

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG
INSTITUTO DE FÍSICA - IF

LAIS NOGUEIRA MAGNO

**LÁTEX DE MANGABEIRA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS E
TECNOLÓGICAS**

Goiânia – GO

2013

LAIS NOGUEIRA MAGNO

**LÁTEX DE MANGABEIRA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS E
TECNOLÓGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Física da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Física.

Goiânia – GO

2013

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
A.	Biomateriais.....	1
B.	Látex.....	2
C.	Mangabeira.....	5
D.	Ensaio biológico para avaliação da potencialidade de novos biomateriais.....	6
E.	Aplicações tecnológicas para o látex de mangabeira.....	6
2.	Objetivos.....	8
2.1.	Objetivo Gerais.....	8
2.2.	Objetivos específicos.....	8
3.	Materiais.....	9
3.1.	Látex de mangabeira.....	9
3.1.1.	Coleta do látex.....	9
3.1.2.	Preparação das biomembranas de látex de mangabeira.....	10
3.1.3.	Esterilização das biomembranas.....	10
3.2.	Biomembranas de látex de mangabeira como matrizes para materiais luminescentes.....	11
3.2.1.	O complexo inorgânico luminescente $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	11
3.2.1.1.	Preparação das biomembranas como matrizes para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	12
3.2.2.	Moléculas orgânicas luminescentes.....	13
3.2.2.1.	Preparação das biomembranas como matrizes para porfirinas.....	14
4.	Técnicas Empregadas.....	15
4.1.	Técnicas espectroscópicas.....	15
4.1.1.	Espectroscopia no Infravermelho	17
4.1.2.	Espectroscopia no Ultravioleta e Visível.....	18
4.1.2.1.	Espectroscopia por reflectância difusa.....	19
4.1.3.	Espectroscopia de fotoluminescência.....	20
4.2.	Análise Estrutural.....	20
4.2.1.	Análise Elementar.....	20
4.2.2.	Análise Termogravimétrica.....	21

4.3.	Técnica de Microscopia.....	21
4.3.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	21
4.4.	Testes biológicos.....	22
4.4.1.	Análise da citotoxicidade.....	22
4.4.1.1.	Crescimento da Cultura Celular.....	23
4.4.1.2.	Biomembranas de látex de mangabeira e culturas de células.....	23
4.4.2.	Análise da Genotoxicidade: Teste Cometa.....	24
4.4.2.1.	Procedimentos para realização do teste cometa.....	25
5.	Resultados e Discussões.....	26
5.1.	Preparação e caracterização das biomembranas de látex de mangabeira.....	26
5.1.1.	Preparação das biomembranas de látex de mangabeira.....	26
5.1.2.	Caracterização estrutural.....	28
5.1.2.1.	Análise Elementar.....	29
5.1.2.2.	Análise termogravimétrica.....	30
5.1.2.3.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	32
5.1.3.	Microscopia eletrônica de varredura.....	35
5.2.	Biomembrana de látex de mangabeira: matriz hospedeira para materiais luminescentes.....	38
5.2.1.	Avaliação luminescente das biomembranas de mangabeira.....	38
5.2.2.	Caracterização das biomembranas de mangabeira como matrizes para o complexo Eu(TTA) ₃	41
5.2.3.	Biomembranas de mangabeira como matrizes para moléculas orgânicas fluorescentes.....	50
5.3.	Biomembranas de látex de mangabeira para aplicações biomédicas.....	62
5.3.1.	Análise da citotoxicidade através do método de viabilidade celular.....	62
5.3.2.	Teste Cometa: Avaliação de danos no DNA.....	64
5.4.1.	Membranas de látex de mangabeira e culturas de células.....	50
6.	Conclusões.....	66
7.	Referências.....	67

i. Lista de Figuras

Figura 1.01- Fórmulas Estruturais do isopreno e cis/trans- 1,4 – poli-isopreno.....	2
Figura 3.01 - Estrutura química da porfirina TPPS (a) e estrutura química da porfirina TMPP (b).....	14
Figura 4.01 - Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após absorção de energia por uma molécula.....	16
Figura 5.01 - (a) látex estabilizado com amônia em placa de petri e, (b) biomembrana polimerizada.....	27
Figura 5.02 – Gráfico da espessura das biomembranas em função do volume utilizado.....	28
Figura 5.03 - Perda de massa em função do tempo, de amostras de látex de mangabeira com amônia (preta); mangabeira com água (verde); seringueira com amônia (azul) e seringueira com água (vermelha). A região ampliada mostra os comportamentos semelhantes entre as biomembranas preparadas com água e com amônia.....	30
Figura 5.04 - Curvas TG/DTG das biomembranas de látex de mangabeira (a) sem amônia, (b) com amônia e látex de seringueira (c) sem amônia e (d) com amônia. As curvas DTG, identificadas pelas curvas com sinal geométrico, mostram exatamente o pico onde há a fase de perda de massa.....	31
Figura 5.05 - Biomembranas de (a) seringueira, (b) mangabeira estabilizada com água (c) mangabeira estabilizada com amônia e (d) mangabeira irradiada.....	33
Figura 5.06 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira com ampliações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	35
Figura 5.07 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com ampliações de (a) x 370 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	37
Figura 5.08- Espectro de transmitância das biomembranas de látex de mangabeira na região do UV/Vis.....	38
Figura 5.09 – Espectros de emissão da biomembrana de látex de mangabeira excitada desde 290 a 630 nm, em intervalos de 5 nm.....	39
Figura 5.10 - Principais bandas observadas no espectro de emissão das biomembranas de látex de mangabeira.....	40

Figura 5.11 - Espectros de excitação das principais bandas observadas para as biomembranas de látex de mangabeira.....,,,	40
Figura 5.12 - Espectro de reflectância do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó obtido por meio da técnica de reflectância difusa.....	42
Figura 5.13 - Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	43
Figura 5.14 - Mecanismo de emissão de fluorescência do íon Eu^{3+}	43
Figura 5.15 - Principais bandas observadas no espectro de emissão das biomembranas de látex de mangabeira utilizadas como matrizes para incorporação de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	44
Figura 5.16 - Espectros de excitação das principais bandas observadas para as biomembranas de látex de mangabeira utilizadas como matrizes para incorporação de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	45
Figura 5.17 – Complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó (a), Biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$	46
Figura 5.18 - Biomembrana preparada com $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó, na ausência de solvente. Magnificação de x 35.....	47
Figura 5.19 – Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ com magnificações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	48
Figura 5.20 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com magnificações de (a) x 400 (b) x 5,000 e (c) x 10,000.....	49
Figura 5.21 – Espectro de absorção das porfirinas diluídas em água. A banda de intensa absorção, em torno de 400 nm é conhecida como banda de Soret, ou banda <i>B</i> . As outras bandas características das moléculas, entre 500 e 650 nm, são chamadas de bandas <i>Q</i>	50
Figura 5.22 - Espectro de emissão fluorescente das porfirinas TMPP (linha pontilhada) e TPPS (linha contínua) diluídas em água.....	51
Figura 5.23 – Espectro de transmissão das porfirinas incorporadas às biomembranas. A banda com transmissão reduzida indica intensa absorção, em torno de 400 nm.....	52
Figura 5.24 - Espectros de emissão da biomembrana utilizada como matriz para a porfirina TPPS.....	53
Figura 5.25 - Espectros de excitação das biomembranas utilizadas como matrizes para a	

porfirina TPPS.....	53
Figura 5.26 – Porfirina TPPS (a), biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para a TPPS (c).....	54
Figura 5.27 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TPPS, com ampliações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	55
Figura 5.28 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TPPS após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com ampliações de (a) x 700 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	56
Figura 5.29 – Espectros de emissão da biomembrana utilizada como matriz para a porfirina TMPP.....	57
Figura 5.30 - Espectros de excitação das biomembranas utilizadas como matrizes para a porfirina TMPP.....	58
Figura 5.31 – Porfirina TMPP (a), Biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para a TMPP (c).....	59
Figura 3.32 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para porfirina TMPP com ampliações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	60
Figura 3.33 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TMPP após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com ampliações de (a) x 1.500 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.....	61
Figura 5.34 - Resultados obtidos a partir do teste de viabilidade celular. As barras representam a média \pm desvio padrão das culturas celulares expostas ao meio de cultivo (controle negativo), à fenol (controle positivo) e às biomembranas com água (LW) e com amônia (LA), em 3 diferentes tempos. * indica a significância dos resultados.....	63
Figura 5.35 - Efeitos da biomembrana de mangabeira com água (LW) e com amônia (LA) na estabilidade do DNA no (a) tamanho e na (b) intensidade da cauda de células de fibroblastos. As barras representam a media de 50 células \pm o desvio padrão.....	64

ii. Lista de Tabelas

Tabela I	Regiões do Espectro Infravermelho.....	18
Tabela II	Volumes e massas de látex in natura empregados e massas das espessuras das biomembranas.....	27
Tabela III	Resultado da análise elementar de amostras de látex de seringueira e mangabeira.....	29
Tabela IV	Resultados das análises térmicas das biomembranas de látex de seringueira e mangabeira.....	32

Ao meu pai.

Agradeço

a Deus, pelo simples fato de estar viva!

Ao meu orientador, prof. Dr. Pablo José Gonçalves, pela confiança, por toda ajuda, pela paciência imensurável e pela gama de conhecimento que me proporcionou.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À prof. Dra. Luciane M. de Almeida, por toda ajuda e contribuições dadas ao meu trabalho. Você foi essencial desde o início!

Ao prof. Dr. Lauro J. Maia, por toda ajuda e colaboração.

À Dra. Juliana Floriano pela amizade e colaboração neste trabalho.

Ao prof. Carlos F. O. Graeff pelo apoio científico na execução do projeto.

Aos professores Andris F. Bakusis, Antônio Alonso e Jesiel Carvalho pela disponibilidade de infraestrutura nos laboratórios do IF.

À técnica do LabMic Tatiane O. dos Santos, por toda ajuda durante os procedimentos de MEV realizados.

À minha mãe, por ter se dedicado tanto a mim e me proporcionado chegar onde cheguei.

Ao meu pai, por todo apoio e por ter sempre demonstrado quão orgulhoso é de mim.

À minha “companheira de cela”, Rosane Castro, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Goianos Rugby feminino, por me proporcionar momentos maravilhosos. Goianas, obrigada por estarem comigo!

Aos amigos e colegas do Instituto de Física da UFG.

Ao estimado Marco Aurélio F. Borges, por ter diagnosticado a NMO em tempo hábil e possibilitado minha recuperação total.

1. Introdução

A. Biomateriais

Nas últimas décadas os biomateriais têm recebido bastante atenção da comunidade científica no que se refere à sua utilização tanto em saúde quanto em tecnologia. Eles vêm apresentando enorme sucesso em diversas aplicações, tais como o tratamento de feridas e doenças e, reparo ou substituição de órgãos e tecidos. Alguns exemplos mais específicos consistem em sua utilização como próteses ortopédicas [1], placas ósseas [2], cimento ósseo [3], ligamentos e tendões artificiais [4], implantes dentários [5, 6], dispositivos de reparação da pele [7, 8], próteses de vasos sanguíneos [9] e tantos outros.

Os biomateriais são considerados quaisquer materiais ou substâncias, diferentes de um fármaco, concebidos para serem empregados em um tecido, órgão ou ainda, para desempenhar alguma função no organismo [10]. De uma forma geral, são utilizados em qualquer procedimento ou propósito médico e/ou biomédico. Para ser um biomaterial, é necessário apresentar certas características físicas e químicas, tais como: ser biocompatível, apresentar estabilidade mecânica, massa e densidade compatíveis e ainda, não ser tóxico ou carcinogênico [11].

Os biomateriais podem ser naturais ou sintéticos. Os biomateriais naturais geralmente são representados por biopolímeros, tais como colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e outros. Os sintéticos, por sua vez, podem ser metais, cerâmicas, polímeros sintéticos e materiais compósitos [5, 12]. Através de sua síntese controlada, os biomateriais podem ser projetados para desempenhar funções específicas como substituir órgãos ou tecidos [9, 13-15], liberar fármacos, nanopartículas e íons [16-19] ou ainda estimular reações biológicas [20, 21].

Pesquisas com produtos naturais têm crescido consideravelmente nos últimos anos, com interesses de diversas áreas do conhecimento. Extratos de um cacto conhecido como pera espinhosa, estão sendo utilizados para fornecer água potável à população de países vítimas de desastres naturais. A mucilagem deste vegetal reduz a níveis aceitáveis a quantidade de metais perigosos na água [22]. Outro produto natural que tem recebido grande atenção é a celulose, particularmente a bacteriana, cujas aplicações tem-se mostrado promissoras em reparação de pele, liberação de fármacos, dentre outros [23-25]. Neste contexto, cabe destacar o uso do látex de *Hevea*

brasiliensis, conhecida como seringueira. Os produtos derivados deste látex têm apresentado importantes propriedades biomédicas e tecnológicas que lhe conferiram uma posição de destaque [7,11, 18, 19, 21].

B. Látex

O látex assemelha-se a um leite que é exsudato por algumas plantas lactíferas, geralmente em resposta a algum ferimento em seu caule. Possui importante função protetora que proporciona uma rápida cicatrização de feridas no tronco da planta [26, 27]. O látex é uma dispersão estável contendo micelas poliméricas em um meio aquoso constituído por micelas de borracha, proteínas, lutóides, partículas *Frey-Wyssling* [11], sendo o *cis* e/ou *trans* poli-isopreno o seu componente majoritário (Figura 1.01).

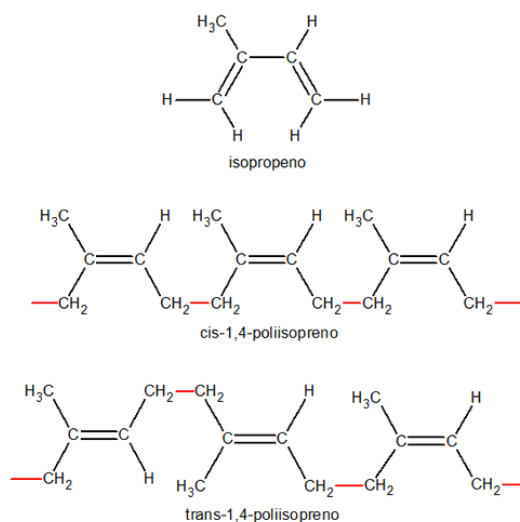


Figura 1.01- Fórmulas Estruturais do isopreno e *cis/trans*- 1,4 – poli-isopreno [28].

O látex proveniente da seringueira tem sido explorado comercialmente desde a década de 1840 quando foi descoberta a técnica de vulcanização, que proporcionou a impulsão da indústria pneumática [29]. Atualmente, os produtos provindos do látex de seringueira se fazem presentes no cotidiano da população mundial de forma bastante expressiva, como em pneus, luvas, botas, preservativos, dentre tantos outros.

Além das aplicações habituais do látex oriundo da *H. brasiliensis*, é importante destacar seu uso em pesquisas relacionadas à substituição e regeneração de tecidos. Pesquisas com este tipo de látex têm se mostrado promissoras, pois o mesmo apresenta

uma interessante propriedade angiogênica [7, 30, 31]. A angiogênese é um processo biológico que favorece a formação de novos vasos sanguíneos a partir de tecidos vasculares pré-existentes com a proliferação, migração, regulação e diferenciação de células vasculares [27]. Do ponto de vista da aplicação médica, as propriedades angiogênicas permitem materiais bioativos com revestimentos para melhorar a proliferação celular e são importantes para o desenvolvimento de curativos para feridas de difícil cicatrização [32, 33].

Estas propriedades e seus potenciais angiogênicos e de neoformação, foram descobertos por Mrué e colaboradores (1996), quando uma espécie de molde para aplicação em oncologia foi desenvolvida. Neste trabalho, verificou-se que ao substituir parte do esôfago canino por uma prótese de látex, havia regeneração completa da parte lesada do órgão, proporcionada pela indução da cicatrização da parede esofágica, estimulação do aumento do número de vasos e pela reepitelização [7, 34].

A partir de tal pesquisa, uma biomembrana de látex foi criada e passou a ser empregada em outras aplicações biomédicas, onde se observou a regeneração de tecidos ósseos [35], o aumento da vascularização no tímpano [36], e tratamento de úlceras cutâneas de difícil cicatrização (comuns em pessoas com diabetes) [8]. Além disso, também foi empregada como molde em neovaginoplastia, timpanoplastia, substituição do alvéolo dental e outros [37, 38, 6].

Com o sucesso das aplicações desta biomembrana foi criado um produto na forma de bandagem, uma espécie de *band-aid* natural, batizado e patenteado com o nome de Biocure® [39]. Esse foi um passo importante que culminou na criação da empresa *Pele Nova*, a qual explora e utiliza as propriedades e produtos originados do látex. Atualmente, o Biocure® teve sua fabricação descontinuada e deu lugar a um creme sintetizado a partir do soro do látex, o Regederm®. Esse creme possui atividade angiogênica aceleradora do processo cicatricial, sendo indicado para o tratamento e cicatrização de úlceras cutâneas de diversas etiologias [39].

Além destas aplicações, outras potencialidades dessas biomembranas têm sido exploradas. Em particular, pesquisas recentes mostraram que a borracha de látex natural, derivada da seringueira, pode ser usada com sucesso em técnicas de liberação controlada de proteínas [21], fármacos [18] e nanopartículas [17]. Neste caso, a biomembrana atua como uma matriz hospedeira, na qual, substâncias podem ser adicionadas ao látex ainda *in natura*, e então liberadas de forma controlada. A

temperatura a que são tratadas as membranas é o fator essencial para promover a liberação das substâncias por mais ou menos tempo [17-19, 21]. Este sistema é bastante simples, envolvendo apenas o látex e a substância que se deseja liberar, permitindo que seja um processo economicamente viável e de fácil reprodutibilidade.

Contudo, apesar dos significativos resultados apresentados pelas biomembranas de seringueira, especialmente em aplicações biomédicas, existem relatos sobre alergia a produtos derivados deste látex [40-43]. Geralmente, a alergia ao látex de seringueira pode manifestar-se como eczema, urticária, simples rinite ou conjuntivite, angioedema, asma e até choque anafilático [40, 43-45]. A alergia ocorre quando há uma sensibilização, pelo contato inicial com o látex, por conta de antígenos presentes neste [44, 45]. Atualmente, sabe-se que as causadoras da alergia são algumas proteínas encontradas no látex [46].

Diante das potencialidades dos produtos oriundos do látex de seringueira e das limitações impostas pelos problemas alergênicos, a busca por materiais naturais que possuem propriedades similares às do látex de seringueira torna-se um desafio de interesse científico. A procura por estes materiais levou à busca por látex de outras plantas que apresentem uma menor carga de proteínas e que então poderiam apresentar um menor potencial alergênico [46, 47].

Embora o látex seja produzido por aproximadamente 35.000 espécies vegetais, menos de 1% dessas espécies foram devidamente investigadas visando explorar seu potencial farmacológico [48]. Dentro de tantas possibilidades, um bom indicativo dos potenciais dos compostos naturais para a descoberta de novas substâncias terapêuticas é se guiar pelo seu frequente uso na medicina popular [26, 27]. A qual torna-se uma grande aliada do meio científico, indicando os potenciais candidatos a serem investigados. Ela traz a tona o conhecimento que há anos, ou mesmo gerações, vem sendo empregado popularmente para a cura de algumas enfermidades. Nesse sentido, frequentemente se encontram relatos populares sobre o uso de gotas de látex de mangabeira, diluídas em água para o tratamento de gastrites, diabetes e traumas com respostas inflamatórias [49-52].

Entretanto, o uso tradicional e popular de plantas e seus extratos, não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros, sendo necessários estudos sistemáticos para compreender a verdadeira ação destas substâncias no organismo, bem como seus potenciais riscos à saúde da população. Particularmente no caso do látex de

mangabeira, algumas de suas propriedades tecnológicas já foram investigadas previamente [46], inclusive foi relatada uma menor carga de proteínas em relação à existente no látex da seringueira. Tal fato desperta interesse, por látex de menor efeito alergênico e ainda mais que seu aspecto de uso biomédico para regeneração de tecidos ainda não foi devidamente explorado.

C. Mangabeira

A mangabeira é uma planta lactescente pertencente à família Apocinácea, com predominância no Cerrado e na região Nordeste do Brasil [53]. É conhecida regionalmente por seu saboroso fruto, a mangaba, que também é consumido na forma de sorvetes típicos em algumas regiões.

Em algumas regiões brasileiras, outras partes da planta, como caule e folhas, são utilizadas também na medicina popular [27, 52, 54]. Recentemente mostrou-se que a partir da casca podem ser extraídas diversas substâncias como flavonóides, taninos e antocianinas, utilizadas, por exemplo, no tratamento e cura de gastrite causada por *Helicobacter pylori* [50]. Além disso, pesquisadores mostraram que o látex desta espécie também apresenta atividade anti-inflamatória [52]. Constatou-se ainda, que administração oral do látex em baixas concentrações não possui efeitos tóxicos, o que permitiu validar a utilização popular do látex quando administrado com água ou leite.

Os extratos etanólicos produzidos a partir das folhas de mangabeira promoveram efeitos vasorrelaxantes na aorta e artérias mesentéricas de ratos através da produção endotelial de óxido nítrico [54]. Como vasodilatadores são clinicamente utilizados no tratamento de hipertensão pontuou-se a mangabeira como potencial agente anti-hipertensivo. Os resultados destes pesquisadores mostraram que os extratos de mangabeira utilizados, reduzem a pressão sanguínea sistólica de ratos, dando suporte ao uso desta planta como anti-hipertensivo na medicina popular, e comparando-os com medicamentos como o Captopril, chegando à conclusão de que seriam 10 vezes mais eficientes na atividade hipotensiva [55, 56].

É importante ressaltar ainda que há também estudos sobre extratos de mangabeira mostrando certa atividade antimicrobiana [57], o que impulsiona a criação e validação de métodos para testar este tipo de atividade com o látex de mangabeira, aumentando a possibilidade de sua aplicação como novo biomaterial.

D. Ensaio biológico para avaliação da potencialidade de novos biomateriais

Qualquer novo material com potencialidade farmacológica deve primeiramente passar por determinados testes biológicos antes da sua aplicação em humanos [58]. A determinação da citotoxicidade e genotoxicidade são partes iniciais dos processos de avaliação estipulados por normas de padronização regidas pela *International Organization for Standardization (ISO)* [58, 59]. Entretanto, não somente a ausência de efeitos tóxicos descreve algum material como biocompatível, mas também a presença da influência positiva em termos de sua biofuncionalidade [27], como no caso da angiogênese, para o látex de seringueira.

A propriedade de uma substância de ser tóxica às células é chamada de citotoxicidade [60]. Os ensaios para a avaliação deste parâmetro são interessantes por serem rápidos, envolverem baixo custo e permitirem a avaliação de diversos alvos celulares. Estes estudos fornecem informações sobre diferentes funções celulares, possibilitando a ampliação do conhecimento sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e a estimativa destes efeitos em humanos. Já a genotoxicidade pode ser definida como qualquer substância que tenha efeito nocivo sobre o DNA, ou seja, são substâncias mutagênicas e/ou cancerígenas [61]. Dentre os agentes genotóxicos, incluem-se os compostos químicos e certos tipos de radiação.

