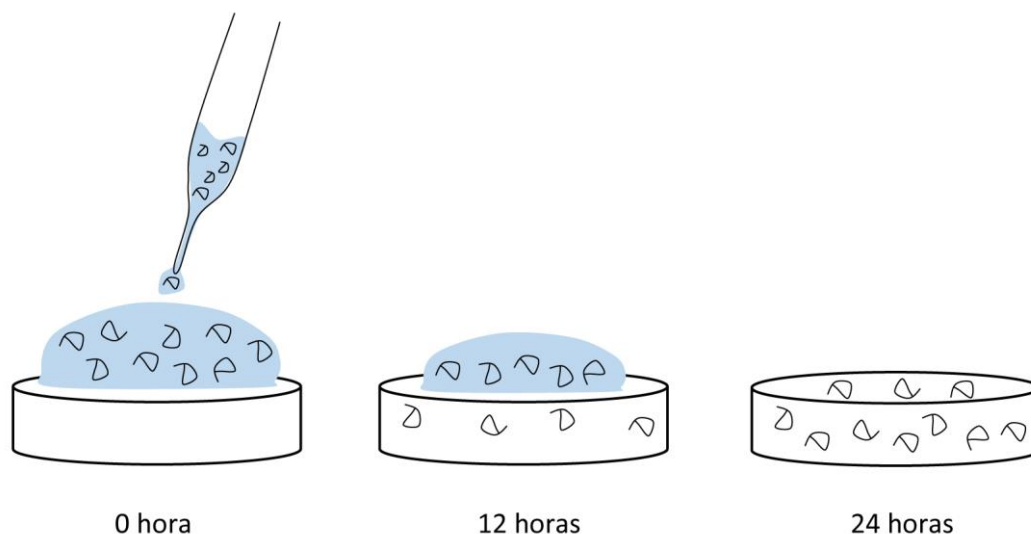
O esquema apresentado na Figura 14 simplifica o processo de remoção das substâncias naturais fracamente ligadas ao látex natural. Onde, na Figura 14A temos a membrana antes do tratamento. A água atravessa a membrana por difusão, carregando as substâncias ligadas ao látex. Ao fim do processo, na Figura 14B temos a membrana livre das substâncias que agora se encontram em solução.

Figura 14: Processo de remoção das substâncias naturais fracamente ligadas ao látex natural: A – Membrana antes do tratamento; B – Membrana após o tratamento.



Com as membranas já tratadas e secas, prosseguimos para a adsorção dos peptídeos. As membranas foram colocadas em placas de vidro, e a partir dos resultados obtidos nos ensaios de absorção de fluídos decidimos utilizar o volume de 1,0 mL de uma solução 1 mg.mL^{-1} de peptídeo que foi gotejada sobre as membranas, após um período de 24 horas toda a solução de peptídeo já havia sido totalmente adsorvida pelas membranas (Figura 15), e então as membranas foram novamente liofilizadas.

Figura 15: Adsorção da solução de peptídeos pelas membranas de látex.



Os ensaios de liberação dos peptídeos pelas membranas submetidas ao tratamento de lavagem foram realizados seguindo a metodologia descrita na **Seção 3.8**.

3.11. Análise dos mecanismos de liberação

Para a construção dos gráficos e o ajuste das funções de liberação foi utilizado o software OriginPro - OriginLab Corporation. As análises dos modelos matemáticos (First Order, Higuchi, Hixon-Crowell, Baker-Lonsdale e Korsmeyer-Peppas) para os mecanismos de liberação foram realizadas pelo software SigmaPlot 12.5 – Systat Software.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Capacidade de absorção e perda de massa

A capacidade de absorção e a perda de massa das membranas foram mensuradas para avaliar o comportamento da matriz polimérica quando este biomaterial estiver em contato com lesões dérmicas, avaliando respectivamente a eficiência de remoção de líquidos liberados pelas feridas e a estabilidade das membranas. A absorção do exsudato pela membrana mantém a umidade ideal para a cicatrização e indução da hemostasia (conjunto de mecanismos pelos quais se mantêm o fluído sanguíneo dentro do vaso), além de evitar a formação de coágulo (“casca”) na superfície da ferida. Este coágulo é inconveniente ao processo de cicatrização por dificultar a proliferação das células epiteliais exigindo maior atividade metabólica e tempo para a cura (FRANCO e GONÇALVES, 2008).

Foram escolhidos os meios: água deionizada pH 5,6 – 6,4 devido a este valor ser próximo ao de feridas (5,8 – 6,6); tampão fosfato salino pH 7,4 (neutro biológico); tampão acetato pH 4,0 e tampão carbonato pH 12,0 para avaliar se as cargas dos fosfolipídeos e proteínas que compõem as partículas de borracha impediriam a liberação dos peptídeos. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.

Nas análises de capacidade máxima de absorção observou-se que as membranas submersas em água deionizada apresentaram absorção em torno de 123% da massa inicial das membranas. Nas soluções fosfato salino pH 7,4; acetato pH 4,0; e carbonato pH 12,0 a capacidade de absorção diminuiu, possivelmente, devido à complexidade dos meios quando comparados a água deionizada. Este resultado era esperado, uma vez que os íons presentes nessas soluções diminuem o gradiente osmótico entre o interior da matriz e o meio, diminuindo assim a entrada de água na estrutura polimérica para atingir o equilíbrio (VEIGA e MORAES, 2012). O fato da membrana de látex natural ser uma matriz complexa devido a existência de diversas substâncias naturais da planta, pode ocorrer uma diminuição da absorção de água devido a presença de moléculas que podem causar a reticulação das cadeias poliméricas do látex diminuindo assim a entrada de água na estrutura (MALMONGE, 1997).

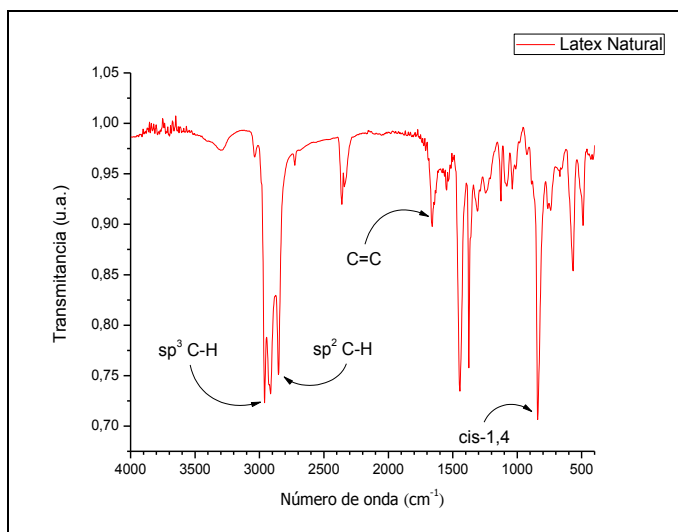
A perda de massa após exposição às soluções aquosas foi mais acentuada para as soluções de água deionizada (3,69%) e para o tampão fosfato salino pH 7,4 (4,33%).

Tabela 4: Valores obtidos para a capacidade de absorção de soluções aquosas por 24 horas a 37°C e perda de massa das membranas por 7 dias a 37°C.

Propriedade	Solução	Membrana de látex liofilizada
Capacidade de absorção (24 h) (%)	Água pH 5,6 – 6,4	123
	Tampão fosfato salino pH 7,4	116
	Tampão acetato pH 4,0	94
	Tampão carbonato pH 12,0	83
Perda de massa (7 dias) (%)	Água pH 5,6 – 6,4	3,69
	Tampão fosfato salino pH 7,4	4,33
	Tampão acetato pH 4,0	2,04
	Tampão carbonato pH 12,0	3,03

