

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

**“CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO
LÁTEX E DA BORRACHA NATURAL QUE
ESTIMULAM A ANGIOGÊNESE”**

Deuber Lincon da Silva Agostini

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente
2009

Deuber Lincon da Silva Agostini

**“CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX
E DA BORRACHA NATURAL QUE ESTIMULAM A
ANGIOGÊNESE”**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre 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
2009

Agostini, Deuber Lincon da Silva.
A221c Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural
que estimulam a angiogênese / Deuber Lincon da Silva
Agostini. - Presidente Prudente : [s.n], 2009.
v, 87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Orientador: Aldo Eloizo Job
Banca: Ana Maria Pires, Gabriel Pinto de Souza
Inclui bibliografia

1. Látex. 2. Borracha natural. 3. Isopreno. 4. Angiogênese.
I. Autor. II. Título. III. Presidente Prudente - Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

CDD(18.ed.) 620.11

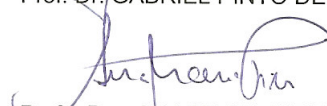
**Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e
Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e
Documentação - UNESP, Câmpus de Presidente Prudente.**
claudia@fct.unesp.br

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 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 30 dias do mês de abril do ano de 2009, às 14:00 horas, no(a) UNESP / 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, Prof. Dr. GABRIEL PINTO DE SOUZA do(a) Centro de Pesquisas Em Materiais / Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Profa. Dra. ANA MARIA PIRES 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 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de DEUBER LINCON DA SILVA AGOSTINI, intitulado "CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX E DA BORRACHA NATURAL QUE ESTIMULAM A ANGIOGENESE". Após a exposição, o discente foi argüido 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


Prof. Dr. GABRIEL PINTO DE SOUZA


Profa. Dra. ANA MARIA PIRES

Teus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.

Dedico este trabalho e toda a minha vida a estas pessoas especiais que sempre acreditaram que poderíamos, através de muito trabalho, dedicação, confiança e respeito mútuo, melhorar nossas condições de vida.

Dourival – Fátima “Fá”- Flávia – Diego - Cléia.

Agradecimentos

Nossos caminhos se cruzaram diante de um ideal comum. Partilhamos cada descoberta, desafio e conquista. Dividimos medo, incertezas e inseguranças... Mas somamos entusiasmo, forças e alegrias... Sua presença tornou mais amena minha jornada. Ao seu lado, as intermináveis horas de estudo, as noites não dormidas e os dias de extremo cansaço foram mais felizes. Hoje, sua amizade me torna mais forte e embala meus planos futuros. Obrigado, amigos, por tornar inesquecível minha formação, por tornar tão agradável minha escolha: abnegação, dedicação, entrega. Obrigado por tornar doce e fascinante o aprendizado da vida.

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 Cléinha, que já faz parte da família a um bom tempo, obrigado por ter me suportado por todo este tempo.

Ao Prof. Dr. Aldo Eloizo Job pela orientação neste trabalho e grande amizade. Pessoa que tem o poder de cativar a todos e mudar a vida destas, mostrando um mundo muito melhor. Dizem que bares não é um lugar para quem quer procurar uma vida melhor, mas se naquele ano de 2001, se não tivesse ido até o bar Marília em Adamantina-SP não teria conhecido esta pessoa maravilhosa, que mudou drasticamente a minha vida.

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. Giacometti pelos conhecimentos, amizade e orientação provisória enquanto o Prof. Dr. Aldo estava realizando Pós-doutorado em Windsor-Canadá.

A banca, Prof. Dr. Ana Maria Pires e Prof. Dr. Gabriel de Souza Pinto, pelo tempo dedicado a correção de minha dissertação e pela contribuição na melhoria da qualidade deste trabalho. Toda a minha consideração e amizade.

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

A Prof. Dr. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva e seu aluno Nilson pela caracterização de proteínas e discussão do resultado do método de Bradford.

Ao Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo, da USP de São Carlos, pelo auxílio nas medidas e discussões dos resultados de RMN.

Ao Prof. Dr. Adonilson dos Reis Freitas pelas medidas auxílio nas medidas e discussões dos resultados de MEV.

Ao Prof. Dr. Pedro Iris pelas medidas de AFM.

Ao Instituto de Física de São Carlos (USP) pelas medidas de raios x.

A Prof. Dr. Débora Terezia Balogh que realizou as medidas de DMA em uma velocidade relâmpago, pois nosso equipamento estava com problemas.

Aos Professores do DFQB: Ana Maria, Carlitos, Eduardo, Francisco, Roberto, Silvio, Totó, que tornaram o dia-a-dia no departamento muito melhor.

Aos Professores da FAI: Dr. Alexandre Teixeira de Souza, Dr. Fabio Cezar Ferreira, Dr. Patrícia Alexandra Antunes, pelas caronas, Lucélia-Presidente Prudente, e pela amizade conquistada nestes anos. Toda a minha consideração e amizade.

Aos amigos do DFQB, Aninha, Carol, Clebão, Dalton, Diogo, Efraim, Elton, Felipe, Flavinho, Lenine, Makoto, Pirapó, Priscila, Igor, Zanfa e outros igualmente importantes, pela amizade e convivência.

Aos amigos a Balão Mágico, Caito, da Ponta, Diogaum, Julhaum, Luizão, Paulim, Pedro, pela hospedagem no período em que não havia sido contemplado com a bolsa, pelos churrascos e festas. Sem eles teria terminado esta dissertação a algum tempo.

Agradeço também aos amigos de Lucélia, onde muitos por lá não está mais, Botim, Dudu, Duzão, Junin, Zé Roberto, Bocão, Lukinha, Guerinha, Fernando, os Vacari pelos intermináveis churrascos e carnavais e pela grande amizade que mesmo a distância não consegue terminar.

Agradeço a FAPESP e ao IMMP/MCT, pelo apoio financeiro, pois sem estas instituições este trabalho não poderia ser realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 - Polímeros	7
1.2 - látex e Borracha Natural.....	8
1.2.1 - Composição do látex.....	11
1.2.1.1 - Partículas de borracha	12
1.2.1.2 - Lutóides e complexos de Frey-Wyssling	13
1.2.1.3 - Soro e constituintes inorgânicos	14
1.2.2 - Clone RRIM 600.....	15
1.2.3 - Preservação do látex.....	15
1.3 - Biomateriais.....	16
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	18
2.1 - Materiais.....	18
2.2 - Coleta do látex	18
2.3 - látex Centrifugado	19
2.4 - Preparação das Membranas de Borracha Natural.....	20
2.5 - Liofilização.....	21
2.6 - Métodos de Caracterização	22
2.6.1 - Espectroscopia por FT-IR modo ATR.....	23
2.6.2 - Espectroscopia Raman	24
2.6.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	25
2.6.4 - Difração de raios X (DRX)	26
2.6.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
2.6.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM)	28
2.6.7 - TG acoplado com infravermelho (TG/FT-IR)	29
2.6.8 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	30
2.6.9 - Análise Dinâmico Mecânico (DMA)	30
2.6.10 - Método de Bradford.....	31
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1 - Espectroscopia no infravermelho (FT-IR) no modo ATR.....	32

3.2 - Espectroscopia Raman.....	37
3.3 - Ressonância magnética nuclear (RMN)	38
3.4 - Difração de raios X (DRX)	42
3.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
3.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM).....	45
3.7 - Análise Termogravimétrica (TG).....	47
3.8 - TG acoplado com FT-IR	52
3.9 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	70
3.10 - Análise Dinâmico Mecânico (DMA)	71
3.11 - Método de Bradford.....	73
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural.</i>	10
<i>Figura 2 – Modelo de uma partícula de borracha em látex envolvida por uma camada de fosfolipídio e outra mais externa de proteínas, proposto por Blackley. Adaptado de [6].</i>	13
<i>Figura 3 - Coleta do Látex.</i>	19
<i>Figura 4 – Três fases constituintes do látex centrifugado.</i>	20
<i>Figura 5 – Curva de DSC para resfriamento e aquecimento do látex.</i>	22
<i>Figura 6 – Analisador Temogravimétrico NETZSCH modelo 209.</i>	29
<i>Figura 7 - Espectros na região do infravermelho das amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.</i>	33
<i>Figura 8 – Ampliação dos espectros na região do infravermelho das amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.</i>	35
<i>Figura 9 – Espectros Raman das amostras de Látex, F1, F2, F3 e das membranas tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.</i>	37
<i>Figura 10 – Espectro de RMN ¹³C DP/MAS das amostras F1, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.</i>	39
<i>Figura 11 - Espectro de RMN ¹³C CP/MAS das amostras F2, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.</i>	40
<i>Figura 12 - Espectro de RMN ¹H das amostras F1, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.</i>	41
<i>Figura 13 – Difração de raios X das frações F2 e F3, liofilizadas.</i>	42
<i>Figura 14 – Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 60°C.</i>	43
<i>Figura 15 - Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 85°C.</i>	44
<i>Figura 16 - Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 120°C</i>	45
<i>Figura 17 – Micrografias por AFM das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.</i>	46
<i>Figura 18 – Curvas de TG e DTG do látex, das fases, F1, F2 e F3, e das membranas produzidas a 60, 85 e 120°C, liofilizados.</i>	48
<i>Figura 19 – Imagem 3D de TG/FT-IR acoplado do látex liofilizado.</i>	53
<i>Figura 20 - Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR do látex liofilizado.</i>	54
<i>Figura 21 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F1 do látex centrifugado e liofilizado.</i>	55
<i>Figura 22 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F1 do látex centrifugado.</i>	56
<i>Figura 23 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F2 do látex centrifugado e liofilizado.</i>	57
<i>Figura 24 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F2 do látex centrifugado e liofilizado.</i>	58
<i>Figura 25 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F3 do látex centrifugado e liofilizado.</i>	59
<i>Figura 26 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F3 do látex centrifugado e liofilizado.</i>	60
<i>Figura 27 – Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 60°C liofilizada.</i>	61
<i>Figura 28 - Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR da membrana de borracha natural obtida a 60°C liofilizada.</i>	62
<i>Figura 29 - Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 85°C liofilizada.</i>	63
<i>Figura 30 – Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR da membrana de borracha natural obtida a 85°C liofilizada.</i>	64
<i>Figura 31 – Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 120°C liofilizada.</i>	65
<i>Figura 32 - Espectros extraídos da imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 120°C liofilizada.</i>	66
<i>Figura 33 – Absorbância versus Temperatura (°C), em 1643 cm⁻¹ para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C.</i>	67

<i>Figura 34 - Absorbância versus Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), em 1588 cm^{-1} para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 35 - Absorbância versus Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), em 1544 cm^{-1} para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 36 - Curva de DSC da amostra de látex, F1, F2, F3 e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 37 – Curva de DMA das membranas tratada a 60, 85 e 120°C.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 38 – Curva de Calibração com BSA.</i>	<i>74</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Composição média do látex recém coletado.</i>	<i>12</i>
<i>Tabela 2 - Principais modos vibracionais do cis 1,4-poli-isopreno.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 3 – Atribuições das bandas nos espectros de FT-IR para grupos funcionais observados nas amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4 – Valores obtidos por meio das curvas termogravimétricas, das fases, F1, F2 e F3 do látex centrifugado e liofilizado.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 5 - Atribuições das bandas características nos espectros de FT-IR extraídos da imagem 3D do látex liofilizado.</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 6 – Massa e volume de BSA para a curva de Calibração.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 7 – Valores da absorbância para cada diluição do soro.....</i>	<i>74</i>

AGOSTINI, Deuber Lincon da Silva. **Caracterização do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**: 2009. 87 f. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2008.

RESUMO

As membranas de borracha natural são usadas frequentemente como material biológico na indução de angiogênese e neoformação. Neste trabalho foram realizados estudos com objetivo de identificar os componentes do látex que são responsáveis pelo processo de angiogênese e neoformação. O látex, as fases centrifugadas do látex e as membranas da borracha natural, tratados termicamente em 60, 85 e 120°C, foram liofilizados para a redução de água nos mesmos. A caracterização de tais materiais foi realizada por espectroscopia infravermelha (FT-IR), micro-Raman, ressonância magnética nuclear (NMR - ^1H e ^{13}C), difração de raio x (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), análise do termogravimétrica (TG) acoplado com infravermelho (TG/FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise dinâmico mecânica (DMA) e o método de Bradford. Nos resultados de espectroscopia no infravermelho, micro de Raman, NMR (^1H e ^{13}C), de raios x e TG/FT-IR; os componentes químicos do látex, das fases centrifugadas do látex e das membranas da borracha natural foram identificados. A técnica de TG foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica e os resultados mostraram que as membranas obtidas a 60°C possuem maior estabilidade. Nos resultados de DSC notou-se que a transição vítrea acontece em $\sim -68^\circ\text{C}$, para todos os materiais que contêm isopreno e a degradação estrutural ocorrem em torno de 376°C. As transições de vítreas foram confirmadas através dos resultados de DMA. O látex centrifugado apresenta três fases: partículas de borracha (F1), lutóides (F2) e Frey-Wyssling (F3). Nas frações F2 e F3 o isopreno é ausente, ou apresenta pequena proporção, mas contêm diversos componentes químicos: proteínas, ácidos aminados e grupos funcionais que podem induzir o angiogênese e a neoformação em tecidos biológicos. A membrana de borracha natural tratada termicamente a 60°C, juntamente com a fração F2, mostrou as atividades mais elevadas de angiogênese e neoformação. Além disso, as membranas que contêm poros favorecem o processo de cicatrização e vascularização.

Palavras-chave: látex, borracha natural, isopreno, angiogênese.

ABSTRACT

Natural latex and natural rubber membranes are frequently used as biomaterial in the angiogenesis induction and neoformation of biological tissues. Our studies aimed to study and identify the latex components that are responsible for angiogenesis and neoformation processes. The natural latex, the centrifuged latex phases and the natural rubber membranes were thermally treated at 60, 85 and 120°C and afterward all samples were lyophilized. The characterization of such materials were carried out using infrared (FT-IR), micro Raman spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR - ^1H e ^{13}C), X-ray diffraction, scanning electronic microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), thermogravimetry analysis coupled with infrared (TG/FT-IR), differential scanning calorimeter (DSC), dynamic mechanical analysis (DMA) and the method of Bradford. From the results of infrared and micro Raman spectroscopy, NMR (^1H e ^{13}C), X-rays and TG/FT-IR the chemical components present in the latex, in the centrifuged latex phases and in natural rubber membranes were identified. TG technique was used to evaluate the thermal stability and results showed that membranes obtained at 60°C present greater stability, up to 350°C. From DSC results it was found that the glass transition happens at -68°C, for all materials containing isoprene, and the structural degradation occurs at 376°C. Glass transitions were confirmed also by DMA results. Centrifuged latex presents three phases: rubber particles (F1), lutoids (F2) and Frey-Wyssling (F3). In the fractions F2 and F3 the isoprene is absent but they contain several chemical components: proteins, amino acids and functional groups that can induce angiogenesis and neoformation on biological tissues. The treated membrane 60°C of natural rubber showed the highest angiogenesis and neoformation activities. Furthermore, membranes containing pores favor the cicatrization process and the vascularization processes.

Keywords: latex, natural rubber, isoprene, angiogenesis.

INTRODUÇÃO

As primeiras informações que se tem sobre a descoberta da Borracha Natural, data 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].

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 [2].

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 [3] e produtos leves com alta resistência como balões, luvas cirúrgicas, preservativos [4] 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 [5,6].

Em meados da década de 90 iniciaram-se estudos para aplicações de látex natural na área da saúde, onde látex extraído dos clones da seringueira *Hevea brasiliensis* se mostrou promissor em vários tipos de aplicações biomédicas [4].

Estudos iniciais, 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. 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 [7].

A atividade angiogênica encontrada em alguns trabalhos que estudaram as membranas de borracha natural é de grande importância, já que nas últimas décadas vários estudos foram realizados, com diversos materiais [8-17], no sentido de se identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo, e também a busca de substâncias com atividade angiogênica, pelo seu grande potencial de aplicação clínica.

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 inicialmente em modelos animais, encontrando-se atualmente em fase de utilização em humanos [18]. Este material demonstrou ser a base de um biomaterial 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 [19,20], sendo que a biocompatibilidade do látex natural, em forma de prótese esofágica, foi investigada e constatada, não demonstrando qualquer indício de manifestação alérgica [21,18].

A biomembrana de látex 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 fásia do músculo temporal) [20]. 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 cm² 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 [22].

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 [23]. Outro fator interessante é que apesar de a sensibilidade ao látex ou aos seus aditivos ser um fenômeno freqüente [24], os autores não observaram em nenhum animal qualquer reação adversa.

Próteses de borracha natural foram utilizadas em diferentes tecidos, apresentando resultados satisfatórios como prótese arterial [25]. 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 [18]. 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. Foi observado também que a membrana de borracha natural induz a diferenciação do tecido de cicatrização, com aumento da detecção de fatores de crescimento como VEGF e

TGF β 1, com o aumento da permeabilidade vascular que organiza a angiogênese já na 1ª semana de tratamento.

Duas teses de doutorado, 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 [26].

Pesquisas recentes descobriram que o látex de borracha natural pode ser aplicado como um poderoso gel anti-rugas e possível aplicação para estimular a produção de cabelos, resultado de trabalhos desenvolvidos por universidades e empresas nacionais. Neste tratamento houve uma redução em cerca de 80% das rugas na região da testa e dos olhos, em apenas um mês [27].

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 [28].

OBJETIVOS

Através dos estudos realizados, até o momento, sobre as membranas de borracha natural utilizadas como biomaterial na indução de angiogênese e de neoformação, é notório que este material deve ser amplamente estudado, tanto em aplicações clínicas, como os seus componentes indutores. Portanto neste trabalho, está sendo apresentado estudos de caracterização do látex *in natura*, das fases do látex centrifugado e das membranas de borracha natural, tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados, utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho (FT-IR), Raman, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Difractometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de força atômica (AFM), TG acoplado com FT-IR (TG/FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise dinâmico mecânico (DMA) e o método de Bradford, com objetivo de conhecer e dominar seus componentes indutores de angiogênese e de neoformação.

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 [29]. 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 [30].

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 [31].

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 [32]. 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. 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 [33].

1.2 - Látex e Borracha Natural

A seringueira é uma planta da família das Euforbiáceas, que abrange uma gama de espécies com grande interesse comercial como, por exemplo, a mamona (*Ricinus communis* L.), o tungue (*Aleurites*) e a mandioca (*Manihot*) [4,34]. Numerosas espécies botânicas espalhadas pelo planeta produzem látex, ocorrendo no reino das plantas em mais de 12.000 espécies pertencentes a 900 gêneros. Dessas plantas laticíferas aproximadamente 1.000 espécies contêm borracha [35]. 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 [36]. Hoje em dia a *Hevea brasiliensis* é cultivada nas regiões tropicais da Ásia (Malásia, Indonésia, Tailândia e Sri Lanka), onde 90% da produção mundial é extraída [37].

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 [38,39,40,41]. Contudo, o interesse pela produção de borracha natural está sendo recuperado, com o Estado de São Paulo atuando como o maior produtor do país [42,43]. O Estado de São Paulo conta hoje com cerca de 45.000 hectares plantados com seringueira. Duas regiões do Estado são aptas para o cultivo desta planta: a região do Oeste Paulista e a região litorânea [38,42].

O látex é um sistema coloidal polifásico, sendo a parte dispersa constituída de micelas de borracha, proteínas, lutóides e partículas Frey-Wyssling e o meio dispersivo constituído do soro aquoso [44]. As partículas Frey-Wyssling, que ocorrem em pequena quantidade (cerca de 1%), são constituídas de carotenóides e lipídios conferindo à borracha uma coloração amarelada [35,56].

A borracha natural é obtida por coagulação do látex por árvores do gênero *Hevea brasiliensis*, 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 [45].

Embora a borracha sintética obtida do petróleo possua quase a mesma composição química da borracha natural, suas propriedades físicas são inviáveis para alguns manufaturados, como por exemplo: para luvas cirúrgicas, preservativos, pneus de automóveis e revestimentos diversos [42], além de ser uma fonte não renovável. A borracha natural é também matéria prima essencial para a

fabricação de vários artefatos em transportes, indústrias e materiais bélicos [4,42,46].

O polímero natural sintetizado pela espécie *Hevea* tem um peso molecular médio próximo a um milhão. É composto de aproximadamente três unidades *trans* isoprênicas, responsável pela parte cristalina, seguidas de cerca de 10.000 unidades *cis* isoprênicas, responsável pela parte amorfa, do tipo cabeça-calda [47], combinadas por ligações 1,4 e um grupo α terminal, conforme mostrado na Figura 1. Esse grupo terminal α varia com a origem da borracha [35,48]. Como a unidade de repetição da parte *cis* isoprênica existe em uma proporção muito maior que a parte *trans* isoprênica a borracha natural se mostra um polímero amorfo.

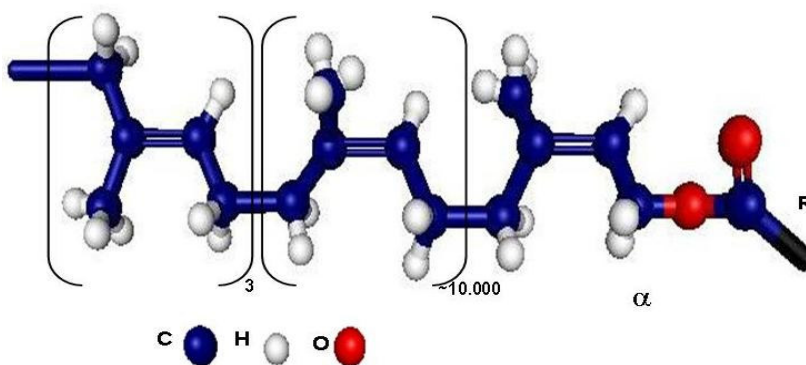


Figura 1 - Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural.

Os constituintes não borracha do látex são proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e outros constituintes inorgânicos [49]. Os principais componentes ao redor da membrana do látex são os lipídios que apresentam importante papel no tempo de estabilidade mecânica do látex estabilizado em amônia [50].

1.2.1 - Composição do látex

Este tópico sobre os constituintes do látex foi retirado da Tese da Prof^a. Dr^a. Marcia Maria Rippel [6], orientada pelo Prof. Dr. Fernando Galembeck, vencedora do Premio CAPES de Melhor Tese na área de Química, no ano 2005. Os constituintes do látex estavam muito bem descritos, por este motivo não foi modificado ou resumido para não perder a qualidade apresentada e teve grande contribuição nesta dissertação, pois foi possível comparar com os resultados obtidos.