E. Aplicações tecnológicas para o látex de mangabeira

Os íons da família dos lantanídeos são bem conhecidos e utilizados, por apresentarem propriedades como forte emissão, longo tempo de vida de fluorescência e alta eficiência luminescente [62]. Pesquisas recentes mostram que a inserção de determinados íons terra-raras em polímeros podem permitir seu uso em diversas aplicações como, por exemplo, dispositivos eletro-ópticos [62, 63], sensores biológicos [64-66] e nanofibras luminescentes [63].

Além dos estudos com compostos inorgânicos, como complexos contendo európio, térbio e ítrio, recentemente, pesquisadores inseriram moléculas orgânicas de porfirinas na estrutura de polímeros e obtiveram nanofibras luminescentes [63], com

potencial para detecção de vestígios de vapor de TNT. Além de produzir as nanofibras com as peculiares propriedades luminescentes, a inserção das porfirinas aumentou a estabilidade do material produzido.

Nesse sentido, além da motivação para estudar o uso das biomembranas de látex de mangabeira em biomedicina, vê-se a oportunidade em avaliar seu uso em aplicações tecnológicas. Relatos de que polímeros suportam tanto compostos luminescentes inorgânicos quanto orgânicos despertaram o interesse em incorporá-los às biomembranas de látex de mangabeira, no intuito de produzir sistemas luminescentes flexíveis que possam ser empregados em diferentes aplicações. Cabe salientar que, pelo nosso conhecimento, as biomembranas de látex ainda não foram investigadas com esse propósito.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Aplicações do látex como biomaterial continuam despertando o interesse de pesquisadores de diversas áreas. Neste sentido, este projeto apresenta como objetivo geral avaliar as potencialidades de biomembranas naturais à base látex de mangabeira visando potenciais aplicações nas áreas médica e tecnológica.

2.2. Objetivos específicos

Especificamente, os objetivos do presente trabalho estão listados abaixo:

1. Avaliar a obtenção de biomembranas à base de látex de mangabeira, a partir do controle do volume de látex empregado;
2. Realizar sua caracterização físico-química, com o intuito de estabelecer comparações entre as biomembranas de látex de mangabeira e seringueira;
3. Realizar ensaios biológicos visando sua aplicação na área médica;
4. Avaliar o uso das biomembranas como matrizes hospedeiras para materiais luminescentes propondo-se aplicações tecnológicas.

3. Materiais

Nesta seção será apresentado o látex de mangabeira, os procedimentos de preparação das biomembranas, a incorporação de materiais luminescentes, bem como as técnicas experimentais empregadas para as devidas caracterizações.

3.1. Látex de mangabeira

O látex utilizado neste trabalho foi coletado na estação experimental da Universidade Estadual de Goiás (UEG), no município de Ipameri - GO, onde as árvores de mangabeira foram plantadas em novembro de 2003. Este látex foi gentilmente fornecido pelos professores Dra. Luciane M. de Almeida e Dr. Nei Peixoto, através de acordos de colaboração.

3.1.1. Coleta do látex

Pouco se sabe sobre os métodos de coleta e a produtividade de látex em mangabeiras. Nesse sentido, o grupo da professora Dra Luciane M. de Almeida têm desenvolvido um estudo sistemático sobre a melhor forma para extração do látex, bem como as influências climáticas sobre sua produção durante o ano [27]. Foi observado que a metodologia de sangria tal como é aplicada em seringueiras não produz o mesmo efeito nas mangabeiras. Nas seringueiras, este processo é realizado com facas específicas e em formatos apropriados no tronco do vegetal. Entretanto, nas árvores de mangabeira a forma mais apropriada para a sangria é obtida através do uso de um corte realizado por um facão na região do caule. Isto está associado ao fato de que a casca da mangabeira é espessa no tronco e o número de vasos lactíferos é superior na região interna, evidenciando que sangrias utilizando cortes superficiais não são eficientes, pois não atingem os vasos lactíferos, diferentemente de quando são realizados cortes em seringueira [27]. Tais resultados são importantes como base para futuras análises visando o melhoramento genético e aumento da produção de látex da espécie.

O látex da mangabeira, quando extraído, é um líquido branco e de aspecto leitoso como o látex da seringueira. Entretanto, em contato com o ar pode se tornar rosado. A polimerização do látex ocorre de forma muito acelerada e existem duas hipóteses que explicam este processo: a primeira, leva em consideração a ação de micro-organismos

reagindo com a porção não-borracha do látex, o que ocasionaria a redução de sua estabilização e, a outra, confere esse fenômeno à liberação de ânions de ácidos graxos através da hidrólise de várias substâncias lipídicas presentes no látex [67]. Para retardar e/ou evitar o processo de polimerização é adicionado um estabilizante, como a amônia ou mesmo a própria água. A quantidade de amônia e água empregadas foi de 0,1 % e 50%, respectivamente. É interessante destacar que a adição da amônia ao látex torna-o instantaneamente cor de rosa. Na presença de estabilizantes e a baixas temperaturas, é possível armazenar o látex por um período de alguns meses sem que a polimerização seja verificada.

3.1.2. Preparação das biomembranas de látex de mangabeira

Com o intuito de reduzir as impurezas, em decorrência da coleta no campo, o látex foi centrifugado a 1.500 rpm durante 5 minutos a 10°C. Em seguida, o látex foi acondicionado em tubos estéreis (*Falcon*) e depositado em um refrigerador comum.

Para a preparação das biomembranas, o látex é depositado em placas de petri e então levado à estufa (40°C) até sua completa polimerização. A polimerização do látex estará concluída e a biomembrana pronta quando estiver completamente seca, o que pode durar alguns dias, dependendo do volume de látex utilizado.

3.1.3. Esterilização das biomembranas

Para os testes biológicos é necessária a esterilização das biomembranas. Foi então, empregada a esterilização por radiação ionizante, que é uma técnica altamente eficiente, econômica e segura, que tem tido um rápido crescimento na indústria médica nos últimos anos [68]. A radiação ionizante destrói os microorganismos presentes em produtos médicos e/ou previne sua reprodução. Ela quebra suas cadeias moleculares e induzindo reações dos fragmentos com o oxigênio atmosférico ou compostos oxigenados [68].

A esterilização das membranas que foram utilizadas nas análises *in vitro* foi realizada no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) em São Paulo, SP. Ela foi realizada através de um acelerador de elétrons com fonte de cobalto, GAMMACELL 220, através de acordo de colaboração, via Prof. Carlos F. O. Graeff, da UNESP, Bauru, SP. Este irradiador proporciona elevada homogeneidade de dose de radiação que é monitorada pelo Serviço Internacional de Garantia de Dose (IDAS) da

Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). A dose utilizada para a esterilização das membranas foi de 25 kGy, baseadas na norma ISO 11137 e a radiação utilizada foi radiação gama [68, 69].

3.2. Biomembranas de látex de mangabeira como matrizes para materiais luminescentes

Visando explorar o potencial do látex para aplicações tecnológicas, foi avaliado o uso das biomembranas como matriz hospedeira de compostos luminescentes. Foram incorporados ao látex *in natura*, tanto compostos dopados com európio, como algumas moléculas orgânicas de porfirinas. Ambos os sistemas apresentam características luminescentes com emissão na região visível do espectro eletromagnético. Neste estudo, as biomembranas formadas foram analisadas pelas técnicas espectroscópicas de absorção no ultravioleta e visível e emissão fluorescente.

3.2.1. O complexo inorgânico luminescente $\text{Eu}(\text{TTA})_3$

O elemento európio (Eu) com número atômico 63, pertence à família dos Lantanídeos, também conhecidos como terras-raras (quando incluem o escândio e o ítrio). As inúmeras aplicações das terras-raras são devidas às suas propriedades ímpares, principalmente as espectroscópicas e magnéticas [70-72].

As propriedades químicas e físicas dos elementos lantanídeos são muito semelhantes, isto é uma consequência da sua configuração eletrônica. Com exceção dos elementos escândio (Sc), ítrio (Y), lantânio (La), itérbio (Yb) e lutécio (Lu), todos os outros possuem a camada 4f incompleta o que lhes confere uma configuração eletrônica $[\text{Xe}] 4f^n 5d^1 6s^2$ ($0 < n < 14$) [73]. As camadas pertencentes aos íons lantanídeos que participam das ligações químicas com outros elementos são as camadas 6s e 5d, mantendo a camada 4f (mesmo sendo incompleta) blindada.

Em sua maioria os lantanídeos, quando estão na forma de íons, se encontram no estado trivalente de oxidação (+3), por ser o estado mais comum e ainda o mais estável termodinamicamente [73]. Os íons lantanídeos, por apresentarem grandes números de níveis de energia, proporcionam emissões desde o infravermelho até o ultravioleta.

Os compostos de íons terras-raras têm despertando grande interesse em diversas áreas, entre as quais destacamos sua utilização como dispositivos eletroluminescentes. Eles vêm sendo empregados e mostrando bons resultados como alta eficiência em dispositivo eletroluminescente [74], agente de contraste para ressonância magnética nuclear [65], sonda luminescente para biomoléculas [66] marcadores biológicos [75] e em nanofibras luminescentes [62].

O európio, assim como o térbio são os elementos das terras-raras mais analisados por apresentarem maior intensidade luminescente [76]. Ambos quando formam complexos com ligantes orgânicos, como o tenoiltrifluoroacetato (TTA), que é uma molécula alifática no qual dois grupos cetona encontram-se localizados nas posições 1,3 separadas por um carbono [77], têm sua emissão intensificada [78]. De maneira geral, estes complexos exibem bandas de emissão estreitas e longos tempos de vida do estado excitado, devido à eficiência da transferência de energia intramolecular destes ligantes coordenados aos íons metálicos centrais [77, 79, 80]. Por esta razão, optou-se por utilizar o ligante TTA com Eu^{3+} e incorporá-los às matrizes de látex. O elemento Eu é um metal dúctil e quase tão rígido quanto o ferro, de configuração eletrônica $[\text{Xe}] 4f^7 6s^2$, que apresenta alta luminescência na região do vermelho [73].

O ligante de caráter orgânico quando interage com o íon lantanídeo Eu^{3+} , sob as condições para a síntese clássica descrita por Charles e colaboradores [78], forma o complexo inorgânico dihidratado $\text{Eu}(\text{TTA})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (será utilizada apenas a abreviatura $\text{Eu}(\text{TTA})_3$, como forma de simplificar o texto). Este complexo foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Lauro Maia, do Grupo Física de Materiais, do Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Goiás (UFG), através de acordos de colaboração. Estudos relacionados à fluorescência da matriz de látex complexada com $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ realizados estão apresentados na seção 5.2.2.

3.2.1.2. Preparação das biomembranas como matrizes para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$

A preparação das biomembranas de látex com a presença do terra-rara e o ligante deu-se da seguinte forma:

- I. Aferiu-se 10 mg do material a ser utilizado: $\text{Eu}(\text{TTA})_3$
- II. A solubilidade do complexo inorgânico $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ foi avaliada em diferentes solventes, sendo melhor solubilizado em álcool isopropílico (iPrOH). Os testes de

solubilidade foram realizados com o intuito de incorporar totalmente o complexo ao látex.

III. Foi solubilizado 10 mg do pó de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em 10 μL de $i\text{PrOH}$. Desta forma, o composto foi dissolvido em $i\text{PrOH}$ de maneira que o volume de álcool estivesse em 1% em relação ao volume total de látex, em que seria posteriormente adicionado. Desta forma, a concentração do composto $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ adicionado ao látex *in natura* foi de 10 mg/mL. A justificativa para a escolha da pequena quantidade de solvente está centrada no fato de que o contato de solventes polares com o látex induz sua polimerização instantânea.

As amostras foram então levadas à estufa a 40°C por período aproximado de 6 horas, até que a biomembrana estivesse completamente seca e polimerizada. Desta forma, foram obtidas membranas com espessuras de aproximadamente 0,3 mm.

3.2.2. Moléculas orgânicas luminescentes

As porfirinas são moléculas orgânicas que apresentam uma extensa conjugação π em sua estrutura e são constituídas por quatro anéis pirrólicos ligados por pontes metil. Estão presentes em importantes sistemas vivos e atuam em processos como a fotossíntese e a hematoze. São conhecidas por possuírem alta absorção na região visível do espectro eletromagnético, bem como eficiente emissão fluorescente. Atualmente, vêm sendo estudadas no intento de aplicações tecnológicas em diversas áreas tais como, catálise [81], limitação óptica [82], chaveamento óptico [83], em Terapia Fotodinâmica [83], sensores de TNT [63] e outros.

Para a realização desta etapa do trabalho foram utilizadas as porfirinas aniônica *meso*-tetrasulfonatofenil (TPPS) e catiônica *meso*-tetrametilpiriumil (TMPP), cujas estruturas químicas são mostradas na figura 3.01. As porfirinas utilizadas nesta etapa do trabalho foram adquiridas da empresa *Porphyrin Products Inc.* e usadas sem purificações posteriores.

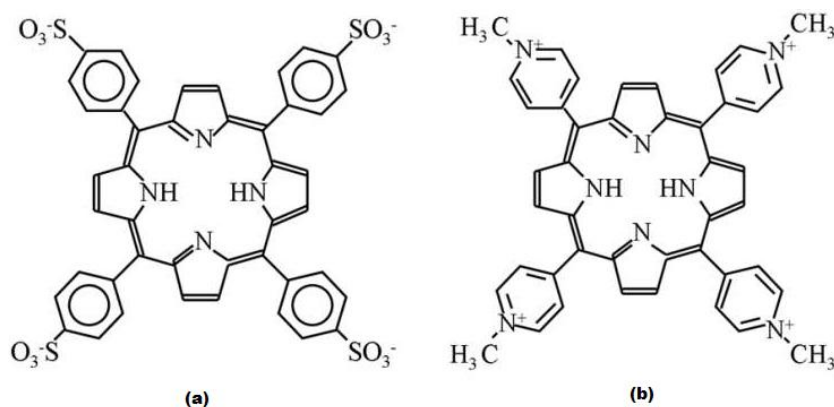


Figura 3.01 - Estrutura química da porfirina TPPS (a) e estrutura química da porfirina TMPP (b).

3.2.2.1. Preparação das biomembranas como matrizes para porfirinas

Os procedimentos de preparo das amostras ocorreram da seguinte forma:

I. Inicialmente, as amostras de porfirinas (TMPP e TPPS) foram diluídas em água Milli-Q, sendo obtida uma solução estoque em alta concentração.

II. Uma pequena alíquota foi adicionada ao látex de forma que a concentração de porfirina fosse ajustada a 50 μM . Este ajuste foi obtido a partir dos espectros de absorção das amostras pela lei de Beer-Lambert, conforme será mostrado na seção 4.

III. Um determinado volume do látex contendo as porfirinas foi então depositado em placa de petri e levado à estufa a 40°C até sua completa polimerização, que ocorreu em cerca de 8 horas.

O estudo espectroscópico e os resultados de FTIR e de microscopia deste sistema estão apresentados na seção 5.2.3.

4. Técnicas Empregadas

Para a devida caracterização das biomembranas foi empregado um conjunto de técnicas experimentais e estas serão apresentadas brevemente a seguir.

4.1. Técnicas espectroscópicas

Muito do atual conhecimento acerca da estrutura da matéria é baseado em investigações fornecidas por técnicas espectroscópicas. Elas empregam radiação eletromagnética de diferentes comprimentos de onda para obter informações valiosas sobre átomos, moléculas, grupos funcionais bem como sobre suas interações com a vizinhança. Permitem obter informações sobre estrutura molecular, processos de absorção e emissão luminescentes, ligações químicas, constantes de ligação, transferência de energia e outros [85, 86].

Uma forma usual de análise espectroscópica é a obtenção de espectros que representam uma grandeza (transmitância ou absorbância) em função do comprimento de onda da radiação. Tal espectro se deve às transições entre estados de energia e pode fornecer informações quando uma molécula absorve, emite ou espalha a radiação eletromagnética [87], tal qual foi relatado na seção 3.2.1 para o caso de matrizes hospedeiras e íons com propriedades luminescentes.

Para melhor explicar os processos envolvidos nesse trabalho, será feito o uso de um diagrama de níveis de energia, conforme apresentado na figura 4.01. Nesta figura as linhas horizontais representam os estados de energia permitidos da molécula, singletos (S_0 e S_1) e tripletos (T_1). As linhas verticais representam as transições envolvidas e as setas onduladas os processos de relaxação de conversão interna, externa e cruzamento entre sistema.

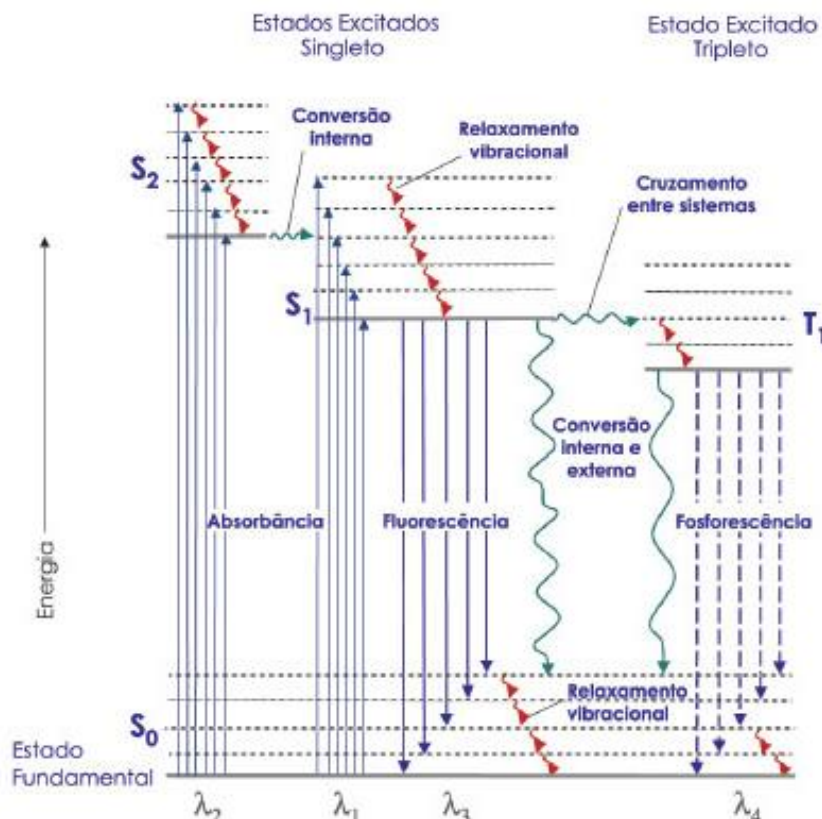


Figura 4.01 - Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após absorção de energia por uma molécula. [88].

No equilíbrio termodinâmico, a molécula se encontra no estado fundamental S_0 . Ao absorver um fóton de energia apropriada, ela sofre uma transição eletrônica para um estado singlete excitado (S_1 ou S_2). Considerando que ocorra uma transição para o estado singlete excitado S_2 ($S_0 \rightarrow S_2$), teremos, após a absorção, uma série de processos de relaxação vibracional que ocorrem até a estabilização no nível vibracional de menor energia deste estado. Neste processo, ocorrerá a relaxação entre níveis de energia do estado S_2 para o estado S_1 . O processo não radiativo entre bandas é denominado conversão interna. Uma vez no estado S_1 , ocorrerá novamente relaxação vibracional dentro desta banda até que ela se estabilize no nível de menor energia. A partir disto, a molécula ou o complexo, possui três caminhos a seguir:

- 1 – Transição eletrônica do estado singlete excitado S_1 para o estado singlete fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$) através do fenômeno da fluorescência, emitindo fótons;
- 2 – Transição eletrônica ($S_1 \rightarrow S_0$) através do processo de conversão interna, sem emissão de fótons;
- 3 – Transição eletrônica entre o estado singlete excitado S_1 e o estado tripleto excitado T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$), sendo o processo $S_1 \rightarrow T_1$, chamado de cruzamento intersistemas.

A molécula volta para S_0 através do processo de conversão interna ou pelo processo de fosforescência, emitindo fótons, sendo este processo mais lento que os demais, por apresentarem spins eletrônicos antiparalelos, devido à inversão de spins que ocorre na transição $S_1 \rightarrow T_1$.

As transições eletrônicas representadas pela absorção ($S_0 \rightarrow S_1$ ou $S_0 \rightarrow S_2$) são avaliadas pela técnica espectroscópica de absorção UV/Vis, a emissão radiativa ($S_1 \rightarrow S_0$) pela espectroscopia de fluorescência. As transições intrabanda, são processos vibracionais e rotacionais e são investigadas pela espectroscopia de infravermelho. Devido estas diferentes transições em diferentes regiões espectrais são necessários diferentes dispositivos para detectar cada fenômeno. Desta forma, cada espectroscopia necessita de um equipamento específico. Neste trabalho serão apresentados estudos espectroscópicos de membranas de látex de mangabeira (com e sem Eu) nas regiões do infravermelho, visível e ultravioleta, bem como resultados de espectroscopia de luminescência.

4.1.1. Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) mostra transições vibracionais entre os níveis de energia das moléculas [85]. A condição para que a radiação infravermelha seja detectada por esta técnica é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional. Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros [89].

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1} ou comprimentos de onda de $0,78$ a $1.000 \text{ }\mu\text{m}$ [89]. Por conveniência, divide-se o espectro infravermelho em infravermelho próximo, médio e distante. A espectroscopia de infravermelho é aplicada para análises quantitativas e qualitativas. A tabela II mostra limites aproximados de cada um.

Tabela I – Regiões do Espectro Infravermelho

Região	Intervalo de compr. de onda (λ), μm	Região de número de onda (ν), cm^{-1}	Região de frequência (ν), Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{14}$
Distante	50 a 1.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: [89] (adaptada)

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas mais empregadas para a identificação de materiais poliméricos [89]. Este recurso analítico baseia-se no fato de que os diferentes grupos funcionais que compõem as moléculas absorvem a radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético em comprimentos de onda característicos.

Neste trabalho foi utilizado o espectrofotômetro da marca *Bruker*, modelo *Vertex 70*, na UNESP – Bauru e da *PerkinElmer*, modelo *Spectrum 400 TF-IR/FT-FIR*, com acessório *HATR* da mesma marca, na Central Analítica do Instituto de Química da UFG. As medidas foram feitas no modo ATR (Reflectância Total Atenuada).

4.1.2. Espectroscopia no Ultravioleta e Visível

Absorção molecular na região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis) é dependente da estrutura eletrônica da molécula. Medidas de absorção tendo como base radiação UV/Vis apresentam inúmeras aplicações em se tratando da identificação e determinação de várias espécies orgânicas e inorgânicas [89]. A espectroscopia no UV/Vis envolve a absorção da radiação eletromagnética por átomos e moléculas na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm, causando a transição eletrônica do estado fundamental para estados excitados [90]. As transições eletrônicas entre os orbitais moleculares dependerão de cada sistema e, principalmente, da energia necessária para levar o elétron do estado fundamental para o estado mais excitado, correspondendo à energia absorvida de um fóton de radiação UV/Vis incidente [89-91].

Quanto maior for o número de moléculas e quanto maior a eficiência de uma molécula em absorver luz em um determinado comprimento de onda, maior será a

intensidade desta absorção [90]. Nesse sentido, a espectroscopia de absorção UV/Vis está baseada na medida da transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes, com um determinado caminho óptico ou espessura da amostra (l). A concentração (c) de um composto absorvente está relacionada linearmente à sua absorbância [89] conforme representado pela expressão matemática da lei de Beer-Lambert:

$$A = -\ln T = -\log I/I_0 = \varepsilon cl \quad (1)$$

Onde I é a intensidade da radiação transmitida e I_0 a intensidade da radiação incidente (a transmitância T é dada pela razão entre I e I_0) e ε é o coeficiente de absorção molar. Para realizar as medidas de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro *Lambda 1050 da Perkin-Elmer*, no laboratório do Grupo Física de Materiais do IF – UFG.