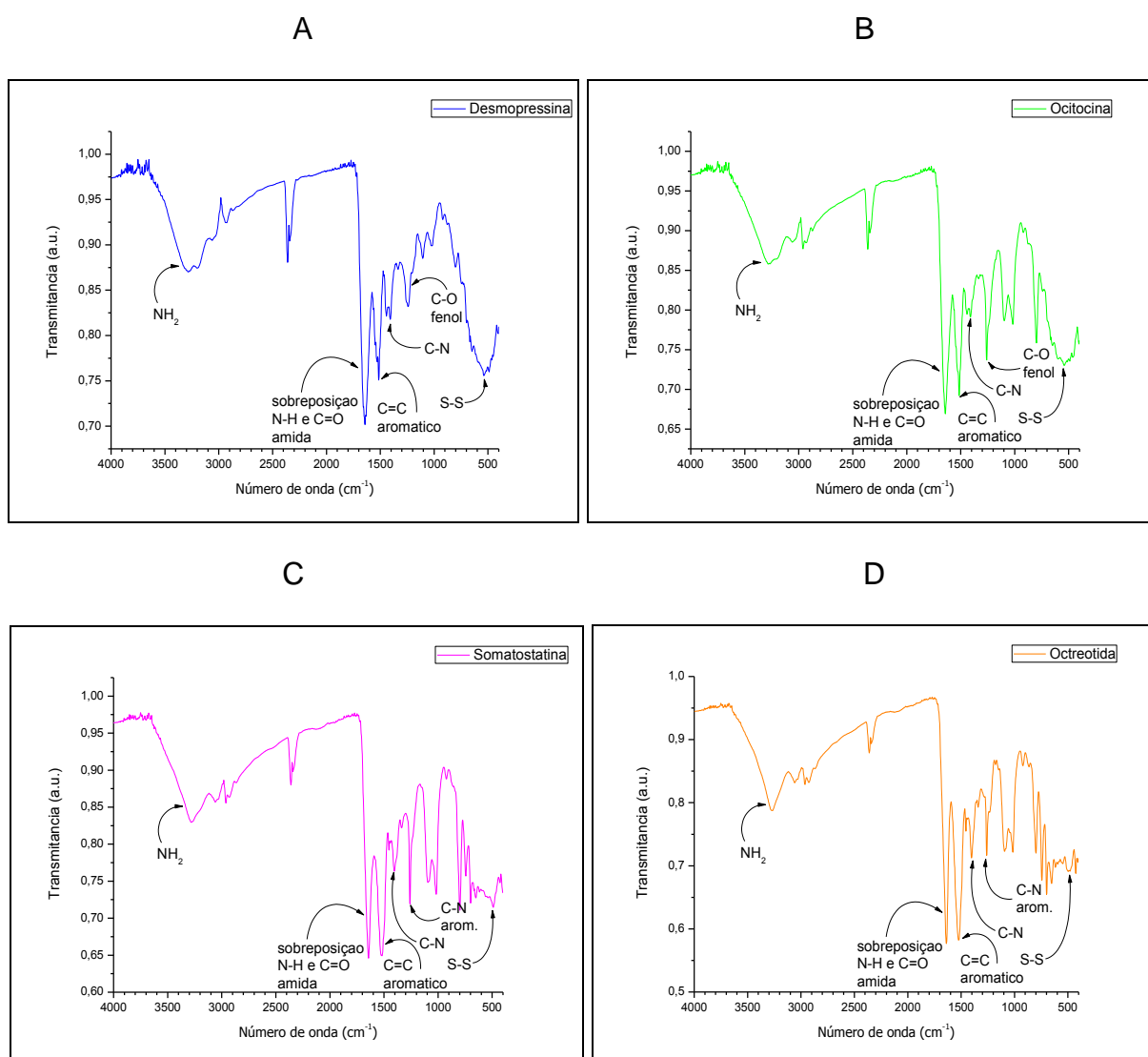
4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Neste trabalho os espectros de FTIR foram utilizados para identificar grupos funcionais característicos do látex natural e dos peptídeos. A Figura 16 mostra o espectro de FTIR para as membranas de látex natural, onde podemos identificar absorções características para o poli(*cis*-1,4-isopreno): 2960 e 1375 cm⁻¹ deformação CH₃; 2916, 2852 e 1446 cm⁻¹ deformação CH₂; 1661 cm⁻¹ deformação C=C; e 836 cm⁻¹ CH fora do plano, sendo esta absorção a mais importante para a identificação do látex natural, pois caracteriza a função R₂C=CHR (*cis*-1,4).

Figura 16: Espectro de FTIR da membrana de látex natural.

As Figuras 17A, 17B, 17C e 17D mostram os espectros de FTIR para os peptídeos (desmopressina, ocitocina, somatostatina e octreotida, respectivamente), onde podemos identificar absorções características para peptídeos: 3280 – 3267 cm^{-1} deformação NH_2 ; 1643 – 1638 cm^{-1} deformação NH de aminas e $\text{C}=\text{O}$ de amidas (quando ambas estão presentes ocorre sobreposição das bandas); 1524 - 1514 cm^{-1} deformação $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos; 1410 – 1403 cm^{-1} deformação $\text{C}-\text{N}$ de aminas e amidas; 1260 – 1242 cm^{-1} deformação $\text{C}-\text{O}$ de fenol e/ou $\text{C}-\text{N}$ aromático (pode ocorrer sobreposição das bandas); e 542 – 498 cm^{-1} deformação $\text{S}-\text{S}$.

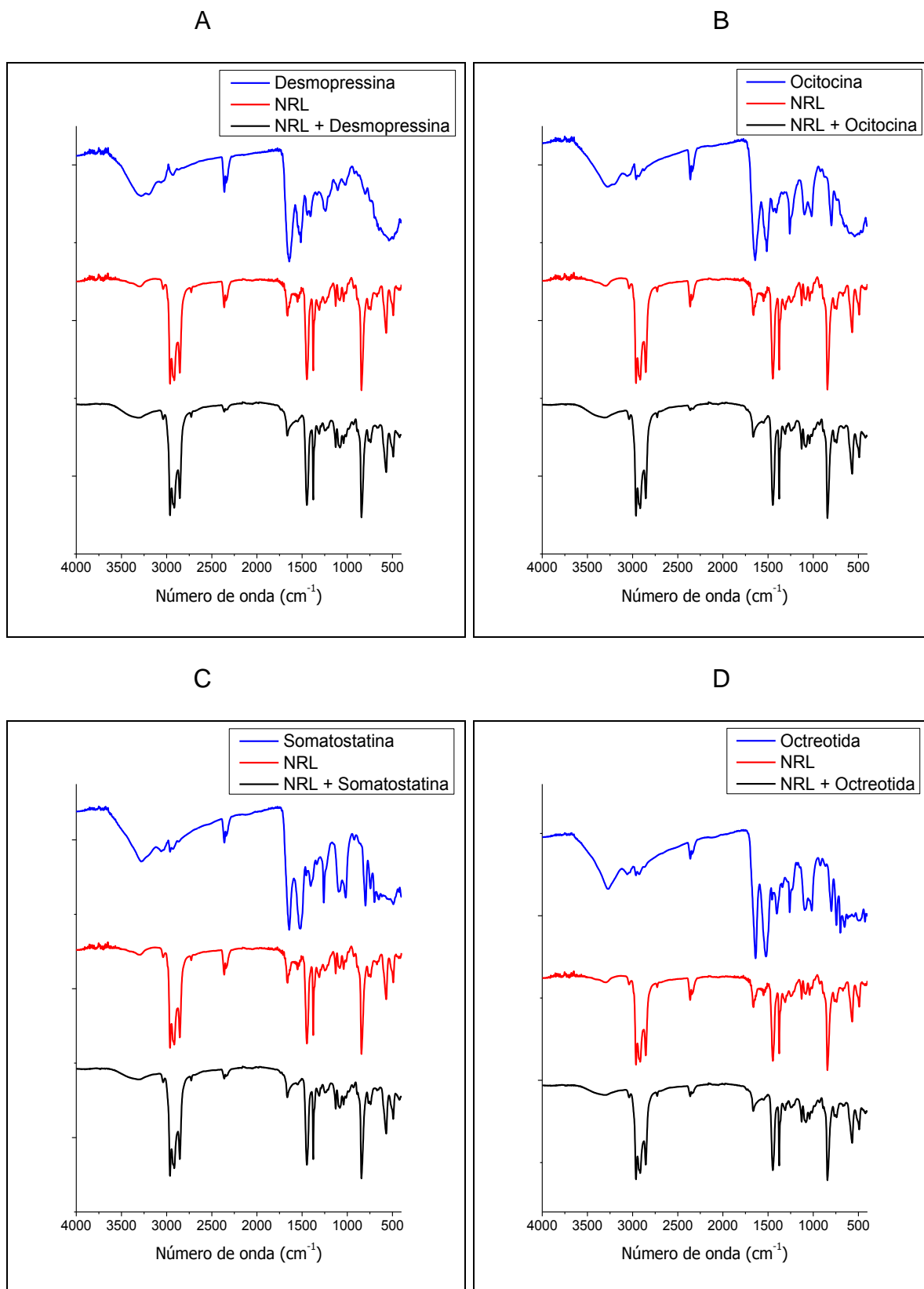
Figura 17: Espectros de FTIR dos peptídeos: A - desmopressina; B - ocitocina; C - somatostatina; D - octreotida.



As comparações dos espectros de FTIR entre a membrana de látex natural pura, peptídeos puros e entre as membranas carregadas com os peptídeos nas Figuras 18A, 18B, 18C e 18D não apresentaram bandas de absorção adicionais, mostrando que não há interação covalente entre os peptídeos e a membrana. Esta constatação indica que o látex natural pode reter os peptídeos em sua rede polimérica e posteriormente liberá-los, pois estes, podem ser solvatados e carregados pela água, pois possuem a capacidade de formar ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos polares presentes nestes.