O látex é composto por uma complexa mistura de diferentes componentes, incluindo macromoléculas. Um dos componentes majoritários do látex é o *cis* e/ou *trans* poli-isopreno. Outros constituintes presentes no látex e relatados em estudos fitoquímicos são: polissacarídeos, flavanóides, lipídeos, fosfolipídios e proteínas, ficou comprovado também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenóides, açúcares e ácidos graxos [51]. Sabe-se que o polisopreno é um dos componentes de todas as espécies laticíferas, porém a elucidação dos outros constituintes necessita de estudos mais aprofundados [52].

O látex de *Hevea brasiliensis* é um sistema polidisperso, no qual partículas negativamente carregadas de vários tipos estão suspensas em um soro. Três tipos de partículas predominam: partículas de borracha que constituem 30 a 45% (em massa) do látex, os lutóides que constituem 10 a 20% e os chamados complexos de Frey-Wyssling (FW) [apud. 53,6]. O soro no qual as partículas estão dispersas é chamado de soro C.

O látex recém coletado tem pH na faixa de 6,0 a 7,0 e densidade de 0,975 e 0,980 g/cm³ e viscosidade variável, principalmente se o látex for diluído

em água em virtude do intumescimento e ruptura dos lutóides [apud. 54,6]. A composição média do látex natural recém coletado é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - *Composição média do látex recém coletado.*

Constituinte	% em massa no látex
Borracha	25-45
Proteína	1-1,8
Carboidratos	1-2
Lipídios neutros	0,4-1,1
Lipídeos polares	0,5-0,6
Inorgânicos	0,4-0,6
Aminoácidos, aminas, etc.	0,4-0,6
Água	49-71

1.2.1.1 - Partículas de borracha

As partículas de borracha natural contém centenas de moléculas de hidrocarboneto e é envolvida por um filme de proteínas e fosfolipídios, que lhe confere carga negativa promovendo estabilidade coloidal das partículas. O diâmetro das partículas de borracha pode variar de 5 nm até 3.000 nm, chegando em alguns casos até a 5.000 nm ou 6.000 nm [apud. 55,56,57]. Aproximadamente 27% do conteúdo total de proteínas no látex recém coletado estão adsorvidos na superfície das partículas de borracha e acredita-se que parte das proteínas estejam no interior das partículas [58,6]. Esta camada de proteínas adsorvida é que conferem estabilidade as partículas de látex estabilizado com amônia, devido a sua carga negativa.

A presença de longas cadeias de hidrocarbonetos nas moléculas de fosfolipídios faz com que tenha forte atividade de superfície, sendo fortemente adsorvidos na superfície das partículas de borracha: as cadeias de hidrocarbonetos ficam ancoradas na borracha e os grupos de cabeça polar na fase aquosa. Assim é

possível explicar a forte adsorção de proteínas na superfície das partículas considerando que os fosfolipídios têm carga positiva, enquanto as proteínas têm carga negativa, levando a associação iônica entre dois tipos de moléculas [6,54]. Assim podemos representar em um modelo proposto por Blackley [54], conforme a Figura 2.

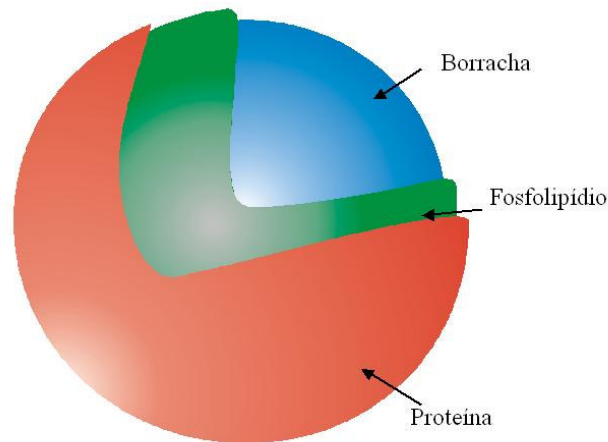


Figura 2 – Modelo de uma partícula de borracha em látex envolvida por uma camada de fosfolipídio e outra mais externa de proteínas, proposto por Blackley. Adaptado de [6].

1.2.1.2 - Lutóides e complexos de Frey-Wyssling

Os lutóides formam o segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis*. Eles são constituídos de proteínas (solúveis e insolúveis), fosfolipídios e sais minerais [54, apud. 59], ligados ou circundados por membranas e são, na média, muito maiores em tamanho do que as partículas de borracha. Eles têm de 2.000 a 5.000 nm de diâmetro, ligados por uma membrana de cerca de 8 nm de espessura também com carga negativa.

O conteúdo dos lutóides é chamado soro B, contém vários cátions, principalmente cálcio, magnésio, potássio e cobre [apud. 60] e proteínas catiônicas

que tem ação flocculante muito rápida sobre partículas de borracha no látex, resultando na formação de microflocos.

Os complexos de Frey-Wyssling são constituídos de carotenóides e lipídios conferindo à borracha sua coloração, mais ou menos amarela [54,58]. Estes complexos são aproximadamente esféricos, tendo um tamanho que varia de 3.000 a 6.000 nm de diâmetro e são ligados por uma dupla membrana. Acredita-se que estes complexos tenham uma função vital nas atividades metabólicas, sendo possíveis sítios da biossíntese da borracha.

Os lutóides e complexos de Frey-Wyssling dissolvem quando o látex recém coletado é estabilizado com amônia, de tal forma que temos no látex amoniacal um sistema de duas fases, constituindo das partículas de borracha e do soro [5, apud.55].

1.2.1.3 - Soro e constituintes inorgânicos

O soro do látex natural tem densidade de $1,020 \text{ g/cm}^3$ e contém diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. 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 e é uma medida da qualidade do látex [54].

O soro do látex contém, além de proteínas, bases nitrogenadas como colina, além de aminoácidos, ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), sais minerais encontrados no soro B e mais outros de rubídio, manganês, sódio, potássio,

cobre, magnésio, ferro e zinco [13,27]. Estes elementos são absorvidos do solo, transportados na seiva e participam de reações que envolvem a biossíntese do látex [5].

1.2.2 - 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 [42].

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. Para propósitos industriais específicos, ele é mais bem apreciado, considerando essa uniformidade essencial [42].

1.2.3 - Preservação do látex

A estabilização do látex através de aditivos decorre da necessidade de se evitar o processo de coagulação espontânea, em que se observa a formação de uma fase superior coagulada e uma fase inferior aquosa e clara. Várias hipóteses [54] explicam o porquê de este processo ocorrer rapidamente, em questão de horas. A primeira considera a ação de microorganismos reagindo com compostos não

borracha, diminuindo seu poder de estabilização. A segunda hipótese atribui esse efeito à liberação de ânions de ácidos graxos através da hidrólise de várias substâncias lipídicas presentes no látex. Estes ânions são então adsorvidos na superfície das partículas de borracha, possivelmente removendo parte das proteínas adsorvidas. Estes ânions então interagem com cátions metálicos divalentes como cálcio e magnésio, presentes no látex ou gradualmente liberados de complexos pela ação de enzimas.

Dois fatos são considerados com estas teorias: o pH é reduzido durante a coagulação espontânea, de 6 para 5 e este processo pode ser acelerado pela adição de pequenas quantidades de sabões carboxilados. Como se pode esperar, grandes quantidades de sabão retardam este efeito de coagulação. Isto é justificado pela dependência da concentração de cálcio e magnésio presentes no látex. Além disso, o tempo no qual o látex pode ser mantido sem coagular é muito aumentado se estes cátions são removidos.

O preservativo mais utilizado é a amônia, quando se necessita preservar o látex a longo prazo, sem a adição de preservativos auxiliares. A amônia é um bactericida muito eficiente em concentrações acima de 0,35% em massa, enquanto que baixas concentrações, 0,05% em massa, podem acelerar o crescimento de bactérias, devido ao aumento do pH de 6,5 para 8, pH este ideal para a multiplicação de muitas formas comuns de bactérias [6].

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 [61,62]. 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 [63].

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 [63]. 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 [64], 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.

CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1 - Materiais

Toda vidraria foi, primeiro, lavada antes de ser utilizada para cada experimento, com solução sulfocrômica, em seguida com água e detergente neutro e enxaguada em água corrente. Por último foi feito um enxágüe com água deionizada e seca em estufa.

2.2 - Coleta do Látex

O látex de borracha natural está contido no sistema de vasos lactíferos situados no córtex da árvore, formando um feixo 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 [2]. A Figura 3 mostra uma imagem da sangria em meio espiral para a coleta do látex.



Figura 3 - Coleta do Látex.

O látex foi extraído de diferentes árvores de seringueira, clone RRIM 600, na Fazenda Indiana localizada na região de Presidente Prudente-SP. A sangria da árvore foi realizada com uma faca em forma de U, com a qual provoca-se um corte, em dias alternados, com o comprimento igual à metade da circunferência do tronco, iniciam-se cortes sucessivos 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, de aspecto leitoso, foi armazenado em vidros escuros previamente limpos.

2.3 - Látex Centrifugado

A centrifugação é de longe o método mais utilizado para concentrar látex natural, chegando a representar 90% de todo o látex concentrado utilizado industrialmente, pois é um processo contínuo e econômico [65,54].

O látex foi centrifugado 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 1400 rpm. A fração menos densa que a água contém partículas de borracha, migrando para a superfície do tubo [66]. A fração aquosa, logo abaixo da fração superior, é um soro que contém íons, proteínas, carboidratos, açúcares e outras substâncias solúveis [66,67]. A fração de fundo 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 [4,68]. Portanto existem três fases, conforme Figura 4, distintas resultantes da centrifugação do látex, estas fases estão representadas, neste trabalho como:

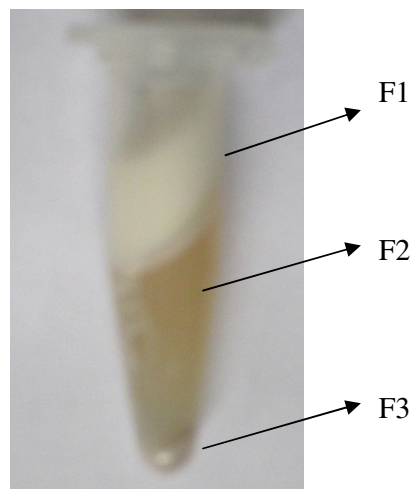


Figura 4 – *Três fases constituintes do látex centrifugado.*

F1 – Fase superior, contendo partículas de borracha;

F2 – Fase intermediária, sendo o soro do látex;

F3 – Fração de fundo, contendo os lutóides.

2.4 - Preparação das Membranas de Borracha Natural

Os filmes de borracha natural foram preparados pelo método de “casting” de solução líquida de látex estabilizada com hidróxido de amônio

(NH₄OH). Na preparação dos filmes foram utilizadas placas de petri de 9,5 cm de diâmetro interno e de fundo reto, para obter filmes de espessura uniforme e controlada. Então a solução de látex foi depositada sobre a placa de petri, em seguida a placa foi colocada em uma estufa, com temperatura mantida em 60, 85 e 120°C, em um período de 6 horas, com sistema de exaustão ligado, para evaporação mais rápida do soro.

2.5 - Liofilização

O látex *in natura*, as fases do látex centrifugado e as membranas de borracha natural foram liofilizados utilizando-se um liofilizador Edwards modelo E-C modolyo, gentilmente disponibilizado pela Prof^a. 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 foi removida após sofrer sublimação em uma câmara de vácuo, sendo retirada da mesma através de uma bomba. O método consiste no congelamento do produto sob vácuo, quando ocorre sublimação.

Para confirmação da efetiva liofilização do látex foi realizado uma medida de calorimetria exploratória diferencial (DSC), Figura 5, portanto o processo de liofilização foi bem sucedido, pois o resfriamento foi realizado a temperatura de -35°C. Há na literatura a discussões [69,70] sobre a diferença entre o ponto de fusão e congelamento, onde sais presentes no material alteram estes pontos, sendo que a concentração destes sais aumentam a medida que a água líquida passa para de gelo, diminuindo o ponto de congelamento. No entanto foi realizada uma medida de DSC para água ultra pura e estes valores foram semelhantes aos

obtidos para o látex, Figura 5, sendo que a presença de sais no látex altera o ponto de fusão e congelamento, mas não significativamente como consta na literatura. Através destas medidas de DSC verifica-se que o ponto de congelamento e de fusão não corresponde a um único valor e sim a valores distintos.

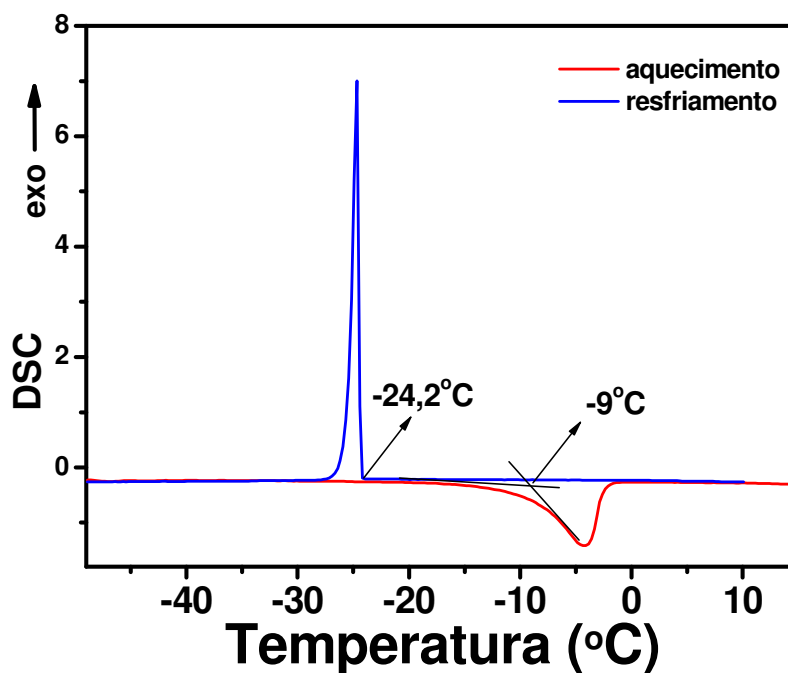


Figura 5 – Curva de DSC para resfriamento e aquecimento do látex.

O processo de liofilização foi utilizado neste trabalho para remover o excesso de água presente nas amostras, pois o objetivo deste trabalho é identificar os componentes do látex e da borracha natural e interfere no processo de identificação destes constituintes do látex.

2.6 - Métodos de Caracterização

Neste item são apresentados os métodos utilizados para investigar as características do látex *in natura*, das fases do látex centrifugado e das

membranas de borracha natural, tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

2.6.1 - Espectroscopia por FT-IR modo ATR

Na Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier a amostra é colocada entre a saída do interferômetro e o detector. Como a amostra absorve certos comprimentos de onda de luz, o interferograma contém o espectro da fonte menos o espectro da amostra, ou, com menor intensidade nos comprimentos absorvidos pela amostra [71].

A técnica conhecida como reflexão total atenuada (ATR) ou espectroscopia de reflexão interna permite a obtenção de espectros qualitativos de sólidos, como no caso na borracha natural. Esta técnica se baseia no fato que um feixe de luz refletido internamente pela superfície de um meio transmissor penetra uma pequena distância além da superfície refletora e retorna ao meio transmissor durante o processo de reflexão [72]. O látex e a borracha natural é posto em contato com a superfície refletora, a luz atravessa alguns micrômetros, produzindo, assim, um espectro de absorção.

O látex e as membranas de borracha natural foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), marca Bruker modelo Vector 22, na região entre 4000-570 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

2.6.2 - Espectroscopia Raman

O fenômeno de Espalhamento Raman foi previsto teoricamente por Smekal (1923) e descoberto experimentalmente pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata **Raman**, que recebeu o prêmio Nobel em 1930, por este trabalho [73]. O efeito logo despertou o interesse entre os físicos, que procuravam explicar o seu mecanismo [74].

Os deslocamentos Raman estão associados a determinados tipos de ligação da mesma maneira que são as absorções no infravermelho. A espectroscopia Raman mostrou-se particularmente importante no campo das análises de hidrocarbonetos [75].

O Efeito Raman é um efeito de espalhamento da luz, porém, com alterações na frequência de uma pequena porção da luz espalhada. Esta mudança de frequência é derivada da combinação entre a radiação incidente e os níveis de energia vibracional das moléculas [76].

A luz, interagindo com uma molécula, pode ser espalhada com uma frequência diferente (deslocamento Raman), que corresponde à frequência do estado vibracional da molécula [73].

O látex e as membranas de borracha natural foram caracterizados, no Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT – UNESP de Presidente Prudente, através do espectrógrafo micro-Raman, marca Renishaw modelo In-Via, sendo o Prof. Dr. Carlos Jose Leopoldo Constantino responsável pelo laboratório.

2.6.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Em consequência da complexidade de suas estruturas moleculares ou por causa da pequena diferença entre unidades isoméricas, a investigação de moléculas e macromoléculas no estado sólido requer boa resolução espectral. Os deslocamentos químicos no espectro de RMN são muito sensíveis à estrutura e conformação da molécula, às interações intermoleculares, à troca química, mudanças de conformação e os tempos de relaxação são sensíveis à dinâmica molecular. Por estes motivos, Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido é uma espectroscopia muito útil ao estudo de polímeros [77].

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro VARIAN INOVA de 9.4 T, operando nas frequências de 100.5 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H . Em todos os experimentos utilizou-se uma sonda da empresa equipada com rotação em torno do ângulo mágico de 5 mm modelo Jackobsen. Os espectros de ^1H foram obtidos utilizando excitação por um único pulso de rádio frequência com duração de 4.0 μs enquanto que os espectros de ^{13}C foram obtidos utilizando dois modos de excitação: 1) a técnica de polarização cruzada (CPMAS) com tempo de contato de 1 ms; 2) Excitação por um único pulso de 3.5 μs (ou polarização direta DPMAS). O uso destes dois modos de excitação permite separar as componentes moleculares do sistema baseado em sua mobilidade. 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. Nos espectros DPMAS e ^1H , em princípio, o sinal de todos os segmentos da amostra deve aparecer. No entanto, como as linhas referentes à parte da amostra que se comporta como líquido (borracha) são muito mais estreitas, elas geralmente se

sobrepõem. Em outras palavras, nos espectros de DPMAS e ^1H os sinais correspondentes as partes móveis da amostra são privilegiados. Baseado nestas características pode-se dizer que os espectros ^1H e DPMAS são predominantemente da borracha (parte com maior mobilidade molecular), enquanto os espectros CPMAS os segmentos mais rígidos aparecem. O fato de os sinais no espectro CPMAS serem típicos de proteínas (aminoácidos), mostra que as proteínas presentes na amostra se encontram em regiões com menor mobilidade molecular.

2.6.4 - Difração de raios X (DRX)

A Espectroscopia Atômica de raios X está baseada nas medidas de emissão, absorção, espalhamento, fluorescência e difração da radiação eletromagnética. O espalhamento dos raios X pelo ambiente ordenado de um cristal resulta na interferência entre os raios espalhados (construtiva ou destrutiva) porque as distâncias entre os centros espalhadores são da mesma ordem de grandeza que o comprimento da onda da radiação.

As medidas de difração de raios X foram realizadas, no Instituto de Física da USP campus de São Carlos, em um difratômetro da marca RIGAKU-ROTOFLEX modelo RV-200B com comprimento de onda característico do $\text{Cu-K}\alpha$, igual a $1,54 \text{ \AA}$, e com ângulos de varredura (2θ) entre 5° e 50° , as amostras foram acondicionadas em superfície de vidro.

2.6.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com

dimensões relativamente grandes, possui alta profundidade de foco, podendo obter diferentes relevos da superfície da amostra simultaneamente em foco. O MEV também produz imagens de alta resolução, o que garante obter alta ampliação de detalhes sem perder a nitidez [72].

O princípio de funcionamento do MEV são elétrons gerados por um dispositivo chamado canhão de elétrons, neste canhão os elétrons são gerados pelo aquecimento resistivo de um filamento de tungstênio em forma de V utilizando uma fonte de alta tensão. A tensão de operação pode variar de 1 kV até 40 kV e, quanto maior a tensão de aceleração, mais fino se torna o feixe de elétrons, o que resulta em uma maior resolução [78], porém nem todo tipo de material resiste a tensões elevadas.

A preparação da amostra é feita sobre suportes metálicos, utilizando adesivos condutivos, como fitas de carbono ou suspensões coloidais de prata ou carbono. O revestimento da amostra por um filme condutor tem como objetivo evitar o acúmulo de carga negativa, no caso da mesma ser formada por um filme não condutor, como no caso de polímeros. A camada de metal deve ser contínua e fina (menor que 20 nm) para não mascarar a topografia. Geralmente utiliza-se a técnica de *sputtering* para a evaporação do metal, sendo o ouro, liga ouro-paládio, platina, alumínio e carbono os materiais mais utilizados.

Apesar da relativa facilidade de preparação da amostra, a investigação de polímeros por MEV requer que sejam considerados problemas como a sensibilidade à irradiação de elétrons e ao baixo contraste da estrutura, uma vez que estes materiais são constituídos por elementos leves (C, H e O) [72].

Neste trabalho foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Shimadzu, modelo SSX-550 pertencente ao Laboratório de

Microscopia da Central Analítica da Universidade Estadual de Maringá – UEM. As amostras foram colocadas em suporte de alumínio e fixadas através de uma fita de carbono condutora. Sobre estes filmes foi pulverizada uma fina camada de ouro por *sputtering* em um aparelho da marca Shimadzu, modelo IC-50.

2.6.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que mede as interações entre uma ponta de contato e a superfície a ser analisada. Tais interações se dão a partir de forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, magnéticas e de atrito, dependendo do tipo de material e da distância entre a ponta e a amostra. Na escala de frações de angstroms prevalecem as forças eletrostáticas (coulombianas) de repulsão, enquanto que em nível de angstroms as forças de atração de Van der Waals passam a predominar. Já na escala de 10 a 200 nm destacam-se as forças atrativas da tensão de superfície do fluido, entre 0,1 e 1,0 μm voltam a prevalecer as forças eletrostáticas, podendo ser de atração ou repulsão nestes casos e, finalmente, para distâncias da ordem de 10 μm há um amortecimento pelo filme fluido [79].