4.1.2.1. Espectroscopia por reflectância difusa

O espectro de reflectância (R) é similar e complementar ao espectro de absorção [92]. O espectro R pode ser muito vantajoso à medida que manifesta as singularidades causadas pelo processo de absorção, mas com a possibilidade de se utilizar amostras sólidas. Pode-se relacionar R e A , a partir da relação:

$$R = I/I_0 \quad (2)$$

A reflectância pode ser registrada em dois modos: reflectância direta, cujas medidas são feitas com amostras bem polidas e incidência normal e, reflectância difusa, onde uma esfera de integração (totalmente refletora) é usada. Esta esfera tem um orifício através do qual a luz passa e é transmitida para a amostra. A luz refletida atinge o detector depois de sofrer múltiplas reflexões no interior da esfera. Esta esfera é utilizada como acessório em espectrofotômetros convencionais e neste trabalho, as medidas de reflectância foram realizadas no espectrofotômetro *Lambda 1050 da PerkinElmer*, com esfera integradora para reflexão no laboratório do Grupo Física de Materiais do IF – UFG.

4.1.3. Espectroscopia de fotoluminescência

A fotoluminescência abrange os fenômenos de fluorescência, sendo esta, a emissão de radiação eletromagnética de um material, após este ter sido submetido a uma excitação luminosa [91]. A frequência do fóton emitido pela amostra está intimamente relacionada com o material que a compõe, pois é resultante de uma transição eletrônica.

Um dos aspectos mais atraentes dos métodos luminescentes é sua grande sensibilidade, com limites de detecção de ordem de grandeza menores que as encontradas em espectros de absorção. As medidas de fotoluminescência se baseiam na análise da luz que é emitida pela amostra quando este é submetido a uma excitação. Esta excitação, (proveniente de uma radiação) faz com que os elétrons da amostra, absorvendo energia, sejam levados a um nível de energia mais alto. Os elétrons excitados tendem a voltar para o estado fundamental, emitindo a energia que absorveram em forma de calor e luz. Analisada, através de um espectrofotômetro, a luz emitida pela amostra, fornece informações sobre os estados existentes no *gap* do material.

As medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro da marca *Fluorolog FL3-221 – Horiba Jobin-Yvon* no Grupo Física de Materiais do IF-UFG.

4.2. Análise Térmica e Estrutural

4.2.1. Análise Elementar

A fim de determinar os principais constituintes de uma determinada amostra, realiza-se a análise elementar, também conhecida como microanálise [93]. Através da pirólise de um determinado composto que contenha carbono, nitrogênio e hidrogênio, principalmente, e da análise dos gases resultantes de sua decomposição, podemos saber a composição percentual em massa destes elementos.

Realizamos a análise elementar na Central Analítica do Instituto de Química da UFG. Os experimentos foram realizados no aparelho *Analyser Organic Elementar, Flash 2000* da *Thermo Scientific*.

4.2.2. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica consiste na medida da massa da amostra em função da temperatura. É utilizada para medir variações de massa de uma amostra durante o aquecimento ou resfriamento ou quando mantida constante uma determinada temperatura. Os principais itens medidos nessa técnica incluem: evaporação, sublimação, decomposição, oxidação, redução, adsorção e dessorção de gases [89]. A utilização da TG é muito importante na avaliação da estabilidade térmica de um material com o intuito de definir a aplicação deste. Para verificar o comportamento térmico das membranas de látex foram feitos estudos termogravimétricos com objetivo de analisar as perdas de massa, o processo termodegradativo delas e a estabilidade da amostra.

Para obter o resultado de TG, as medidas foram realizadas utilizando um cadinho de alumina, na faixa de temperatura 20 a 600°C, sob atmosfera controlada de N₂, no aparelho *DTG 60/60H* da *Shimadzu* na Central Analítica do Instituto de Química da UFG.

4.3. Técnica de Microscopia

4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar a biomembrana de látex de mangabeira bem como a incorporação dos compostos luminescentes foi empregada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esta técnica permite avaliar a porosidade e rugosidade das biomembranas e também como ocorreu a incorporação dos compostos às matrizes de látex.

O princípio da microscopia eletrônica de varredura consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, que, concentrado, controlado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas incide sobre a amostra provocando uma série de emissões de sinais relacionados com interação do feixe incidente de elétrons e a amostra [94].

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 [94]. Esta técnica permite a obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da

amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este não seja transparente aos elétrons.

A preparação da amostra é feita sobre suportes metálicos. O revestimento da amostra por um filme condutor tem como objetivo evitar o acúmulo de carga negativa, no caso de a 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. No caso das biomembranas foi utilizado ouro como condutor.

O MEV foi realizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia De Alta Resolução – Labmic no Instituto de Física da UFG, no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), *Jeol, JSM – 6610*, equipado com EDS, *Thermo Scientific NSS Spectral Imaging*, utilizando o sistema para deposição de filmes de ouro, *Denton Vacuum, Desk V*.

4.4. Testes Biológicos

Esta etapa foi realizada em colaboração com a então doutoranda Juliana Ferreira Floriano, aluna do professor Dr. Carlos F. O. Graeff e colaboração da professora Lígia S. L. S. Mota, na UNESP, campus Botucatu, SP.

4.4.1. Análise da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é um dos primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso biomédico. Somente depois de comprovada a sua não-toxicidade é que o estudo do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório [58]. Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.

O teste de citotoxicidade consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se a ocorrência de morte celular através da alteração colorimétrica da amostra. O parâmetro que foi utilizado para avaliar a toxicidade das biomembranas de mangabeira foi o teste de viabilidade celular, no qual se empregam corantes vitais, como vermelho neutro, solúvel em água e que

passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos. É possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* [58].

4.4.1.1. Crescimento da Cultura Celular

Nos testes *in vitro* foi utilizada uma linhagem celular de NIH fibroblastos de camundongos. As células foram transferidas para frascos de cultura (25 cm²) juntamente com 3,0 ml de meio de cultivo, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e incubadas em estufa a 38 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂, como forma de reproduzir o ambiente natural das células. O meio de cultivo tem por finalidade manter as células vivas e evitar que microorganismos indesejáveis (como bactérias) se proliferem.

As culturas foram periodicamente observadas para acompanhamento do crescimento celular. Houve troca de meio de cultivo, a princípio, a cada três dias. Durante as trocas foi também avaliado o nível do pH no meio, mantendo-o sempre em torno de 7,0. Quando as células atingiram seu grau máximo de proliferação, as mesmas foram isoladas por meio de tratamento com tripsina. A tripsina é uma enzima que, neste caso, age cortando a matriz extracelular e separa uma célula da outra.

4.4.1.2. Biomembranas de látex de mangabeira e culturas de células

As biomembranas produzidas a partir do látex de mangabeira foram colocadas em contato com uma quantidade conhecida de células ($2,5 \times 10^5$ células), juntamente com o meio de cultura, por três períodos: 24, 48 e 72 horas. A partir de então, iniciou-se o processo de avaliação da citotoxicidade. A partir do procedimento de viabilidade celular, descrito anteriormente.

Volumes de 0,2 ml de uma suspensão, com $2,5 \times 10^5$ células/ml da linhagem de fibroblastos foram distribuídas nos poços de uma microplaca com 48

orifícios. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C para a formação da monocamada celular. As amostras e os respectivos controles foram testados em triplicatas. A microplaca foi novamente incubada a 37 °C. Após 24 horas o meio de cultura foi substituído por 0,2 ml de solução contendo 50 µg de vermelho neutro/ml. A incorporação do vermelho neutro pelas células vivas foi verificada após 3 horas. O meio foi removido e as células lavadas com tampão fosfato-salino, seguida de outra lavagem com uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) em formaldeído (1% de CaCl₂ em formaldeído 0,5%).

A primeira lavagem é feita para retirada do vermelho neutro em excesso, restando apenas aquele incorporado pela célula e a segunda, apresenta como finalidade a redução de água no meio de cultivo. Após descarte, cada poço recebeu 0,2 ml da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em etanol 50%). A placa foi agitada por 10 minutos e as medidas de absorvância foram realizadas num espectrofotômetro *Organon Teknika Reader 530* versão 1.24, em uma faixa de 540 - 570 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%). Através deste resultado pode-se encontrar o índice de citotoxicidade, chamado de IC₅₀ que elucida qual amostra induz 50% de lise ou morte celular e como consequência a inibição de incorporação do vermelho neutro. Para haver uma avaliação concisa, a própria placa de cultivo foi utilizada com controle negativo e como controle positivo foi utilizado fenol 0,2%.

4.4.2. Análise da Genotoxicidade: Teste Cometa

O teste cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, é um método de estudo que tem por finalidade avaliar os danos ao DNA de células individuais, pois permite analisar as quebras das fitas dos cromossomos.

As células submetidas a este tipo de teste são colocadas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Em meios apropriados, membranas, núcleo e organelas celulares são rompidas. Em seguida, os componentes citoplasmáticos e as proteínas nucleares são retirados, submetendo-se o material genético à eletroforese [95]. A eletroforese é uma técnica de separação de partículas que atua de acordo com sua carga elétrica e peso molecular [96]. Para a separação de DNA, a eletroforese baseia-se na carga total negativa deste, devido aos oxigênios do

grupamento fosfato. No ensaio realizado, fragmentos de DNA do núcleo migram para uma extremidade da placa e após coloração, analisada por fluorescência, nota-se um rastro, em forma de cometa, que dá nome ao teste.

4.4.2.1. Procedimentos para realização do teste cometa

As células de fibroblastos de ratos cultivadas para realizar o teste de viabilidade celular após 72h de contato com a biomembrana de mangabeira foram submetidas ao teste para avaliar danos ao DNA, de acordo com o método descrito por Singh e colaboradores (1994), com leves modificações. Foram utilizados 5 µL do meio de cultivo e as células foram suspensas em agarose e cuidadosamente pipetadas sobre placas foscas preparadas com este material. As lâminas com a suspensão de células foram cobertas com lamelas de vidro e subsequentemente colocada durante a noite num frasco Coplin contendo solução de lise (10% de DMSO, 1% de Triton X em tampão de lise alcalino: 2,5 mM de NaCl, 10 mM Tris, 100 mM de Na₂EDTA, pH 10) para digerir completamente proteínas celulares. Em seguida, as lâminas foram removidas da solução de lise e colocadas numa unidade de eletroforese em gel horizontal, com tampão de eletroforese frio (NaOH 0,3 M e 1 mM de Na₂EDTA, pH 13,2). As lâminas foram dispostas sobre o tampão alcalino por 20 minutos para permitir o desenrolar das fitas de DNA e a expressão de danos. A eletroforese foi realizada durante 20 minutos a 300 mA e 25 V. Após a neutralização, gota a gota (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5) durante 5 minutos, as células foram coradas pela aplicação de 50 µl de 20 µg/ml de brometo de etídio. As lâminas foram examinadas e o comprimento da cauda foi medida com um microscópio de fluorescência associada com o sistema de software de imagem (*Comet II; Instruments Perpective, Suffolk, UK*), utilizado para avaliar os danos do DNA, em termos de percentagem da cauda do DNA. A migração do DNA de 50 células selecionadas aleatoriamente foi analisada para cada amostra.

Por esta razão, no presente trabalho foram iniciadas análises sobre a citotoxicidade e genotoxicidade da biomembrana de *H. speciosa* em testes *in vitro*, com linhagens de células de fibroblastos de ratos.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados em três seções: a preparação e caracterização físico-química das biomembranas, seu uso como matrizes hospedeiras para compostos luminescentes e os testes biológicos para avaliar suas potenciais aplicações biomédicas.

5.1. Preparação e caracterização das biomembranas de látex de mangabeira

Nesta seção apresentaremos a primeira etapa dos resultados deste trabalho: a preparação da biomembrana, bem como sua caracterização. Para a análise estrutural foram empregadas as técnicas de espectroscopia no infravermelho, análise termogravimétrica e análise elementar. Para avaliar o comportamento luminescente, foram empregadas as técnicas espectroscópicas de absorção no ultravioleta e visível (UV/Vis) e emissão fluorescente. Também foi avaliada a influência dos anticoagulantes (amônia e água) em sua composição. Devido ao sucesso das aplicações das biomembranas de látex de seringueira, parte das análises foi realizada comparando-se as características destas, com as das biomembranas de mangabeira. Além disso, a morfologia das biomembranas de mangabeira foi verificada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.

5.1.1. Preparação das biomembranas de látex de mangabeira

Após a coleta, conforme previamente relatado nas seções 3.1.1 e 3.1.2, o látex foi submetido a um processo de centrifugação para eliminação de impurezas (1.500 rpm, a 10°C por 5 minutos). Em seguida, determinados volumes foram depositados em placas de petri e levados à estufa (40°C) para sua polimerização. A figura 5.01, apresenta o látex *in natura*, na presença de amônia (a) e a biomembrana polimerizada (b).



Figura 5.01 - (a) látex estabilizado com amônia em placa de petri e, (b) biomembrana polimerizada.

Visando a reprodutibilidade do processo de preparação das biomembranas, avaliou-se suas espessuras e as massas, em função do volume de látex *in natura* adicionado às placas de petri. Também foram avaliadas as perdas de massa durante o processo de polimerização e a densidade do látex de mangabeira.

As biomembranas foram preparadas utilizando-se volumes conhecidos de látex, que foram depositados em placas de 5 cm de diâmetro interno. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela II.

Tabela II – Volumes e massas de látex *in natura* empregados e massas das espessuras das biomembranas.

Volume látex <i>in natura</i> (mL)	Massa látex <i>in natura</i> (g)	Massa da biomembrana (g)	Espessura da biomembrana (mm)
3	2,98 ± 0,01	1,04 ± 0,04	0,45 ± 0,05
6	5,88 ± 0,07	2,08 ± 0,02	0,81 ± 0,03
9	8,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	1,23 ± 0,03

Os valores na tabela representam a **média ± desvio padrão** das análises em triplicata.

A partir dos dados da tabela II verificou-se que a densidade do látex de mangabeira foi de $0,98 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$. Além disso, conclui-se que durante o processo de polimerização da biomembrana, esta, sofreu perdas de aproximadamente 37% de sua massa em relação à massa do látex *in natura*. A Fig. 5.02 apresenta um gráfico da espessura da biomembrana de látex polimerizada a 40°C em função do volume de látex *in natura* adicionado às placas de petri.

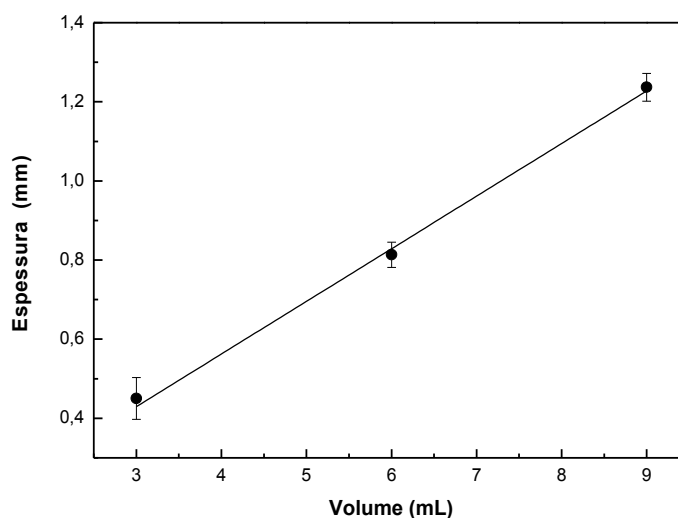


Figura 5.02 – Gráfico da espessura das biomembranas com amônia, em função do volume utilizado.

É bem documentado que a porosidade da biomembrana é um fator importante no processo de liberação controlada de fármacos. Dependendo da densidade de poros, a liberação pode durar horas, dias ou semanas [18, 19, 21]. Desta forma, acredita-se que a espessura da biomembrana também possa ser um parâmetro a ser monitorado no processo de liberação de substâncias, pois pode influenciar a permeação de um fármaco dentro da própria membrana. Neste sentido, é importante destacar que foi possível obter biomembranas de espessuras desejadas, a partir do simples controle da quantidade de látex *in natura* depositada na placa de petri. Apesar de ser um resultado bastante simples, este é um parâmetro importante quando se necessita controlar a reprodutibilidade das características das biomembranas, ao se pensar num processo industrial.

5.1.2. Caracterização estrutural

No intuito de avaliar a utilização das biomembranas de mangabeira em aplicações semelhantes às das biomembranas de seringueira, foram realizados testes que permitissem a comparação estrutural entre os dois tipos de biomembranas. Para isto, foram empregadas as técnicas de análise elementar, análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os resultados destas análises são mostrados nas subseções a seguir.

5.1.2.1. Análise Elementar

Na técnica de análise elementar, os elementos químicos constituintes das substâncias objeto de estudo são identificados e quantificados. Nas análises realizadas para as biomembranas de látex de mangabeira e seringueira, foram avaliadas as quantidades percentuais dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio. Os resultados da análise elementar para as biomembranas estão apresentados na tabela III.

Tabela III – Resultado da análise elementar de amostras de látex de seringueira e mangabeira.

Amostras	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Outros (%)
Mangabeira com água	80 ± 2	11,4 ± 0,1	0,08 ± 0,03	8,5 ± 2,1
Mangabeira com amônia	82 ± 2	11,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	6,2 ± 2,6
Seringueira com água	82 ± 1	11,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	6,1 ± 1,6
Seringueira com amônia	82,0 ± 0,5	11,4 ± 0,1	0,70 ± 0,02	5,9 ± 0,6

Os valores na tabela representam a **média ± desvio padrão** das análises em triplicata.

A tabela III mostra que o principal componente das biomembranas é o carbono, chegando a atingir valores maiores que 80% de sua composição. O hidrogênio possui presença significativa de 11%, enquanto que o nitrogênio é menor que 1%. Sabendo que a soma total dos constituintes da amostra deve ser igual a 100 %, a porção de elementos não identificados por esta análise, está apresentada na tabela como “Outros”. Os dados desta tabela mostram uma grande semelhança entre as quantidades dos principais constituintes das biomembranas. Pode-se destacar que o pequeno aumento observado na quantidade de nitrogênio em algumas amostras está associado à amônia adicionada ao látex.

Os dados obtidos a partir da análise elementar mostram a semelhança entre as biomembranas de látex de mangabeira e seringueira. Além disso, é possível observar que a adição de amônia não provoca mudanças significativas na estrutura das biomembranas.

5.1.2.2. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das biomembranas foi analisada por meio de análise termogravimétrica (TG). Este é um estudo que permite avaliar a influência da temperatura sobre a estabilidade térmica das amostras. Na figura 5.03 apresenta-se as curvas de TG das biomembranas de mangabeira e seringueira, ambas na presença de amônia e na presença de água.

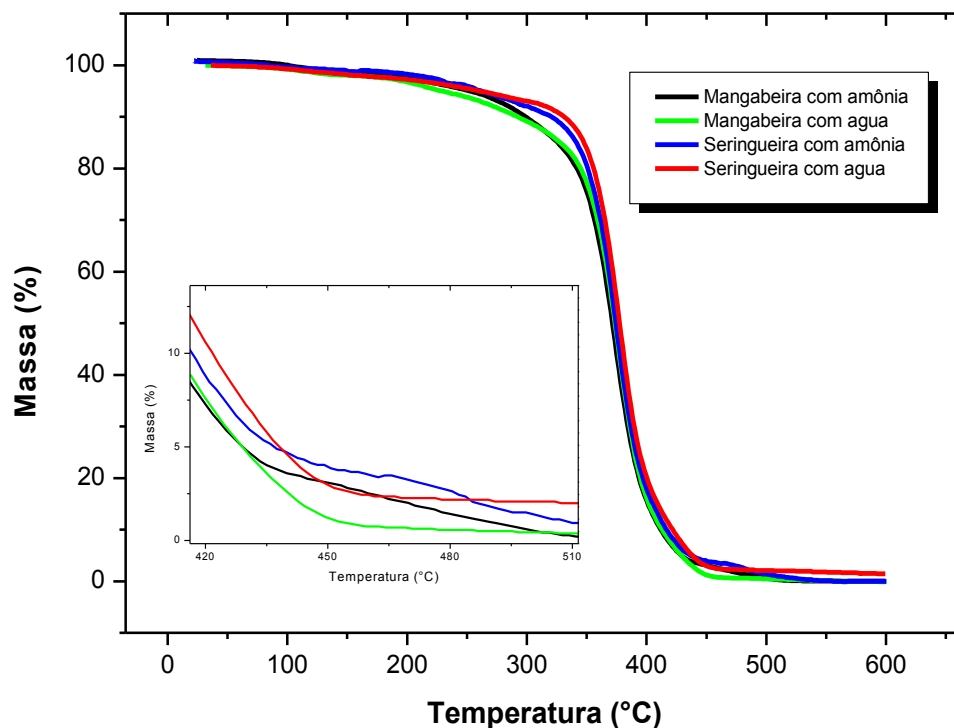


Figura 5.03 - Perda de massa em função do tempo, de amostras de látex de mangabeira com amônia (preta); mangabeira com água (verde); seringueira com amônia (azul) e seringueira com água (vermelha). A região ampliada mostra os comportamentos semelhantes entre as biomembranas preparadas com água e com amônia.

Nota-se, a partir da análise das curvas mostradas na Fig. 5.03, que todas as membranas são termicamente estáveis até aproximadamente 200°C. Acima desta temperatura inicia-se a mais significativa perda de massa pelas biomembranas, onde poder ser observado que as amostras de mangabeira iniciam sua degradação a temperaturas menores do que as de seringueira.

As perdas de massa iniciais (até 200°C) podem estar associadas à liberação de subprodutos de baixa estabilidade térmica presentes no látex, como proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e água. Para temperaturas

superiores a 260°C a perda de massa está associada à formação de novos produtos (aldeídos, cetonas) e por volta de 400°C, à degradação das cadeias poliméricas do poliisopreno [11]. Perdas de massa acima de 420°C podem estar associadas à degradação das cadeias poliméricas mais estáveis. Como pode ser visto na imagem ampliada da figura 5.03, as biomembranas preparadas com água (tanto de mangabeira quanto de seringueira) mostram comportamentos semelhantes no que se refere à estabilização do processo de degradação térmica em torno de 455°C. As biomembranas preparadas com amônia, também mostram comportamentos semelhantes nesta temperatura, porém, nota-se uma pequena banda, que pode ser atribuída ao estabilizante.

A primeira derivada da curva da TG (em função da temperatura ou do tempo) é chamada de DTG e pode ser empregada para identificar as perdas de massa de forma mais clara. As figuras 5.04 (a), (b), (c) e (d), apresentam as curvas TG/DTG das amostras exibidas na figura 5.03.