Além destas observações, as bandas características para os peptídeos utilizados também são observadas no espectro de FTIR para o látex natural, uma vez que este material possui em sua composição proteínas naturais da seringueira *H. brasiliensis*.

Figura 18: Espectros de FTIR comparativos entre o látex natural (NRL), peptídeos, e membranas de látex natural carregadas com peptídeos: A – Desmopressina; B – Ocitocina; C – Somatostatina; D – Octreotida.



4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura realizadas para o peptídeo desmopressina (sólido), membrana de látex natural pura e membrana de látex natural carregadas com peptídeo, mostram que uma parcela do peptídeo forma agregados sólidos na superfície da membrana (Figura 19). Esta parcela de peptídeos presente na superfície da membrana nos dá indício de como, possivelmente, será a sua cinética de liberação. Uma vez que, os peptídeos presentes na superfície da membrana seriam solubilizados muito rapidamente pela solução utilizada nos ensaios, dando origem ao efeito denominado “burst release” ou explosão de liberação, que consiste na liberação quase que espontânea de uma fração do composto incorporado ao sistema de liberação.

As imagens obtidas em corte transversal mostram a elevada porosidade interna das membranas de látex natural confeccionadas em liofilizador (Figura 20A), e a presença de peptídeos entre os poros internos da matriz polimérica (Figura 20B). Este resultado, mostra que, possivelmente, os peptídeos presentes no interior da membrana só seriam solvatados e então carregados para fora da membrana após a solução utilizada nos ensaios de liberação difundir por entre os poros da matriz polimérica, dando origem efeito denominado “stable profile” ou perfil estável, onde a liberação poderia ocorrer por difusão simples, ou seja, da região mais concentrada para a região mais diluída do sistema de ensaio.

Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura (x300):

A – Peptídeo desmopressina liofilizado;

B – Membrana de látex natural (pura);

C – Membrana de látex natural carregada com peptídeo desmopressina.

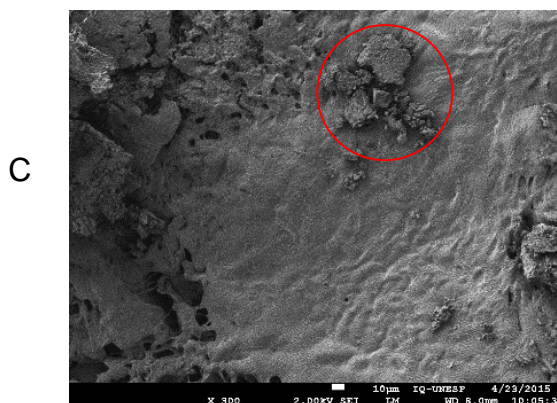
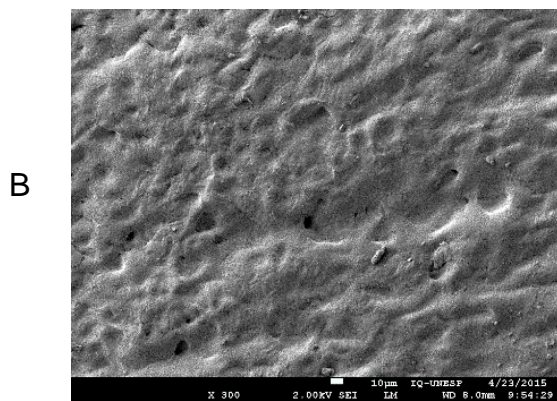
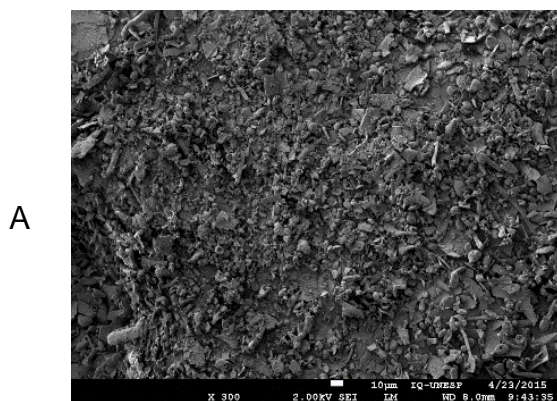
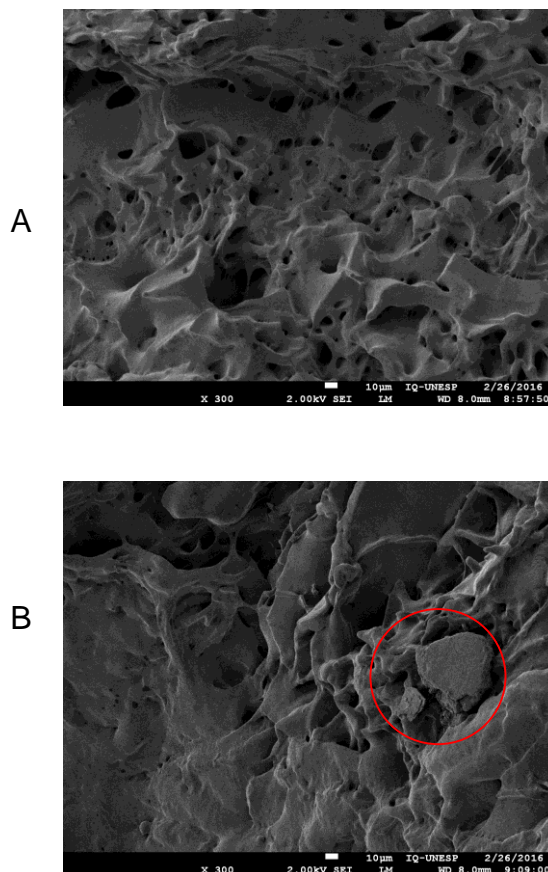


Figura 20: Microscopia Eletrônica de Varredura (x300) em corte transversal:

A – Membrana de látex natural (pura);

B – Membrana de látex natural carregada com peptídeo desmopressina.



4.4. Ensaio de liberação dos peptídeos

Durante os ensaios de liberação dos peptídeos pelas membranas de látex natural nas soluções: água deionizada (pH 5,6 – 6,4); tampão fosfato salino pH 7,4; e tampão carbonato pH 12,0, foi observado um aumento na concentração dos peptídeos nas soluções, evidenciando a liberação máxima destes compostos pelas membranas em períodos de 6 à 48 horas dependendo do peptídeo e da solução utilizada, seguido de uma diminuição da concentração em função do tempo (Figura 21), com extinção total dos peptídeos em períodos que variaram de 48 a 120 horas. Estes resultados demonstram que os peptídeos foram, possivelmente, degradados durante os ensaios

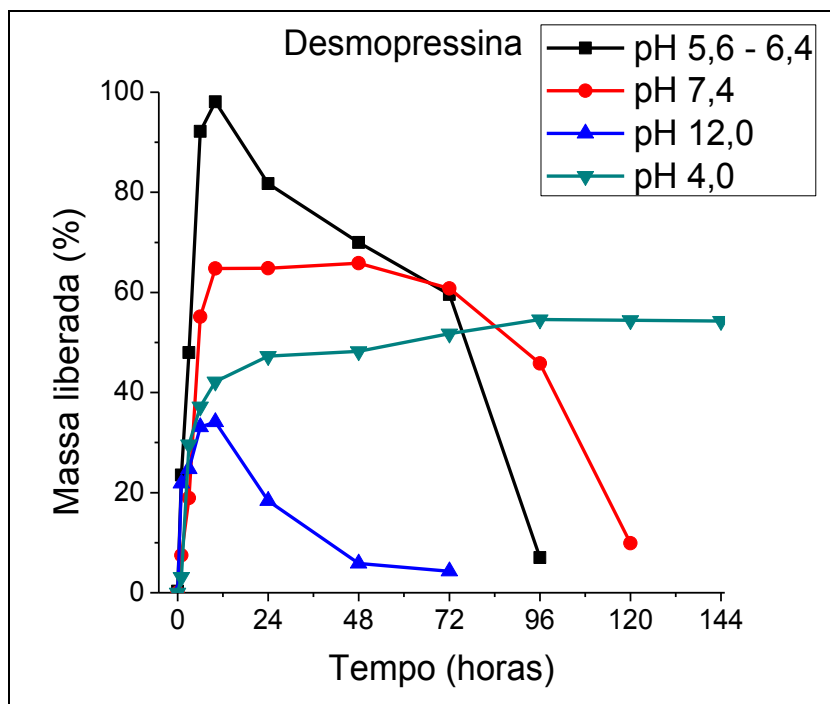
de liberação. No entanto, nos ensaios realizados em solução tampão acetato pH 4,0 foi observado o aumento da concentração dos peptídeos, mas não houve a diminuição da concentração, ou seja, os peptídeos não foram degradados neste valor de pH, obtendo liberação de 50% em 24 horas para o peptídeo desmopressina; 55% em 48 horas para ocitocina; 80% em 96 horas para octreotida; e 15% em 72 horas para somatostatina. Este resultado sugere a presença de enzimas proteolíticas no látex natural, e que não possuem atividade de catálise em valores ácidos de pH.