A técnica de AFM fornece, entre outras informações, a topografia da superfície do filme com seus defeitos e ordenamentos moleculares, possibilitando a medida direta de suas alturas e profundidades, bem como a rugosidade do filme. As medidas de AFM são feitas localmente, varrendo áreas de centenas de angstroms quadrados e não requer que a superfície estudada seja condutora eletricamente, ampliando ainda mais suas possíveis aplicações. As imagens de AFM foram obtidas no modo *tapping*, utilizando um equipamento da

Digital Instrument modelo Nanoscope IV com ponta de nitrato de silício e uma constante de mola de 0,12 N/m.

2.6.7 - 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, apresentado na Figura 6, na faixa de temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) até 800°C , utilizando uma massa de aproximadamente 12 mg para o látex, para suas fases e para as membranas de borracha natural, com uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em um cadinho de alumina em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 25 mL/min. Os gases evaporados nos estudos termogravimétricos são canalizados, por diferença de temperatura, para uma câmara que faz as medidas no infravermelho simultaneamente.

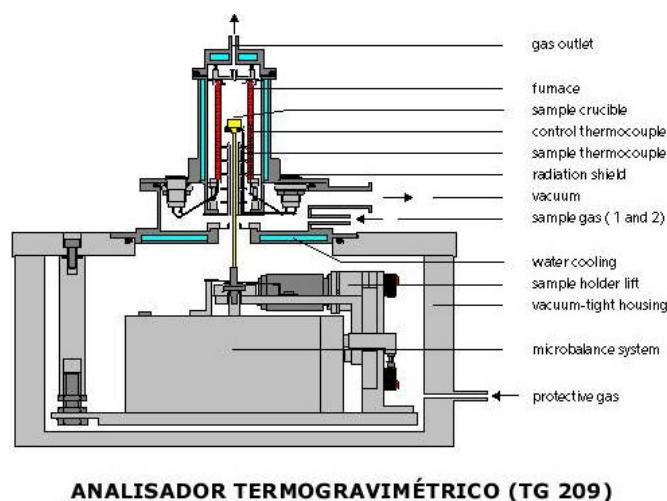


Figura 6 – Analisador Termogravimétrico NETZSCH modelo 209.

2.6.8 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica usada para detectar mudanças físicas ou químicas que são acompanhadas de ganho ou perda de calor. Quando as substâncias são aquecidas, várias transformações físicas ou químicas envolvendo absorção (processo endotérmico) ou evolução de calor (processo exotérmico) podem ocorrer. A técnica de DSC pode ser usada para investigar propriedades térmicas de uma variedade de materiais, sendo empregada para caracterizar materiais orgânicos, inorgânicos, biológicos e poliméricos. Dentre as aplicações pode-se citar: determinação qualitativa e quantitativa de transições de fase, tais como transição vítrea, fusão, cristalização, estudo da cinética de polimerização, de decomposição e de cura.

O látex e as membranas de borracha natural foram caracterizados por 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 10°C/min num intervalo de temperatura de -140°C a 500°C em atmosfera inerte de N₂ com fluxo de 25 mL/min. Para as medidas de DSC foi utilizada uma massa de aproximadamente 8 mg, tanto para o látex como para as membranas de borracha natural.

2.6.9 - Análise Dinâmico Mecânico (DMA)

A análise dinâmico mecânica tem sido amplamente usada como uma técnica de caracterização de polímeros através de detecção dos processos de relaxação, tanto microscópico quanto molecular. Essa técnica fornece informações a respeito do módulo elástico (E'), do módulo de dissipação viscosa (E'') e do

amortecimento mecânico ($\tan\delta = E''/E'$) de um material, quando sujeito a uma solicitação dinâmica. Uma das utilizações mais comuns da técnica de DMA é a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) que apresenta a grande vantagem de ser um método direto de medição.

Neste trabalho foi utilizado um DMA marca Netzsch, modelo 204, no modo tensão, utilizando ar como atmosfera, frequência de 10 Hz, razão de aquecimento de 5°C/min num intervalo de temperatura de -100 a 180°C.

2.6.10 - Método de Bradford

Para a realização do método de Bradford utilizou-se 40 mg de BG-250 que foi dissolvido em 20 mL de etanol absoluto. Em seguida adicionou-se 40 mL de ácido fosfórico 85% agitando com bastão de vidro. Finalizando, adicionou-se água deionizada para completar 100 mL de solução em balão volumétrico. Esta solução foi deixada em repouso e sob abrigo da luz por 24 h, sendo após este tempo filtrada utilizando papel de filtro. No momento da realização das medidas foi feita uma diluição (1:4, v/v) da solução em água. Uma curva padrão para proteínas foi realizada utilizando-se uma solução diluída de proteínas de Albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 1 mg/mL. Foi dissolvido 0,25 g de BSA para 50 mL da seguinte solução: 0,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M e 49,5 mL de água deionizada. Cada 1 mL desta solução contém 5 mg de proteínas. Esta solução espuma muito, por este motivo não deve ser agitada fortemente.

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados de caracterização do látex *in natura*, das fases do látex centrifugado e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C liofilizadas, utilizando as técnicas de FT-IR modo ATR, TG acoplado ao FT-IR, DSC e o método de Bradford para quantificar as proteínas presentes na fase intermediária, resultado da centrifugação do látex.

3.1 - Espectroscopia no infravermelho (FT-IR) no modo ATR

A Figura 7 apresenta os espectros de FT-IR obtidos das amostras de Látex, F1, F2, F3 e das membranas tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados, na região de 4000 a 600 cm^{-1} . Nota-se duas regiões distintas contendo vários picos, a primeira entre 4000 e 2700 cm^{-1} e a segunda região entre 1800 e 600 cm^{-1} , para todas as amostras.

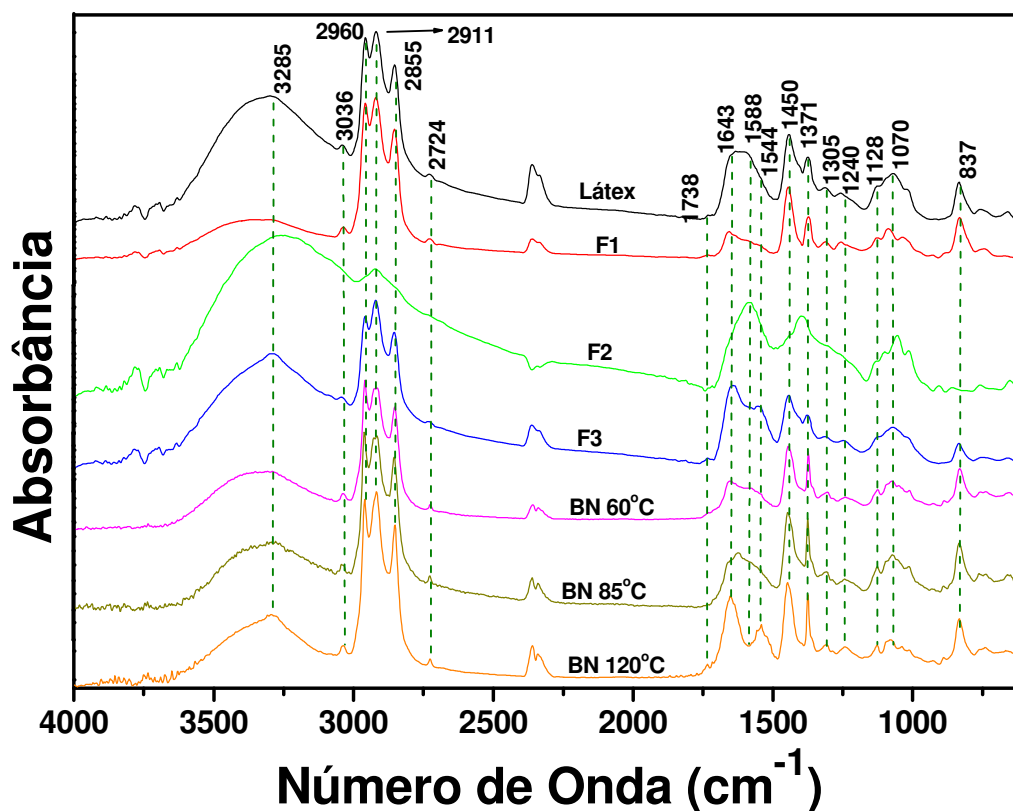


Figura 7 - Espectros na região do infravermelho das amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

As bandas de absorção relativas aos principais modos vibracionais do *cis*-1,4-poli-isopreno estão na Tabela 2. Nota-se na F2 a ausência de vários picos referentes ao isopreno, pois no processo de centrifugação as partículas de borracha migram para o topo, deixando a fração do soro (F2) extremamente límpida contendo diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. Todas as amostras apresentaram o pico em 3285 cm⁻¹ referente ao estiramento simétrico de ligações N-H formando ligação de hidrogênio em proteínas, sendo que na F2 este pico possui maior absorbância em relação aos picos em 3036, 2960 e 2911 cm⁻¹, pois no soro a quantidade de partículas de borracha é muito reduzida.

Tabela 2 - Principais modos vibracionais do *cis* 1,4-poli-isopreno.

Experimental	Literatura [80]	Atribuição [81, 82]
3036	3036	ν_s (=C-H)
2960	2962	ν_s C-H no CH_3 [83]
2911	2912	ν_s C-H no CH_3
2855	2854	ν_s C-H no $-\text{CH}_2-$ [84]
2724	2726	ν $-\text{CH}_2-\text{C}=(\text{CH}_3)$ [85]
1450	1450	δ $-\text{CH}_2-$
1371	1375	δ_s $-\text{CH}_3$
1305	1309	$-\text{CH}_2-$ twist
1240	1244	$-\text{CH}_2-$ twist
	1125 ou 1128	
1128	[146,158]	C-H bending no plano ou $\nu(\text{C}-\text{C})$ <i>cis</i> ou CH_2 wag
837	837	δ C = C - H [86]

A segunda região do espectro, de 1800 a 600 cm^{-1} , é de maior interesse, pois contém picos característicos que permitem avaliar a presença de grupos funcionais devido a grupos carbonílicos como ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas. A Figura 8 apresenta uma ampliação desta região espectral, para melhor visualização e comparação dos picos.

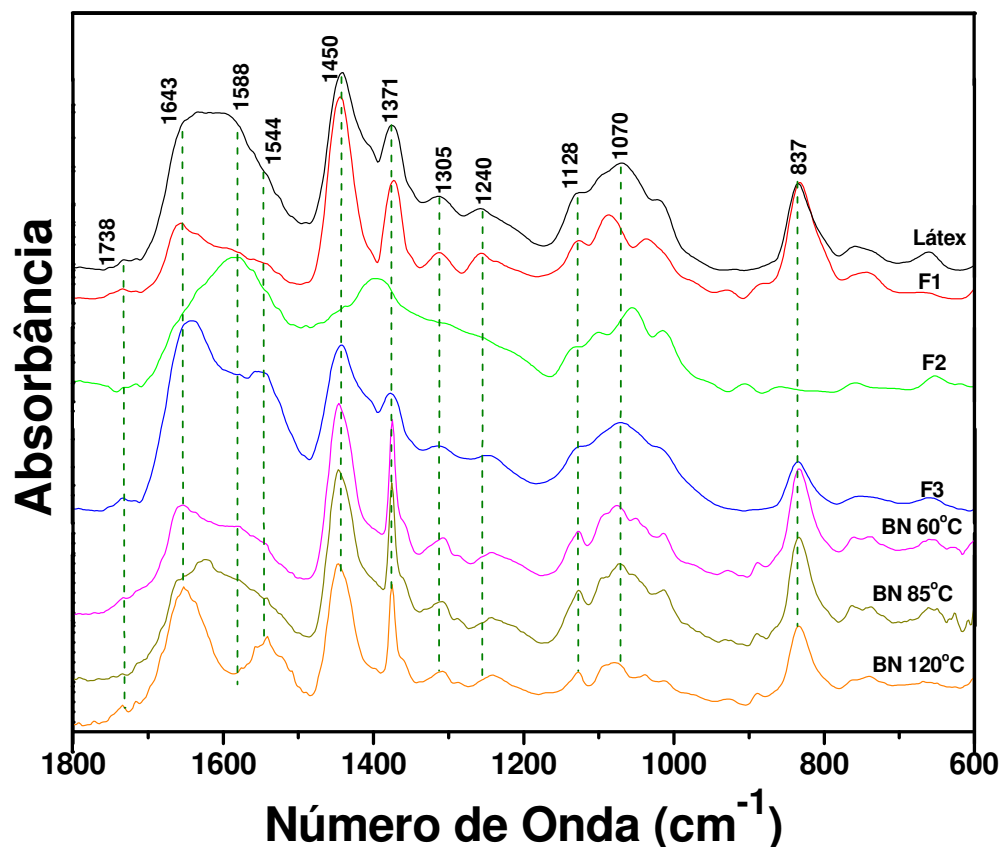


Figura 8 – Ampliação dos espectros na região do infravermelho das amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

Na região de 1800-1500 cm^{-1} , os espectros apresentam picos de absorção em 1738 cm^{-1} , de baixa absorbância, relativo ao estiramento simétrico de C=O em éster. A absorção em 1643 cm^{-1} sendo um ombro para as amostras de látex, F2 e BN 85°C e um pico para F1, F3, BN 60°C e BN 120°C é característica, de amida primária, em estiramento de C=O em ligação de hidrogênio com água. Em 1588 cm^{-1} há um pico característico de estiramento assimétrico de C=O de COO^- em proteínas na F2, sendo um ombro para as amostras de BN 60°C e BN 85°C, estando ausente nas F1, F3 e na BN 120°C. O pico em 1544 cm^{-1} , característico de amida secundária, apresentou-se nas amostras de F3 e BN 120°C, apresentando para

as outras amostras como apenas um ombro. Esta região entre 1800-1500 cm^{-1} apresentou-se muito semelhante entre F3 e BN 120°C.

A Tabela 3 mostra um grupo de frequências referentes aos grupos funcionais presentes na borracha que não são atribuídos ao *cis* 1,4-poli-isopreno [6].

Tabela 3 – Atribuições das bandas nos espectros de FT-IR para grupos funcionais observados nas amostras de látex, F1, F2, F3, e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

Frequência Experimental	Literatura [87]	Atribuição [88, 89,90]
3500-3200	3400	ν_s N–H livre
	3200-3400	ν_s O–H (ligação de hidrogênio)
3285	3280-3300	ν_s N–H formando ligação de hidrogênio
1643	1640	Amida primária ν C=O em ligação H com água
	1630	ν N–H ligado a C=O em ligação H
1588	1565-1585	ν_{ass} C=O de $-\text{COO}^-$ de proteínas
1544	1530-1560	Amida secundária $\nu(\text{CN}) + \delta(\text{NH})$
	1259	ν_{ass} P=O em (PO_2^-) de fosfolipídio [91]
1070	1176-1080	ν C–O de éter alifático
	1080-1040	ν C–O de éter

A região entre 1700 e 1000 cm^{-1} apresenta as maiores diferenças entre as amostras, portanto esta região será de grande interesse para nosso estudo. A amostra F2 foi que apresentou as maiores discrepâncias com a amostra BN 120°C, o que evidencia que a parte protéica é que está agindo como indutor de angiogênese.

3.2 - Espectroscopia Raman

A Figura 9 apresenta os espectros Raman obtidos das amostras de Látex, F1, F2, F3 e das membranas tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizadas, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras de F1, F3, BN 85°C e BN 120°C apresentaram o fenômeno de fluorescência, encobrindo assim o sinal dos picos.

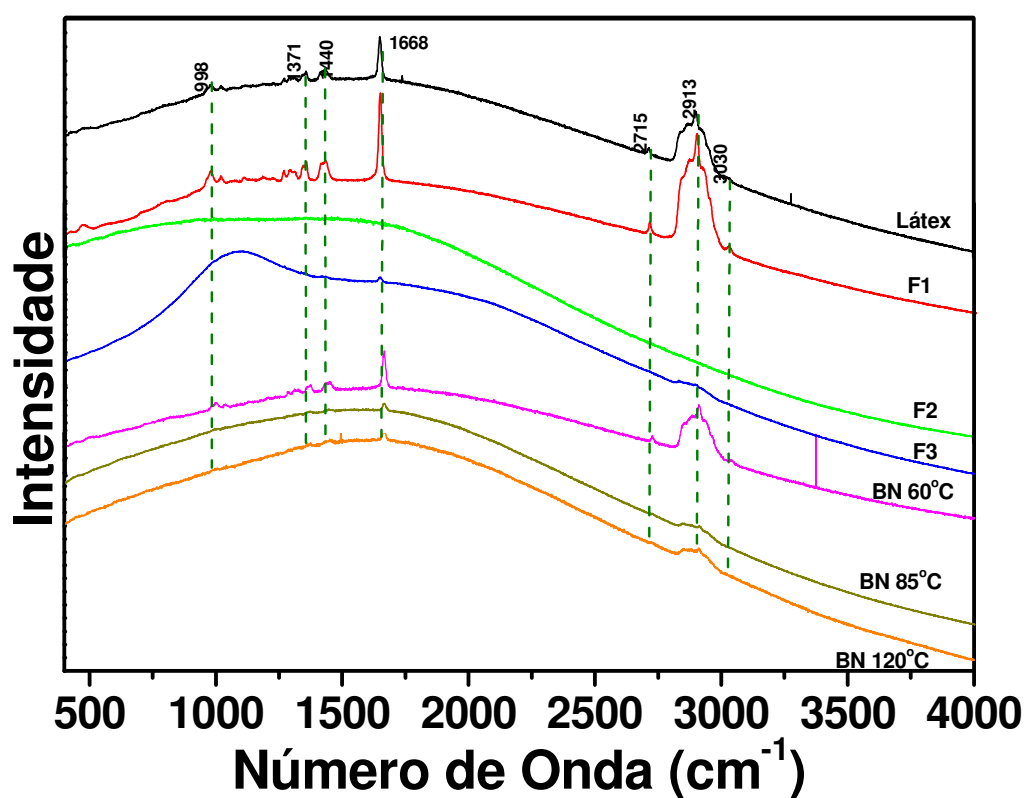


Figura 9 – Espectros Raman das amostras de Látex, F1, F2, F3 e das membranas tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

As amostras de látex, F1, BN 60°C apresentam alguns picos característicos ao isopreno, apesar de também apresentar o fenômeno de fluorescência.

Em 998 cm^{-1} observa-se um pico característico de ligações $=\text{C-H}$, já em 1371 cm^{-1} , tem-se a deformação de grupos CH_3 e em 1440 cm^{-1} nota-se um pico referente a ligações do tipo H-C=O . A vibração do C=C está particularmente desobstruída e é sensível a seu ambiente em uma maneira similar à vibração do C=O no infravermelho. As vibrações da cadeia tipo *cis*, do C=C , podem ser vistas em 1668 cm^{-1} . As vibrações entre 2715 e 3030 cm^{-1} corresponde ao estiramento CH , sendo pertencente ao grupo CH_2 e CH_3 [92].

3.3 - Ressonância magnética nuclear (RMN)

A Figura 10 apresenta os espectros de RMN de ^{13}C DP/MAS das amostras F1, F3 e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C . Esses espectros são típicos da estrutura do isopreno em estado sólido, com duas regiões distintas, sendo uma entre 140 e 120 ppm e outra entre 35 e 20 ppm.

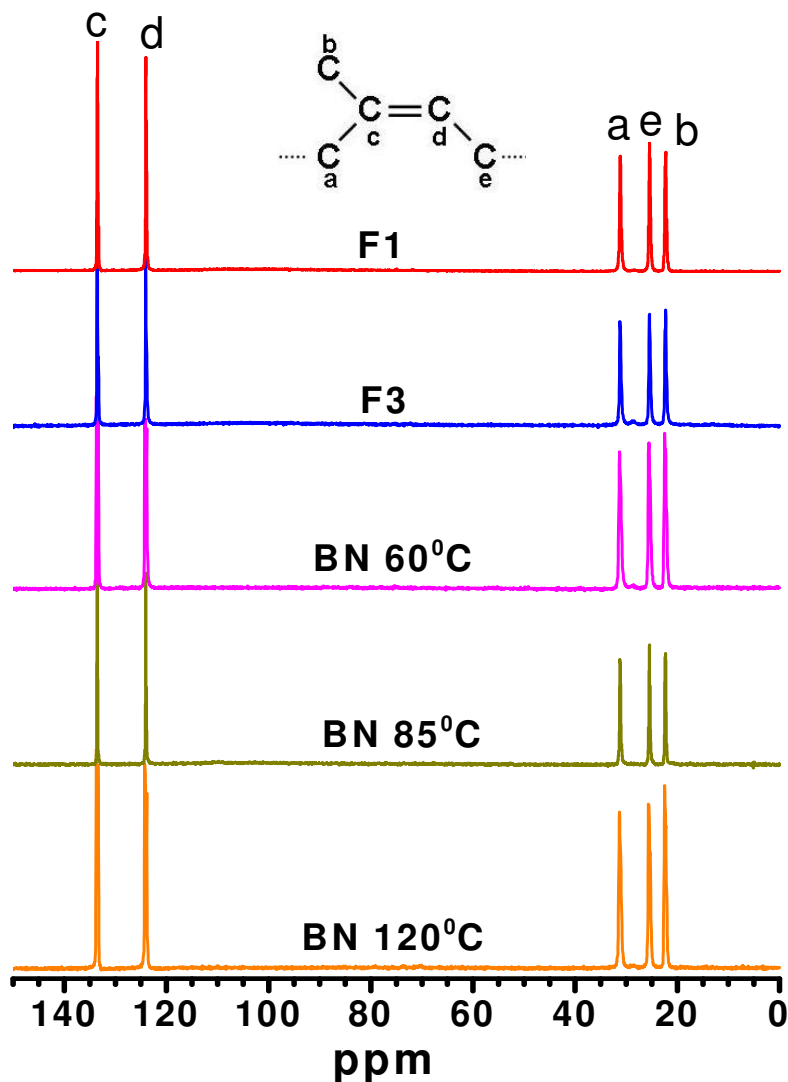


Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C DP/MAS das amostras F1, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.

Os espectros obtidos, em todas as amostras, mostraram cinco sinais característicos dos dois carbonos etilênicos, dos dois grupos metilênicos e do grupo metil da estrutura cis-1,4-poli-isopreno, cuja estrutura química está representada na Figura 10. Os sinais em 133,5 e 124,1 ppm são atribuídos aos carbonos (c) e (d) da dupla ligação, respectivamente. O sinal em 31,3 ppm é atribuído ao carbono metilênico (a), o sinal em 25,3 ppm é atribuído ao carbono (e) e o sinal em 21,20 ppm ao carbono (b) do grupo metil [93,94,95,96].