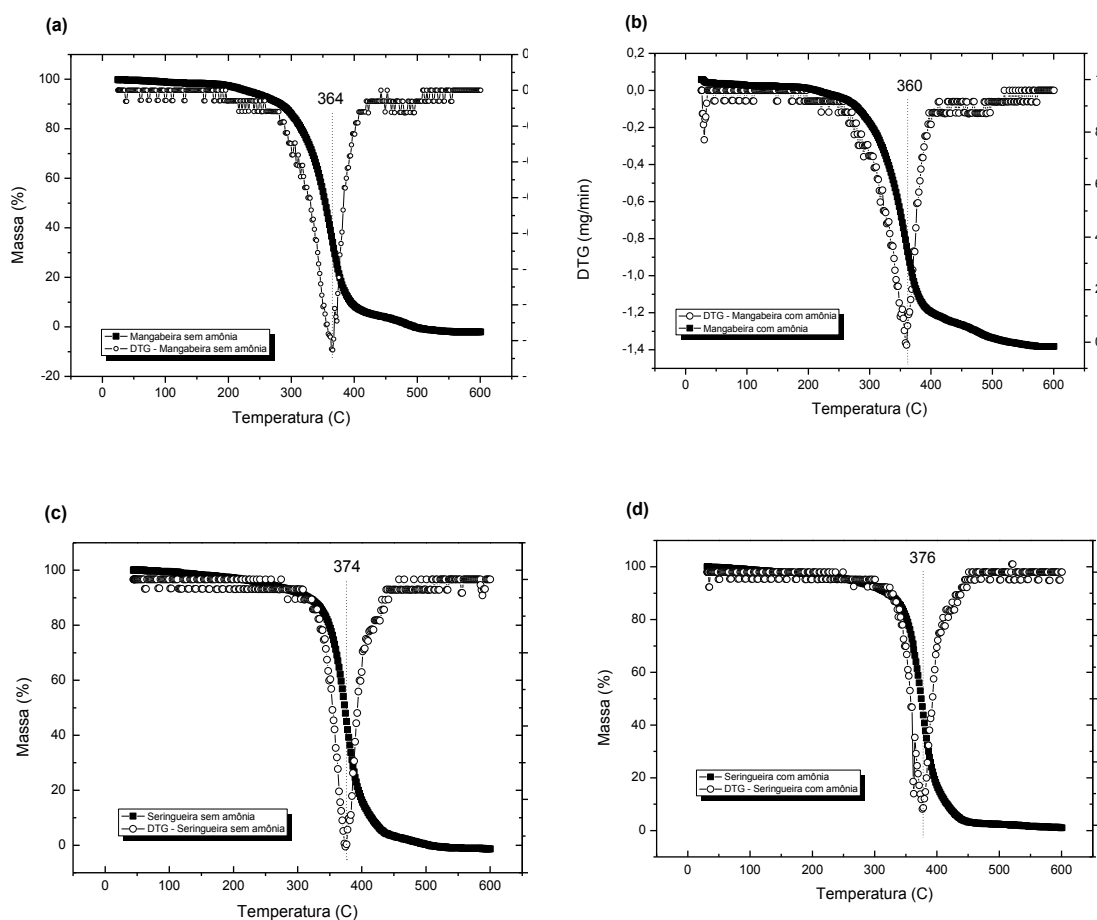


Figura 5.04: Curvas TG/DTG das biomembranas de látex de mangabeira (a) sem amônia, (b) com amônia e látex de seringueira (c) sem amônia e (d) com amônia. As curvas DTG, identificadas pelas curvas com sinal geométrico, mostram exatamente o pico onde há a fase de perda de massa.

A tabela IV apresenta a média das perdas de massa (Δm , %) referentes à principal etapa de decomposição térmica das biomembranas e das temperaturas de pico (T_{pico}) encontradas nas curvas DTG. Pode-se observar que todas as amostras apresentam o pico maior de perda de massa acima de 370°C, sendo a mangabeira em 371°C e a seringueira em 376°C. A comparação das curvas e os resultados exibidos nesta tabela permitem concluir que presença de amônia não influencia significativamente no processo de perda massa das membranas, permanecendo o T_{pico} em torno do mesmo valor. A perda de massa total para todas as biomembranas chegou a cerca de 100% de sua massa inicial.

Tabela IV– Resultados das análises térmicas das biomembranas de látex de seringueira e mangabeira

Amostras	Δm (%)	$T_{\text{pico DTG}}$ (°C)
Mangabeira sem amônia	89,3 ± 3,4	374,5 ± 3,5
Mangabeira com amônia	88,6 ± 0,7	376,5 ± 2
Seringueira sem amônia	87,6 ± 2,4	377,5 ± 0,7
Seringueira com amônia	88,4 ± 1,6	376 ± 3

Os valores na tabela representam a **média ± desvio padrão** das análises em triplicata.

Diante desses resultados pode-se observar comportamentos bem semelhantes entre os dois tipos de biomembranas. A similaridade entre as curvas de TG das duas espécies indica que os mecanismos de decomposição possam ser os mesmos, fato este esperado, já que tanto a mangabeira quanto a seringueira apresentam o cis-1,4-pol-iisopreno como principal constituinte, com poucas modificações na composição de seus látex, podendo ser atribuídas à porção não-borracha [97].

Assim como os resultados da análise elementar, os resultados de TG sugerem que as membranas de seringueira e mangabeira apresentam propriedades bastante semelhantes, fornecendo indicativos de que ambas as biomembranas possam ser utilizadas para os mesmos fins.

5.1.2.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A figura 5.05 mostra os espectros de FTIR obtidos a partir das biomembranas de látex de mangabeira. Foram avaliadas: a influência do estabilizante (água e amônia), o efeito da esterilização por irradiação ionizante, e a comparação com a biomembrana de látex de seringueira.

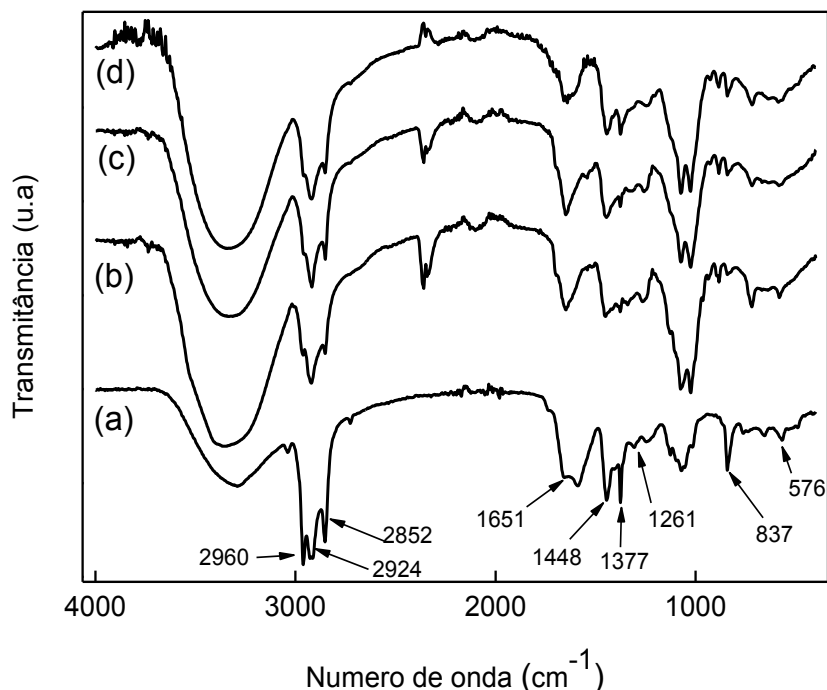


Figura 5.05 - Biomembranas de (a) seringueira, (b) mangabeira estabilizada com água (c) mangabeira estabilizada com amônia e (d) mangabeira irradiada.

Alguns dos vários grupos funcionais presentes no látex de seringueira já estão reportados na literatura através de estudos de FTIR [11, 17, 46]. Na figura 5.05, as setas indicam as principais bandas atribuídas ao cis-1,4-poli-isopreno, o componente majoritário do látex. Pode ser observada a presença do poli-isopreno tanto na biomembranas de seringueira (a) quanto nas de mangabeira (b), (c) e (d). Isto indica uma grande semelhança estrutural entre as biomembranas. Os espectros (c) e (d) mostram, respectivamente, que a presença de amônia, assim como a submissão destas biomembranas à radiação esterilizante, não provocam alterações significativas em suas características estruturais.

As atribuições para as principais bandas de vibração das biomembranas estão associadas ao estiramento de ligações C – H em 2960 cm^{-1} e estiramentos simétricos e assimétricos do grupo CH_3 em 2920 e 2852 cm^{-1} . Na região de 1448 a 1377 cm^{-1} o mesmo grupo (CH_3) sofre torções simétricas e assimétricas [98]. Em 1651 cm^{-1} a banda

é referente à amida I, presente na parte não-borracha do látex [17, 30]. A banda larga, situada na região hidroxil, entre 3700 e 3000 cm^{-1} , tem um máximo de absorção entre 3400 a 3300 cm^{-1} e pode estar relacionada à sobreposição de estiramentos vibracionais de OH e NH_2 , típicos de proteínas e água, oriundos da porção soro [17].

A adição de amônia é uma metodologia comumente empregada nos campos de coleta de látex de seringueira para evitar sua coagulação em um curto intervalo de tempo. Este é um procedimento relevante, pois normalmente a extração é feita em local distante e o tempo entre a coleta e seu processamento pode ser longo. Nesse sentido, foi observado durante este trabalho que, na presença da amônia, o látex de mangabeira refrigerado permanece sem polimerizar por um período de até seis meses. Com base nos espectros de FTIR apresentados, pode-se verificar que não há diferenças significativas entre as membranas estabilizadas com água e as estabilizadas com amônia. Desta forma, esses resultados trazem bons indicativos de que a adição da amônia não afeta a estrutura da biomembrana de mangabeira.

Segundo as normativas da ISO 11137, produtos destinados à aplicação em saúde devem ser submetidos a processos de esterilização, no intuito de evitar infecções por contaminantes como vírus e bactérias [69]. Visando o uso das biomembranas para aplicações *in vivo*, as mesmas devem ser esterilizadas, para que microrganismos, que podem estar presentes no látex *in natura*, sejam eliminados. Este procedimento pode ser efetuado via radiação ionizante, conforme descrito na seção 3.1.3.

Os efeitos de irradiação por raios gama sobre o poli-isopreno foram investigados através das técnicas de DSC e FTIR por Polovková e Cibulková e seus colaboradores [99, 100]. Eles observaram que em altas doses de irradiação gama, o poli-isopreno pode sofrer modificações estruturais devido à sua oxidação. As bandas associadas à oxidação se encontram na região hidroxil, de 3400 a 3290 cm^{-1} . A menores doses, na faixa de 20 a 50 kGy, foi verificada a formação de bandas que são atribuídas a álcoois (3430 – 3440 cm^{-1}), hidroperóxidos (3325 cm^{-1}), cetonas e/ou éteres ([11, 17, 99, 100]. No presente trabalho, as doses de 25 kGy empregadas para a esterilização não provocaram mudanças significativas que possam ser atribuídas tanto à oxidação quanto à formação de outros produtos, mostrando que houve preservação das características estruturais da biomembrana de mangabeira.

Assim como os resultados das análises elementar e termogravimétrica, os resultados de FTIR reiteram a similaridade entre as biomembranas de mangabeira e

seringueira. Desta forma, devido à semelhança entre as características estruturais das biomembranas de látex mangabeira e de seringueira, acredita-se que as biomembranas de mangabeira possuam um grande potencial para diversas aplicações, tais quais as já existentes para produtos oriundos do látex de seringueira.

5.1.3. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) são geralmente utilizadas para analisar materiais sólidos em escala micrométrica [94, 101]. A morfologia dos materiais submetidos a este tipo de análise é visualizada de forma muito nítida, devido ao grande poder de resolução e ampliação deste tipo de aparelho. Utilizando esta técnica, foi avaliada a morfologia das superfícies das biomembranas de mangabeira, conforme apresentado na figura 5.06.

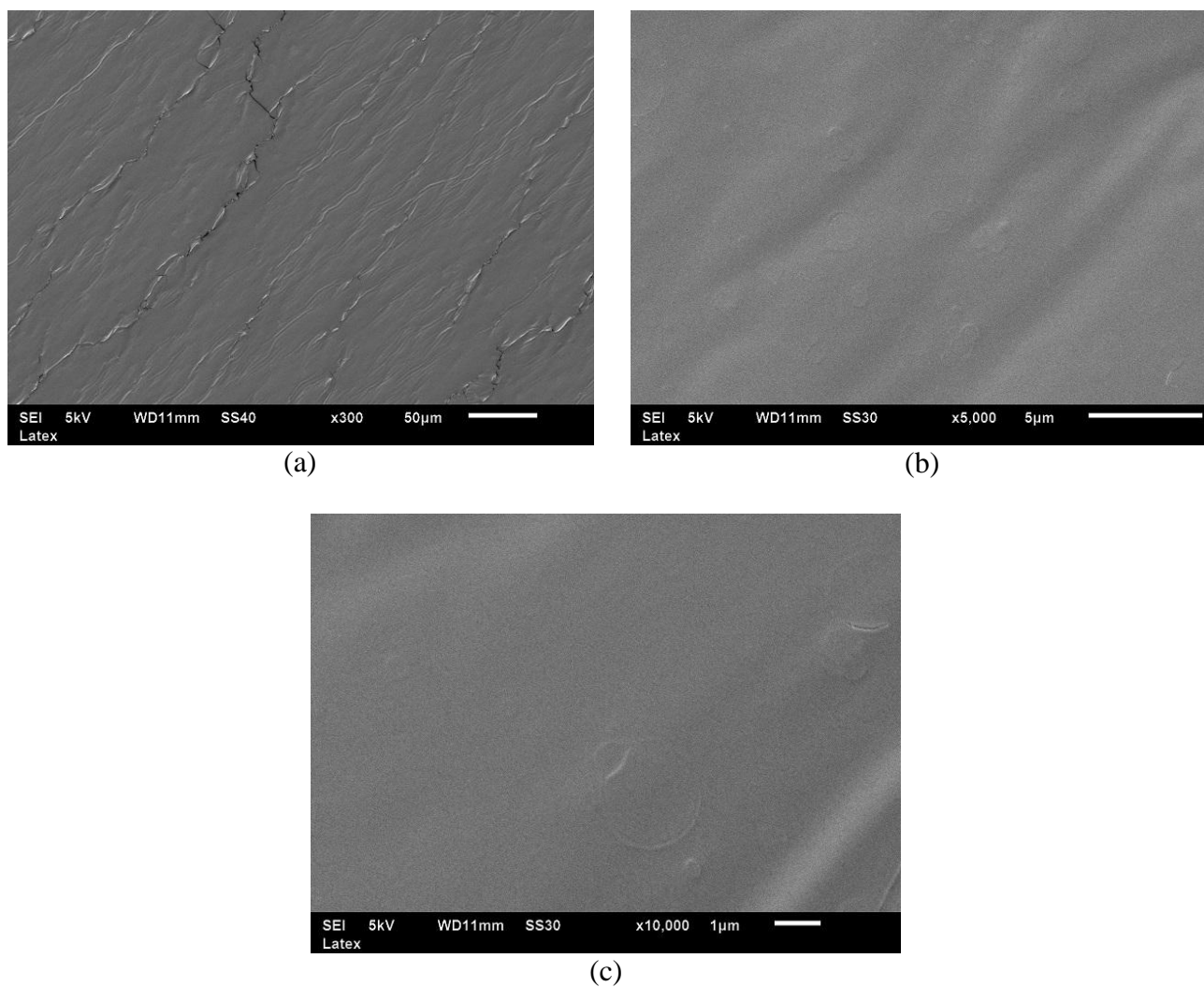


Figura 5.06 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira com magnificações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

A imagem apresentada na Fig. 5.06 (a), com magnificação de 300 vezes, mostra uma região com certa rugosidade. Entretanto, as imagens 5.06 (b) e (c), de maiores magnificações, mostram superfícies aparentemente homogêneas, apresentando pouca rugosidade, bem como ausência de poros.

Herculano e colaboradores (2010) mostraram a influência da temperatura no processo de polimerização e suas consequências para a liberação controlada de fármacos por biomembranas de látex de seringueira. Os resultados revelaram que, na faixa de -100°C a 40°C , a densidade de poros é inversamente proporcional à temperatura do tratamento térmico.

Uma vez que neste trabalho será avaliado o uso da biomembrana como matriz hospedeira é desejada a retenção dos compostos na biomembrana e espera-se que esta apresente uma característica homogênea, sem a presença ou com a mínima densidade de poros. Para tanto, levou-se em conta os resultados obtidos por Herculano e colaboradores (2010), e a temperatura de polimerização escolhida foi de 40°C [17, 18].

A rugosidade observada na imagem 5.06 (a) pode estar associada às deformações provocadas pelo manuseio da biomembrana durante o processo de retirada da placa de petri e fixação no suporte para a análise por MEV.

Desta forma, devido à baixa porosidade das biomembranas produzidas sob as condições escolhidas nesta etapa do trabalho, acredita-se que elas podem apresentar potencial aplicação quando o objetivo é a retenção de compostos e não a permeação ou liberação destes para o meio.

Com o intuito de analisar mais detalhadamente a estrutura interna da biomembrana, ela foi submetida a um processo de fratura manual, após sua imersão em nitrogênio líquido por aproximadamente 5 minutos. Os detalhes da região fraturada analisados por MEV podem ser visualizados na Fig. 5.07.

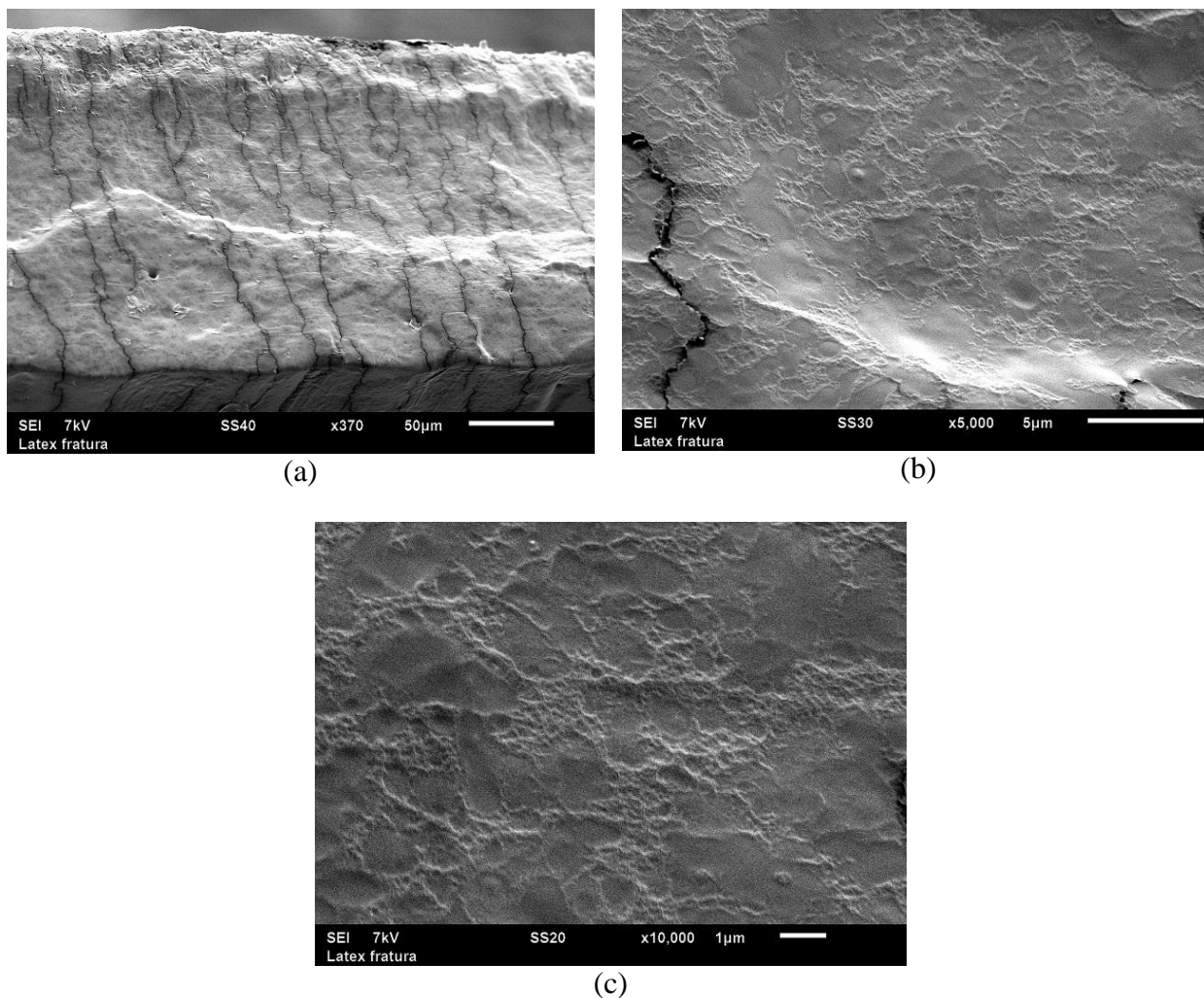


Figura 5.07– Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com magnificações de (a) x 370 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

As fissuras observadas no corte transversal exibidas na Fig. 5.07 (a) (linhas escuras) devem ter surgido devido à imersão da amostra em nitrogênio líquido, visto que este é um efeito característico deste procedimento. Estas microestruturas podem ainda ter surgido devido ao processo de fratura da amostra, ou, tal qual relatado por Agostini (2009), devido à evaporação da água contida no látex.

As imagens 5.07 (a), (b) e (c), em diferentes magnificações sugerem uma biomembrana com o interior bastante irregular, no entanto, sugerem ainda, a pouca formação de poros, os quais poderiam atuar como canais permeadores de quaisquer substâncias inseridas ao látex.

5.2. Biomembrana de látex de mangabeira: matriz hospedeira para materiais luminescentes

Nesta seção será apresentada a avaliação do uso das biomembranas como matrizes hospedeiras para materiais luminescentes. Foram estudados complexos com íons luminescentes de lantanídeos (Eu^{3+}) e moléculas orgânicas fotoluminescentes (porfirinas). Para isto foram empregadas as técnicas espectroscópicas de absorção UV/Vis e emissão fluorescente, FTIR e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na subseção 5.2.1 será apresentado o estudo apenas das biomembranas. Em seguida, nas subseções 5.2.2 e 5.2.3, serão apresentados os efeitos da incorporação de compostos luminescentes às biomembranas.

5.2.1. Avaliação luminescente das biomembranas de mangabeira

A Fig. 5.08 apresenta a curva de transmitância da biomembrana de látex de mangabeira na região do UV/Vis.

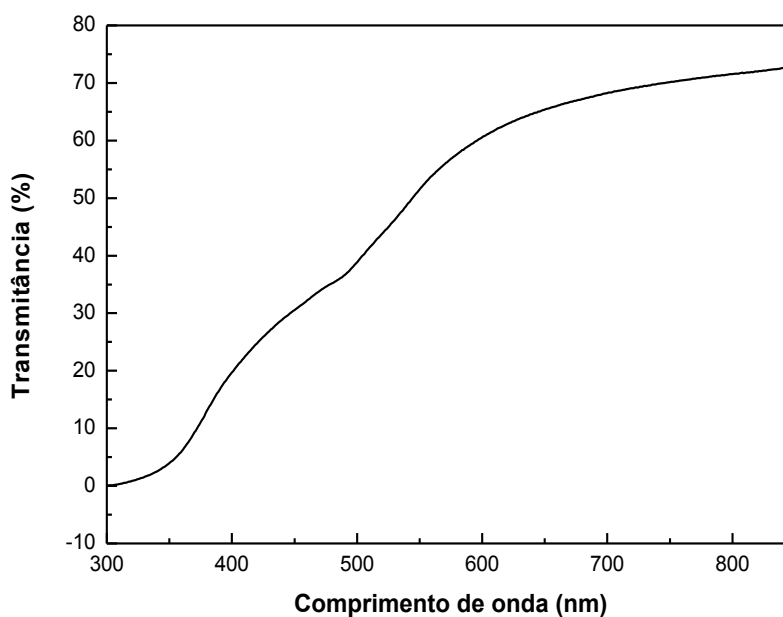


Figura - 5.08- Espectro de transmitância das biomembranas de látex de mangabeira na região do UV/Vis.