Nas Figuras 21A, 21B, 21C e 21D estão representadas as cinéticas de liberação dos peptídeos desmopressina, ocitocina, somatostatina e octreotida respectivamente.

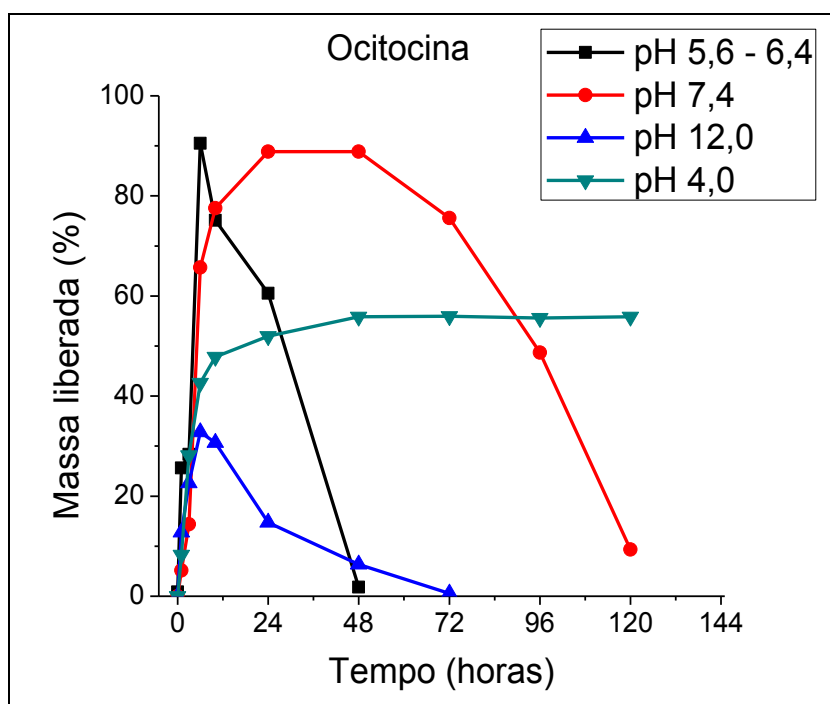
Figura 21: Cinéticas de liberação dos peptídeos em diferentes valores de pH:

A - desmopressina; B - ocitocina; C - somatostatina; D - octreotida.

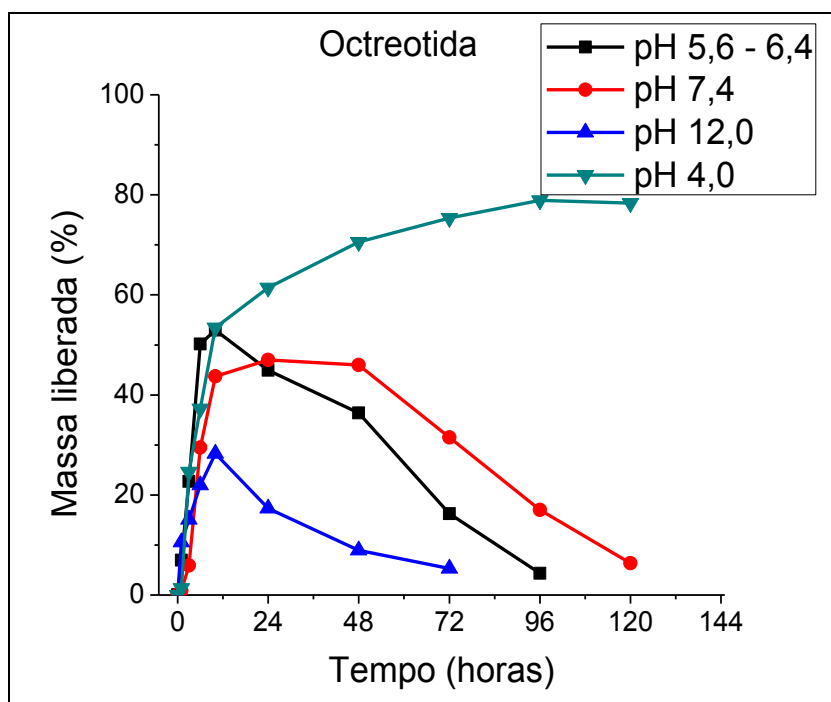
A



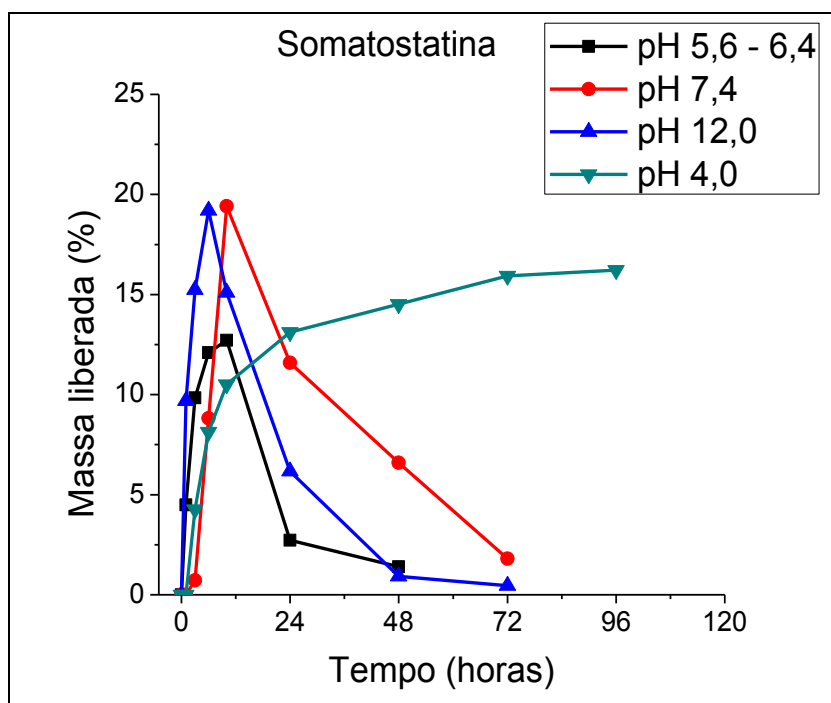
B



C



D



4.5. Ensaio de degradação dos peptídeos

Os peptídeos são constituídos de unidades de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (ligação covalente de caráter rígido e planar). Esta união ocorre à partir da reação de condensação entre os grupos N-terminal e C-terminal de 2 aminoácidos, a reação de condensação recebe este nome, pois libera uma molécula de água como subproduto.

A degradação dos peptídeos ocorre devido à reação de hidrólise das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos do peptídeo. Para realizar esta hidrólise sem o uso de catalizadores biológicos (enzimas) é necessária grande quantidade de energia (calor) e valores extremos de pH.

Como os meios utilizados durante os ensaios de liberação dos peptídeos não apresentam estas características, pode-se afirmar que a hidrólise dos peptídeos em solução de liberação das membranas de látex segue uma rota química de menor energia de ativação pela presença de um catalizador biológico (protease/peptidase).

Foram realizados testes de degradação dos peptídeos em diferentes valores de pH na presença (ou não) de solução liberada pelo látex natural. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5:

Tabela 5: Resultados obtidos durante os ensaios de degradação dos peptídeos hormonais.