Pela análise de RMN de ^{13}C CP/MAS, Figura 11, foi detectado um sinal na região de 172 ppm, certamente das carboxilas da cadeia lateral, sinais relacionados a grupos $\text{C}=\text{C}$ em 134,05 e 123,7 ppm dos carbonos (c) e (d), respectivamente.

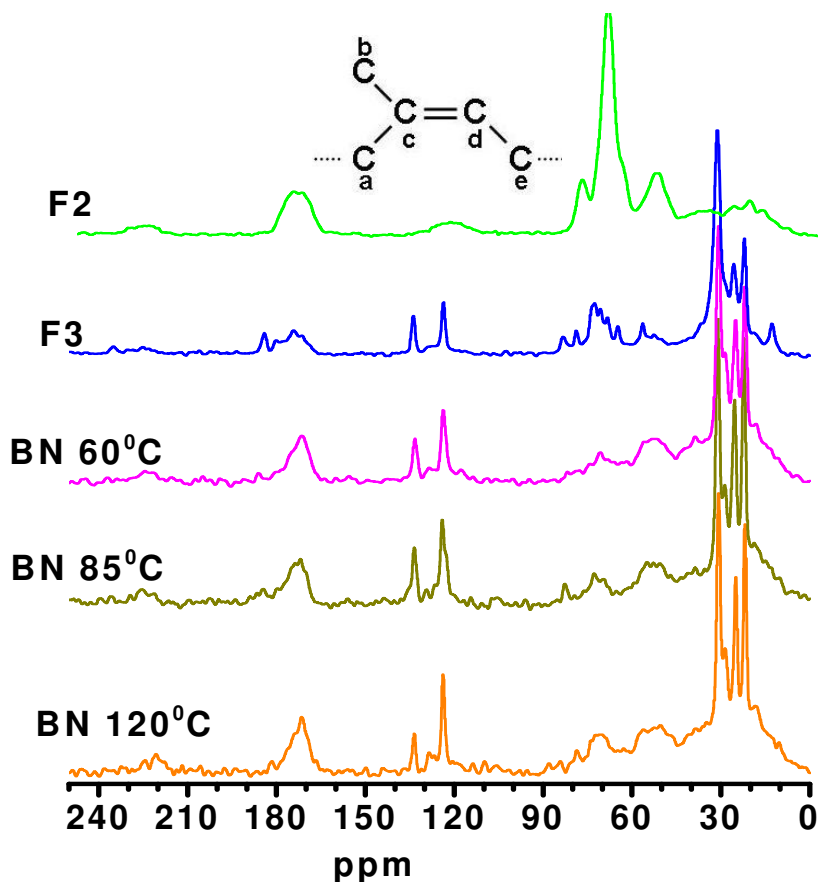


Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C CP/MAS das amostras F2, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.

Foram detectados sinais, com maior relevância nas amostras F2 e F3, referentes a grupos $\text{C}-\text{O}$ em 83,7 ppm; $\text{CH}-\text{O}$ em 79,7 ppm, na faixa de 75–70 ppm relacionados a grupos $\text{CH}-\text{O}$, na faixa de 67–55 ppm a grupos CH_2 -, sinais estes derivados de grupos tipos açúcares como, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Ainda foram detectados sinais na faixa de 35-12 ppm,

correspondentes a região de CH₂, CH, CH₃ de cadeias alifáticas dos carbonos (a),(e),(b), que podem ser constituintes tanto de ramificações quanto da cadeia.

Os espectros de RMN ¹H, Figura 12, também apresentaram duas regiões bem distintas, sendo uma de 4-6 ppm e outra de 0,5-2 ppm.

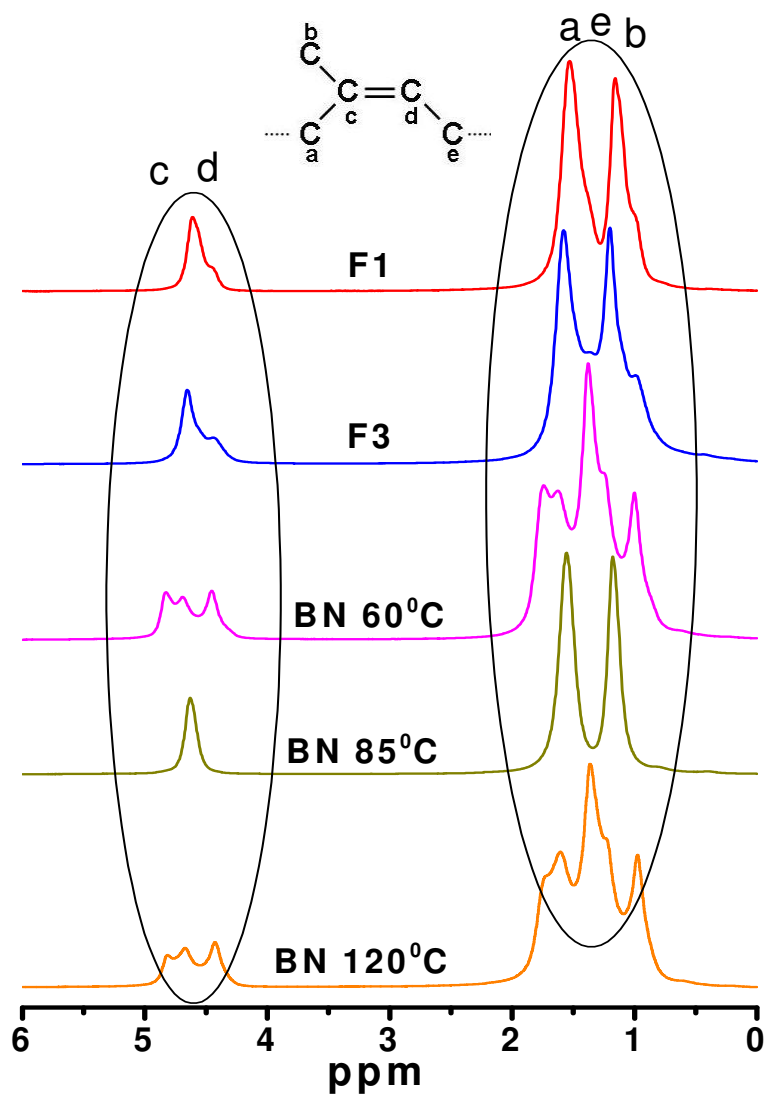


Figura 12 - Espectro de RMN ¹H das amostras F1, F3 e das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.

O deslocamento químico de 4-6 ppm está associado a prótons de C=C, já a segunda região de deslocamento entre 0,5-2 ppm está associada a prótons

do grupo metílico ($-\text{CH}_3$) [95]. Os sinais de próton metílico ($-\text{CH}_3$) do 1,4- cis- isopreno foram observados em 1,75 e 1,61 ppm, nas membranas tratadas a 60 e 120°C e em 1,55 ppm nas amostras F1, F3 e na membrana tratada a 85°C.

O espectro da membrana tratada termicamente a 85°C apresentou-se muito diferente das outras membranas, tal fato pode estar associado as condições experimentais no qual foi realizada a coleta dos dados, onde pode ser detectado somente a parte isoprênica que compõe a membrana.

3.4 - Difração de raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X foi utilizada nas frações F2 e de Fundo, conforme a Figura 13 com o intuito de verificar a presença de compostos cristalinos, como a presença de metais ou estruturas com certa organização.

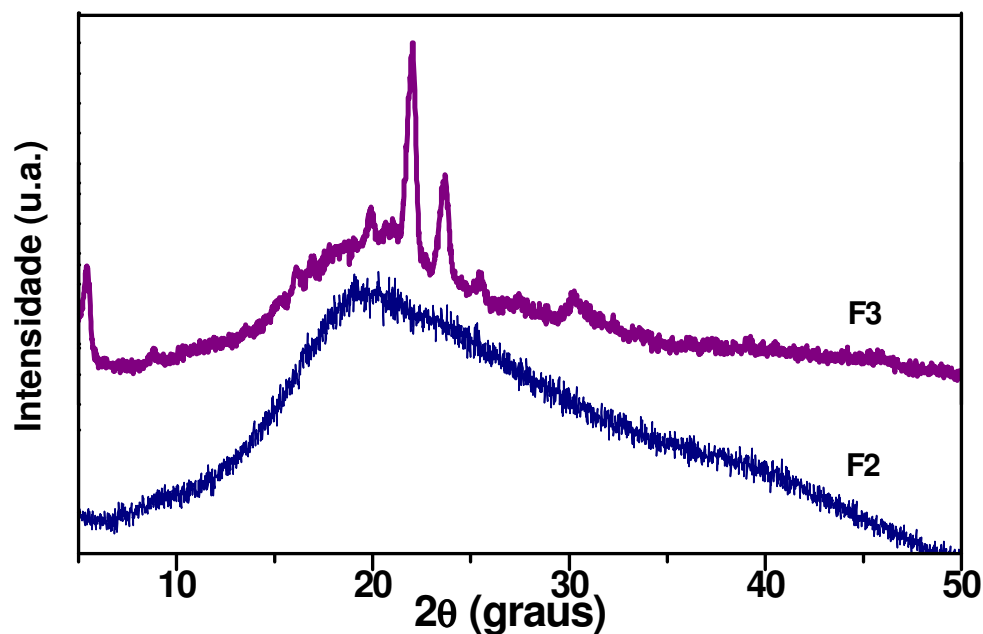


Figura 13 – Difração de raios X das frações F2 e F3, liofilizadas.

No difratograma da amostra F2 temos a ausência de picos difratados que caracterizariam uma fase cristalina, observou-se apenas um largo

pico de espalhamento centrado em $2\theta=19^\circ$ atribuído a difração de raios x nas regiões amorfas das amostras, portanto a fração F2 não apresenta estrutura cristalina bem definida. Já na fração F3 o difratograma apresenta alguns picos de difração característicos de material com certa estrutura cristalina, tais picos podem estar associados a cátions metálicos que compõe esta fase, pois Ca, Zn e Rb formam o segundo grupo mais abundante de elementos, enquanto que as concentrações de Mn, Fe, Ni, Cu e Br são muito baixas [6].

3.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 14 apresenta a micrografia com ampliação de 8000 vezes da membrana de borracha natural tratada termicamente a 60°C .

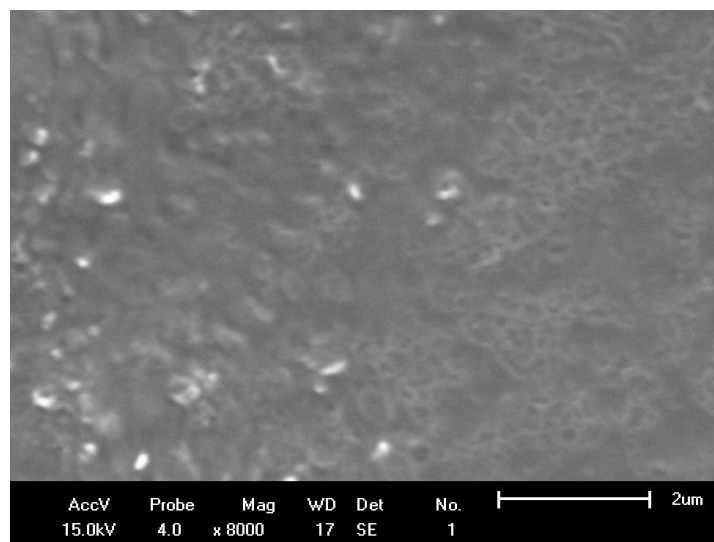


Figura 14 – Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 60°C .

Nota-se nesta micrografia a presença partículas de borracha, que coagularam mais rapidamente, durante a evaporação de subprodutos do látex, permitindo assim maior presença de fosfolipídios e proteínas não ligados por partículas de borracha.

Na Figura 15 tem-se a micrografia da membrana de borracha natural tratada termicamente a 85°C. Nota-se maior homogeneidade nesta membrana, não apresentando grandes partículas de borracha natural, como no caso da membrana tratada a 60°C. Vale destacar que membranas tratadas a temperatura de 85 °C estão no limiar para agir como indutores de angiogênese, onde possivelmente as partículas de borracha podem ligar-se com um maior número de fosfolipídios e proteínas não permitindo que estes grupos atuem na angiogênese.

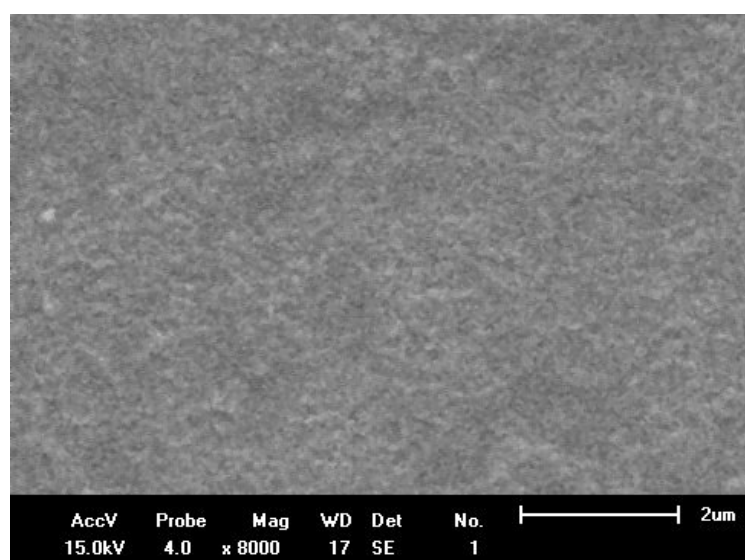


Figura 15 - Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 85°C.

Na Figura 16 tem-se a micrografia da membrana de borracha natural tratada termicamente a 120°C.

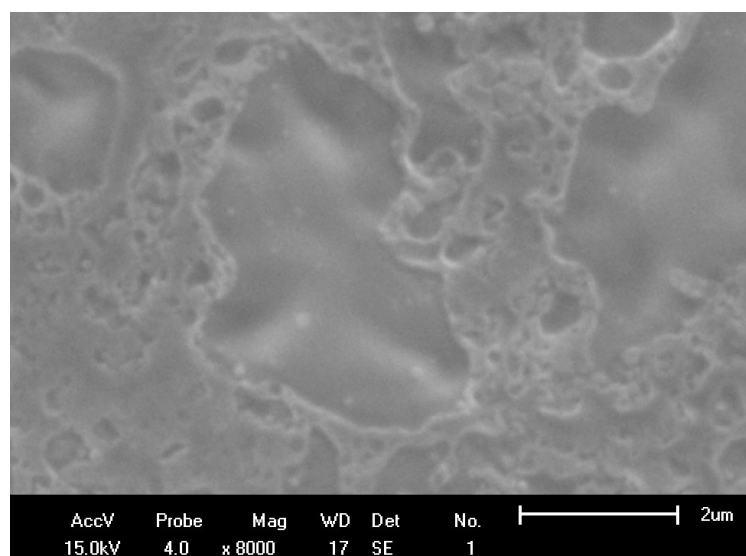


Figura 16 - *Micrografia da membrana de borracha natural tratada a 120°C*

Nesta micrografia é possível notar que houve um processo de evaporação muito rápido de água, mas levando juntamente subprodutos do látex, formando regiões bem características. A evaporação destes subprodutos pode diminuir a concentração de substâncias de grande importância no processo de indução de angiogênese, impossibilitando o uso desta membrana como biomaterial [97].

3.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das membranas, tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, foram estudadas por microscopia de força atômica (AFM), como mostra a Figura 17. As amostras dos filmes micrografados tem dimensões de 2,5 µm x 2,5 µm. Nota-se grande diferença entre a morfologia das membranas, onde a membrana tratada a 60°C apresentou maior quantidade poros, tal fato pode estar associado a evaporação lenta dos componentes não borracha. Estudos realizados na USP de Ribeirão Preto mostram que a quantidade de poros ou a indução de poros melhora a

vascularização, melhorando assim o processo de indução da angiogênese, por este motivo a membrana tratada a 60°C tem maior poder nesta indução, além de ter maior concentração de subprodutos do látex que também colaboram para esta indução.

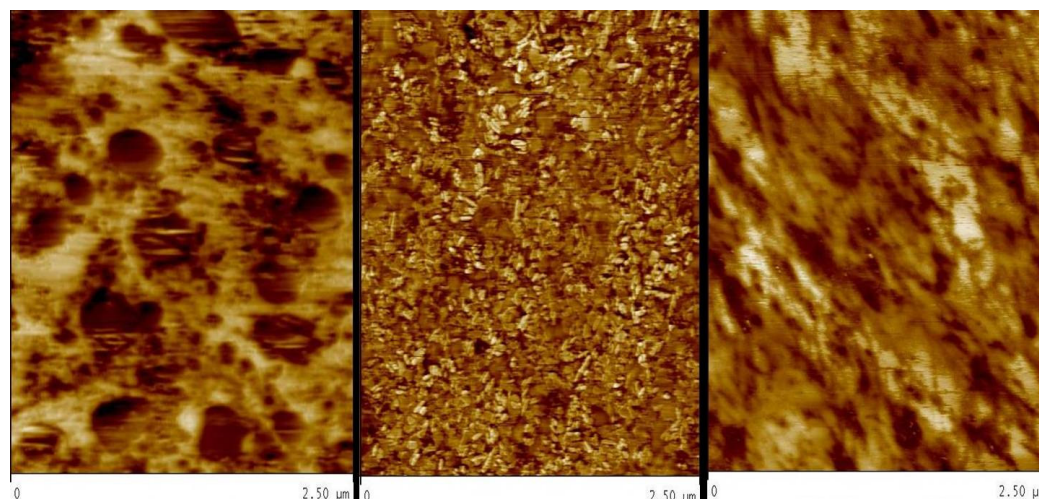
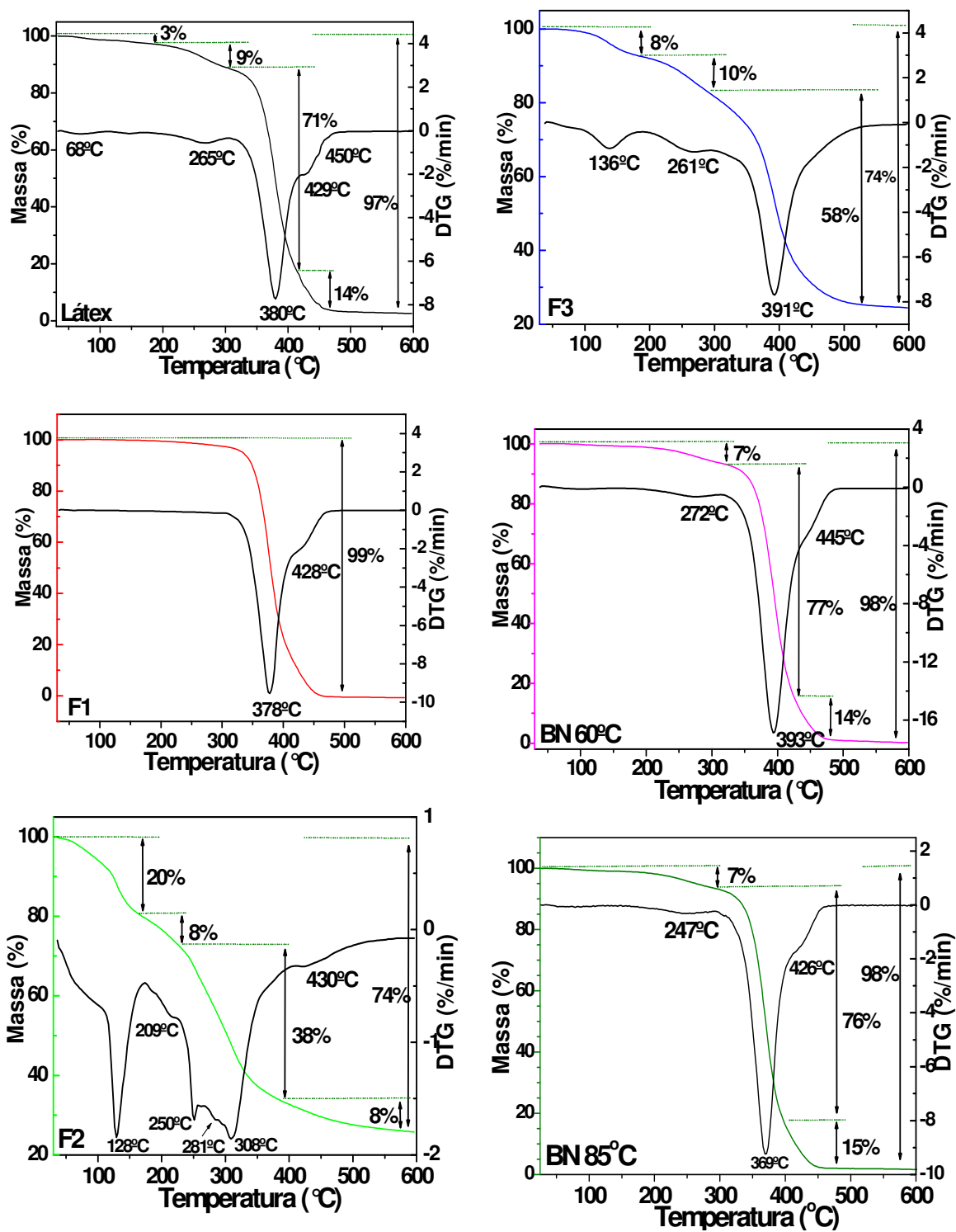


Figura 17 – Micrografias por AFM das membranas tratadas a 60, 85 e 120°C.

A membrana, tratada a 85°C, apresentou maior uniformidade assim como analisado na microscopia eletrônica de varredura (MEV). Já a membrana, tratada a 120°C, possui uma superfície irregular com algumas regiões mais claras e outras um pouco mais escuras, sendo este fato associado a evaporação mais rápida dos subprodutos do látex e a diminuição da concentração de compostos não borracha, presentes nesta amostra. Há muitos dados a serem explorados com a técnica de AFM, mas as medidas foram salvas em formato JPEG o que impossibilita a coleta de alguns dados, como, tamanho e profundidade dos poros.