A análise da figura 5.08 mostra que a baixa transmitância, apresentada na região de comprimentos de onda menores que 500 nm, reflete a intensa absorção da biomembrana nesta. Pode ser observado que a absorção torna-se ainda mais intensa

para comprimentos de onda menores que 400 nm, o que é um comportamento típico de estruturas orgânicas. [102, 103]. Além disso, também pode ser observada uma pequena banda próxima a 500 nm. Na região acima de 600 nm, nota-se uma região de baixa absorbância.

As características luminescentes da biomembrana foram avaliadas através da técnica de emissão fluorescente. Uma vez que o látex contém diferentes componentes, os quais podem absorver e/ou emitir luminescência em diferentes regiões do espectro eletromagnético, sua emissão foi avaliada de 290 nm a 630 nm, com excitação a cada 5 nm, conforme apresentado na Fig. 5.09.

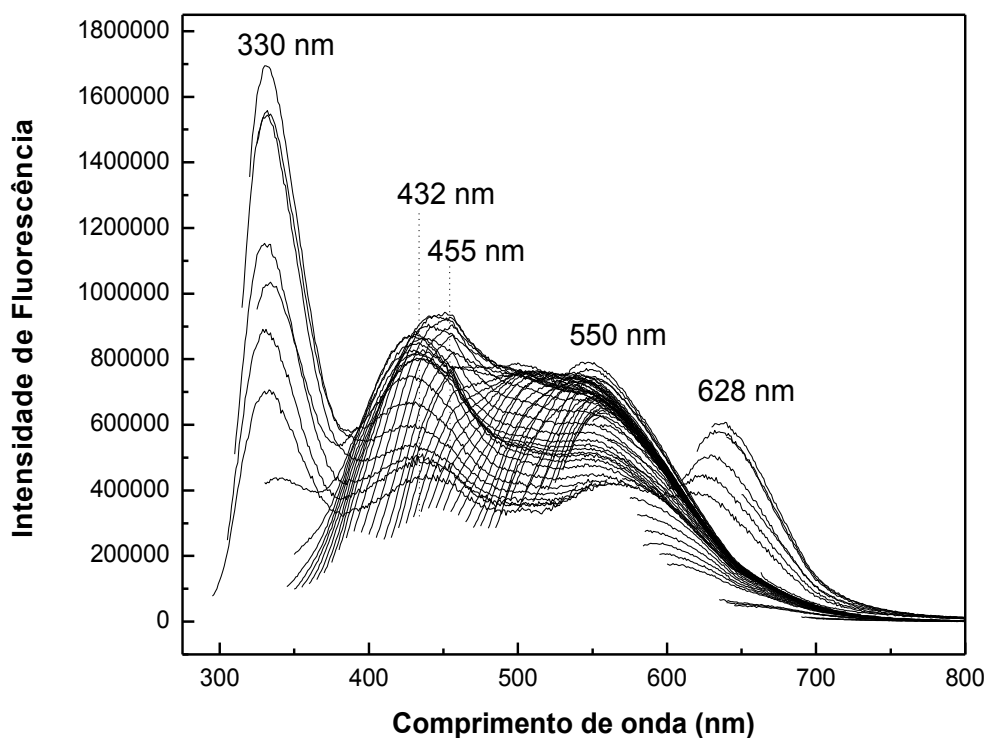


Figura 5.09 – Espectros de emissão da biomembrana de látex de mangabeira excitada desde 290 a 630 nm, em intervalos de 5 nm. Os valores indicam o pico das principais bandas

Na Fig. 5.10 são apresentadas as principais bandas da emissão fluorescente identificadas a partir dos espectros apresentados na Fig. 5.09. Estão indicados tanto os principais picos de emissão (330, 432, 455, 550 e 634 nm) quanto os comprimentos de onda de excitação utilizados (300, 330, 360 e 490 nm).

A partir da identificação das principais bandas de emissão, foram obtidos os espectros de excitação, que permitem determinar as bandas responsáveis por dada emissão. O espectro de excitação é obtido fixando o comprimento de onda de emissão e

varrendo os comprimentos de onda de excitação. Desta forma, pode-se dizer que este espectro é o correspondente ao espectro de absorção da amostra. Os espectros de excitação obtidos estão apresentados na Fig. 5.11.

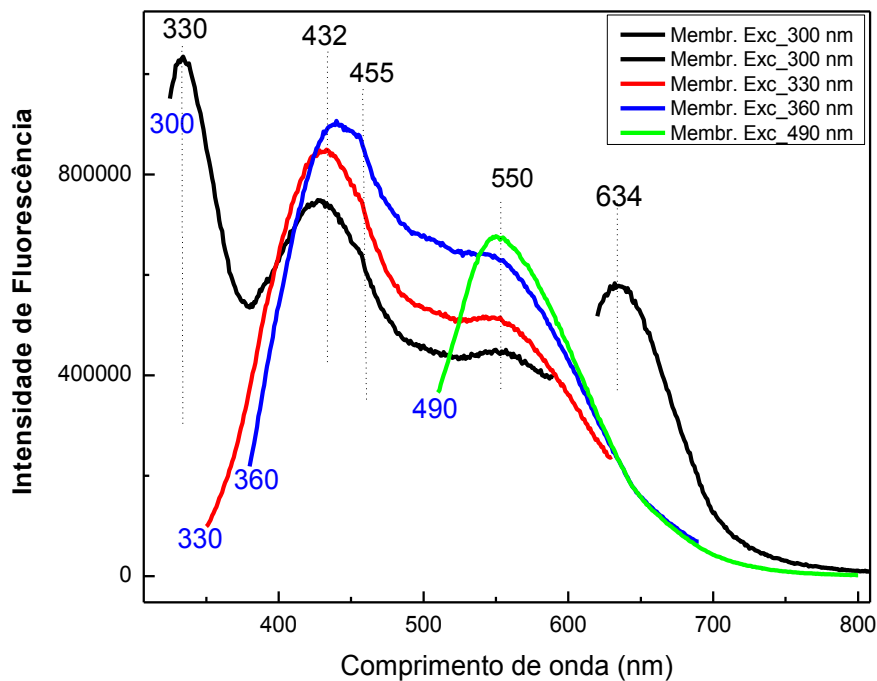


Figura 5.10– Principais bandas observadas no espectro de emissão das biomembranas de látex de mangabeira obtidos em diferentes comprimentos de onda de excitação. Os valores abaixo das curvas indicam o comprimento de onda de excitação e os valores acima das curvas os picos das principais bandas.

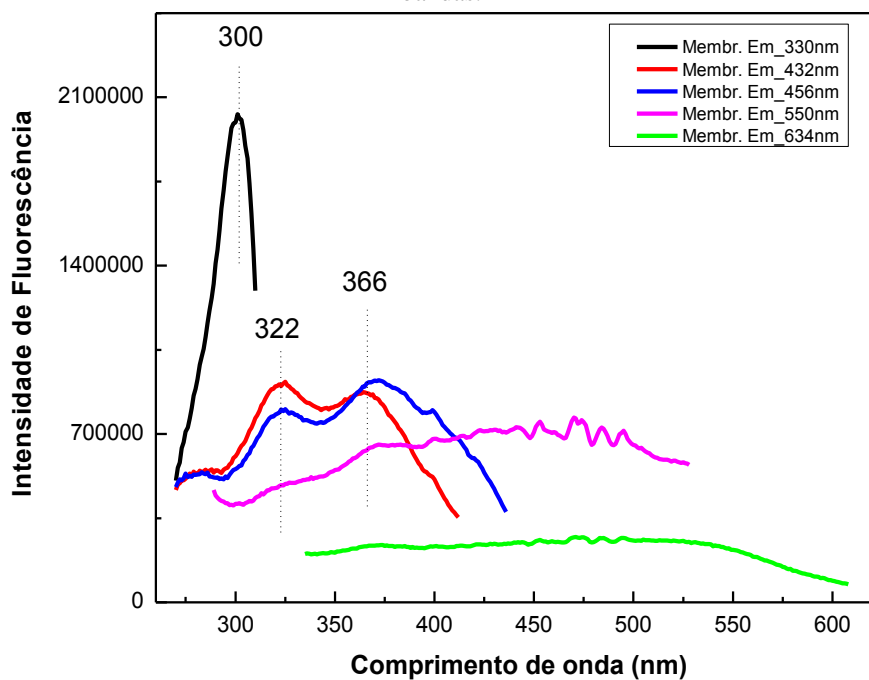


Figura 5.11– Espectros de excitação da biomembrana de látex de mangabeira obtidas analisando suas principais bandas de emissão (330, 432, 456, 550 e 634 nm).

A Fig. 5.10 mostra que a excitação em 300 nm (linha preta) provoca emissão, gerando quatro bandas centradas em 330, 432, 550 e 634 nm. A excitação em 330 nm (linha vermelha) gera duas bandas: em 432 e em 550 nm. Para a excitação em 360 nm (linha azul) identifica-se diretamente a banda em 550 nm e percebe-se um deslocamento da banda de 432 para 438 nm. Além disso, mostra um pequeno ombro em 455 nm. A excitação em 490 nm gera apenas uma banda em 550 nm.

Diante dos resultados apresentados, pode-se observar que as bandas de emissão em 432 e 550 nm foram observadas em quase todos os espectros (Fig. 5.09 e 5.10). Entretanto, as bandas em 330 e 634 nm foram observadas apenas para excitação próxima de 300 nm. Indicativo de que existe mais de uma espécie na biomembrana (fluoróforos) responsável pela sua emissão.

Através dos espectros de excitação apresentados na figura 5.11 é possível visualizar que os fluoróforos que emitem na região entre 432 e 550 nm, absorvem na região de 300 a 400 nm, com bandas bem definidas em 322 e 366 nm. A espécie que emite em 330 nm corresponde a um fluoróforo que absorve intensamente em 300 nm. Para a emissão em 550 nm, verifica-se uma pequena contribuição das bandas de 322 e 366 nm juntamente com uma banda larga entre 400 e 550 nm. A espécie que emite em 634 nm mostra uma banda larga que vai de 350 a 600 nm.

É importante destacar que através dos espectros de excitação pôde-se identificar as bandas de absorção da biomembrana, o que não foi possível através do espectro de transmitância devido às intensas absorções na região próxima do UV, conforme apresentados na figura 5.09. Além disso, os resultados das bandas de emissão indicam a existência de ao menos dois fluoróforos presentes na biomembrana.

Uma vez caracterizada as propriedades espectroscópicas e luminescentes da biomembrana, será avaliado seu uso como matriz hospedeira para compostos luminescente nas próximas seções.

5.2.2. Caracterização das biomembranas de mangabeira como matrizes para o complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$

Na presente seção será avaliada a inserção do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ ao látex, visando a obtenção de biomembranas com propriedades luminescentes. Para este estudo

foram empregadas as técnicas espectroscópicas de absorção UV/Vis, emissão fluorescente e FTIR, além de análise via MEV.

A luminescência do íon Eu^{3+} é bastante conhecida na literatura, com uma intensa emissão na região do visível e máxima eficiência em 612 nm [62, 63, 77]. Entretanto, para intensificar a luminescência do Eu^{3+} , geralmente se usa associá-lo com alguns ligantes orgânicos [77, 78]. Neste sentido, o Eu^{3+} tem sido preparado em TTA, onde foi observado um significativo aumento em suas propriedades luminescentes [78].

Uma vez que o complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ se encontra na forma de pó, o espectro de sua absorvância foi obtido através da análise da reflectância, que fornece informação similar a seu espectro de absorção, conforme apresentado na Fig. 5.12.

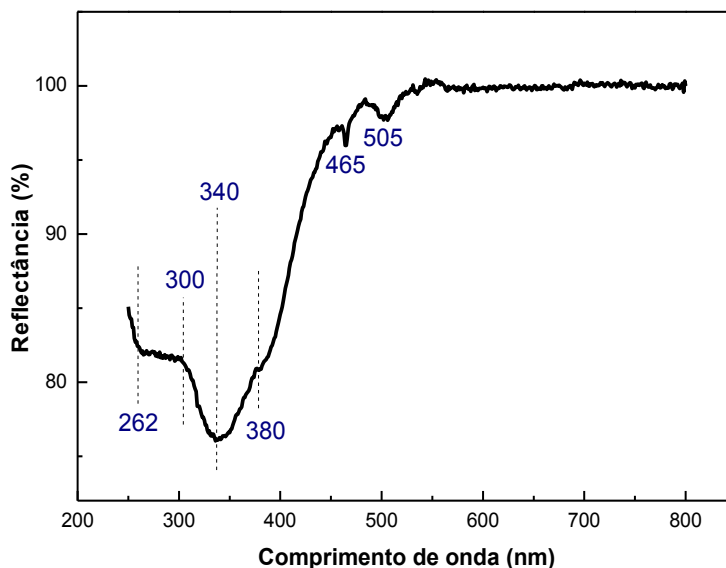


Figura 5.12 - Espectro de reflectância do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó obtido por meio da técnica de reflectância difusa.

O espectro de reflectância do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ apresentado na Fig. 5.12 mostra uma intensa absorção entre 260 e 450 nm. Pode ser identificada uma banda com absorção em 340 nm e outras bandas de menor intensidade em 465 e 505 nm. Pode ser observado ainda um pequeno ombro em 384 e em 262 nm. Na região de 560 a 800 nm houve grande reflexão do composto, indicando uma baixa absorção. O espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ solubilizado em álcool isopropílico (iPrOH) está apresentado na Fig. 5.13, cujos comprimentos de onda de excitação foram selecionados de acordo com as bandas mencionadas acima.

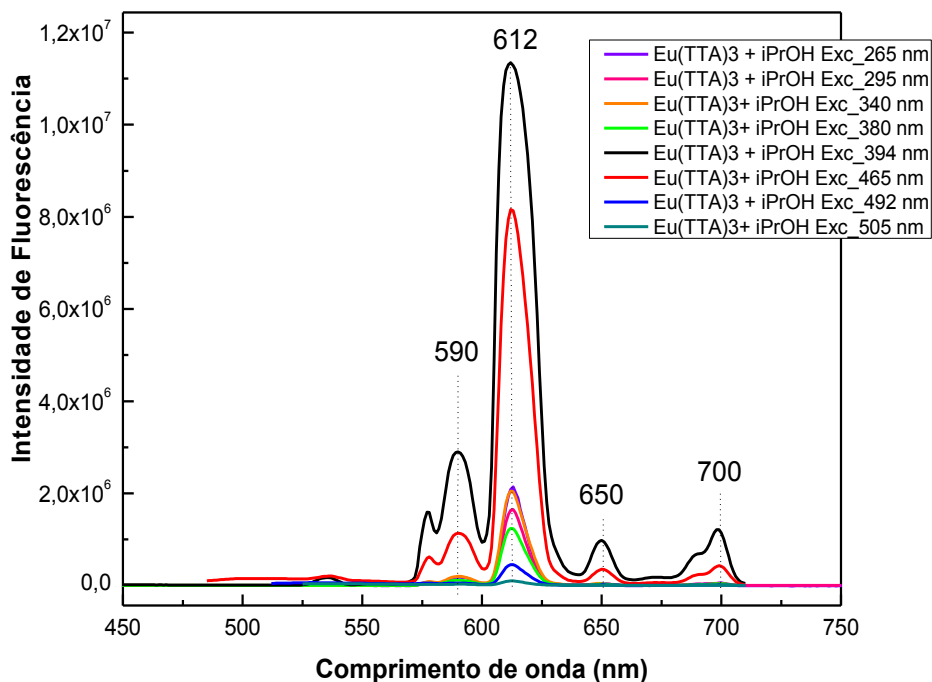


Figura 5.13 - Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ obtidos com excitações em diferentes comprimentos de onda (265, 295, 340, 380, 394, 465, 492 e 505 nm).

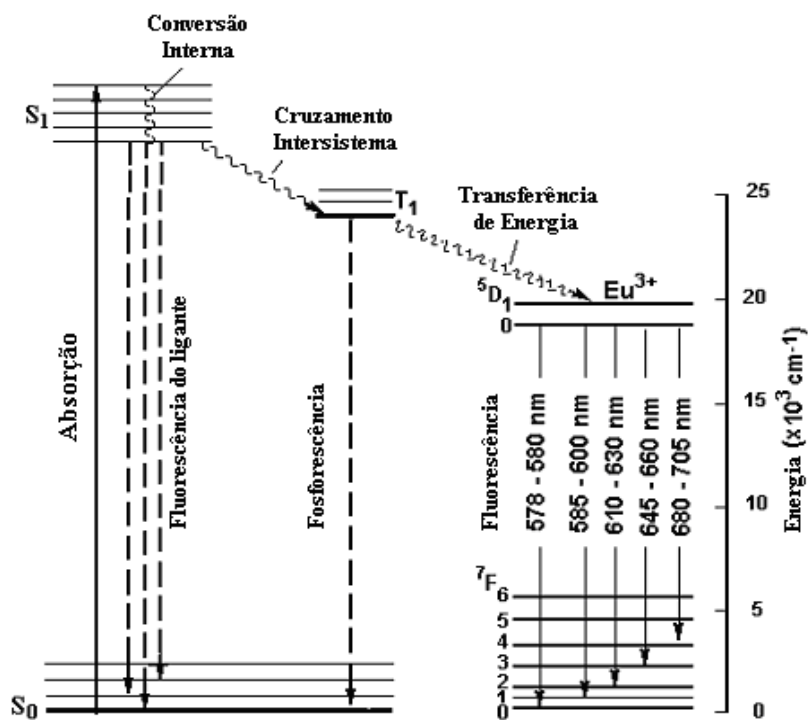


Figura 5.14 - Mecanismo de emissão de fluorescência do íon Eu^{3+}

O espectro de emissão do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ apresentado na figura 5.13 mostra, além da banda relativa ao comprimento de onda de máxima eficiência (612 nm), outras bandas

bem definidas em 577, 590, 650, e 700 nm. Estas cinco bandas de emissão são bem conhecidas. Elas correspondem à transição de ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J= 0-2$) do íon Eu^{3+} , especificamente: ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (577 nm), ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (590 nm), ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (612 nm), ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_3$ (650 nm) e ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ (700 nm), como pode ser visto no diagrama da figura 5.14. É importante destacar que, diferentemente das biomembranas apenas com látex, o espectro de emissão do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ foi independente do comprimento de onda de excitação.

Conforme relatado na seção 5.2.1, as características luminescentes da biomembrana foram avaliadas através da análise de sua absorção e também de sua emissão com excitação em diferentes comprimentos de onda. Da mesma forma, a biomembrana contendo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ foi avaliada e os espectros de emissão e excitação são mostrados nas Figuras 5.15 e 5.16.

Os comprimentos de onda utilizados para a excitação da biomembrana com $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ (265, 300, 340, 380, 465 e 505 nm) foram escolhidos a partir do espectro do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó (Fig. 5.12). A excitação em 495 nm ocorreu devido à absorção característica da biomembrana, conforme apresentado na Fig. 5.08, a qual coincide com a uma região de baixa absorção do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$.

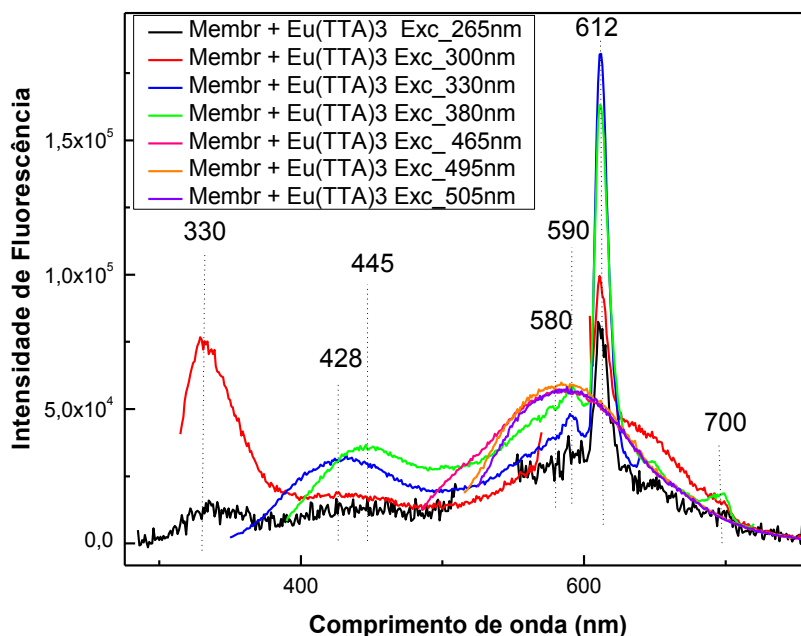


Figura - 5.15 - Principais bandas observadas no espectro de emissão das biomembranas de látex de mangabeira utilizadas como matrizes para incorporação de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação (295, 300, 330, 380, 465, 495 e 505 nm).

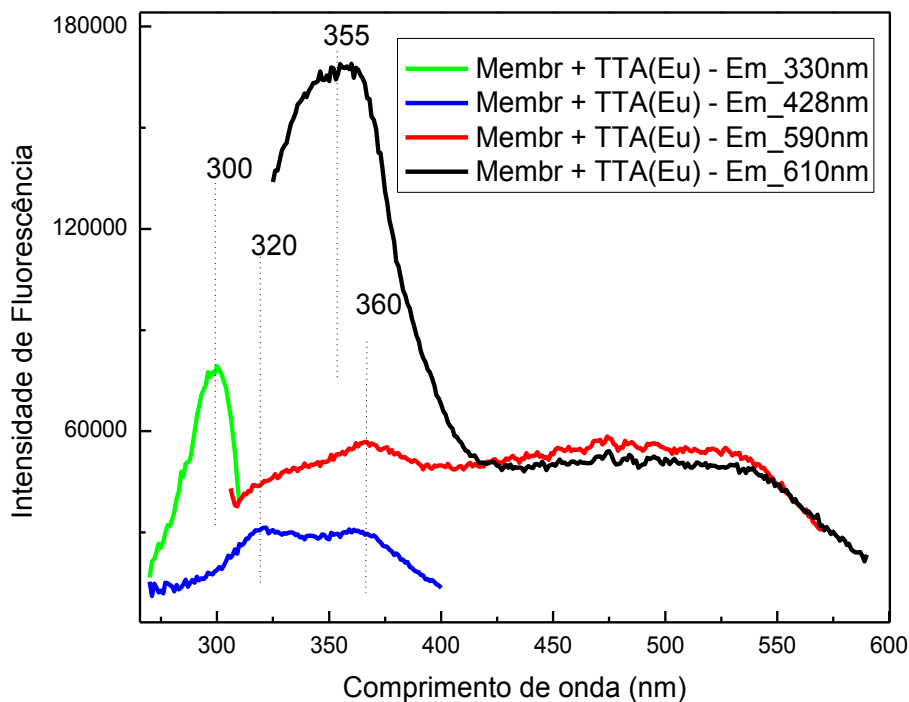


Figura 5.16 – Espectros de excitação das principais bandas observadas para as biomembranas de látex de mangabeira utilizadas como matrizes para incorporação de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ obtidos ao analisar as principais bandas de emissão (330, 428, 590 e 610 nm).