Solução	Resultado
1 - Água deionizada pH 5,6 – 6,4	Negativo
2 - Tampão acetato pH 4,0	Negativo
3 - Tampão fosfato salino pH 7,4	Negativo
4 - Tampão carbonato pH 12,0	Negativo
5 - Água deionizada + Solução liberada pelo látex	Positivo
6 - Tampão acetato pH 4,0 + Solução liberada pelo látex	Negativo
7 - Tampão fosfato salino pH 7,4 + Solução liberada pelo látex	Positivo
8 - Tampão carbonato pH 12,0 + Solução liberada pelo látex	Positivo

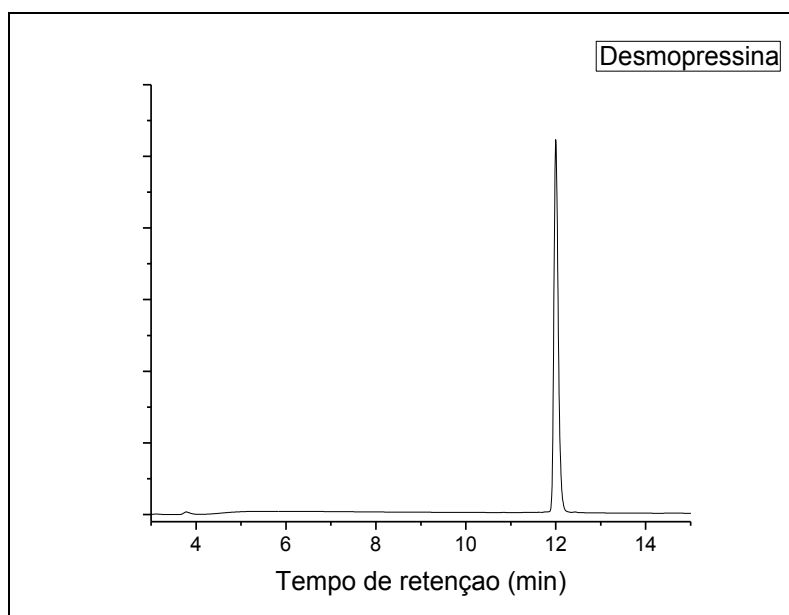
Concluimos que os peptídeos utilizados são estáveis em soluções de diferentes valores de pH. E que o fator responsável pela degradação dos peptídeos está presente no látex natural. Além disso, com o resultado obtido na **reação 6** (Tabela 5), conclui-se que a degradação dos peptídeos não ocorre em valores ácidos de pH. Desta forma, pode-se tratar de enzimas proteolíticas alcalinas e inespecíficas, uma vez que os peptídeos utilizados não apresentam nenhum padrão de resíduos de aminoácidos em comum entre eles.

A Figura 22 mostra a análise de liberação e degradação para o peptídeo desmopressina avaliado por CLAE e utilizado neste trabalho como padrão no estudo da degradação de peptídeos pela solução de liberação das membranas de látex natural. Na Figura 22A, temos o perfil cromatográfico do peptídeo desmopressina com tempo de 12 min de retenção nas condições cromatográficas utilizadas durante os ensaios.

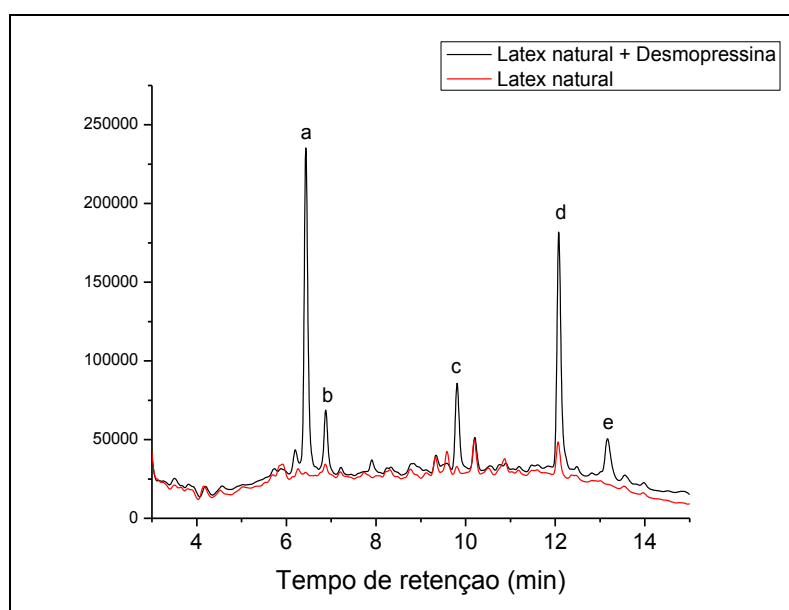
Como pode ser observado na Figura 22B, o cromatograma (144 horas de liberação) da membrana de látex natural pura não apresenta o pico característico para o peptídeo desmopressina (12 min de retenção) quando comparado ao cromatograma da membrana confeccionada com o peptídeo. Ainda na Figura 22B, podemos observar no cromatograma da membrana contendo o peptídeo o surgimento de outros picos de retenção (*a* - 6,4 min; *b* - 6,9 min; *c* - 9,8 min; *e* - 13,2 min), demonstrando a degradação do peptídeo (*d* - 12 min) em outros compostos.

Figura 22: Análise de degradação do peptídeo desmopressina: A - Cromatograma padrão para o peptídeo desmopressina; B - Comparação da liberação da membrana de látex natural pura e membrana de látex natural contendo o peptídeo desmopressina. Onde *a*, *b*, *c* e *e* são produtos de degradação do peptídeo, e *d* é o pico característico para o peptídeo.

A

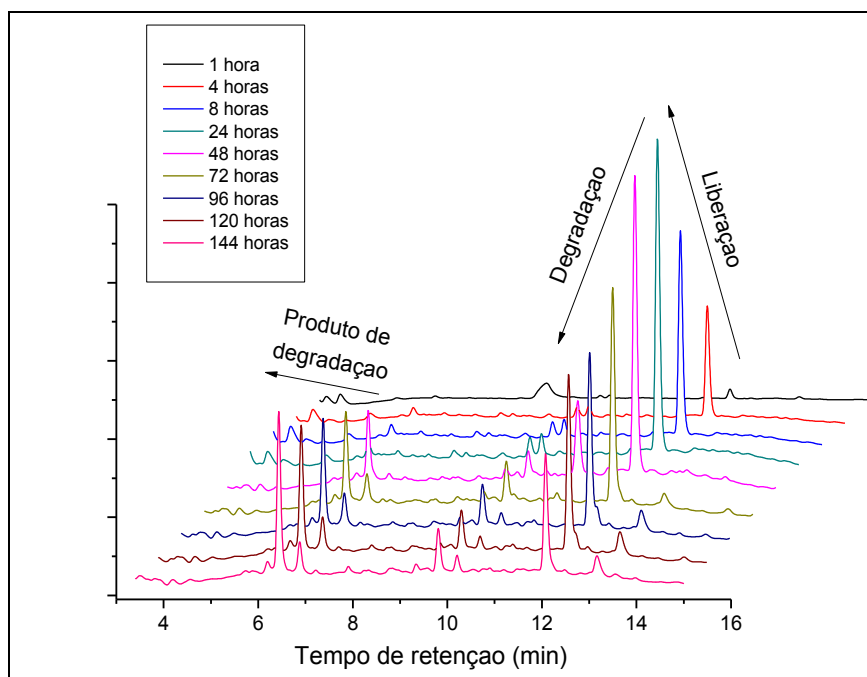


B



A Figura 23 mostra os cromatogramas da liberação do peptídeo desmopressina seguido da sua degradação quando utilizado água deionizada como solução (pH 5,6 – 6,4). Pode-se observar que durante o período inicial de 24 horas há uma liberação constante do peptídeo pelas membranas (12 min de retenção) e após este período a concentração do peptídeo em solução diminui ao mesmo tempo em que as concentrações dos produtos de degradação aumentam (tempos de retenção 6,4; 6,9; 9,8; e 13,2 min).

Figura 23: Liberação de desmopressina seguida pela degradação do pico característico do peptídeo e o surgimento de picos para os produtos de degradação.



4.6. Ensaio de liberação dos peptídeos pelas membranas tratadas (lavadas)

As membranas utilizadas nesta etapa do trabalho foram submetidas ao tratamento de remoção de substâncias (naturais ao látex natural) fracamente ligadas à membrana, como descrito na **Seção 3.10**. Este tratamento se faz importante como uma estratégia de impedir o processo de degradação dos peptídeos.

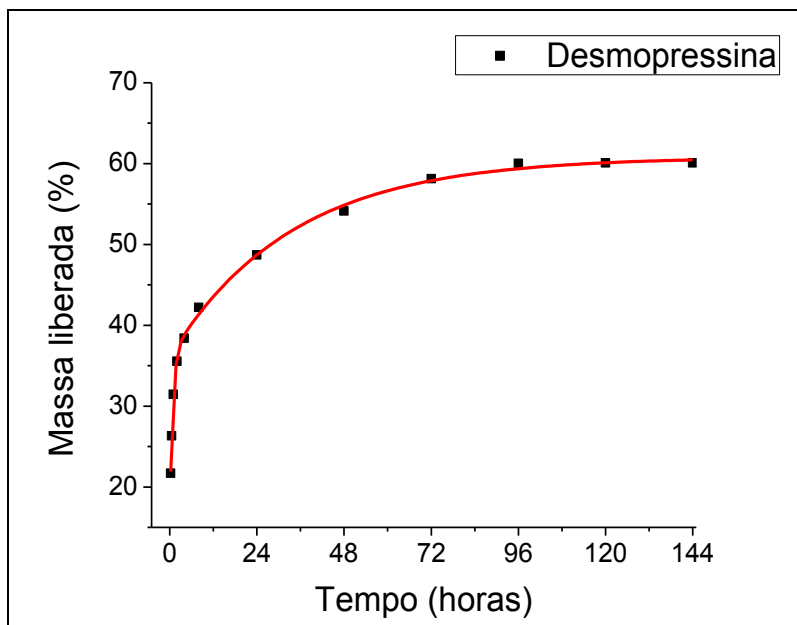
Os resultados obtidos durante os ensaios de liberação em água deionizada dos peptídeos pelas membranas de látex natural submetidas ao tratamento de lavagem, demonstram que esta estratégia mostrou-se eficaz, pois tornou possível a liberação dos peptídeos sem degradá-los, com liberação de 60% em 96 horas para o peptídeo desmopressina (Figura 24A); 90% em 24 horas para somatostatina (Figura 24B); 45% em 8 horas para ocitocina (Figura 24C); e 80% em 24 horas para octreotida (Figura 24D).