3.7 - Análise Termogravimétrica (TG)



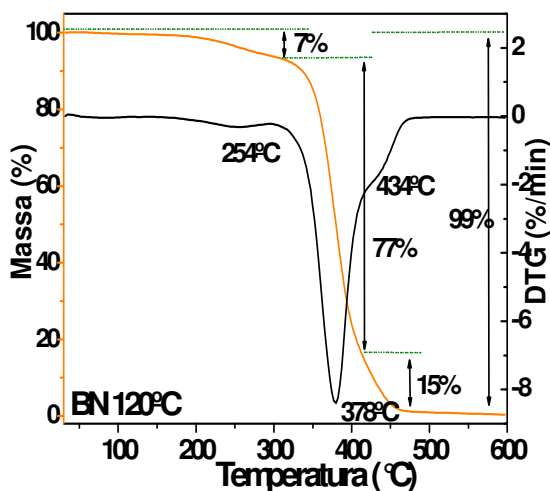


Figura 18 – Curvas de TG e DTG do látex, das fases, F1, F2 e F3, e das membranas produzidas a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

A Figura 18 apresenta as curvas de TG e DTG do látex, das fases, F1, F2 e F3, e das membranas produzidas a 60, 85 e 120°C, liofilizados. Nota-se uma perda de 3% em massa no intervalo de temperatura de 30-180°C, formando dois pequenos vales em 68 e 147°C na curva de DTG. Estas perdas estão associadas à liberação de subprodutos de baixa estabilidade térmica dos componentes não borracha presentes no látex (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos). A perda de massa, em 265°C, de 9% pode estar associada simultaneamente a reticulação e cisão de cadeias. No caso da reticulação ocorre uma perda muito pequena, sendo a perda mais acentuada associada à formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos [6,98]. Em 380°C ocorre a maior perda de massa, 71%, em que ocorre a degradação das cadeias poliméricas do isopreno, principal constituinte do látex, juntamente com outros compostos ligados. Notam-se também perdas de 14% em massa nas temperaturas de 429 e 450°C, associadas à degradação de cadeias poliméricas termicamente mais estáveis, talvez produtos de reticulação ou ciclização. O resíduo final após a completa degradação do polímero é

de 3%, podendo ser óxidos, carbonatos, fosfatos e silicatos metálicos presentes no látex.

Na F1, fração superior resultado do processo de centrifugação, uma única perda de massa é observada na curva de TG, de 99%, correspondendo na curva de DTG a um pico em 378°C e um ombro em 428°C referente a degradação de cadeias poliméricas e também destas cadeias poliméricas termicamente mais estáveis [99]. Esta parte superior apresenta as mesmas propriedades térmicas do isopreno, portanto foi denominada de fração borracha. Já na fração F2, que é uma fração intermediária entre a borracha (F1) e a fração de fundo. Nota-se uma perda de massa de 20% no intervalo de temperatura de 30-180°C, formando um vale em 128°C na curva de DTG e também outra perda, em 209°C, de 8% em massa, em que ambos podem estar associados à parte protéica (fosfolípida) que possuem carga negativa promovendo a estabilidade das partículas de borracha presentes no látex. Como no processo de centrifugação estes constituintes são separados das partículas de borracha, a fração superior que foi denominada borracha se coagula tornando-se um sólido borrachoso. A F2 apresenta outra perda significativa de 38% em massa no intervalo de 220-400°C, a qual pode estar associada a triglicerídeos, esteróis, ésteres de esteróis e outros lipídeos. Estes constituintes ocorrem predominantemente dentro das partículas de borracha, portanto pode haver partículas de borracha também neste soro. Devido à densidade dos constituintes, estas partículas não coagulam, não ficando na parte superior. A amostra F2 apresentou uma massa residual de 26% podendo estar associada a ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), sais minerais e outros de rubídio, manganês, sódio, potássio, cobre, magnésio, ferro e zinco, pois estes produtos são constituintes do soro.

A amostra F3, fração de fundo, apresenta 3 perdas de massa significativas. A primeira de 8% entre 30-180°C corresponde aos constituintes não borracha mencionados para a mesma região soro (F2). As outras 2 perdas coincidem com a degradação térmica da borracha. As partículas de borracha podem estar fortemente ligadas com elementos de alta densidade, mencionados na região de 220-400°C, e resíduos do soro, fazendo com que as partículas de borracha fiquem no fundo do tubo de centrifugação. A fração de fundo apresentou uma massa residual de 26%, valor que coincide com o do soro, portanto associado aos mesmos elementos.

Nota-se uma perda muito pequena de massa entre 30-120°C, nas membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60 e 85°C, que somada a perda em 272°C é de 7%. Este valor é inferior a quantidade de massa degradada no látex, de 12%, o que pode estar relacionado a menor quantidade de compostos não borracha na membrana, os quais podem ter sido evaporados ou, ao contrário, terem se ligado mais fortemente às partículas de borracha durante o tratamento térmico em estufa. A perda de massa em 393°C, de 77%, evidencia que no tratamento térmico em estufa os componentes não borracha se ligam às partículas de borracha, degradando somente quando ocorre a degradação das cadeias poliméricas [98]. A degradação de cadeias poliméricas termicamente mais estáveis ocorre em 445°C apresentando a mesma porcentagem para o látex, 14%. O resíduo final após a completa degradação do polímero é de 2%.

As perdas de massa para as membranas obtidas a 60, 85 e 120°C são semelhantes. Já a estabilidade térmica da membrana a 120°C apresentou-se semelhante a do látex, porém um pouco inferior a aquela observada para a membrana produzida a 60°C. Tal fato, provavelmente, pode ser associado à própria

história térmica da membrana produzida a 120°C. A degradação de cadeias poliméricas termicamente mais estáveis, de 15%, ocorre em 434°C e o resíduo final após a completa degradação do polímero é de 1%. Esta diminuição gradual dos resíduos pode estar associada a ligações que podem ocorrer no tratamento térmico em estufa, visto que o tratamento em estufa é um processo isotérmico e nas medidas de TG o processo é dinâmico.

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos nas medidas de TG do látex, das fases, F1, F2 e F3, e das membranas produzidas a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

Tabela 4 – Valores obtidos por meio das curvas termogravimétricas, das fases, F1, F2 e F3 do látex centrifugado e liofilizado.

Amostra	ΔT (°C)	m (%)	dm (°C)	Resíduo
Látex	30-200	3	68 e 147	3%
	220-300	9	265	
	300-420	71	380	
	420-500	14	429 e 450	
F1	300-500	99	428	1%
F2	30-170	20	128	26%
	170-230	8	209	
	230-400	38	250, 281 e 308	
	400-600	8	430	
F3	30-200	8	136	26%
	200-300	10	261	
	300-550	58	391	
BN 60°C	30-300	7	272	2%
	300-430	77	393	
	430-500	14	445	
BN 85°C	30-290	7	247	2%
	280-430	76	369	
	410-490	15	426	
BN 120°C	30-280	7	254	1%
	290-410	77	378	
	410-480	15	434	

3.8 - TG acoplado com FT-IR

Medidas de FT-IR foram realizadas simultaneamente com a análise de TG. Todo gás emitido pela amostra com o aumento da temperatura no TG é canalizado para uma câmara que coleta espectros de FT-IR a cada segundo e os resultados são agrupados formando uma imagem em 3D com os eixos das ordenadas compostos por número de onda, temperatura e absorbância.

A Figura 19 apresenta a medida de TG/FT-IR acoplado da amostra do látex liofilizado. Observa-se que os picos de absorção ocorrem predominantemente em 2 faixas distintas de temperatura. A primeira região está associada aos componentes não borracha como visto nas curvas de TG. A partir de 250°C tem-se a degradação da borracha natural e de compostos fortemente ligados à borracha presente no látex. Nota-se que próximo a 3000 cm^{-1} e entre $1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ocorrem dois picos para esta mesma frequência característica, tal fato ocorre pela degradação das cadeias poliméricas do isopreno e pelos mesmos altamente reticulados, respectivamente.

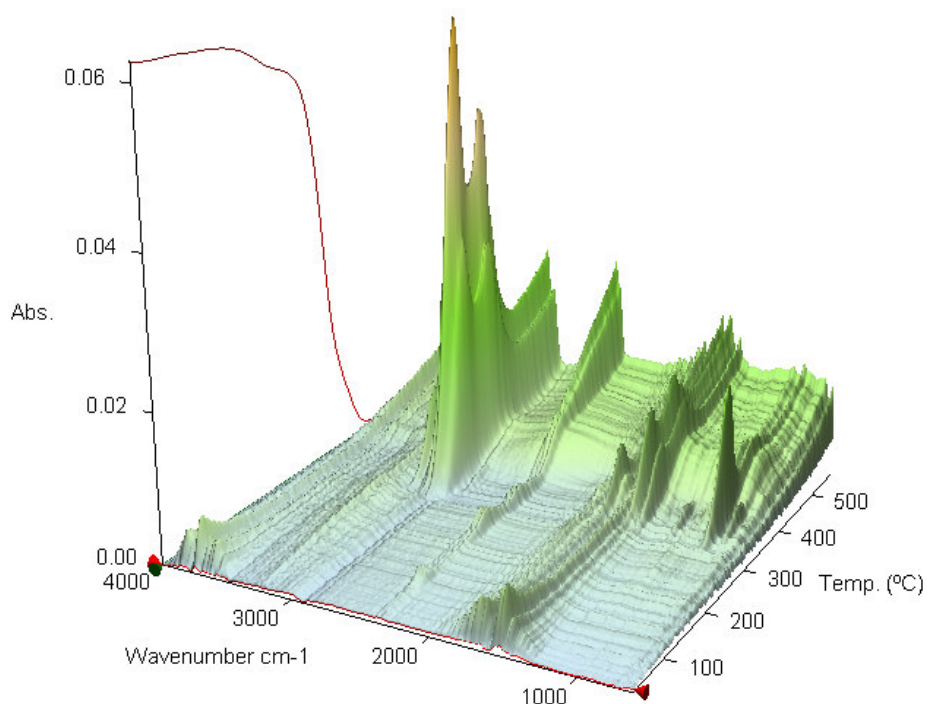


Figura 19 – Imagem 3D de TG/FT-IR acoplado do látex liofilizado.

A Figura 20 apresenta os espectros extraídos da imagem 3D do látex liofilizado da Figura 19. Nos espectros extraídos do látex liofilizado referentes às temperaturas de 68°C e 265°C notam-se duas regiões de destaque uma em 3900-3100 cm^{-1} e outra de 1800-1300 cm^{-1} referentes, predominantemente, à fração não borracha que compõe o látex. Vale destacar os picos em 1730 cm^{-1} característico de ligações C=O em aldeídos e em 1680 cm^{-1} atribuído ao estiramento C=O em amida primária. Em 1648 cm^{-1} nota-se absorções de estiramento simétrico de ânion carboxilato e em 1565 cm^{-1} ligações C=O de -COO^- de proteínas, sendo em 1527 cm^{-1} de amidas secundárias [100]. Estes picos apresentam diminuição da intensidade relativa conforme ocorre o aumento de temperatura e são responsáveis pela parte protéica que constitui o látex. Nos espectros referentes às temperaturas de 380 e 429°C nota-se que os picos são característicos da cadeia do isopreno.

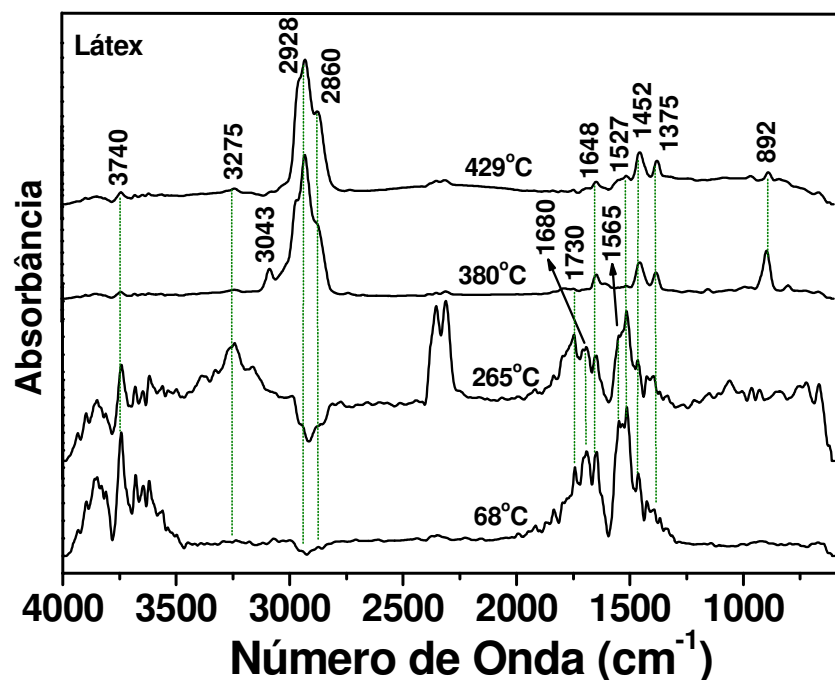


Figura 20 - Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR do látex liofilizado.

Tabela 5 - Atribuições das bandas características nos espectros de FT-IR extraídos da imagem 3D do látex liofilizado.

68°C	265°C	380°C	429°C	Região	Atribuição
3740	3740	3740	3740	3900-3500	O-H de vapor de água
	3275			3280-3300	Estiramento simétrico N-H formando ligação hidrogênio
		3043			Estiramento simétrico (=C-H)
		2928	2928		Estiramento antissimétrico C-H no CH ₂
		2860	2860		Estiramento simétrico C-H no -CH ₂ -
1730	1730			1725-1730	Estiramento simétrico C=O de aldeídos e cetonas
1680	1680			1680	Amida primária v C=O livre, em ambiente hidrofóbico
1648	1648	1648	1648	1545-1650	Estiramento simétrico C=O de ânion carboxilato, - COO ⁻ de ácido graxo ou também Amida primária v C=O em ligação H
1565	1565			1565-1585	Estiramento antissimétrico C=O de - COO ⁻ de proteínas
1527	1527	1527	1527	1530-1560	Amida secundária Estiramento (CN)+ deformação (NH)
1452	1452	1452	1452	1450	Deformação CH ₂ -
1375	1375	1375	1375	1375	Deformação CH ₃
		892		890	CH ₃ wagging

A Figura 21 apresenta a imagem 3D de TG/FT-IR da F1, resultado da centrifugação do látex. Esta fração é formada por partículas de borracha, porém, notam-se também picos de absorção característicos dos componentes não borracha, como vapor de água, componentes protéicos do látex e grupos funcionais.

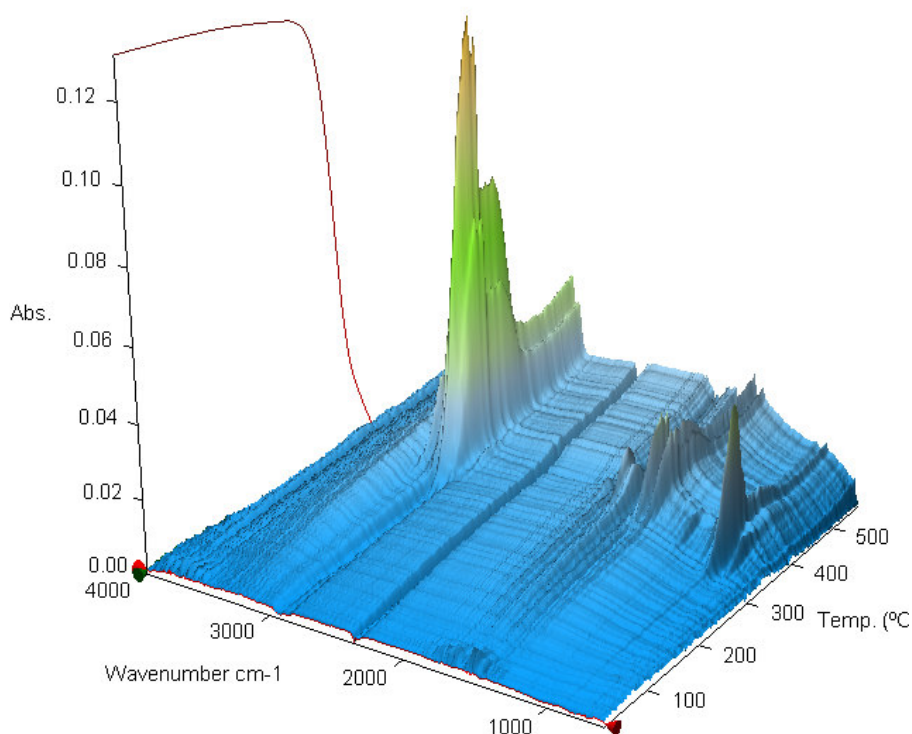


Figura 21 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F1 do látex centrifugado e liofilizado.

Nota-se que a degradação desta fração ocorre somente a partir de 300°C. Com exceção das absorções que ocorrem abaixo de 100°C, a imagem 3D desta borracha se assemelha com a membrana produzida a 120°C, ou seja, somente picos característicos do isopreno e de alguns grupos funcionais (1682 e 1570 cm^{-1}) fortemente ligados às partículas de borracha, como mostra a Figura 22 dos espectros extraídos da imagem 3D desta fração nas temperaturas de 378 e 428°C.

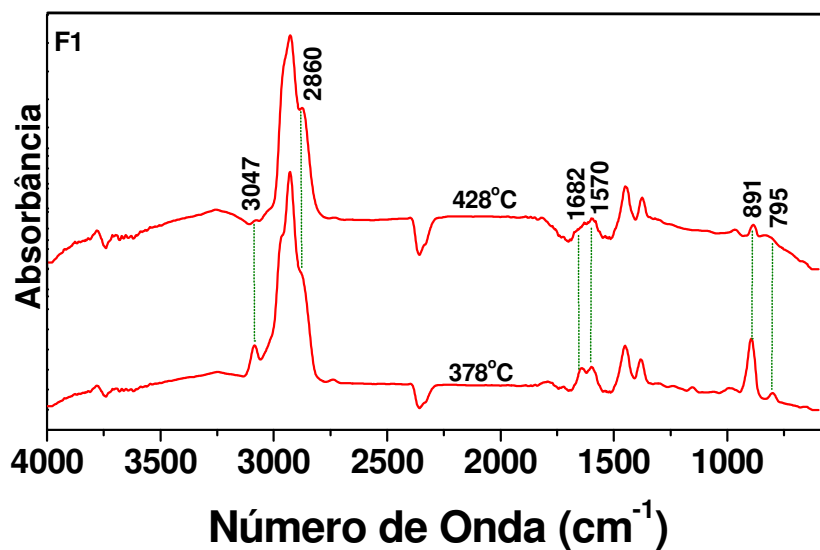


Figura 22 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F1 do látex centrifugado.

A Figura 23 apresenta a imagem 3D da F2, fração intermediária do processo de centrifugação. Esta fração apresentou resultados interessantes sobre os grupos funcionais constituintes do látex que não pertencem ao isopreno. Nota-se que não há picos significativos a temperaturas superiores a 300°C.

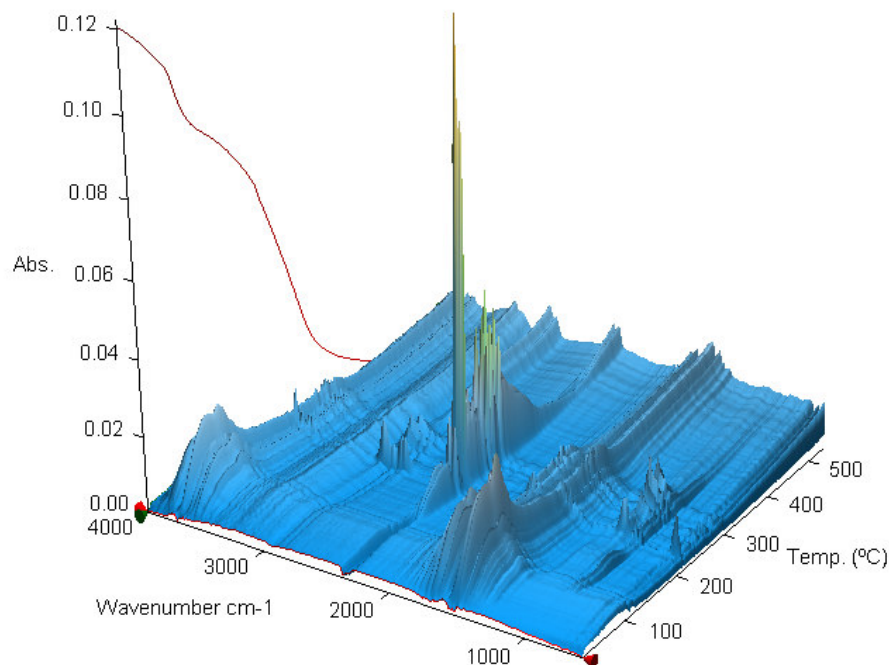


Figura 23 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F2 do látex centrifugado e liofilizado.

Na Figura 24 têm-se os espectros extraídos nas temperaturas de 128, 209, 250, 280, 308 e 430°C. O espectro em 430°C é o único que apresenta picos com absorção significativa referentes ao isopreno (2927 cm^{-1}) e grupos funcionais. Tal fato reforça a possibilidade desses grupos aumentarem a estabilidade térmica da borracha natural, explicando o fato de ocorrer à degradação de uma parte da borracha em temperaturas superiores a 400°C. A região de $3900\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ característicos de vapor de água mostra-se presente em todos os espectros. A região de $1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ apresenta vários picos referentes aos grupos funcionais constituintes da parte protéica que compõe o látex. Em 1732 cm^{-1} tem-se o estiramento simétrico de $\text{C}=\text{O}$ de aldeídos e cetonas apresentando menor absorbância no espectro em 430°C. O pico em 1680 cm^{-1} característico de amidas primárias teve maior absorbância no espectro em 128°C, já em 1645 cm^{-1} houve um aumento na intensidade relativa do pico conforme o aumento da temperatura. Os

picos em 1568 e 1530 cm^{-1} , característicos do estiramento assimétrico C=O de COO^- de proteínas e amidas secundárias, respectivamente, não apresentou variação na intensidade relativa nos espectros conforme o aumento da temperatura. Em 1455 cm^{-1} tem-se um pico, com maior absorção no espectro em 430°C, característico de deformação angular de $-\text{CH}_2-$. O pico em 1060 cm^{-1} de estiramento C-O de éter mostrou-se evidente em 209, 250, 430°C e com maior absorbância em 280 e 308°C.