No espectro apresentado na figura 5.15, pode-se observar que a biomembrana com o complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ apresenta a combinação das principais bandas de emissão de ambos constituintes: as bandas estreitas e localizadas do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em 590, 612 e 700 nm e as bandas largas da biomembrana em 330, 465 e 580 nm. Entretanto, as principais bandas de emissão atribuídas ao $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ não foram observadas para excitações em 465, 495 e 505 nm. Entretanto, elas poderiam ter sido encobertas pela emissão característica da biomembrana.

Os espectros de excitação mostrados na figura 5.16 permitem que sejam visualizadas mais claramente as regiões de absorção dos fluoróforos da biomembrana contendo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$. Novamente, as bandas em 300, 320 e 360 nm, indicam as espécies absorvedoras relativas às biomembranas. Já a região entre 350 e 360, responsável pela emissão em 612 nm, pode ser atribuído ao complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$. A emissão em 612 nm também é gerada por uma banda larga entre 450 e 550 nm. A banda de emissão em 590 nm, é gerada por uma banda larga desde 300 a 560 nm.

Para avaliar a incorporação do complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ às biomembranas, também foi empregada a técnica de FTIR. A figura 5.17 mostra os espectros do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ em pó

(a), da biomembrana de mangabeira livre do composto (b) e da biomembrana utilizada como matriz para o $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ (c).

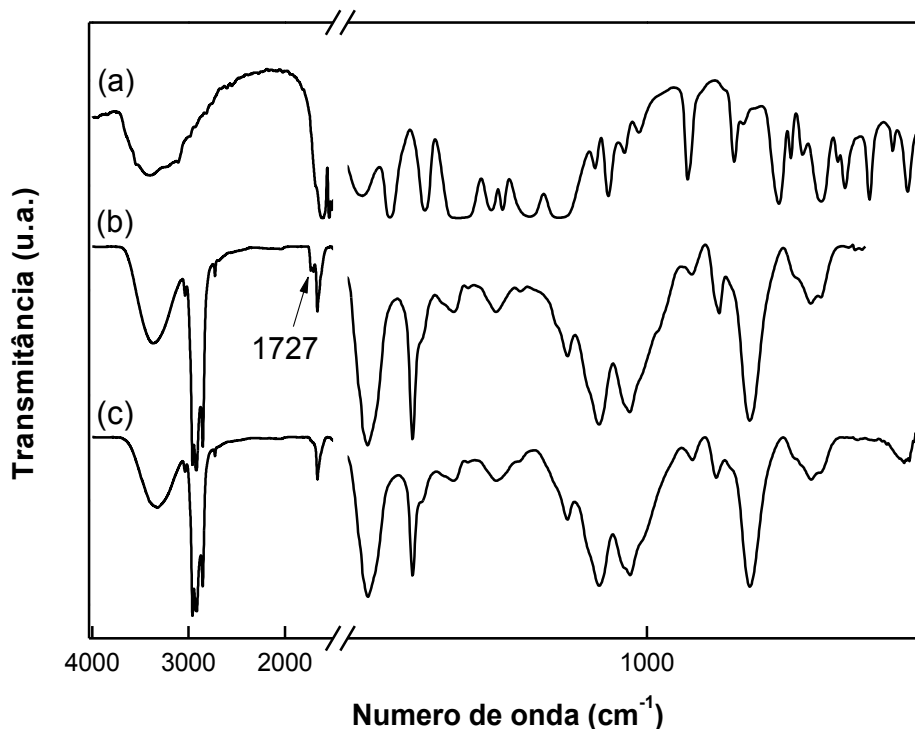


Figura 5.17 – Complexo $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ em pó (a), Biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ (c).

A Fig. 5.17(a) apresenta o espectro do complexo $\text{Eu}(\text{TТА})_3$, onde pode-se observar maior concentração de bandas entre 1.700 e 500 nm. A banda na região hidroxil, referente aos grupos OH, pode ser atribuída à água presente no complexo. A comparação entre espectros (b) e (c), relativos às biomembranas sem e com $\text{Eu}(\text{TТА})_3$, respectivamente, permitem inferir que a presença do complexo na biomembrana, não produz alterações significativas no seu espectro no infravermelho. Além disso, pode ser observado que as estruturas da matriz de látex permaneceram praticamente preservadas devido ao processo de inserção do composto luminescente. Observou-se apenas uma redução na intensidade da banda em 1727 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento simétrico de C=O em ésteres [98, 104]. Isto pode estar associado à ligação do complexo $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ com estes grupamentos ésteres presentes no látex.

O processo de obtenção da biomembrana contendo $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ foi realizado visando o preparo de uma matriz hospedeira que apresentasse uma superfície lisa e homogênea. Para avaliar estas condições, a biomembrana contendo $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ foi analisada através de imagens de MEV. A figura 5.18 exibe uma imagem da

biomembrana preparada com o próprio pó do $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ dissolvido diretamente no látex. A imagem mostra, claramente, a formação de grumos na biomembrana.

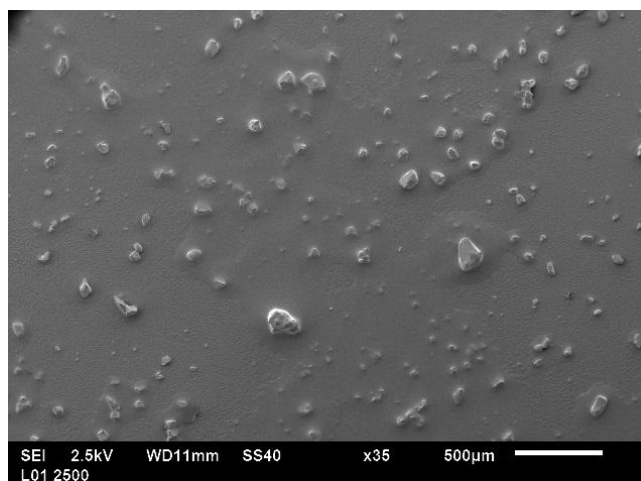


Figura 5.18 - Biomembrana preparada com $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ em pó, na ausência de solvente. Magnificação de x 35.

Apesar de reter uma grande quantidade de material luminescente, propiciando uma biomembrana que pudesse apresentar forte emissão devido ao íon Eu^{3+} preservado e sem influência de algum solvente, o objetivo principal é a formação de uma matriz lisa e uniforme. Desta forma, foi testada a solubilidade do $\text{Eu}(\text{TТА})_3$ em diferentes solventes antes de dissolvê-lo no látex *in natura*. A melhor solubilidade do composto foi verificada em isopropanol. As imagens da biomembrana com $\text{Eu}(\text{TТА})_3$, solubilizado em isopropanol, são mostradas pelas micrografias mostradas na Fig. 5.19.

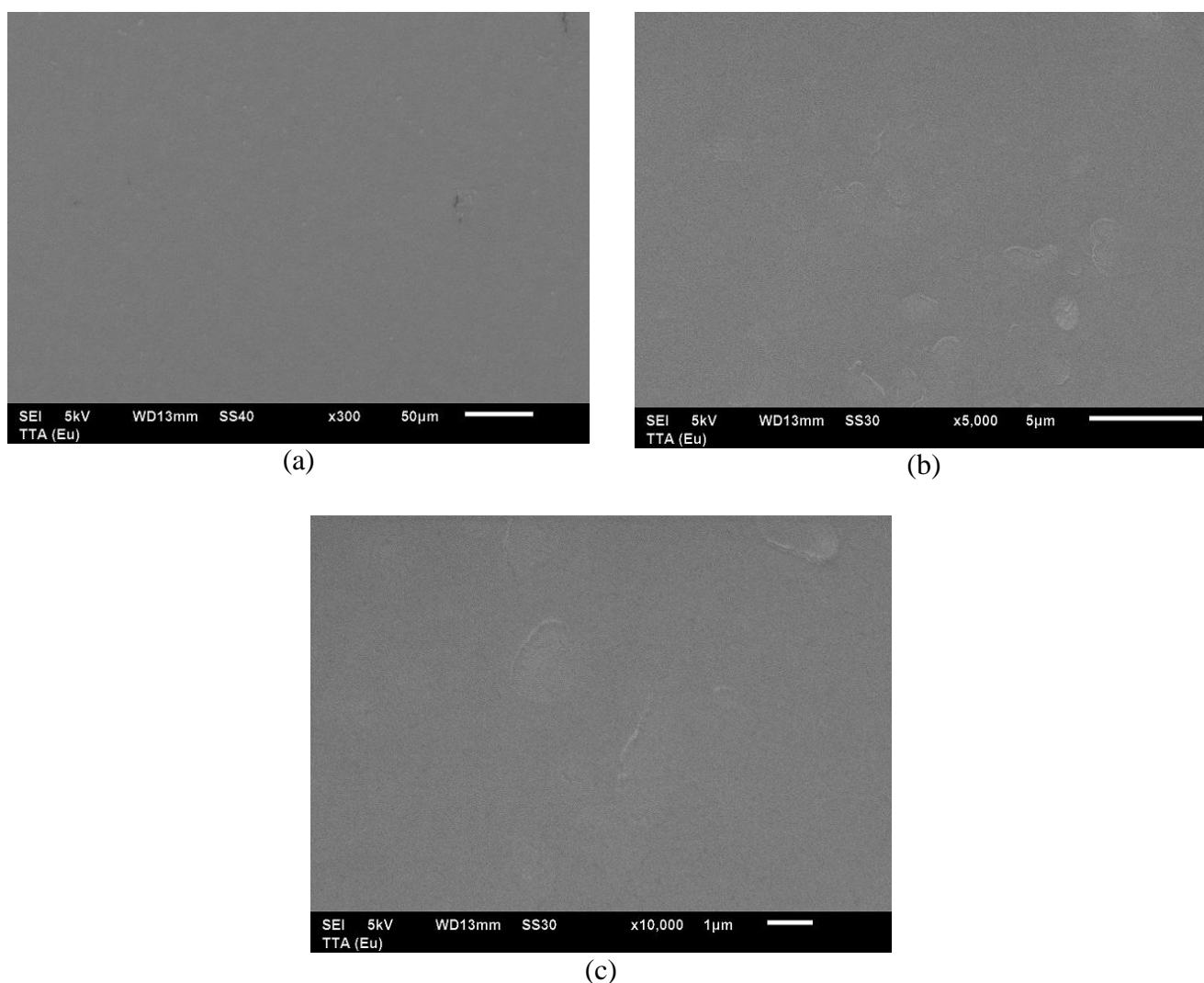


Figura 5.19 – Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$, com magnificações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

Pelas imagens mostradas em 5.19(a), (b) e (c) pode-se observar novamente o aspecto liso e homogêneo, encontrado nas biomembranas preparadas apenas com o látex. Além disso, também pode ser observada a inexistência de regiões com rugosidade e porosidade. Esta homogeneidade sugere que a solução de $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ solubilizada em isopropanol foi devidamente incorporada ao látex.

O processo de fratura realizado com o uso de nitrogênio líquido, previamente descrito na seção 5.2.1, também foi realizado para as biomembranas contendo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ e estão apresentados na Fig. 5.20.

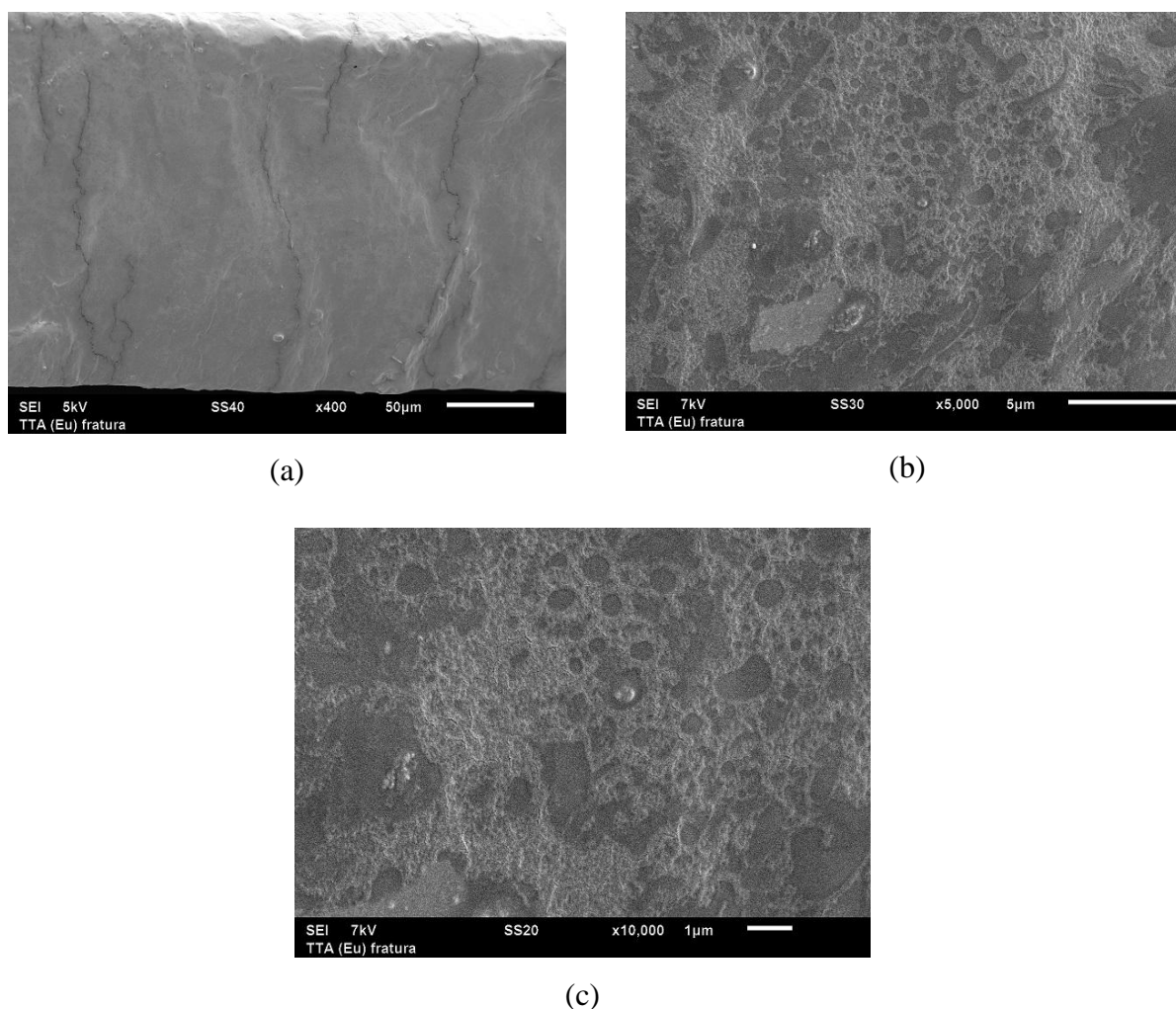


Figura 5.20 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com magnificações de (a) x 400 (b) x 5,000 e (c) x 10,000.

As imagens 5.20(a), (b) e (c), que apresentam o corte transversal da biomembrana em diferentes magnificações, indicam a ausência de poros em sua estrutura. As irregularidades observadas para as amostras apenas de látex repetem-se para esta biomembrana. Estas regiões de irregularidade mostram grânulos (visualizados pelos pontos brilhantes na imagem) alusivos ao complexo $\text{Eu}(\text{TTA})_3$, que pode não ter sido solubilizado completamente pelo álcool isopropílico.

Os resultados de FTIR mostrados nesta seção sugerem que a biomembrana não sofreu alterações significativas em sua estrutura. Além disso, foi obtida uma matriz hospedeira de superfície lisa e homogênea, que pode combinar propriedades físicas (como flexibilidade e resistência), e luminescentes da biomembrana às características luminescentes dos compostos inseridos. Os dados apresentados nesta seção sugerem que a biomembrana de látex pode ser utilizada como matriz hospedeira para compostos

luminescentes inorgânicos, pois além de não alterar o comportamento luminescente do $\text{Eu}(\text{TTA})_3$, preserva suas principais bandas de emissão.

5.2.3. Biomembranas de mangabeira como matrizes para moléculas orgânicas fluorescentes

Nesta subseção será avaliada a incorporação de moléculas orgânicas fluorescentes de porfirinas às biomembranas. Inicialmente será apresentada a caracterização das amostras em solução aquosa e em seguida sua incorporação nas biomembranas. Na Fig.5.21 são apresentados os espectros de absorção das porfirinas aniônica (TPPS) e catiônica (TMPP) em solução aquosa.

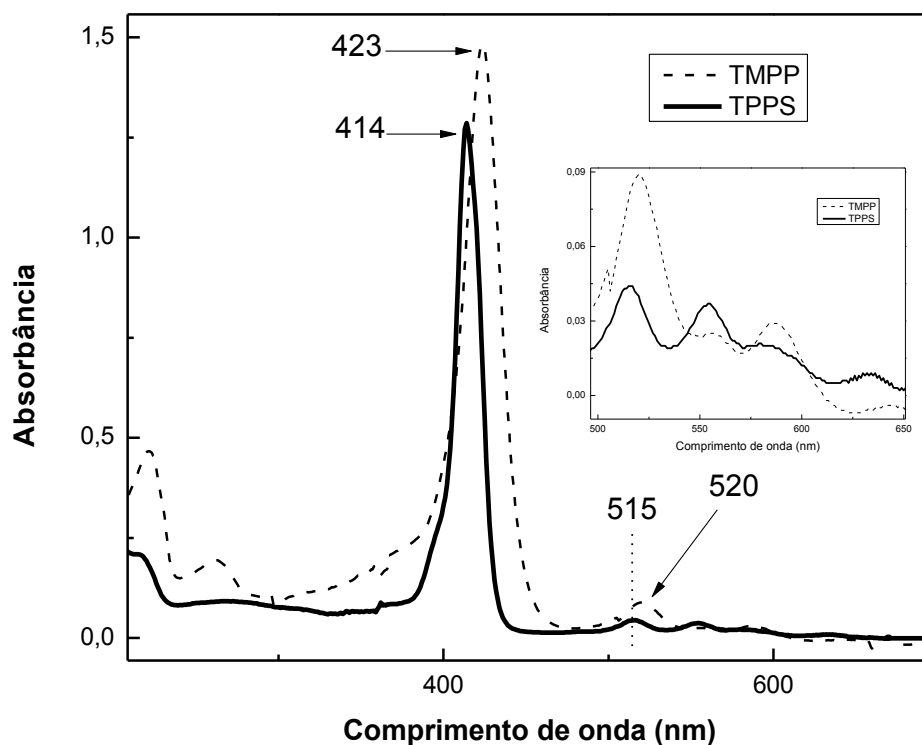


Figura 5.21 – Espectro de absorção das porfirinas diluídas em água. A banda de intensa absorção, em torno de 400 nm é conhecida como banda de Soret, ou banda *B*. As outras bandas características das moléculas, entre 500 e 650 nm, são chamadas de bandas *Q*.

Através da figura 5.21 é possível visualizar a região de mais intensa absorção das porfirinas (banda *B*, ou banda de Soret). Para a TMPP esta banda é centrada em 423 nm e para a TPPS em 414 nm. As porfirinas também possuem uma região de menor

absorção (bandas Q) que se encontra entre 490 a 680 nm. Dentre as bandas Q, a mais intensa para a TMPP se encontra em 520 nm e para a TPPS em 515 nm.

Os espectros de emissão das porfirinas em solução aquosa estão mostrados na figura 5.22. Pode-se observar que a porfirina TMPP apresenta banda larga de emissão com pico em 665 nm. A TPPS apresentou três bandas, sendo a mais intensa centrada em 640 nm.

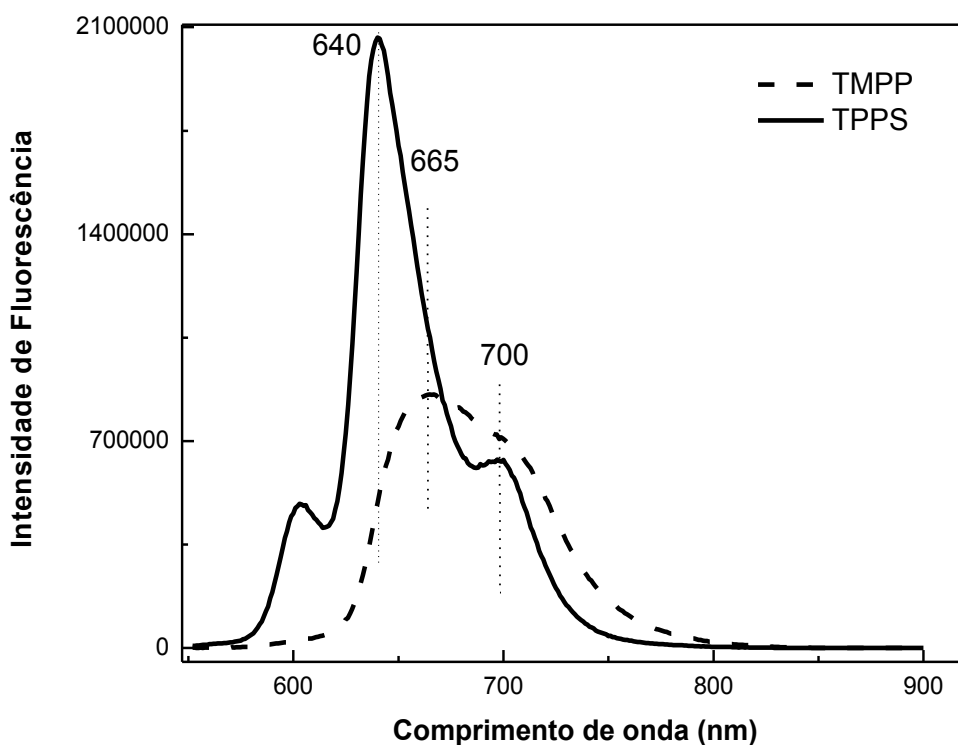


Figura 5.22 - Espectro de emissão fluorescente das porfirinas TMPP (linha pontilhada) e TPPS (linha contínua) diluídas em água.

A Fig. 5.23 apresenta o espectro de transmitância das biomembranas com as moléculas orgânicas de porfirinas já incorporadas, conforme procedimento descrito na seção 3.2.2.1.

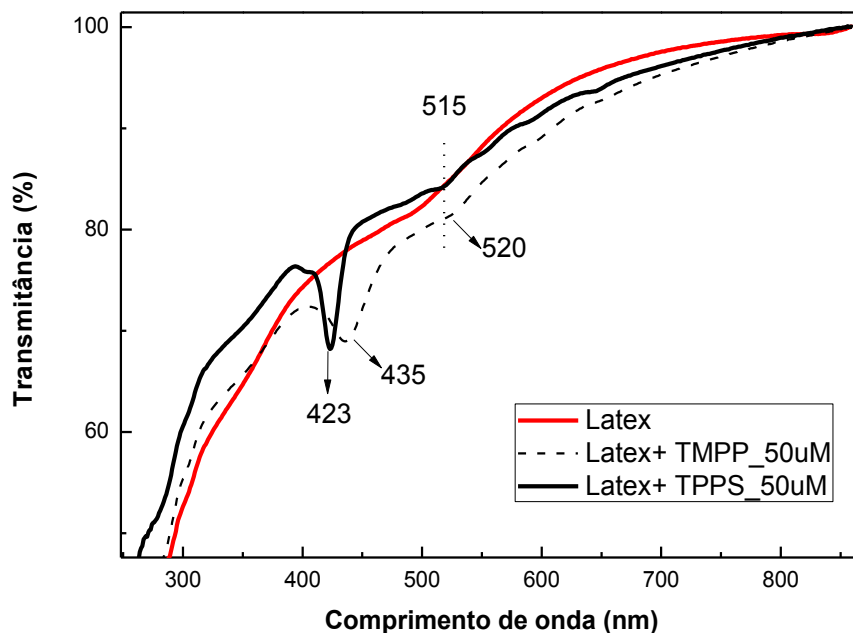


Figura 5.23 – Espectro de transmissão das porfirinas incorporadas às biomembranas. A banda com transmissão reduzida indica intensa absorção, em torno de 400 nm.