Os gráficos das cinéticas de liberação dos peptídeos pelas membranas de látex natural foram obtidos utilizando a função bi-exponencial: $y(t) = y_0 + A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2}$, onde $y(t)$ é a quantidade de peptídeo liberado pela membrana em função do tempo t , y_0 é a quantidade inicial de peptídeo na membrana. Os valores para A_1 e A_2 (constantes), e os tempos característicos τ_1 e τ_2 para cada peptídeo estão listados na Tabela 6.

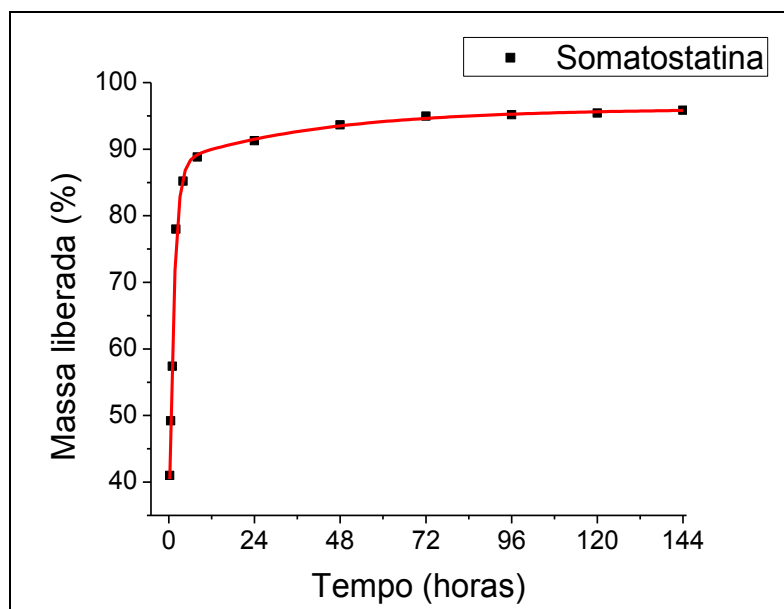
O peptídeo desmopressina (Figura 24A) apresentou uma cinética de liberação de duas etapas: (i) liberação inicial rápida (“burst release”); seguida de (ii) uma liberação mais lenta (“stable profile”) devido a carga de peptídeo adsorvida no interior da membrana. Enquanto os demais peptídeos apresentaram cinética de liberação com apenas uma etapa: (i) liberação inicial rápida (“burst release”) (Figuras 24B, 24C, 24D), fato que pode ter ocorrido pela presença de grande quantidade de peptídeos na superfície das membranas, o que propõe uma deficiência na adsorção destes peptídeos ao interior das membranas. No entanto, com mudanças simples na preparação das membranas, é possível obter maior controle da densidade de poros nas membranas, proporcionando diferentes níveis de adsorção dos peptídeos e, conseqüentemente, diferentes cinéticas de liberação (mais lentas ou mais rápidas) (Herculano, 2010).

Figura 24: Cinéticas de liberação dos peptídeos: A - Desmopressina; B - Somatostatina; C - Ocitocina; D - Octreotida.

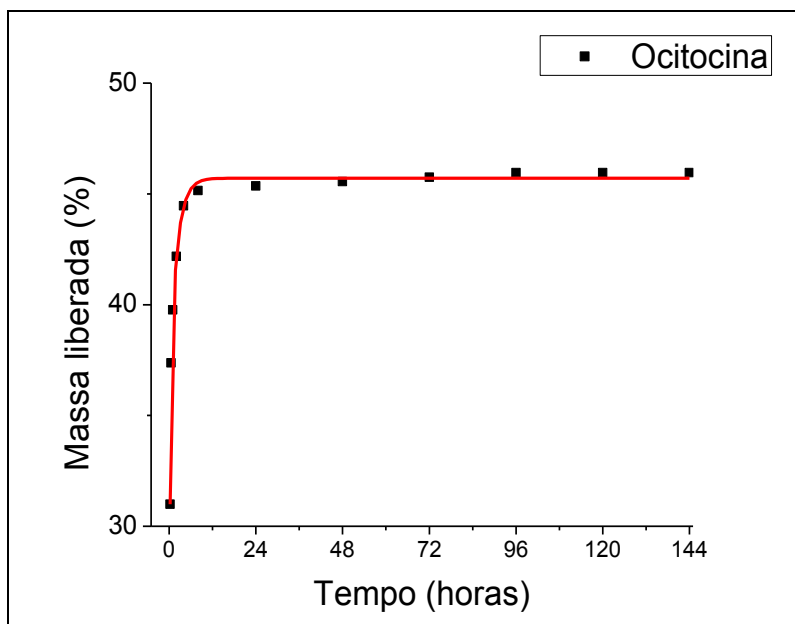
A



B



C



D

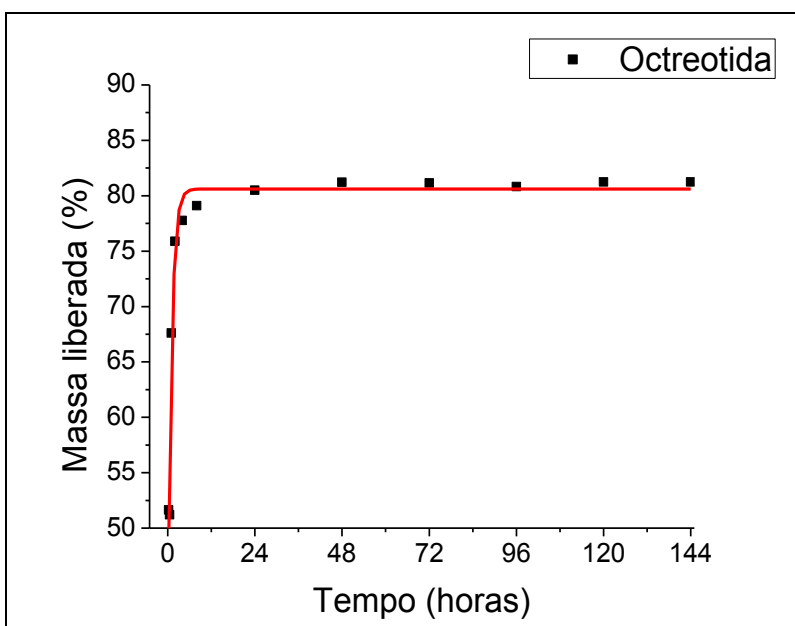
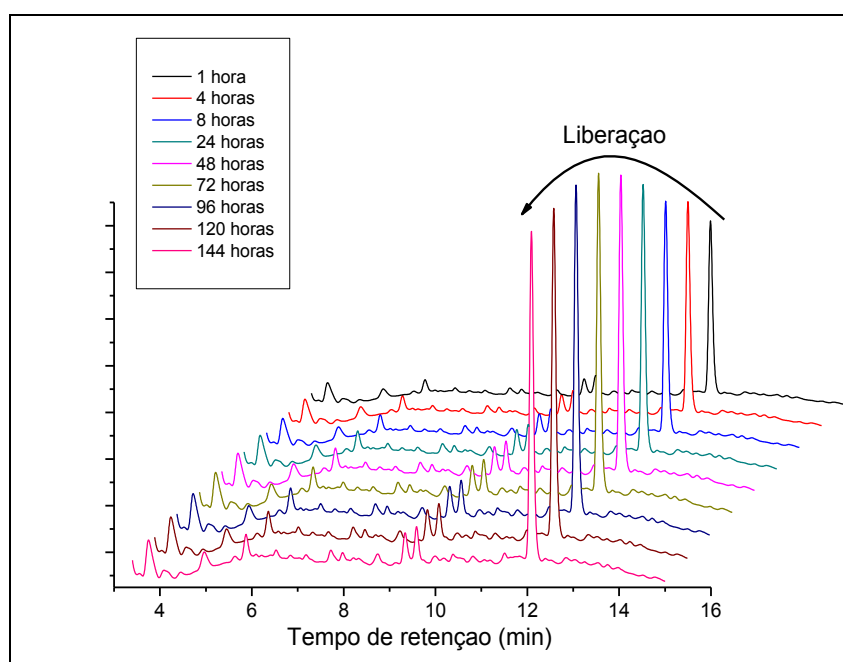


Tabela 6: Valores das constante obtidas a partir da função bi-exponencial aplicada as cinéticas de liberação dos peptídeos.