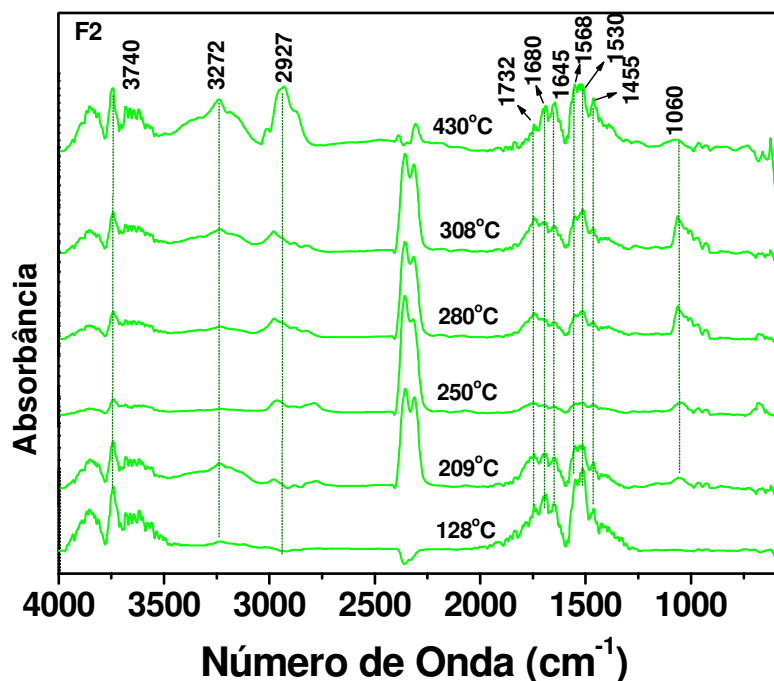


Figura 24 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F2 do látex centrifugado e liofilizado.

A Figura 25 apresenta a imagem 3D da F3 (fração de fundo). Nesta fração há presença tanto de grupos funcionais como de partículas de borracha, estando esta borracha fortemente ligada a esses grupos e a metais, o que faz com que haja precipitação destas partículas.

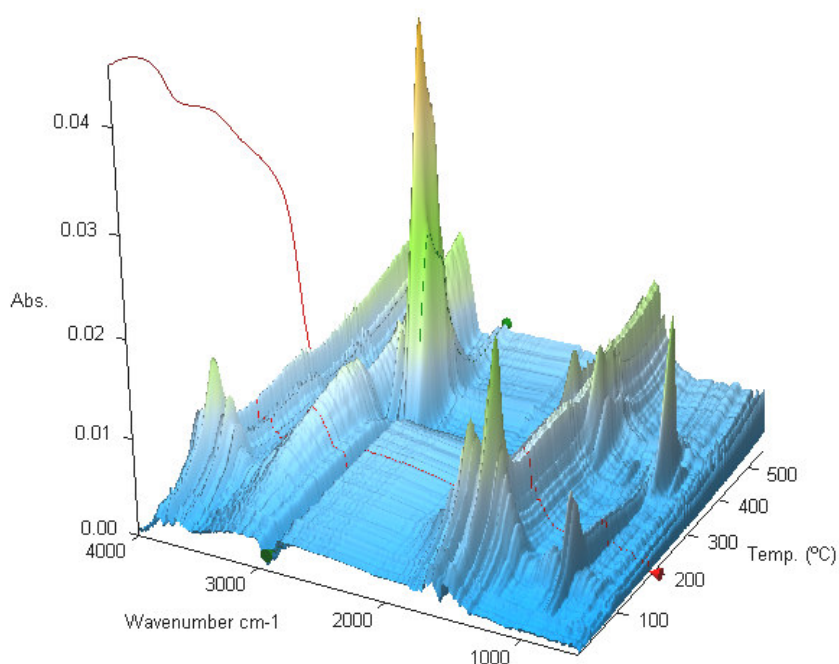


Figura 25 – Imagem 3D de TG/FT-IR da F3 do látex centrifugado e liofilizado.

A Figura 26 apresenta os espectros extraídos da imagem 3D da fração de fundo nas temperaturas de 136 e 391°C. O espectro na temperatura de 136°C apresenta vários picos de grupos funcionais podendo estar ligados às partículas de borracha ou a metais presentes no látex. O pico em 985 cm⁻¹ é característico do estiramento de $-C-CH_3$. Na temperatura de 391°C ocorre a degradação das partículas de borracha juntamente com os grupos funcionais ligados a estas partículas, pois os picos de maior absorção são do isopreno, que compõe a borracha natural.

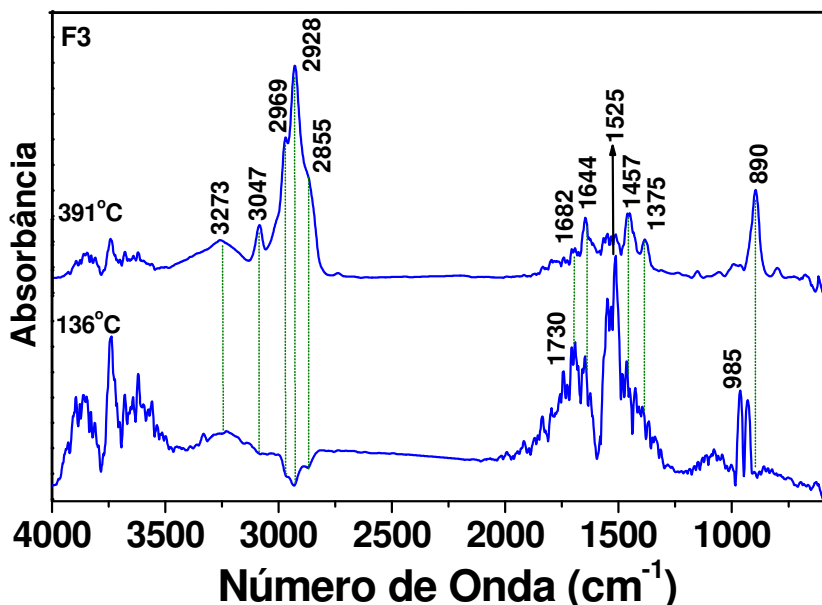


Figura 26 - Espectros extraídos da imagem de 3D de TG/FT-IR da F3 do látex centrifugado e liofilizado.

Em todas as amostras há presença de grupos funcionais responsáveis pela parte protéica do látex, ou seja, partes destes grupos ligam-se às partículas de borracha. Porém, a fração mais rica em proteínas está no soro. Este soro garante a estabilidade do látex de borracha natural, pois no processo de centrifugação a fração superior (borracha) e a fração de fundo são sólidas, resultado da coagulação do látex.

A Figura 27 apresenta a imagem 3D da membrana de borracha natural liofilizada obtida a 60°C. Esta amostra também apresenta uma região de degradação relacionada aos componentes não borracha, conforme já discutido para o látex liofilizado. Na região próxima a 3000 cm^{-1} para temperatura superior a 350°C notam-se não dois picos como no látex, mas um ombro referente a degradação mais lenta das cadeias poliméricas do isopreno. Tal fato pode estar ocorrendo pelo tratamento térmico em estufa, aumentando a reticulação das cadeias.

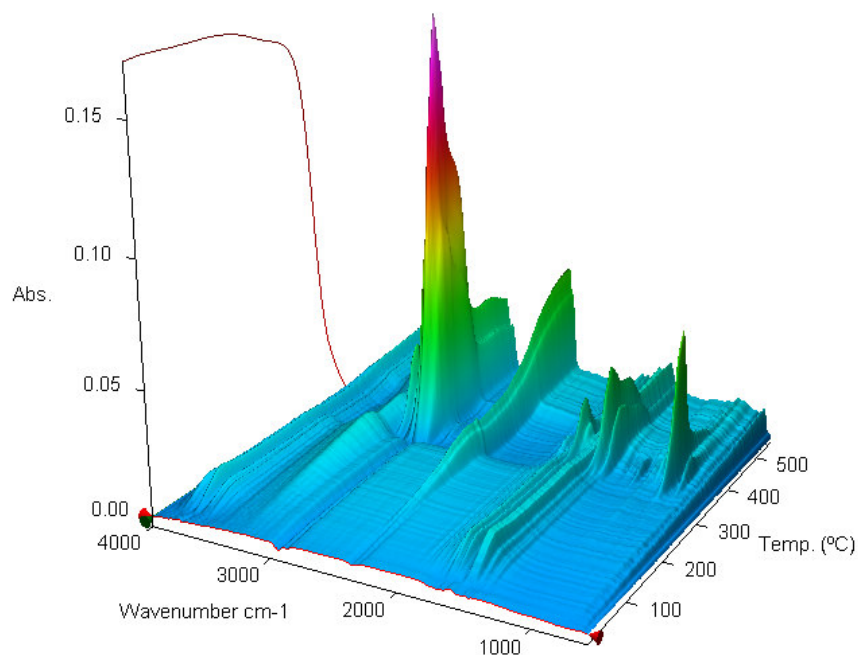


Figura 27 – Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 60°C liofilizada.

Na Figura 28 têm-se os espectros extraídos da imagem 3D da membrana de borracha natural produzida a 60°C liofilizada, na temperatura de 272°C nota-se picos característicos de constituintes não borracha como amidas primárias, secundárias e vapor de água. O pico em 3279 cm^{-1} de estiramento N-H formando ligação hidrogênio, apresenta uma pequena diferença entre o látex e a membrana de borracha natural produzida a 60°C, pois no látex ele é evidente somente na temperatura de 265°C, sendo na membrana de borracha natural produzida a 60°C evidente tanto em 272°C como em 455°C. As regiões onde foram extraídos os espectros mostram-se bastante semelhantes tanto para o látex como para a membrana de borracha natural produzida a 60°C, tanto pela degradação das cadeias do isopreno como para os grupos funcionais que compõe o látex de borracha natural.

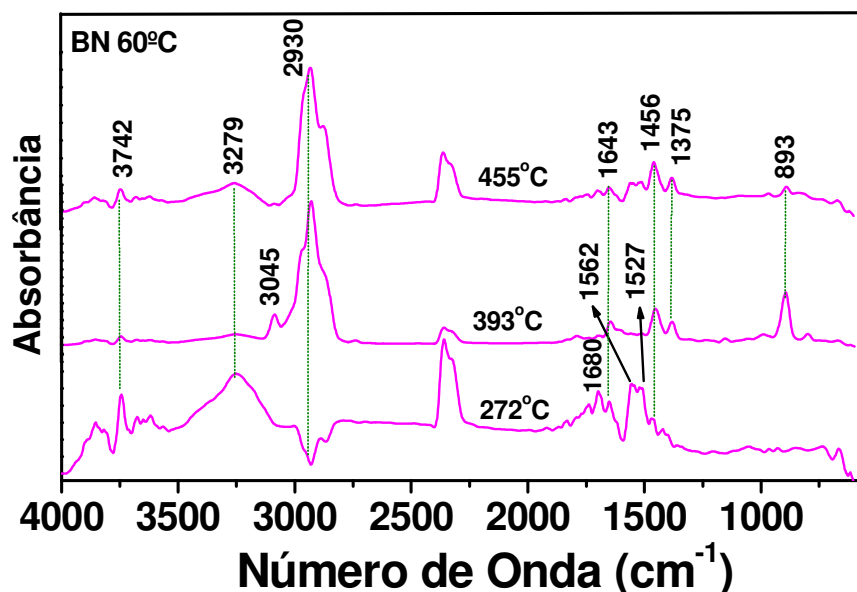


Figura 28 - Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR da membrana de borracha natural obtida a 60°C liofilizada.

A Figura 29 apresenta a imagem 3D da membrana de borracha natural liofilizada obtida a 85°C . Esta amostra apresentou um comportamento muito semelhante à membrana tratada a 60°C , onde apresenta uma região de degradação relacionada aos componentes não borracha, conforme já discutido anteriormente. Na região próxima a 3000 cm^{-1} para temperatura superior a 350°C notam-se não dois picos referente a degradação mais lenta das cadeias poliméricas do isopreno. Tal fato pode estar ocorrendo pelo tratamento térmico em estufa, aumentando a reticulação das cadeias.

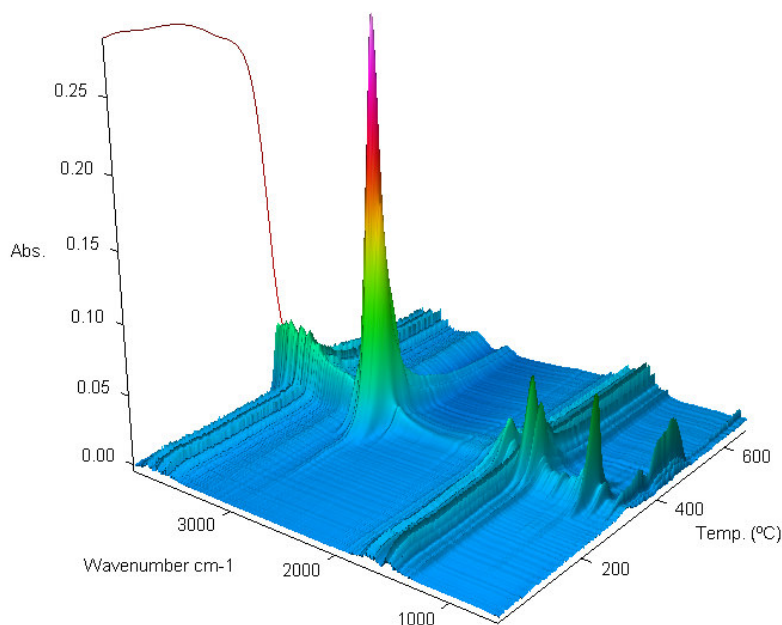


Figura 29 - Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 85°C liofilizada.

Na Figura 30 têm-se os espectros extraídos da imagem 3D da membrana de borracha natural produzida a 85°C liofilizada, na temperatura de 247 e 426°C nota-se picos característicos de constituintes não borracha como amidas primárias, secundárias e vapor de água. Em 369 °C tem a degradação de praticamente toda a parte isoprênica da amostra. Compostos não borracha ser encontrados a temperatura de 247 e 426°C deve-se ao fato de que no primeiro caso estes compostos estão em uma forma mais livre, apenas envolvendo as partículas de borracha e no segundo caso podem estar encapsulados juntamente com as partículas de borracha degradando somente a altas temperaturas. Todos os picos característicos já foram apresentados para as amostras de látex e para a membrana tratada termicamente a 60 °C.

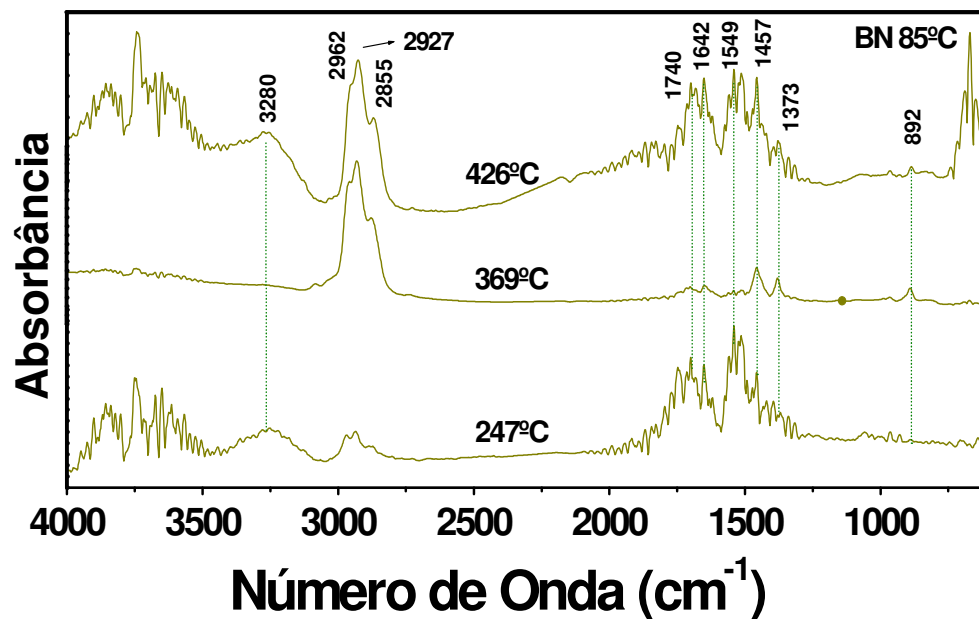


Figura 30 – Espectros extraídos da imagem de 3D do TG/FT-IR da membrana de borracha natural obtida a 85°C liofilizada.

Na Figura 31 apresenta-se a medida de TG/FT-IR da membrana de borracha natural produzida a 120°C liofilizada. Observa-se na imagem 3D que os picos de absorção ocorrem em uma faixa superior a 350°C, os quais são característicos do isopreno.

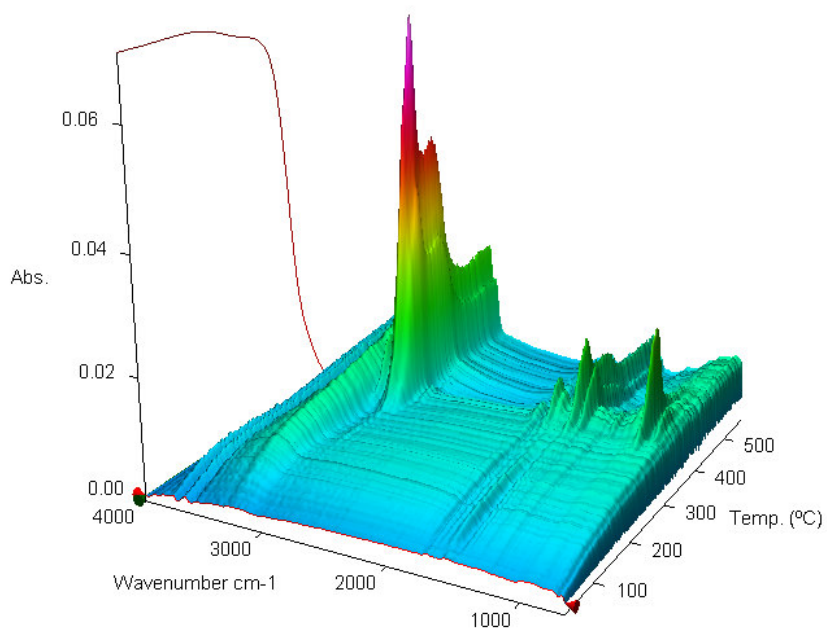


Figura 31 – *Imagem 3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 120°C liofilizada.*

A Figura 32 apresenta os espectros extraídos da imagem 3D da membrana de borracha natural obtida a 120°C. Com exceção dos picos em 3660, 3260 e 1643 cm^{-1} característicos de vapor de água, amidas secundárias e primárias, respectivamente, todos os outros picos são característicos do isopreno, principal constituinte do látex.

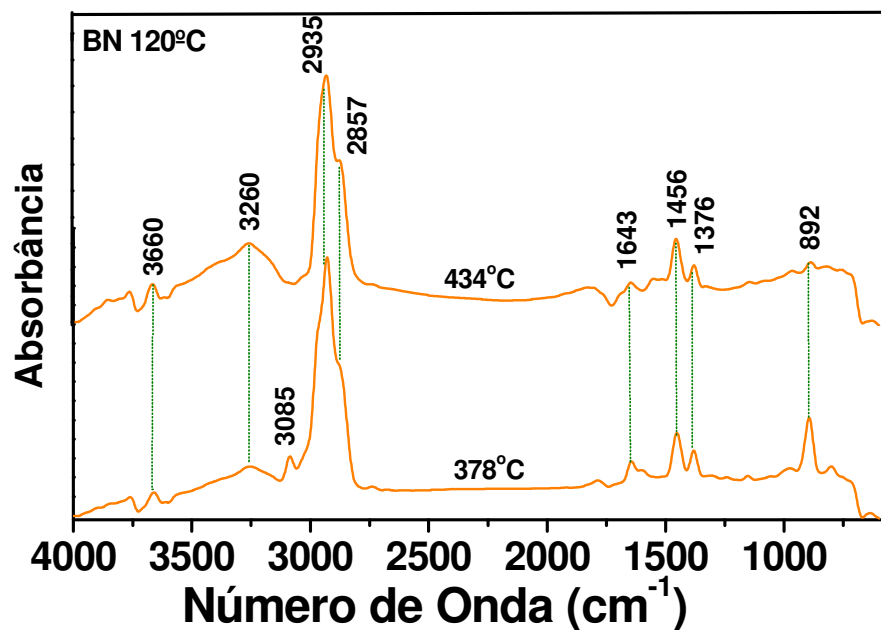


Figura 32 - Espectros extraídos da imagem3D de TG/FT-IR para a membrana de borracha natural obtida a 120°C liofilizada.

Através das imagens 3D e dos espectros extraídos das amostras foi possível notar diferenças significativas entre as amostras de látex e membranas de borracha natural obtidas a 60 e 120°C, sendo a presença de grupos funcionais os fatores que diferem da membrana produzida a 120°C para as demais amostras. Apesar de amidas primárias e secundárias terem sido notadas na membrana produzida a 120°C, sendo tal fato associado a forte ligação entre as partículas de borracha a estes grupos funcionais, não foram notados a presença dos mesmos em regiões de baixa temperatura na membrana de borracha natural produzida a 120°C, o que reforça a idéia de que podem estar estes grupos associados aos fatores que induzem a angiogênese. Para uma análise mais aprofundada desta região do espectro, de 1700-1500 cm^{-1} , foi utilizado um recurso do software que produz a imagem 3D resultado do acoplamento TG/FTIR, onde é possível plotar a uma curva de Absorbância *versus* Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), que para este trabalho é de fundamental

relevância pois permite monitorar determinado grupo funcional em relação a temperatura.

A Figura 33 apresenta as curvas em relação ao pico em 1643 cm^{-1} , referente a amida primaria, deformação C=O em ligação de hidrogênio com água, para a amostra F2 e as membranas tratadas a 60 e 120°C .