Os espectros de transmissão da figura 5.23 mostram a presença das bandas características das porfirinas, (entre 420 e 440 nm e entre 515 e 650 nm) quando incorporadas às biomembranas. Para a banda de Soret, pode ser verificado um deslocamento para o vermelho, de 9 nm, para a TPPS e 12 nm para a TMPP. Este efeito está associado à mudança de ambiente sofrida pelas amostras ao serem incorporadas ao látex. Entretanto, é interessante observar que este deslocamento não foi observado para as bandas de menor intensidade (bandas Q). Pode-se observar ainda a presença da banda característica da biomembrana em 500 nm, como identificada previamente nos resultados mostrados nas seções 5.2.1 e 5.2.2.

As análises da incorporação das porfirinas nas biomembranas serão realizadas separadamente a partir deste ponto. Para as biomembranas contendo TPPS, os espectros de emissão, mostrados na Fig. 5.24, foram obtidos a partir de diferentes comprimentos de onda de excitação. Estes foram selecionados devido às bandas de maior absorção, que conforme a Fig. 5.23, estão centradas em 435 nm (banda de Soret) e 515 nm (na banda Q). As bandas em 300, 400 e 500 nm, foram escolhidas por estarem relacionadas às bandas da biomembrana de látex.

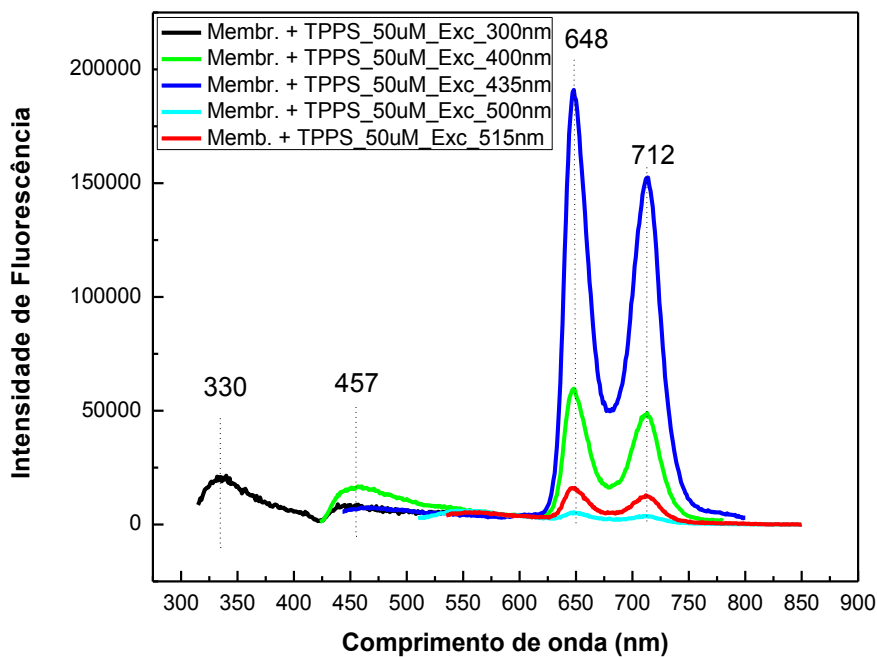


Figura 5.24 - Espectros de emissão da biomembrana utilizada como matriz para a porfirina TPPS.

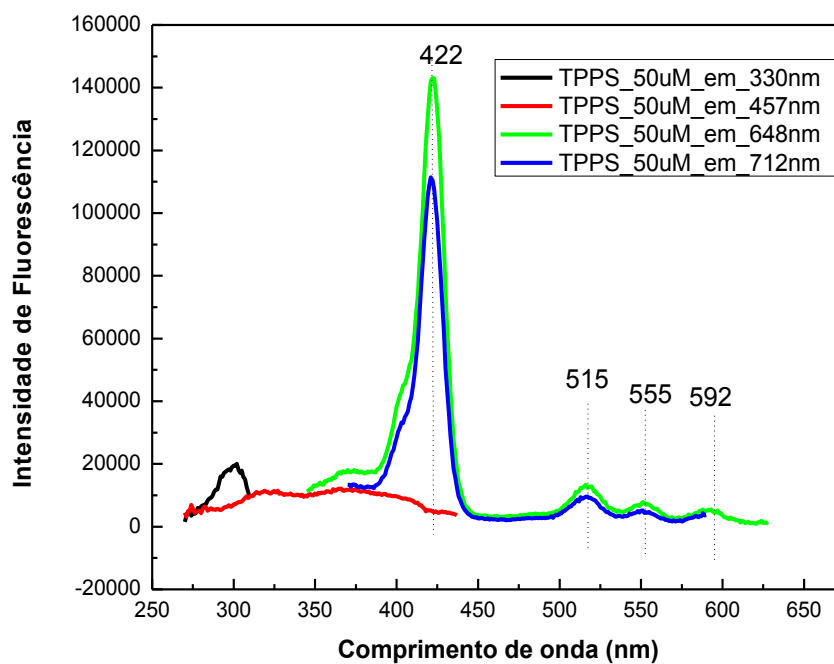


Figura 5.25 - Espectros de excitação das biomembranas utilizadas como matrizes para a porfirina TPPS.

Através dos espectros de emissão (figura 5.24) pode-se observar a formação de duas bandas de emissão bem distintas, centradas em 648 e 712 nm, para todos os comprimentos de onda de excitação. Estas bandas estão atribuídas à emissão da TPPS,

conforme as figuras 5.21 e 5.23. Além disso, pode ser identificado um deslocamento para o vermelho de 7 e 10 nm, para estas bandas em 648 e 712 nm, respectivamente. A máxima emissão foi observada para o 435 nm e corresponde à excitação do pico de maior absorção da TPPS na biomembrana. Enquanto que a menor emissão, para a excitação em 500 nm, corresponde a uma região de baixa absorção da porfirina e grande absorção para o látex. Pode ser observado ainda, que as bandas de emissão da porfirina são muito mais intensas que as da biomembrana.

A figura 5.25 mostra os espectros de excitação destas biomembranas. Fica claro que as bandas de absorção responsáveis pelas emissões em 648 e 712 nm, são características da porfirina TPPS (Soret, em 422 nm e bandas Q, em 515, 555, 592 nm). Enquanto que as bandas responsáveis pelas emissões em 330 e 457 nm são bandas atribuídas à biomembrana.

Na figura 5.26 são apresentados os espectros de FTIR para a biomembrana preparada com TPPS.

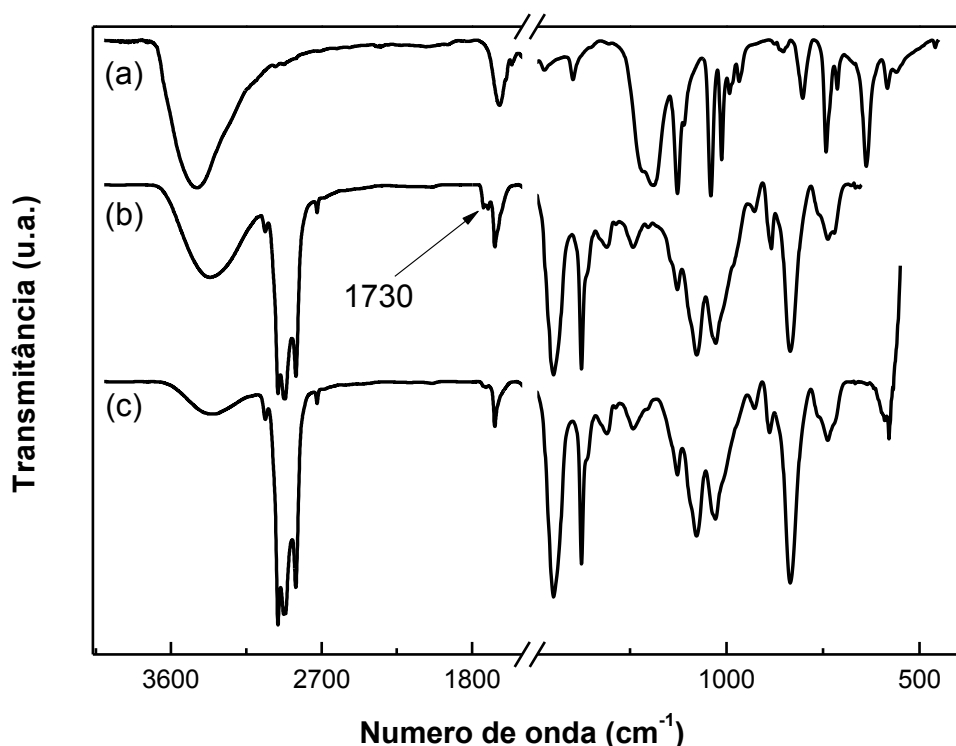


Figura 5.26 – Porfirina TPPS (a), biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para a TPPS (c).

Na Fig. 5.26, as bandas relativas à estrutura da porfirina (a) não apareceram no espectro da matriz na qual foi inserida (c). A supressão destas bandas deve estar

relacionada à baixa concentração da porfirina adicionada à matriz. A seta indica uma banda que surge para a biomembrana preparada apenas com látex e é suprimida para a biomembrana na presença da TPPS. Esta banda, em 1730 cm^{-1} , é característica de estiramento simétrico de C=O em ésteres [98, 104], como relatado para o complexo inorgânico inserido na biomembrana. A supressão desta banda na biomembrana pode estar relacionada com o sítio de ligação da TPPS com o látex.

A incorporação da TPPS também foi analisada via MEV. A figura 5.27 mostra a biomembrana utilizada como matriz para incorporação da TPPS com diferentes magnificações.

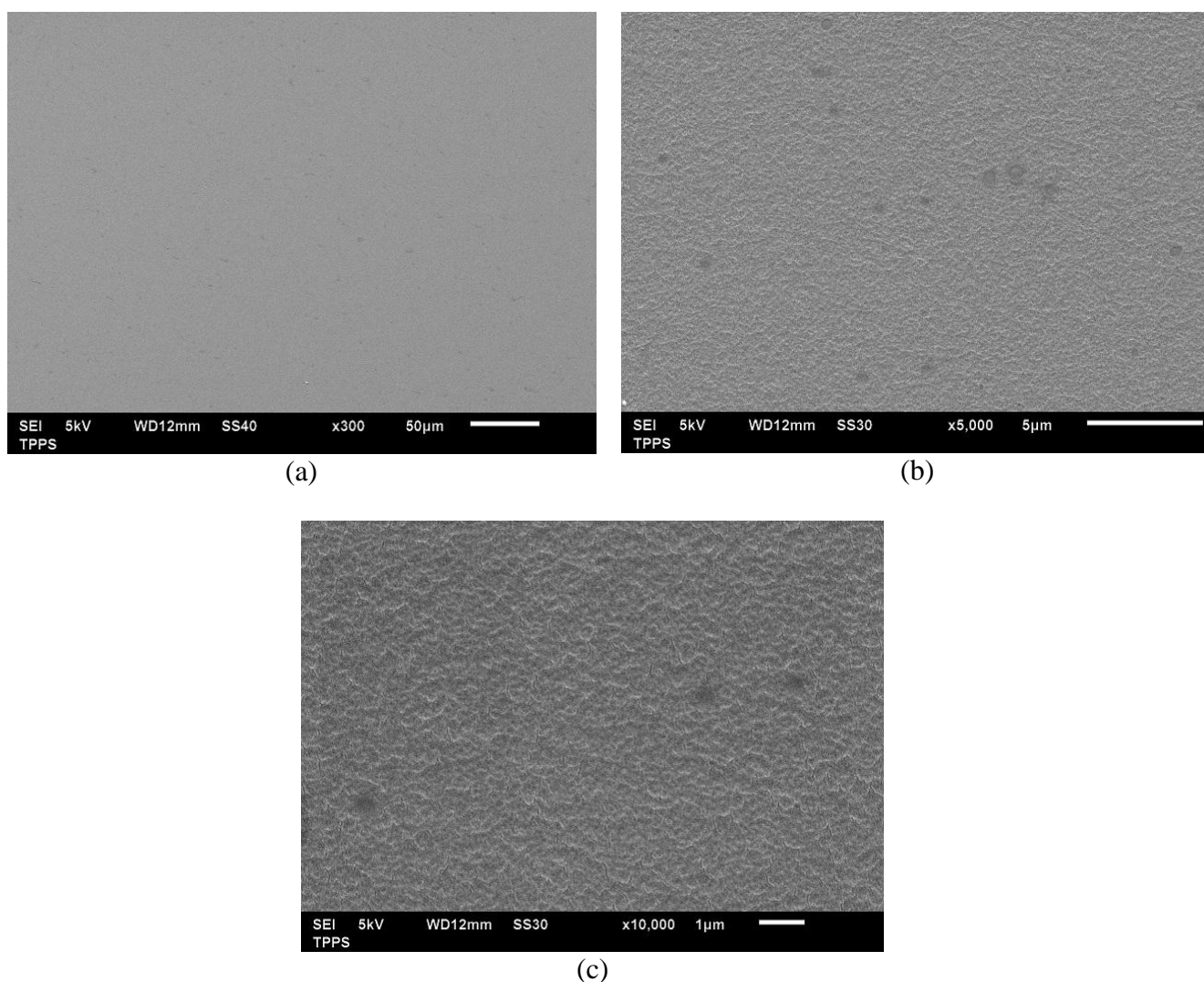


Figura 5.27 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TPPS, com magnificações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

A Fig. 5.27(a) mostra uma biomembrana com superfície aparentemente uniforme. No entanto, à medida que a magnificação aumenta (b) e (c), muitas

irregularidades ficam aparentes, deixando explícita a produção de uma biomembrana rugosa. Cortes transversais também foram realizados com esta amostra através de sua imersão em nitrogênio líquido, e estão apresentando na Fig. 5.28.

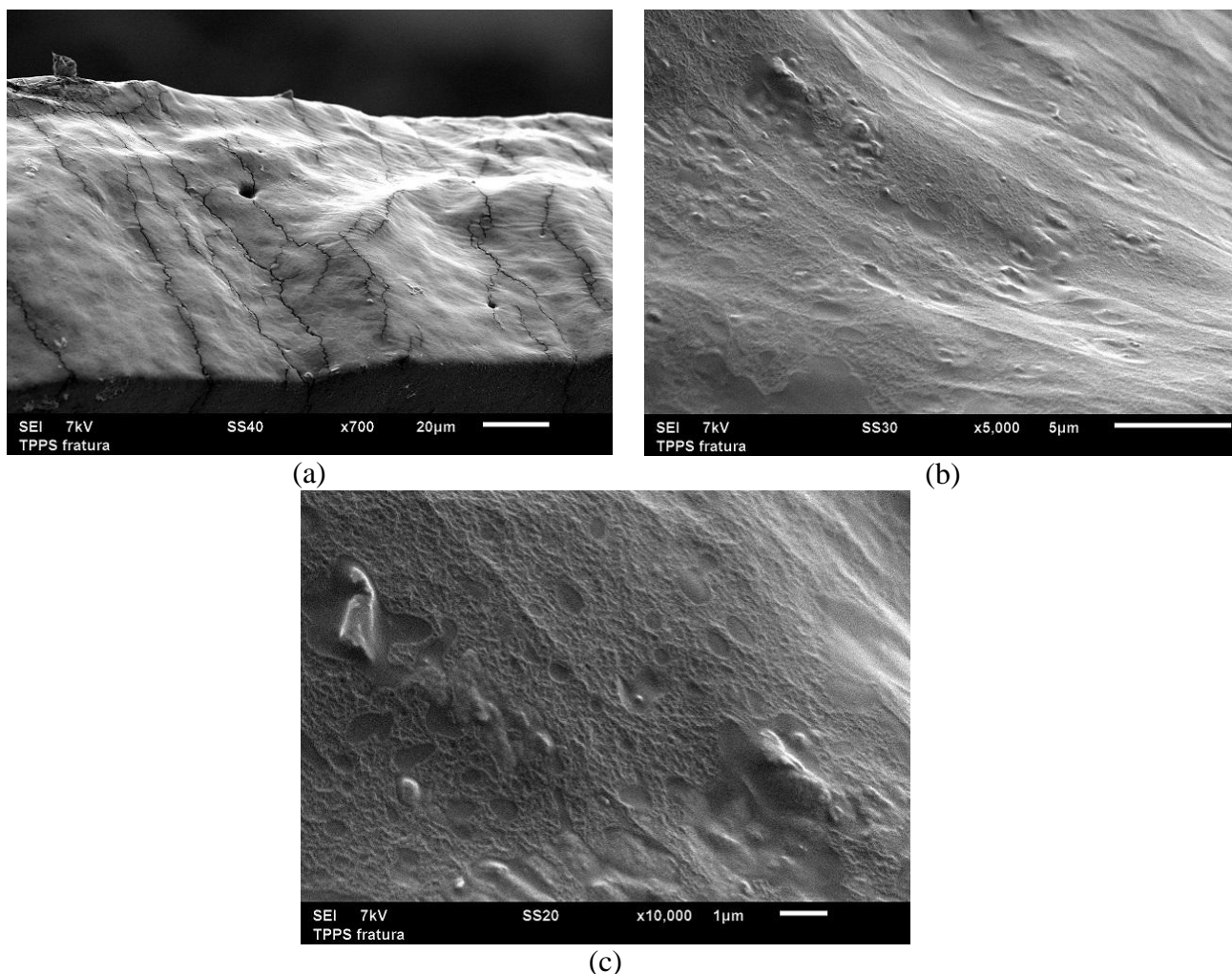


Figura 5.28 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TPPS após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com magnificações de (a) x 700 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

A Fig. 5.28 mostra regiões bastante irregulares da biomembrana. A Fig. 5.28(a) reporta as fissuras ocasionadas pelo nitrogênio líquido e indica uma baixa densidade de poros. As figuras 5.28(b) e (c) permitem que seja visualizada de forma mais clara a baixa densidade de poros. Estruturas sólidas confinadas pela biomembrana aparecem de forma nítida em 5.28 (c). Provavelmente estas estruturas surgiram por alguma interação entre a TPPS (aniônica) e algum constituinte do látex, possivelmente da fração não-borracha. Além disso, mostram microestruturas (relatadas para as biomembranas preparadas sem compostos luminescentes) que podem ser características da biomembrana.

As mesmas análises feitas para a porfirina aniônica TPPS foram realizadas para a porfirina catiônica utilizada neste trabalho. As análises de FTIR, fotoluminescência e MEV para a TMPP estão descritas a seguir.

A obtenção dos espectros de emissão e excitação da biomembrana contendo TMPP, mostrados nas figuras 5.29 e 5.30, respectivamente, foi realizada a partir de comprimentos de onda selecionados por meio de suas bandas de absorção características, mostradas em seu espectro de transmitância. Estas bandas estão centradas em 435 nm (banda de Soret) e 520 nm (na banda Q), conforme apresentado previamente na figura 5.21. As bandas em 345 e 500 nm, foram escolhidas por estarem relacionadas às bandas da biomembrana de látex.

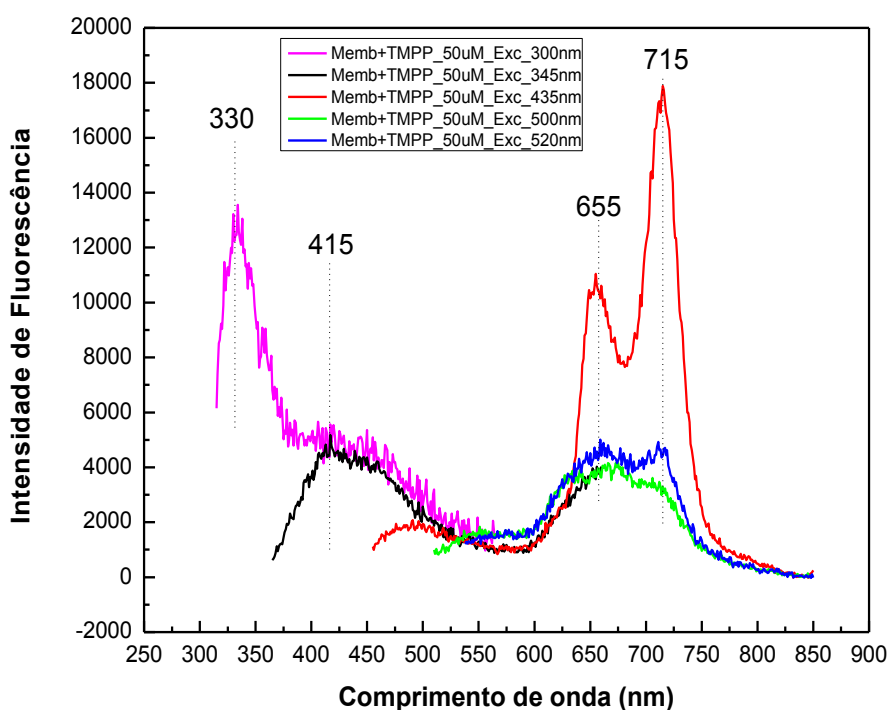


Figura 5.29 – Espectros de emissão da biomembrana utilizada como matriz para a porfirina TMPP.

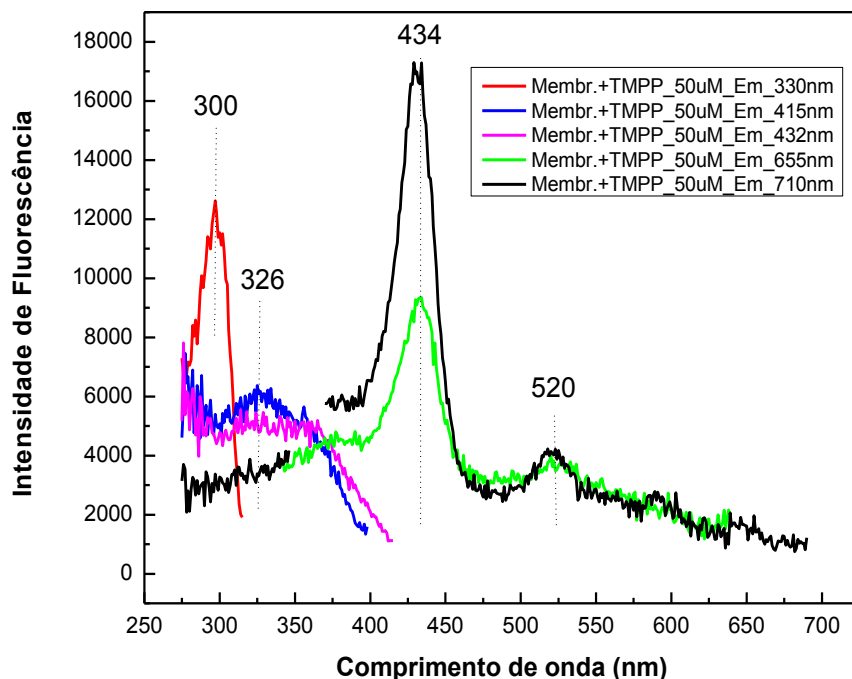


Figura 5.30 - Espectros de excitação das biomembranas utilizadas como matrizes para a porfirina TMPP.