Equação	$y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + A_2 \cdot \exp(-x/t_2) + y_0$		
Desmopressina	Adj. R-Square: 0,99824		
		Valor	Erro padrão
	y ₀	60,81089	0,4781
	A ₁	-24,63822	0,63392
	t ₁	33,78412	2,77164
	A ₂	-19,80802	1,17589
Somatostatina	Adj. R-Square: 0,99261		
		Valor	Erro padrão
	y ₀	96,0715	1,82544
	A ₁	-8,1365	2,16157
	t ₁	41,72264	35,35533
	A ₂	-57,04877	2,68107
Ocitocina	Adj. R-Square: 0,99683		
		Valor	Erro padrão
	y ₀	45,70599	0,10227
	A ₁	-9,69061	0,86218
	t ₁	2,0045	0,24087
	A ₂	-48,1388	26,49428
Octreotida	Adj. R-Square 0,95274		
		Valor	Erro padrão
	y ₀	80,61149	0,92658
	A ₁	-20,05741	3,29E+08
	t ₁	1,03054	36547,65024
	A ₂	-20,05741	3,29E+08
t ₂	1,03056	36548,49729	

Na Seção 4.5 foi apresentada a degradação do peptídeo desmopressina quando liberado por membranas não tratadas (Figura 23), observa-se a liberação até o período de 24 horas, e em sequência, sua degradação com o surgimento dos produtos de hidrólise. Na Figura 25 apresentamos os cromatogramas para a liberação do peptídeo desmopressina por membranas submetidas ao tratamento de lavagem, sendo possível observar a liberação por até 96 horas, e sua estabilidade, uma vez que, não há o surgimento dos picos característicos para os produtos de degradação, como observado anteriormente na Figura 23. A comparação entre as Figuras 23 e 25 demonstra de forma didática a degradação do peptídeo quando incorporado na membrana não tratada, e a estabilidade dele quando na membrana tratada, mostrando a eficácia do método utilizado.

Figura 25: Liberação e estabilidade do peptídeo desmopressina quando incorporado em membranas tratadas.



Os parâmetros físicos de liberação dependem de diversos mecanismos como degradação da matriz polimérica, difusão pela densidade de poros, dilatação/relaxamento entre as cadeias do polímero, e erosão. Assim, foram aplicados modelos matemáticos semi-empíricos para avaliar quais os parâmetros físicos envolvidos na cinética de liberação dos peptídeos pelas membranas de látex. A

Tabela 7 mostra os valores obtidos para a cinética de liberação de cada peptídeo. O coeficiente de correlação R^2 indica o quanto o modelo matemático se ajusta ao perfil de liberação apresentado por cada peptídeo. O melhor R^2 encontrado para todas as cinéticas de liberação dos peptídeos foi para o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas ($f(t) = kt^n$), onde $f(t)$ é a fração do composto liberada no tempo t , n é o expoente de liberação (este define o mecanismo de liberação), e k é a constante cinética (este relaciona as características estruturais e geométricas da matriz). Este modelo é aplicado para formulações poliméricas quando o mecanismo de liberação é desconhecido ou pode envolver mais de um mecanismo (COSTA, 2002). Se $n \leq 0,5$ indica difusão de Fick (também conhecida como equação de “Higuchi”); $0,5 < n < 1,0$ indica mecanismos de transporte anômalo; $n = 1$ indica “case II transport” (também conhecido como equação de “ordem zero”, devido ao relaxamento, erosão e inchamento do polímero); e $n > 1$ indica “super case II transport” (STEINGRABER, SCHATOLZ e RODRIGUES, 2008). Para os quatro peptídeos, os valores de $n < 0,5$ indicam que estes seguem mecanismo de liberação por difusão Fickiana. A difusão de Fick é caracterizada por situações nas quais existem gradientes de concentração de uma substância, produzindo um fluxo de partículas que tende a homogenizar a dissolução e uniformizar a concentração.

Tabela 7: Valores obtidos para os modelos matemáticos semi-empíricos.

Desmopressina	n	k (hora ⁻¹)	R^2
Baker-Lonsdale		$1,17 \times 10^{-3}$	0
Korsmeyer-Peppas	$1,44 \times 10^{-1}$	30,6	0,98
Hixon-Crowell		$3,04 \times 10^{-3}$	0
Higuchi		6,50	0
First Order		$1,17 \times 10^{-2}$	0
Ocitocina	n	k (hora ⁻¹)	R^2
Baker-Lonsdale		$7,25 \times 10^{-5}$	0
Korsmeyer-Peppas	$7,07 \times 10^{-2}$	38,8	0,73
Hixon-Crowell		$2,08 \times 10^{-3}$	0
Higuchi		5,36	0
First Order		$7,46 \times 10^{-3}$	0
Octreotida	n	k (hora ⁻¹)	R^2
Baker-Lonsdale		$8,24 \times 10^{-3}$	0
Korsmeyer-Peppas	$5,56 \times 10^{-2}$	64,7	0,70
Hixon-Crowell		$1,02 \times 10^{-2}$	0
Higuchi		9,46	0
First Order		1,36	0
Somatostatina	n	k (hora ⁻¹)	R^2
Baker-Lonsdale		$7,78 \times 10^{-3}$	0
Korsmeyer-Peppas	$9,75 \times 10^{-2}$	62,9	0,80
Hixon-Crowell		$1,12 \times 10^{-2}$	0
Higuchi		10,9	0
First Order		1,05	0,76

BORGES et al. (2014) realizou ensaios de liberação de extratos de *Casearia sylvestris* utilizando membranas de látex natural como matriz sólida. Neste trabalho, o modelo matemático que melhor se encaixou à liberação do extrato foi também o modelo de Korsmeyer-Peppas, obtendo valores de $n > 1$ determinando que a liberação do extrato pelas membranas de látex segue mecanismo de liberação “super case II transport”. MURBACH et. al. (2014) realizou ensaios de liberação do fármaco ciprofloxacina utilizando membranas de látex natural como matriz sólida. Neste, os

autores observaram que o modelo matemático que melhor se encaixou também foi o modelo de Korsmeyer-Peppas, com valores de $n > 1$ determinando mecanismo de liberação “super case II transport”.

5. CONCLUSÃO

Os resultados das análises de FTIR para as membranas de látex natural e para os peptídeos permitiram identificar os grupos funcionais característicos de cada amostra. O espectro de FTIR da membrana de látex natural apresentou algumas bandas de absorção características de proteínas e fosfolipídios. Além disso, as análises de FTIR para as membranas de látex natural contendo os peptídeos não apresentaram interações covalentes, ou seja, não foram identificadas banda de absorção além das bandas já presentes no látex natural e as bandas para os peptídeos. Este resultado demonstra que as membranas de látex natural podem ser empregadas como um suporte para os peptídeos, não os mantendo ligados covalentemente e/ou a nenhuma outra espécie química presente no biopolímero, corroborando com os trabalhos realizados incorporando ao látex: nicotina (PICHAYAKORN et al., 2012), metronidazol (HERCULANO, 2009), extrato natural (BORGES et al., 2014) e ciprofloxacina (MURBACH et al., 2014).

As membranas de látex natural foram capazes de adsorver os peptídeos durante a confecção, e de liberá-los durante os ensaios, porém, houve diminuição da concentração dos peptídeos na solução de liberação (exceto para a liberação em **pH 4,0**). Este efeito sugere a presença de enzimas proteolíticas no látex natural, e que não possuem atividade catalítica em pHs ácidos.

Os ensaios de degradação realizados na ausência de solução liberada pelas membranas de látex mostraram que os peptídeos são estáveis em solução aquosa. Entretanto, ensaios realizados na presença de solução liberada pela membrana de látex apresentaram a hidrólise dos peptídeos e o surgimento de produtos de degradação. O resultado obtido deixa claro que o fator de degradação dos peptídeos está presente no látex natural.

As membranas submetidas ao tratamento de lavagem foram capazes de liberar até 60% em 96 horas do peptídeo desmopressina; 90% em 24 horas de somatostatina; 45% em 8 horas de ocitocina; e 80% em 24 horas de octreotida, e se mostraram eficazes quando tratamos da degradação dos peptídeos, porém, a etapa de adsorção dos peptídeos nas membranas tratadas foi ineficiente, proporcionando perdas e menor controle da liberação. No entanto a adsorção dos peptídeos nas membranas

de látex natural pode ser melhorada modificando a densidade de poros na matriz polimérica.