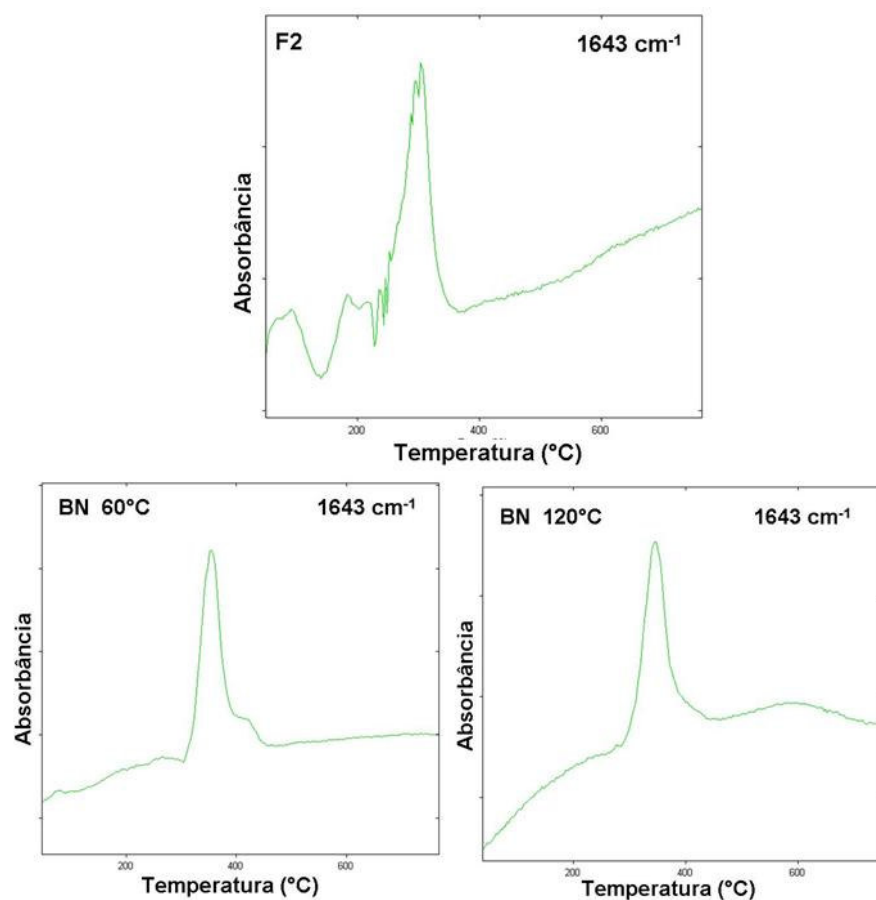


Figura 33 – Absorbância versus Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), em 1643 cm^{-1} para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C .

Nota-se que na fração F2 foi detectado este tipo de ligação até a temperatura de $\sim 150^{\circ}\text{C}$, o que também foi notado a temperatura abaixo de 100°C para a membrana tratada a 60°C , e posteriormente na faixa de 200 a 400°C para a amostra F2 e com maior estabilidade térmica, acima de 300°C , nas membranas tratadas a 60 e 120°C .

Na Figura 34 tem-se as curvas em relação ao pico em 1588 cm^{-1} da Absorbância *versus* a Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), também para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C .

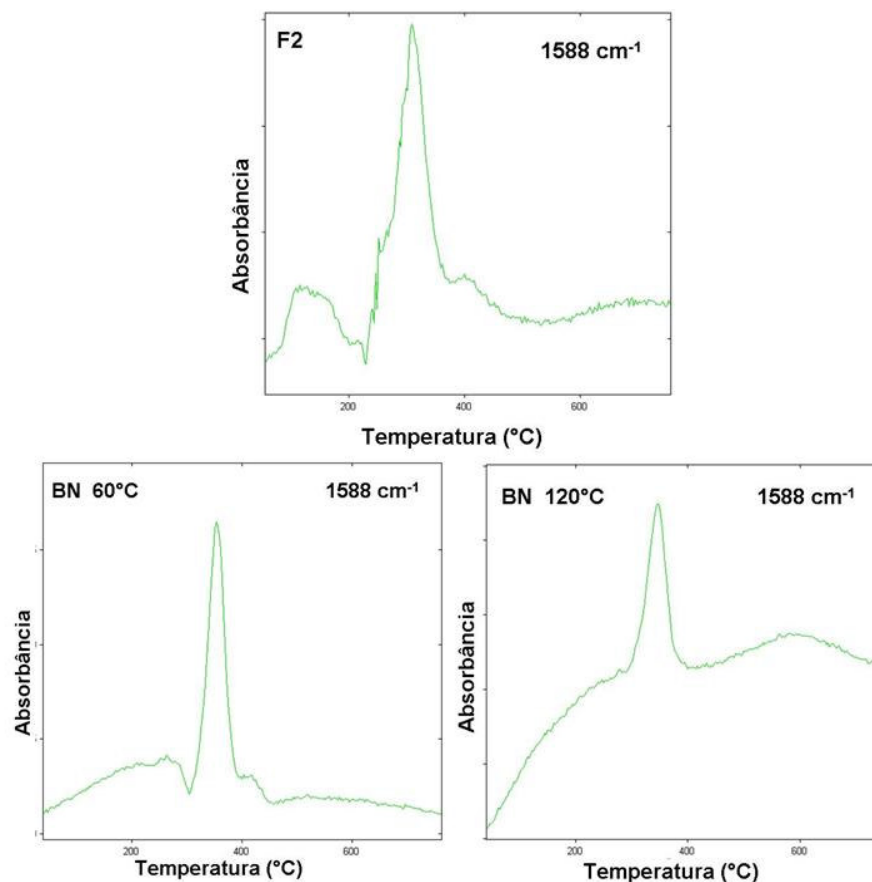


Figura 34 - Absorbância *versus* Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), em 1588 cm^{-1} para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C .

Nota-se que em 1588 cm^{-1} , referente a estiramento assimétrico $\text{C}=\text{O}$ de $-\text{COO}^-$ em proteínas, um comportamento muito semelhante com o ocorrido em 1643 cm^{-1} em relação a todas as amostras, por este motivo vale a mesma justificativa ocorrida para este número de onda específico.

Na Figura 35 tem-se a curva para o número de onda em 1544 cm^{-1} , referente a amida secundária, para a amostra F2 e as membranas tratadas a 60 e 120°C ; foram utilizadas somente estas amostras, para este tipo de análise, pois são

as que apresentaram maiores discrepâncias nas outras técnicas de caracterização e acreditamos que estas amostras contém o grupo funcional indutor de angiogênese.

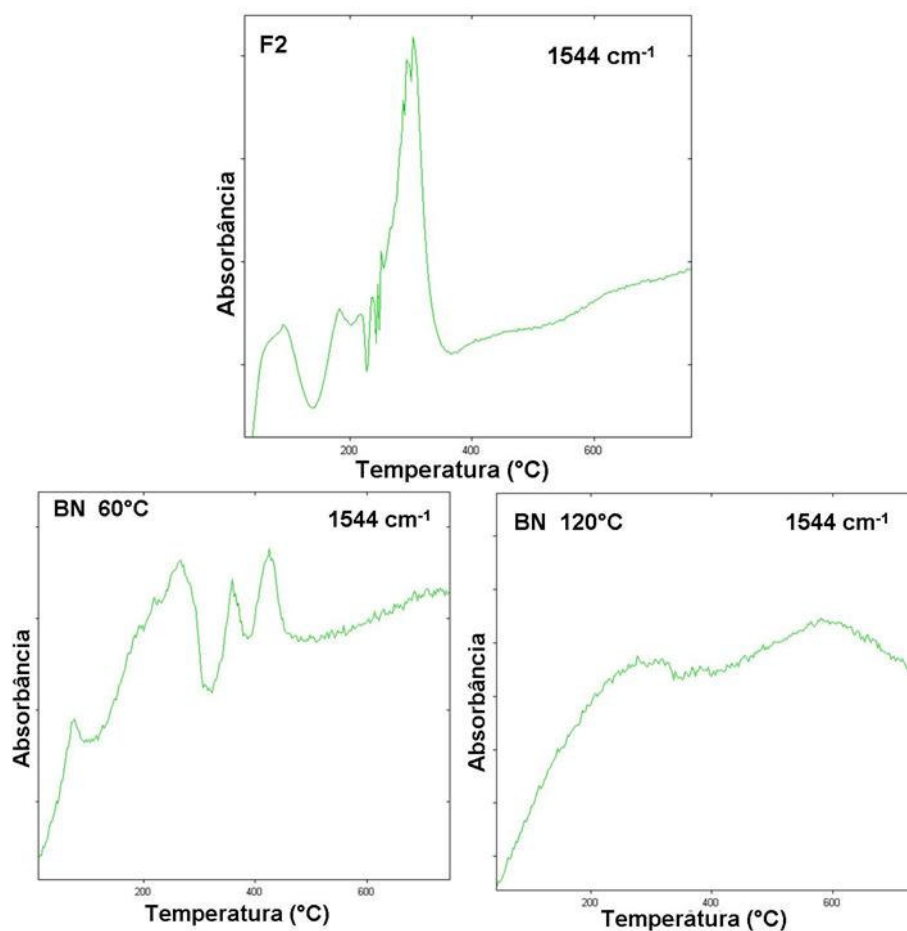


Figura 35 - Absorbância versus Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), em 1544 cm^{-1} para a amostra F2 e membranas tratadas a 60 e 120°C .

Em 1544 cm^{-1} a amostra F2 apresenta o mesmo comportamento quando comparado a 1643 e 1588 cm^{-1} , pois nesta fase do látex centrifugado há praticamente todos os compostos não borracha, como proteínas, aminoácidos, carboidratos e açúcares. A membrana tratada a 60°C apresentou a degradação deste composto em vários intervalos de temperatura, sendo que a principal região está abaixo de 150°C , o que pode reforçar a hipótese de serem compostos com esta

características os indutores de angiogênese. Já na amostra a 120°C não notou-se picos onde possa ser identificado a região de degradação deste composto.

3.9 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 36 apresenta a medida de DSC do látex *in natura*, das fases do látex centrifugado (F1, F2 e F3) e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

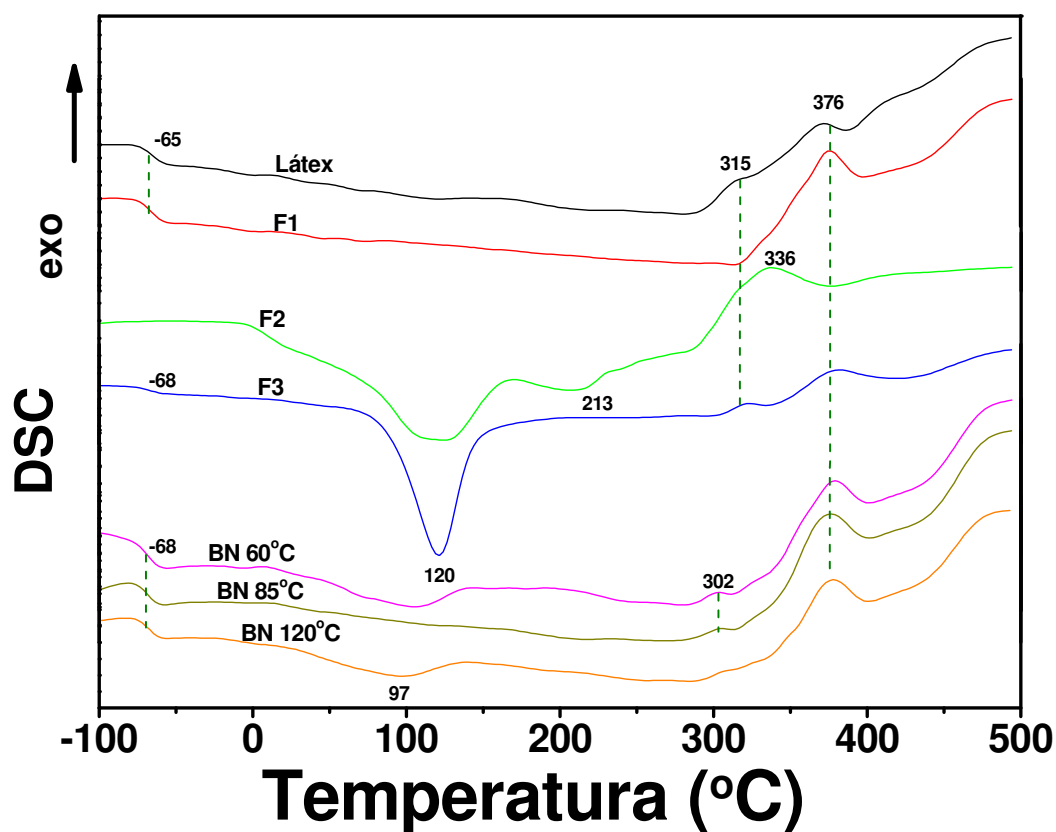


Figura 36 - Curva de DSC da amostra de látex, F1, F2, F3 e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, liofilizados.

A transição vítrea (T_g), propriedade do material onde podemos obter a temperatura da passagem do estado vítreo para um estado “maleável”, sem ocorrência de uma mudança estrutural, do látex e da F1 é de -65°C e para as

amostras F3, BN 60°C, BN 85°C e BN 120°C sendo de -68°C. Os valores da Tg observados estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura [101,102,103,104,105]. A amostra F2 não apresentou valor de Tg, fato que comprova a pequena quantidade de partículas de borracha presente nesta fase.

A amostra BN 60°C e BN 120°C apresentam um pico largo, endotérmico, em torno de 97°C, sendo que este pico se estende para temperaturas mais altas na amostra de BN 60°C. Este pico pode estar relacionado a evaporação de água em ambas as amostras e também de subprodutos presentes no látex.

Nas amostras F2 e F3, nota-se um pico endotérmico em torno de 120°C, responsável pela degradação dos constituintes não isopreno, como, proteínas, aminoácidos e ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), fato observado nas medidas de TG acoplado ao FT-IR, em torno de 128°C. Na F2 nota-se também um outro pico endotérmico em 213°C talvez pela degradação de constituintes inorgânicos presentes nesta fase intermediária.

Nas amostras de BN 60°C, BN 85°C e BN 120°C há um pico exotérmico em 302°C e na amostra de látex e na F3 em torno de 315°C, responsável por estágios iniciais de degradação, podendo ser reações de oxidação, reticulação e cisão de cadeias.

Em 376°C nota-se um pico exotérmico para as amostras de látex, F1, F3, BN 60°C, BN 85°C e BN 120°C, responsável pela degradação das cadeias poliméricas do isopreno.

3.10 - Análise Dinâmico Mecânico (DMA)

A Figura 37 apresenta as curvas de DMA para as membranas tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C. Nota-se que a membrana tratada a 85°C

possui o maior valor do módulo de armazenamento (E'), acima de 2,5 GPa, tal fato pode estar associado a maior homogeneidade da membrana, conforme visto nas micrografias (MEV).

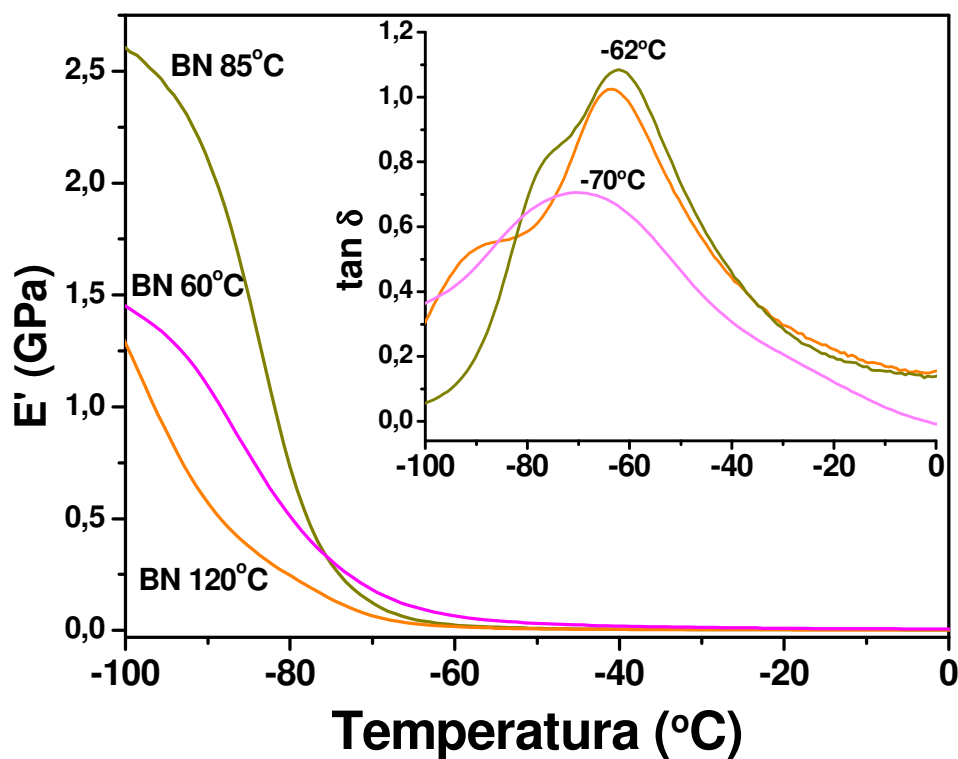


Figura 37 – Curva de DMA das membranas tratada a 60, 85 e 120°C.

A membrana tratada a 120°C possui o menor valor para o módulo de armazenamento, onde a diminuição da concentração de compostos não borracha pode estar colaborando para a redução no valor do E' . A membrana tratada a 60°C ficou em um valor intermediário entre as outras membranas, onde não há uma grande diminuição na concentração dos compostos não borracha, mas há a formação de partículas de borracha, conforme visto na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os picos apresentados na curva de $\tan \delta$ estão associados a transição vítrea (T_g) em -62°C para as membranas tratadas a 85 e 120°C , sendo de -70°C para a membrana tratada a 60°C .

O estudo de análise dinâmico mecânico poderá servir para trabalhos futuros, onde será possível comparar o comportamento mecânico destas membranas com tecidos ou parte de órgãos para ser utilizado como implante deste material.

3.11 - Método de Bradford

O método de Bradford foi utilizado para quantificar as proteínas totais presentes no soro. A Albumina de Soro Bovino (BSA) foi diluída nas concentrações apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – *Massa e volume de BSA para a curva de Calibração.*

Tubo	Massa BSA (μg)	Volume de Água (μL)	Volume BSA (μL)
1	5	95	5
2	10	90	10
3	20	80	20
4	40	60	40
5	50	50	50

As diluições foram feitas sempre em triplicata para verificar-se a reprodutibilidade dos resultados. O soro do látex também foi diluído nas concentrações (soro:água) de 1:10, 1:50 e 1:100 (v:v). As diluições da BSA foram analisadas em um espectrofotômetro a 595 nm para fazer-se uma curva de calibração. No momento da análise no espectrofotômetro foi adicionado o *Coomassie brilliant blue* (BG-250) na proporção de 1:4 (v:v) de BSA:BG-250 e soro:BG-250. A Figura 38 apresenta a curva de calibração.

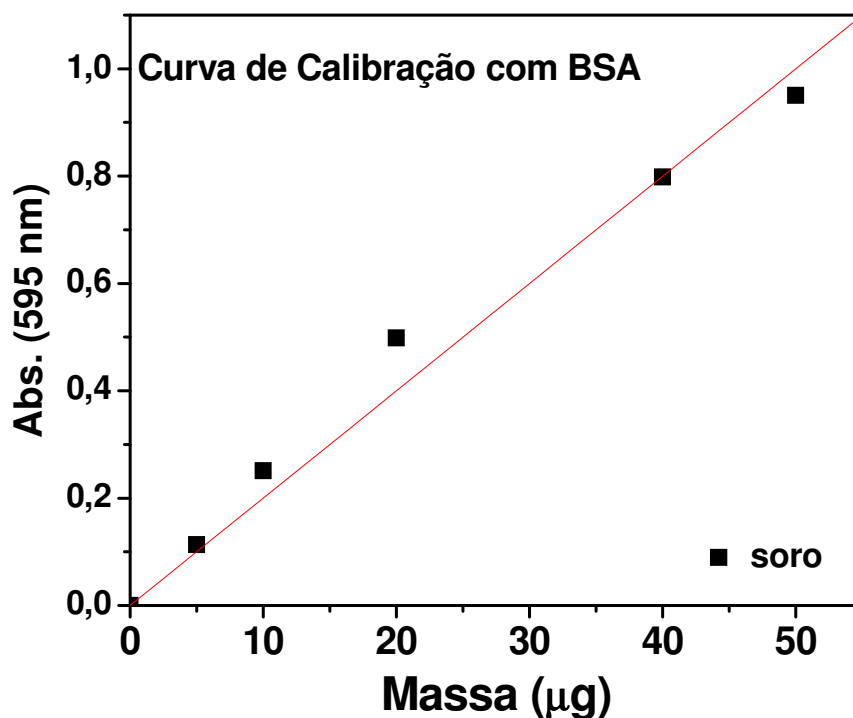


Figura 38 – Curva de Calibração com BSA.

Foi traçada uma reta entre os valores encontrados para a BSA em que a inclinação serve como parâmetro para o cálculo de proteínas totais presentes no látex. O valor encontrado para a inclinação da reta foi de 0,02; sendo a equação da reta dada por $y = Bx$, em que y é o valor encontrado para a absorção do soro no espectrofotômetro, B é o valor da inclinação da reta e x a quantidade em massa de proteínas totais presentes no soro. A Tabela 7 apresenta os valores da absorbância para cada diluição do soro.

Tabela 7 – Valores da absorbância para cada diluição do soro.

Tubo	Massa Soro (µg)	Volume de Água (µL)	Abs. (595 nm)
1	5	95	0,11
2	10	90	0,25
3	20	80	0,49
4	40	60	0,80
5	50	50	0,95

A proporção soro:água de 1:50 foi o que mais se aproximou dos valores de absorção da BSA, sendo de 0,80 a 595 nm. Substituindo este valor na equação foi encontrado o valor de 40 µg que, multiplicado por 50 (proporção de água no soro), resulta em 2000 µg para cada 0,1 mL de soro. Simplificando os valores tem-se que a quantidade de proteínas totais é de 20 mg/mL, o que corresponde a 0,2% do volume total do soro.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentou-se um estudo bibliográfico relacionado com conceitos que englobam o tema do projeto, tais como: biomateriais, angiogênese, composição do látex, polímeros e borracha natural. O enfoque principal deste estudo foi à caracterização do látex para uso em cirurgias. Os resultados apresentam fortes indícios de que a parte protéica é indutora de angiogênese.

Nas medidas de FT-IR no modo ATR foi possível identificar os componentes presentes no látex, nas fases do látex centrifugado e nas amostras de borracha natural, tanto pertencentes ao isopreno, principal constituinte do látex, como para os grupos funcionais. Notou-se que na região entre 1700 e 1000 cm^{-1} apresentou as maiores diferenças entre as amostras, portanto esta região será de grande interesse para nosso estudo. A amostra F2 foi que apresentou as maiores discrepâncias com a amostra BN 120°C, o que evidencia que a parte protéica e que está agindo como indutor de angiogênese.