As cinéticas de liberação dos peptídeos pelas membranas de látex natural seguem o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. Este modelo é aplicado para formulações poliméricas quando o mecanismo de liberação é desconhecido ou pode envolver mais de um mecanismo. Os valores obtidos de $n < 0,5$ indicam que o mecanismo de liberação das membranas é por difusão Fickiana.

O fato da identificação da degradação dos peptídeos durante o estudo não deveria ser considerado um fator prejudicial para a utilização do látex natural como matriz sólida na liberação de peptídeos, uma vez que os ensaios foram realizados em meio estático (sem fluxo) comparado a um meio dinâmico como a derme.

Desta forma, membranas de látex natural podem ser utilizadas como matriz sólida para a liberação tópica de peptídeos, uma vez que a pele humana possui pH levemente ácido (4,6 – 5,8) (Leonardi, Gaspar e Campos, 2002), valores de pH em que a degradação dos peptídeos causada pela solução liberada pelo látex é minimizada ou talvez não ocorra.

Podemos também afirmar que se faz necessária maior investigação sobre as enzimas proteolíticas presentes no látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*.

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram selecionados por possuírem ligações dissulfeto em suas estruturas mantendo as cadeia cíclicas. Estas ligações, em estruturas peptídicas podem proteger as moléculas de ataques proteolíticos.

Finalmente, estes peptídeos quando incorporados ao látex natural podem também apresentar aplicações de interesse comercial e social. A desmopressina para compor um sistema de liberação sustentada que reduz a produção de urina no tratamento de incontinência urinária, proporcionando bem estar aos pacientes (MEDICINANET, 2015); a ocitocina em casos de deficiências na liberação do leite materno, e proporcionar um tratamento alternativo para casos depressivos (MEDICINANET, 2010a); a somatostatina poderia ser utilizada no alívio dos sintomas associados com tumores endócrinos gastroenteropancreáticos funcionais (MEDICINANET, 2010b).

REFERÊNCIAS

- ALLARCON, J. B.; MALITO, M.; LINDE, H.; BRITO, M. E. M. Alergia ao látex. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 1, p. 89-93, 2003.
- ALVES, M. C. O. **Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- BORGES, F. A.; BOLOGNESI, L. F. C.; TRECCO, A.; DRAGO, B. C.; ARRUDA, L. B.; LISBOA FILHO, P. N.; PERRI, E. G.; GRAEFF, C. F. O.; SANTOS, A. G. dos; MIRANDA, M. C. R.; HERCULANO, R. D. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/241297.
- CAVALHEIRO, V. M. S. e MARTINS, M. M. Química da borracha. In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 14., 2010, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2010. v.1. Disponível em: <<http://www.unifra.br/eventos/sepe2010/2010/Trabalhos/tecnologica/Completo/5445.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2015.
- COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.
- CVETKOVIC, R. S.; PLOSKER, G. L. Desmopressin: in adults with nocturia. **Drugs**, v. 65, n. 1, p. 99-107, 2005.
- D'AUZAC, J.; JACOB, J. L.; CHRESTIN, H. (Ed.). **Physiology of rubber tree latex: the laticiferous cell and latex: a model of cytoplasm**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 470 p.
- DICKINSON, C. J.; DELVALLE, J.; TODISCO, A.; GANTZ, I.; TONG, L.; FINNISS, S. E.; YAMADA, T. Canine prosomatostatin: isolation of a cDNA, regulation of gene expression, and characterization of post-translational processing intermediates. **Regulatory Peptides**, v. 67, n. 3, p. 145-152, 1996.
- DRUGSUPDATE.COM. **Octreotide information from DrugsUpdate**. 2011. Disponível em: <<http://www.drugupdate.com/generic/view/91>>. Acesso em: 12 jan. 2015.
- ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A. C.; PASETTO, S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F. O.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 95, n. 3, p. 932-939, 2010.
- FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; COUTINHO NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

GUIDELLI, E. J.; KINOSHITA, A.; RAMOS, A. P.; BAFFA, O. Silver nanoparticles delivery based on natural rubber membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 3, p. 1536-1545, 2003.

HASMA, H.; SUBRAMAUIAN, A. Composition of lipids in latex of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 501. **Journal of Natural Rubber Research**, v. 1, n. 1, p. 30-40, 1986.

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

HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A. C.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 253-256, 2009.

HERCULANO, R. D.; GUIMARÃES, S. A. C.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA, O. N. J.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 57-61, 2010.

KANG, H. S.; PARK, S. H.; LEE, Y. G.; SON, T. I. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(γ -glutamic acid) for biological application: preparation, physical properties, and cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n. 1, p. 386-394, 2006.

LEE, H.-J.; MacBETH, A. H.; PAGANI, J. H.; YOUNG, W. S. Oxytocin: the great facilitator of life. **Progress in Neurobiology**, v. 88, n. 2, p. 127-151, 2009.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for drug delivery systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p. 149-173, 2010.

MALMONGE, S. M. **Hidrogel sintético para reparo de defeitos na cartilagem articular**. 1997. 186 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MEDICINANET. **Desmopressina**. Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos/248/desmopressina.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

MEDICINANET. **Ocitocina**. Porto Alegre, 2010a. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/conteudo/3873/ocitocina.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

MEDICINANET. **Somatostatina**. Porto Alegre, 2010b. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos_injetaveis/3549/somatostatina.htm>. Acesso em: 24 jun. 2015.

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

MORENO, R. M. B.; FERREIRA, M.; GONÇALVES, P. S.; MITTOSO, L. H. C. Avaliação do látex e da borracha natural de clones de seringueira no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 583-590, 2003.

MRUE, F.; COUTINHO NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F. A.; MIRANDA, M. C. R.; LOPES, R.; BARROS, N. R.; MAZALLI, A. V. G.; SILVA, R. G.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/157952.

NAWAMAWAT, K.; SAKDAPIPANICH, J. T.; HO, C. C.; MA, Y.; SONG, J.; VANCSA, J. G. Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, n. 1/3, p. 157-166, 2011.

PANUS, P. C.; JOBST, E. E.; TINSLEY, S. L.; TREVOR, A. J.; KATZUNG, B. G. **Pharmacology for the physical therapist**. New York: McGraw Hill, 2009. 608 p.

PICHAYAKORN, W.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; AMNUAIKIT, T.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: effect of polymer and plasticizer blends. **Journal of Membrane Science**, v. 411/412, p. 81-90, 2012.

PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, S. J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

POLYPEPTIDE GROUP. **[Des-Ala¹, des-Gly², des-Ans⁵, D-Trp⁸, IAmp⁹]Somatostatin-14**. 2014a. Disponível em: <<http://www.poly peptide.com/des-ala-des-gly-des-asn-d-trp-iampsomatostatin-14-hypothalamic-releasing-hormones-prsc1308.html>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

POLYPEPTIDE GROUP. **Desamino-[D-Arg⁸]Vasopressin**. 2014b. Disponível em: <<http://www.polypeptide.com/desamino-d-argvasopressin-pituitary-peptides-prsc417.html>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

POLYPEPTIDE GROUP. **Octreotide**. 2014c. Disponível em: <<http://www.polypeptide.com/octreotide-hypothalamic-releasing-hormones-prsc1456.html>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

POLYPEPTIDE GROUP. **Oxytocin**. 2014d. Disponível em: <<http://www.polypeptide.com/oxytocin-pituitary-peptides-prsc061.html>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

REZAKHANIHA, B.; ARIANPOUR, N.; SIROOSBAKHAT, S. Efficacy of desmopressin in treatment of nocturia in elderly men. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 16, n. 4, p. 516-523, 2011.

SADER, S. L.; COUTINHO NETTO, J.; BARBIERI NETTO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES, J. R. P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, n. 4, p. 338-344, 2000.

SALAMON, B. F. **Controle de qualidade de cápsulas de cloridrato de venlafaxina manipuladas em farmácias magistrais de Porto Alegre - RS**. 2011. 30 f. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. Oxytocin and social contact reduce anxiety: hormone may be less effective at relieving stress for isolated animals. **ScienceDaily**, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2010/11/101115160626.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

STEINGRABER, T.; SHTOLZ, T.; RODRIGUES, P. O. Avaliação da influência de adjuvantes não-poliméricos solúveis na liberação do nimodipino a partir de formulações matriciais de liberação prolongada. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas**, v. 37, n. 2, p. 122-132, 2008.

VEIGA, I. G.; MORAES, Â. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. S1, p. 154-160, 2012.