Os espectros de RMN de ^{13}C DP/MAS das amostras F1, F3 e das membranas de borracha natural tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C. Os resultados mostraram a estrutura do isopreno em estado sólido, com duas regiões distintas, sendo uma entre 140 e 120 ppm e outra entre 35 e 20 ppm. Os espectros obtidos, em todas as amostras, mostraram cinco sinais característicos, sendo dois carbonos etilênicos, dois grupos metilênicos e o grupo metil da estrutura cis-1,4-poli-isopreno.

Pela análise de RMN de ^{13}C CP/MAS, foi detectado um sinal na região das carboxilas da cadeia lateral e sinais relacionados a grupos C=C. Foram

detectados sinais, com maior relevância nas amostras F2 e F3, referentes a grupos C-O; CH-O, CH₂-, sinais estes derivados de grupos típicos de açúcares como, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Ainda foram detectados sinais correspondentes a região de CH₂, CH, CH₃ de cadeias carbônicas alifáticas.

Os espectros de RMN ¹H, também apresentou duas regiões bem distintas. Os deslocamentos químicos estão associado a prótons de C=C e a segunda região apresenta deslocamentos associado a prótons do grupo metílico (-CH₃).

Nas medidas de difração de raios x observou-se que a fração de fundo (F3) possui picos de difração característicos de materiais com certa estrutura cristalina, sendo tais picos associados a cátions metálicos que compõe esta fração, como Ca, Zn, Rb, Mn, Fe, Ni, Cu e Br.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), na membrana tratada termicamente a 60°C, a presença partículas de borracha, que coagularam mais rapidamente, durante a evaporação de subprodutos do látex, permitindo assim maior presença de fosfolipídios e proteínas não ligados com partículas de borracha. Na amostra tratada termicamente a 85°C notou-se uma grande homogeneidade e na amostra a 120°C houve um processo de evaporação muito rápido de água, levando juntamente subprodutos do látex, formando regiões bem características. A evaporação destes subprodutos pode diminuir a concentração de substâncias de grande importância no processo de indução de angiogênese, impossibilitando o uso desta membrana como biomaterial.

A morfologia das membranas, tratadas termicamente a 60, 85 e 120°C, estudadas por microscopia de força atômica (AFM) onde houve uma grande diferença entre a morfologia das membranas. A membrana tratada a 60°C apresentou maior quantidade poros, tal fato podendo estar associado a evaporação

lenta dos componentes não borracha, onde estudos realizados na USP de Ribeirão Preto mostram que a quantidade de poros ou a indução de poros melhora a vascularização, melhorando assim o processo de indução da angiogênese.

Nas medidas de termogravimetria (TG) notou-se além da degradação das cadeias poliméricas a temperaturas acima de 300°C, também perdas associadas à liberação de subprodutos de baixa estabilidade térmica dos componentes não borracha presentes no látex, como, proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucléicos.

Através das imagens 3D e dos espectros extraídos das amostras foi possível notar diferenças significativas entre as amostras de látex, das frações do látex centrifugado e membranas de borracha natural obtidas a 60 e 120°C, sendo a presença de grupos funcionais os fatores que diferem da membrana produzida a 120°C para as demais amostras. Apesar de amidas primárias e secundárias terem sido notadas na membrana produzida a 120°C, sendo tal fato associado a forte ligação entre as partículas de borracha a estes grupos funcionais, não foram notados a presença dos mesmos em regiões de baixa temperatura na membrana de borracha natural produzida a 120°C, o que reforça a idéia de que podem estar estes grupos associados aos fatores que induzem a angiogênese.

Na curvas extraídas das imagens 3D, Absorbância *versus* Temperatura (°C), notou-se as discrepâncias, para os grupos funcionais em 1544, 1588 e 1643 cm^{-1} , entre a fração F2 e a membranas tratadas termicamente a 60 e 120°C, tais grupos podem estar colaborando na indução de angiogênese e de neoformação, devido a seu comportamento em relação a temperatura de tratamento das membranas de borracha natural.

Nas medidas de DSC foi possível notar um pico endotérmico em torno de 120°C para as amostras F2 e F3 responsável pela degradação dos constituintes não isopreno, como, proteínas, aminoácidos e ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), fato também observado nas medidas de TG acoplado ao FT-IR, em torno de 128°C. Em todas as amostras, com exceção da F2, notou-se a Tg com valores que correspondem aos encontrados na literatura.

Em todas as amostras houve a presença de grupos funcionais responsáveis pela parte protéica do látex, ou seja, partes destes grupos ligam-se as partículas de borracha, mas a fração mais rica em proteínas está no soro (F2). Este soro garante a estabilidade do látex de borracha natural, pois no processo de centrifugação a fração superior (F1) e a fração de fundo (F3) são sólidos, resultado da coagulação do látex. Através do método de Bradford calculou-se que a quantidade de proteínas totais no soro foi de 20 mg/mL que corresponde a 0,2% do volume total.

As frações F2 e F3 são as que apresentam maior quantidade de compostos não isopreno, referentes a proteínas, aminoácidos e grupos funcionais que podem induzir a angiogênese. A fração F2 é a mais recomendada para o uso como fármaco, pois a fração F3 apesar de conter compostos semelhantes pode apresentar contaminantes provenientes da coleta do látex. A membrana tratada a 65°C apresenta-se como a mais eficiente no processo de indução de angiogênese e por possuir uma morfologia que favorece o processo de cicatrização devido a quantidade de poros colaborando na vascularização.

Os trabalhos foram apresentados no ano de 2008 em eventos nacionais e internacionais, como:

- (1) IIV Workshop Multidisciplinar de Materiais Poliméricos (IMMP), na cidade de Atibaia-SP, de 16 a 20 de março, intitulado de “*Caracterização por FT-IR modo ATR, TG/FT-IR e DSC do látex e das fases do látex centrifugado, liofilizados.*”.
- (2) VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), na cidade do Guarujá-SP, de 28 a 02 de outubro de 2008 intitulado de “*Characterization by coupling TG/FTIR of the natural rubber membrane*”.
- (3) Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC), que neste ano foi realizado juntamente o *14th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC)* com o *Congresso Brasileiro de Análise térmica e Calorimetria (VI CBRATEC)* na cidade de São Pedro-SP, de 14 a 18 de setembro de 2008, apresentando dois trabalhos intitulados de “*Thermal Characterization of the Phases of the Centrifuged Latex by TG/FT-IR Coupled and DSC*” e “*Thermoplastic Natural Rubber/Leather/Starch Blends*”. Participou, como colaborador, em dois trabalhos sendo: “*Thermal and Spectroscopic Properties of a POLY(AZO)URETHANE Synthesized by CO₂ Fixation*” e “*Thermal Study of Products Formed from the CO₂ Capture with Cyclic Amines*”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] Portal da vulcanização, <http://www.vulcanizar.com.br>, consultado em 20/12/07
- [2] IAPAR – INSTITUTO AGRÔNOMICO DO PARANÁ, <http://www.iapar.br>, consultado em 13/12/07.
- [3] BIKALES, N. M.; MARK, H. F.; GAYLORD, N. G. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York: American Chemical Society, 1973.
- [4] 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.
- [5] ^a PIERRE R., JEAN-LUC, C. Vulcanizable rubber composition for the manufacture of a tire, and a tire, the tread of which comprises such a composition. MICHELIN RECH. TECH. 2003. US6667362. ^b GRIFFITH, W.B., BUNN, A.G., UHL, I.E., HO K.S. Adhesive tape, comprises polymer film, primer coat on the polymer film, and adhesive layer on the primer coat ROHM & HAAS CO. 2002 EP1223206-A2. ^c AKINORI, O., DAISUKE, N. Rubber composition. BRIDGESTONE CORP. 2003. US6667356. ^d MEYER, J., SCHOLZ, M., KERNER, D. A method for improving the thermal stability of polymers, e.g. silicone rubber, silicone oil and natural or synthetic rubber, involves adding hydrophobic, pyrogenic, iron oxide-containing titanium oxide before or during processing. DEGUSSA. 2002, DE10059003-A1. ^e GENNARO, C.F., VICTOR, T.G.M. Rubber stock for bead wire components. GOODYEAR TIRE & RUBBER CO. 2003.US6662840.
- [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] MENDONÇA, R.J. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2004.
- [8] 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.
- [9] NAKAYAMA, Y.; MATSUDA T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: Preparation of microporous polymer surfaces by an excimer laser ablation technique. Journal of Biomedical Materials Research, 29, 1295-1301, 1995.
- [10] NAKAYAMA, Y.; MATSUDA T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: *In vitro* transmural endothelialization on microporous segmented polyurethane films fabricated using an excimer laser. Journal of Biomedical Materials Research, 31, 235-242, 1996.

-
- [11] 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.
- [12] NEVES Jr., W. F. P., FERREIRA, M., ALVES, M. C. O., Graeff, C. F. O., Mulato Influence of Fabrication Process on the Final Properties of Natural-Rubber Latex Tubes for Vascular Prosthesis, *Brazilian Journal of Physics*, vol. 36, 2006.
- [13] ARIYOSHI, H. *et al.* Expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) vascular graft loses its thrombogenicity six months after implantation. *Thrombosis Research*, 88, 427-433, 1997.
- [14] AOMATSU, Y. *et al.* Efficacy of agarose/polystyrene sulfonic acid microencapsulation for islet xenotransplantation, *Transplant Proc.*, 32, 1071-1072, 2000.
- [15] ABALOVICH, A. *et al.* Pancreatic islets microencapsulation with polylactide-co-glycolide, *Transplant. Proc.* 33: 1977-1979, 2001.
- [16] 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.
- [17] GUPTA, B. S.; KASYANOV, V. A. Biomechanics of human common carotid artery and design of novel hybrid textile compliant vascular grafts – *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 341-349, 1997.
- [18] FRADE, M. A. C. *et al.* Chronic phlepopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int. J. Dermatol.* 2001; 40(3): 238-240.
- [19] MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomenbrana de látex natural com polilisina. [tese] – Ribeirão Preto (SP): Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, 2000.
- [20] OLIVEIRA, J. A. A. *et al.* *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. Vol. 69, nº5. São Paulo. Set/Out.2003.
- [21] THOMAZINI, J. A. *et al.* J. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasilienses* for medical utilization. *Acta Microscopica*, v.6, suppl. B, p.798-799, 1997.
- [22] MRUE, F. *et al.* Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane, *Materials Research*, Vol 41. 7, Nº. 2, 277-283, 2004.
- [23] SADER, S. L. *et al.* Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana do látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovas.*, 15, 338-344, 2000.
- [24] GELLER, M.; GELLER, P. Considerações sobre a alergia ao látex. *JBM*, v.73, p.33-6, 1997.
- [25] 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.
- [26] ERENO, D. Curativo de Borracha. *Pesquisa FAPESP*, n.88, p.66-69, Jun, 2003.
- [27] FIORAVANTI, C. Marcas Esmaecidas, *Revista FAPESP*, Seção Tecnologia, 157, 76-79, 03/2009.

-
- [28] 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.
- [29] CARRAHER Jr., C. E.; *Polymer chemistry: an introduction*, 4th ed., p.348, 1996.
- [30] MANO, E. B.; MENDES, L. C.; *Introdução a polímeros*, Ed. Edgar Blücher, 2 ed., Cap 1, 1999.
- [31] LUNARDI, G.; BRETAS, R. E. S., Polímeros Intrinsecamente Condutores Elétricos. *Revista não identificada*. Vol. 10, nº 3, p. 34-40, 1987.
- [32] FUKADA, E., TAKAMATSU, T.I., YASUDA, “Callus formation by electret”, *J. Appl. Phys.*, 14 (1975) 2079.
- [33] 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 (1993) 48.
- [34] ALLINGER, N. L.; CAVA, M.P.; JONH, C. R.; LEBEL, N.A.; *Química Orgânica*. 2^a Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1976.
- [35] Honorato S. B. Efeito Antioxidante de Componentes do Látex da Seringueira e Mangabeira Sobre a Degradação termo-oxidativa do Poli(1,4-*cis*-isopreno) Sintético. *Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Química Inorgânica) Universidade Federal do Ceará - UFC – Fortaleza*, 2005.
- [36] Leela E., P. Muhamed A.; Assessment of biodeterioration of rubber wood exposed to field conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 31–36, 2006.
- [37] Adiwilaga, K.; Kush, A. Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Plant. Mol. Biol.*, **30**, 935 1996.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] International Rubber Study Group - *Natural Rubber Statistical Bulletin*, 58, p.9, 2004.
- [41] 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, nº 3, p. 235-238, 2006
- [42] Instituto Agrônomo de Campinas. <http://www.iac.br>. Consultado em 15/01/2001.
- [43] 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.

-
- [44] Wititsuwannakul R. *et al*, A rubber particle protein specific for Hevea latex lectin binding involved in latex coagulation. *Phytochemistry*, 69, 1111–1118, 2008.
- [45] BRASIL, Ministério da Indústria e do Comércio. Superintendência da Borracha. Curso básico em tecnologia de elastômeros, v. 1-6, 1993.
- [46] SEMEGEN, S. T. & FAH, C. S., Natural Rubber. In: BABBIT, R. O. The Vanderbilt Rubber Handbook, Vanderbilt Co. Iric. Publi., p. 18-41, 1978.
- [47] GALIANI, P. D., MALMONGE, J. A., SANTOS, D. P., MALMONGE, L. F., Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaios Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 17, nº 2, p. 93-97, 2007
- [48] Tanaka, Y., Kawahara, S., Tangpakdee, J., *Journal of Kautsch Gummi Kunst.*, **50**, 6 1997.
- [49] BAUKKWILL, W. J., eds. Rubber. London, Longman, cap. 1, p. 1-56, 1989.
- [50] HASMA, H., Lipids Associated with Rubber Particles and Their Possible Role in Mechanical stability of latex Concentrates. *Journal of Natural Rubber Research*. V.62, p. 105-114, 1991.
- [51] UZABAKILIHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987
- [52] Nascimento A. M. R.; Estudo do látex e fruto da sorva pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Tese (Doutor em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros), Universidade Federal do Rio de Janeiro - IMA/UFRJ - Rio de Janeiro – RJ, 2006.
- [53] WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J. Rubber. Longman, New York, first edition, 1989.
- [54] BLACKLEY, D.C. Polymers Latices; Chapman & Hall: Glasgow, 1997. vol. 2.
- [55] CYR, D.R. Natural Rubber. In: Encyclopedia of Chemical Technology. Kirk-Othmer, 1991, 20, 468-491.
- [56] WISNIEWSKI, A. Látex e Borracha. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. SDI, Belém, 1983.
- [57] COCKBAIN, E.G.; PHILPOTT, M.W. Colloidal Properties of Latex. In: The Chemistry and Physics of Rubber-like Substances. Maclaren, London, 1963, 73-95.
- [58] SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. Natural Rubber. Biology, Cultivation and Thechnology. Elsevier Science, Netherlands, 1992.
- [59] D’AUZAC, J.; JACOB, J-L; CHRESTIN, H. Physiology of Rubber Tree Latex. CRC Press, Florida, 1989.
- [60] SCHOON, G.F., VAN DE BIE, G.J. Particle size distribution in brominated *Hevea* lattices. *J. Polymer Sci.*, 1955, 16, 63-88.
- [61] Williams DF. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

-
- [62] 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) 130.
- [63] PARK, J.B. “Biomaterials: an introduction”, New York: Plenum Press, 1980.
- [64] TUREG, S.L. “Ortopedia, princípios e aplicações”, Flórida, Manole, 1991.
- [65] GREVE, H-H. Natural Rubber. In: Ulmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH Publishers, 1993, 23A, 225-237.
- [66] 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.
- [67] BLACKLEY, D.C. Polymers Latices; Chapman & Hall: Glasgow, 1997. vol. 2.
- [68] COCKBAIN, E.G.; PHILPOTT, M.W. Colloidal Properties of Latex. In: The Chemistry and Physics of Rubber-like Substances. Maclaren, London, 1963, 73-95.
- [69] PRISTA L. M. Tecnologia farmacêutica. 4º Ed. Lisboa; Fundação Calouste GULBENKIAN. 1995.
- [70] OLIVEIRA, S. D. Estudo da Otimização do Ciclo de Liofilização da Vacina contra Febre Amarela, Mestrado Profissional (Dissertação em Tecnologia de Imunobiológicos), Instituto Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, 2005.
- [71] HARRIS, D. C.. Quantitative Chemical Analysis, Quinta Edição, W. H. Freedman and Company, New York, USA, 1999.
- [72] CANEVAROLO Jr., S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. ArtLiber, p. 31, São Paulo, Brasil, 2003.
- [73] EWING, G.W. Métodos Experimentais de Análise Química, Edgard Blücher, São Paulo, Brasil, 1972.
- [74] GRASSELLI, J.G.; BULKIN, B.J. Analytical Raman Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York, USA, 1991.
- [75] Omega Filters Inc.. Raman Spectroscopy, Technical Bulletins, USA, 1998.
- [76] SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, Editora Unesp, São Paulo, Brasil, 1995.
- [77] SILVA, A. L. B. B. Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido. (Edição do Autor). São Carlos, 2005.
- [78] BITTENCOURT, P. R. S. “Nylon 6 e 6,6 em Blendas com a Fração da Lignina Kraft Solúvel em Ácido Fórmico: Caracterização e Efeito de Radiação UV”, Tese (Doutorado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Maringá - UEM – Maringá, 2008.
- [79] HERMANN, P.S.P.; DA SILVA, M.A.P.; BERNARDES FO, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 1997, 4, 27.

-
- [80] WEST, Y.D., HENDRA, P.J. and HEALY, A.M. A Fourier-transform raman study of the strain-induced crystallization and cold crystallization of natural rubber. *Polymer* 1996, 37, 4009-4024.
- [81] CORNELL, S.W. and KOENING, J.L. Ramam spectra of polyisoprene rubbers. *Macromolecules* 1969, 2, 546
- [82] SAUNDERS, R.A. and SMITH, D.C. Infra-red spectra and structure of hevea and gutta elastomers. *J. App. Phys.* 1949, 20, 953-965.
- [83] HSU, S.L. and LU, F.J. A vibration spectroscopic analysis of the structure of natural rubber. *Rubber Chem. Technol.* 1987, 60, 647-658.
- [84] EBDIN, J.R. and Nor, H.M. Ozonolysis of natural rubber in chloroform solution part 1. A study by GPC and FTIR spectroscopy. *Polymer* 2000, 41, 2359-2365.
- [85] ELLIOT, A. Infra-red spectra and structure of organic long-chain polymers. London. Edward Arnold Publishers, 1966, 107-108.
- [86] PACKHAM, D.E., EDGE, S., COOK, J. W. and THOMPSON, A. S. The thermal behaviour of natural rubber and chlorinated rubber blends. *J. Applied Polym. Sci.* 65, 1348-1379, 1997.
- [87] ISAKSON, K. Infrared Spectroscopy. Its Use in the Coating Industry. Federation of Societies for Paint Technology, Philadelphia, 1969.
- [88] SERVAGENT-NOINVILLE, S., REVAULT, M., QUIQUAMPOIX, H., BARON, M.-H. Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis. *J. Colloid Interf. Sci.* 2000, 221, 273-283.
- [89] VERNOOIJ, E.A.A.M., KETTENES-VAN DEN BOSCH, J.J., CROMMELIN, D.J.A. Fourier transform infrared spectroscopic determination of de hydrolysis of poly(ethylene glycol)- phosphatidylethanolamine-containing liposomes. *Langmuir*, 2002, 18, 3466-3470.
- [90] PUSKAS J.E., DAHMAN Y., MARGARITIS A. Novel Thymine-functionalized Polystyrenes for applications in biotechnology. 2. Adsorption of model proteins. *Biomacromolecules*, 2004, 5, 1412-1421.
- [91] GEVC, G. Phospholipids Handbook. New York, Marcel Deker, 1993, 372-373.
- [92] Nallasamy, P.; Mohan, S. Vibrational Spectra of CIS-1,4-POLYISOPRENE. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, Volume 29-1^a. 2004.
- [93] TANAKA, Y. *et al.* Initiation of Biosynthesis in CIS Poly-isoprenes, *Phytochemistry*, Vol. 39, No. 4, pp. 779-784, 1995.
- [94] KANG, H. *et al.* Characterization of natural rubber biosynthesis in *Ficus benghalensis*, *Plant. Physiol. Biochem.* 38, 979-987, 2000.
- [95] CHEONG, I. W. *et al.*, Synthesis and cross-linking of polyisoprene latexes *Polymer* 45, 769-781, 2004.
- [96] MARTINS, M. A. *et al.* Evaluation of natural rubber from IAC series clones by solid state ¹³C NMR. *Anais do 8º Congresso Brasileiro de Polímeros*. 2005.
- [97] OLIVEIRA, P.C. "Modificação Química da Borracha Natrual pela técnica de polimerização em emulsão por semente: propriedades coloidais, estrutura

-
- química e comportamento”, Tese (Doutorado em Materiais e Processos de Fabricação) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP – Campinas, 2003.
- [98] 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.
- [99] OLIVEIRA, L.C.S. et al. Evaluation of thermal behavior of latex membranes from genetically improved rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Thermochimica Acta* 445, 27–31, 2006.
- [100] RIPPEL, M.M.; LEE, L.; LEITE, GALEMBECK, F. Skim and Cream Rubber Particles: Colloidal Properties, Coalescence and Film Formation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 268, 330-40, 2003.
- [101] LOADMAN, M.J.R. The glass transition temperature of natural rubber. *J. Thermal Anal.* 1985, 30, 929-941.
- [102] KOW, C., MORTON, M., FETTERS, L.J., HADJICHRISTIDIS, N. Glass transition behavior of polysoprene – influence of molecular weight, terminal hydroxyl groups, microstructure and chain branching. *Rubb. Chem. Technol.* 1982, 55, 245-252.
- [103] BURFIELD, D.R., LIM, K.L. Differential scanning calorimetry analysis of natural rubber and related polysoprenes – measurement of glass transition temperature. *Macromolecules* 1983, 16, 1170-1175.
- [104] SCHNEIDER, M., PITH, T., LAMBLA, M. Toughening of polystyrene by natural rubber-based composite particles. 1. Impact reinforcement by PMMA and PS grafted core-shell particles. *J. Mater. Sci.* 1997, 32, 6331-6342.
- [105] KHEW, M.C., HO, C.C. Low glass transition temperature (T_g) rubber film formation studied by atomic force microscopy. *Langmuir*, 16, 2436-2449, 2000.