Os espectros de emissão apresentados na figura 5.29 mostram que para excitações entre 435 e 520 nm, duas bandas de emissão são geradas em 655 e 715 nm. Para a TMPP estas bandas além de isoladas, apresentam intensidades reduzidas em relação à TPPS. Para excitações em 300 e 345 nm, uma banda em comum é mostrada, centrada em 415 nm. Novamente, a emissão em 330 nm aparece, sendo estas últimas, bandas característica da biomembrana.

Como mencionado previamente, os espectros de excitação mostrados na figura 5.30, correspondem aos de absorção, e podem servir para identificar as bandas responsáveis por dadas emissões. Pode-se observar a similaridades entre os espectros de emissão da figura 5.30 e o espectro de absorção da TMPP em água (Fig. 5.21), com bandas muito bem definidas para a banda de Soret, em 434 nm e para a absorção mais intensa na banda Q, em 520 nm. As bandas em 300 e em 326 nm, características da biomembrana, também são reportadas nas seções 5.2.1 e 5.2.2 para as biomembranas apenas com látex e com $\text{Eu}(\text{TTA})_3$.

Os espectros de FTIR para a biomembrana preparada com a porfirina TMPP são mostrados na Fig. 5.31.

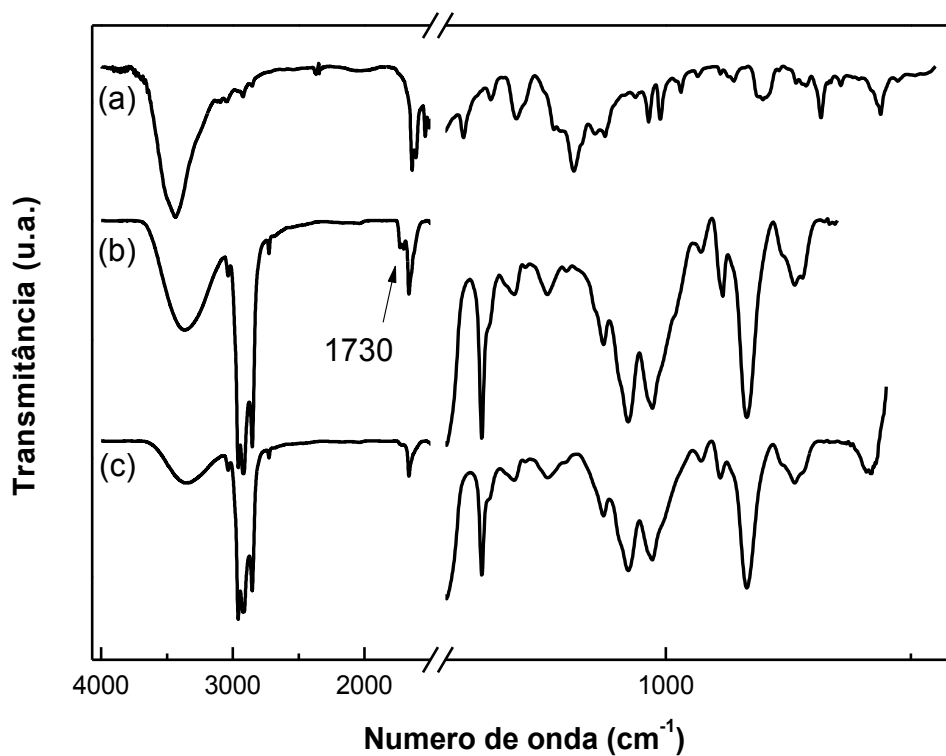


Figura 5.31 – Porfirina TMPP (a), Biomembrana de látex de mangabeira (b) e biomembrana como matriz para a TMPP (c).

As bandas relativas à estrutura da porfirina TMPP, mostradas no espectro (a) da Fig. 5.31, assim como para a TPPS, não apareceram na matriz de látex (c). Novamente, pode-se relacionar a supressão destas bandas à baixa concentração da porfirina adicionada à matriz, tal qual ocorreu para a porfirina TPPS. O possível sítio de ligação entre a porfirina e algum componente do látex, em 1730 cm⁻¹ novamente aparece e está indicado pela seta.

A incorporação da porfirina TMPP, assim como da TPPS, foi analisada via MEV. A figura 5.32 mostra a biomembrana utilizada como matriz para incorporação da TMPP.

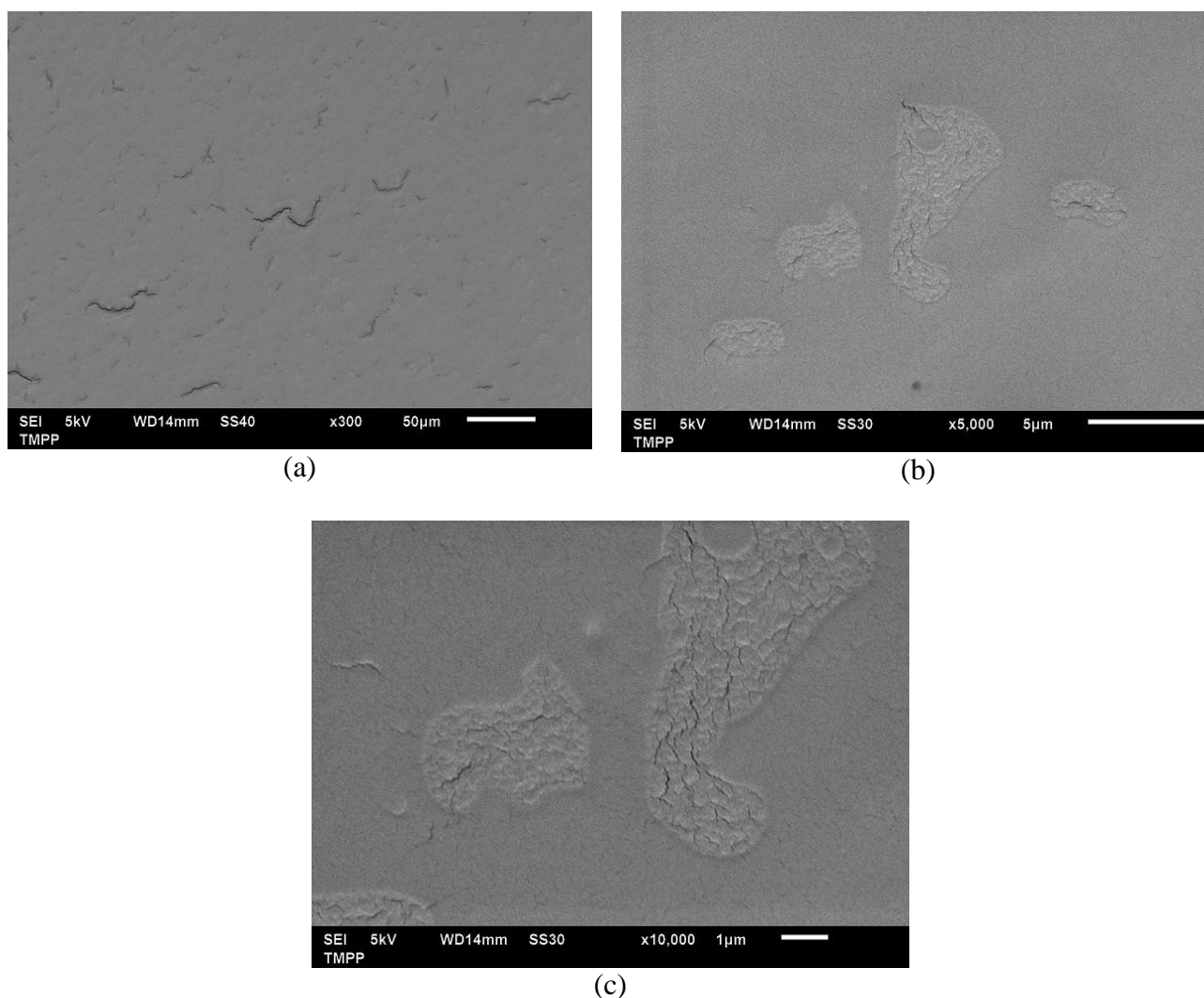


Figura 3.32 - Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para porfirina TMPP com magnificações de (a) x 300 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

A Fig. 3.32 (a) mostra que a biomembrana com a TMPP não apresentou uniformidade, mas algumas fissuras e certas “ilhas”. Observa-se, nesta região quando ampliada (Fig. 3.32 (b) e (c)), que tal membrana pode exibir um aspecto quebradiço, não relatado em nenhuma outra imagem de MEV deste trabalho. Possivelmente, este fato pode estar associado à natureza catiônica da TMPP em sua interação com a biomembrana de látex.

A fratura da biomembrana com TMPP, obtida através do mesmo procedimento mencionado previamente, é mostrada na figura 3.33.

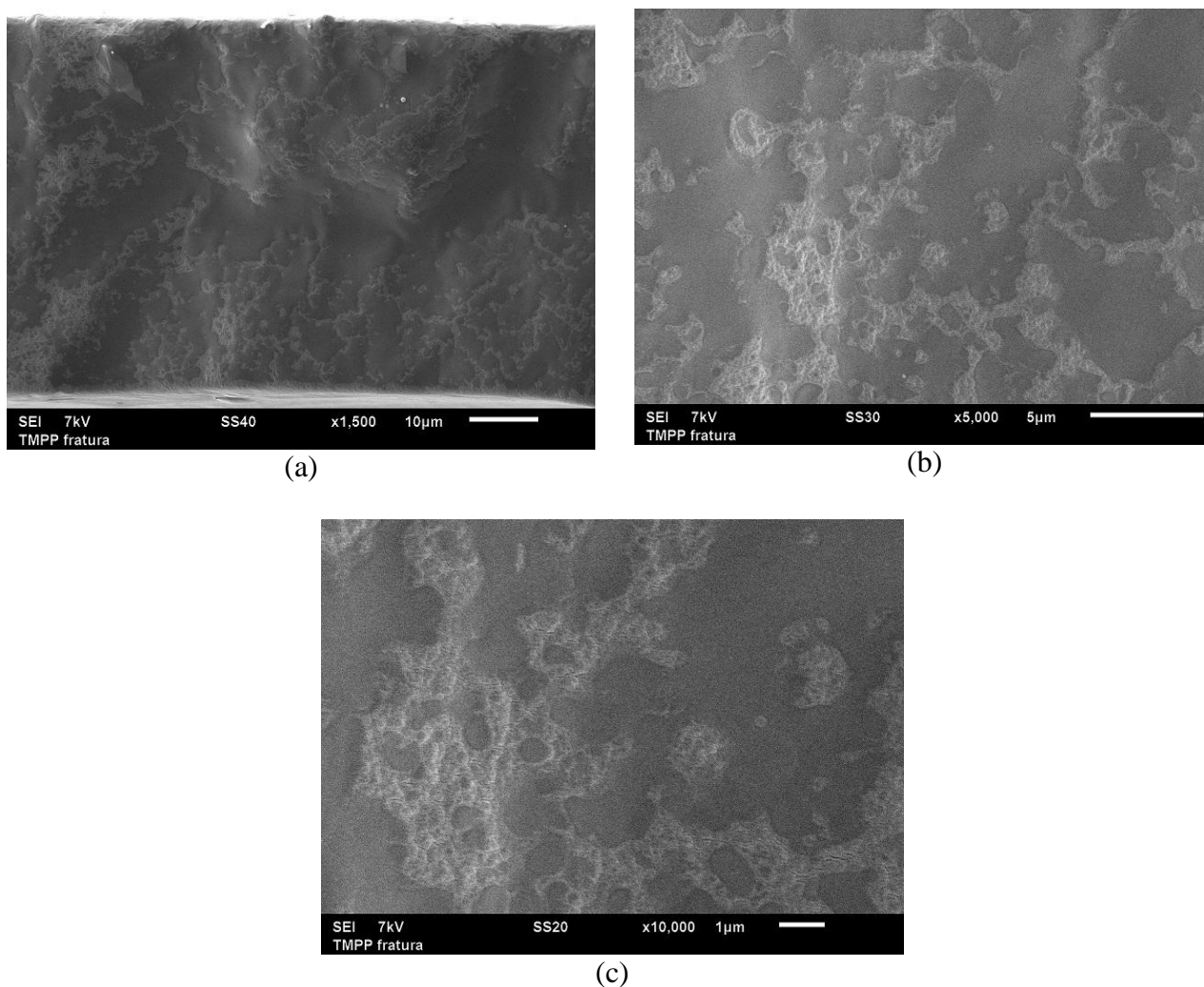


Figura 3.33- Imagens de MEV da biomembrana de látex de mangabeira como matriz para TMPP após fratura ocasionada por imersão em nitrogênio líquido, com magnificações de (a) x 1.500 (b) x 5.000 e (c) x 10.000.

A Fig. 3.33 mostra uma superfície lateral irregular, no entanto, com reduzida densidade de poros. Como discutido nas seções anteriores, estas estruturas podem ter relação com a interação com nitrogênio líquido, com o processo de quebra da biomembrana ou com o processo de evaporação da água presente no látex. Estas microestruturas, presentes em todas as amostras estudadas, porém mais acentuadas para algumas delas.

De maneira geral, os resultados desta seção, em que é apresentada a incorporação de porfirinas às biomembranas, sugerem que a biomembrana de mangabeira apresenta potenciais para a retenção de compostos orgânicos. A análise de fotoluminescência tanto para a porfirina TMPP quanto para a TPPS, sugere que a biomembrana de látex incorporou as moléculas, mantendo as bandas características de cada uma delas. Além

disso, não foram observadas alterações significativas nos espectros de FTIR, com exceção da banda em 1730 cm^{-1} , que sugere uma interação das moléculas orgânicas com o látex. Apesar de terem sido obtidas biomembranas com superfícies rugosas e irregulares, muito provavelmente devido às moléculas serem catiônicas (TMPP) e aniônicas (TPPS), os resultados sugerem que moléculas orgânicas fluorescentes possam ser empregadas visando o uso de biomembranas como matrizes hospedeiras.

5.3. Biomembranas de látex de mangabeira para aplicações biomédicas.

Com objetivo de avaliar o potencial das biomembranas de mangabeira em áreas biomédicas, serão apresentados nesta seção os resultados dos testes de avaliação de danos às células e ao DNA, conforme previamente descritos na seção 4.4.

5.3.1. Análise da citotoxicidade através do método de viabilidade celular

Com o intuito de avaliar o efeito citotóxico das biomembranas de mangabeira, foi realizado o teste de viabilidade celular, com auxílio do corante vermelho neutro. O teste foi realizado *in vitro* com linhagem NIH de células de fibroblastos de ratos. Além de avaliar a citotoxicidade do látex, a presença de amônia também foi um parâmetro considerado no teste. Para tanto, foram utilizados dois grupos de biomembranas: com amônia (LA) e com água (LW).

O controle negativo foi o próprio meio de cultivo, e o positivo foi o fenol, que deve induzir morte celular. As amostras foram submetidas aos testes durante 24, 48 e 72 horas, segundo recomendações da ISO 10993-5.

Na Fig. 5.34 está apresentada a quantidade de células viáveis após o contanto com os controles e biomembranas preparadas com água e amônia, em diferentes tempos de exposição.

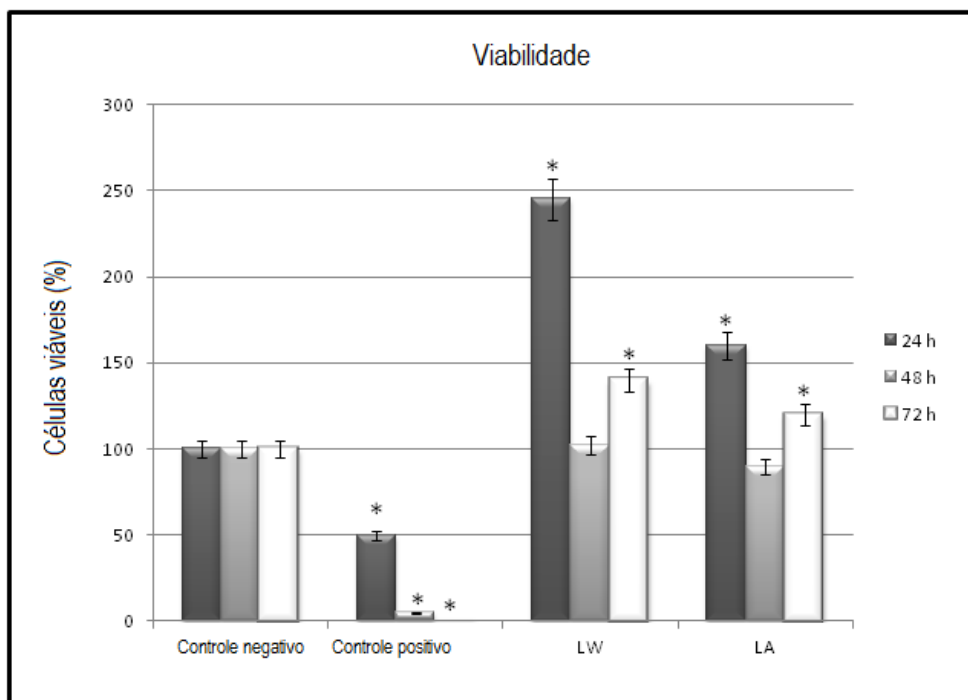


Figura 5.34 - Resultados obtidos a partir do teste de viabilidade celular. As barras representam a média \pm desvio padrão das culturas celulares expostas ao meio de cultivo (controle negativo), à fenol (controle positivo) e às biomembranas com água (LW) e com amônia (LA), em 3 diferentes tempos.

* indica a significância dos resultados.

IC_{50} é o índice que mede quão tóxica é uma substância para 50% das células utilizadas. Ele mostra quando algum tipo de substância induz 50% de morte celular. Os resultados mostram que para o controle negativo, não há morte celular em nenhum dos tempos de contato, como se esperava, já que se trata do próprio meio de cultivo. Para o controle negativo, observa-se o IC_{50} : é vista 50% de morte celular já nas primeiras 24h de contato. Após 48 e 72h nota-se morte total do meio. Este resultado também é esperado, pois o meio utilizado propicia a morte das células. Para os grupos LW e LA, nota-se que, para as primeiras 24h não há toxicidade em nenhum das biomembranas de látex e quando comparadas ao controle negativo, nota-se proliferação celular, sendo este um resultado de grande relevância, pois é um dos primeiros indicativos de que o material pode ser utilizado como biomaterial.

Comparando a biomembrana de mangabeira do grupo LW com a do grupo LA é possível visualizar uma pequena diferença entre o número de células sobreviventes após 48h de exposição. A quantidade de células vivas é maior para a cultura exposta à biomembrana do grupo LW, mostrando que o grupo LA induziu uma pequena quantidade de morte celular. Esta é uma importante informação para o estabelecimento

da metodologia de coleta e estabilização do látex. Quando o objetivo é sua aplicação em saúde, deve-se optar por estabilizantes que provoquem o mínimo de morte celular possível, ficando clara a escolha pelo látex de mangabeira estabilizado com água.

Os resultados são promissores no que concerne à confirmação de que o material não causa morte celular. Ao contrário, é capaz de induzir proliferação de células, sendo superior ao próprio meio de cultivo.

5.3.2. Teste Cometa: Avaliação de danos no DNA

Este teste, realizado de forma simples, foi utilizado para medir os danos no DNA das células de fibroblastos de ratos (utilizadas nos testes de viabilidade celular), após 72h de exposição às biomembranas de látex preparadas tanto com amônia quanto com água. μ

A ruptura dos filamentos de DNA está representada pela média do tamanho e da intensidade da “cauda” de 50 células escolhidas aleatoriamente. A representação dos resultados mostram na Fig. 5.35 (a) o tamanho da cauda e (b) a intensidade da cauda em porcentagem, das células expostas aos grupos LW e LA.

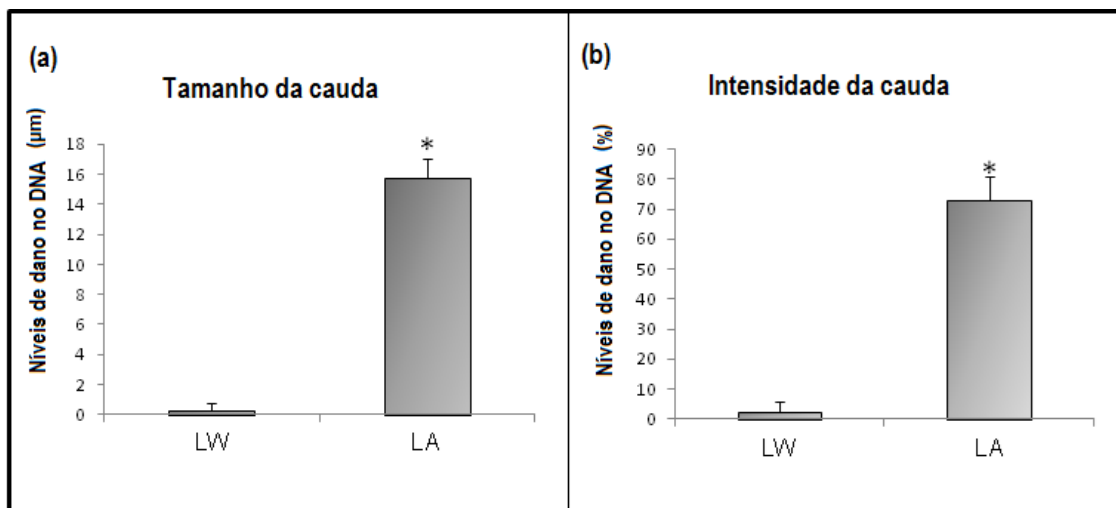


Figura 5.35 – Efeitos da biomembrana de mangabeira com água (LW) e com amônia (LA) na estabilidade do DNA no (a) tamanho e na (b) intensidade da cauda de células de fibroblastos. As barras representam a media de 50 células \pm o desvio padrão. * indica a significância dos resultados.

A análise da Fig. 5.35 (a) e (b), mostra que a biomembrana LW não induziu ruptura no DNA, por não apresentar valores de significância maiores que 1 para o tamanho e 10% para a intensidade da cauda. Entretanto, há um significativo aumento no dano de

DNA com a adição de amônia ao látex, ficando claro em 5.09 (b) o aumento na intensidade da cauda, com valores próximos de 80%. A significância destes resultados está ligada ao fato de que houve danos significativos no DNA celular, quando utilizado o grupo LA.

O látex de *H. brasiliensis*, muito utilizado na fabricação de bens de consumo como luvas, brinquedos, balões, catéteres e preservativos, geralmente é estabilizado com amônia após sua coleta, em quantidades que variam de 0.2% a 0.7% [105]. Alguns estudos também têm mostrado que a adição de amônia altera, destrói ou modifica algumas estruturas dos componentes do látex, podendo intensificar as características alergênicas dos produtos produzidos com ele [106]. No látex de mangabeira, a adição de amônia foi utilizada como forma de evitar sua coagulação durante a realização da coleta. Contudo, os resultados obtidos e aqui apresentados, mostraram que a adição de amônia reduz a viabilidade celular quando comparada ao látex com água. Além disso, causa danos no DNA. Sendo assim, os melhores resultados, visando aplicações de materiais que precisem ser biocompatíveis, apareceram para as biomembranas preparadas com água como anticoagulante.

Logo, quando analisados em conjunto, os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, mostram que não há toxicidade notável no látex de mangabeira quando utilizada água como estabilizante, indicando que este, seria um bom produto com propriedades que o viabilizam como biomaterial. Como já discutido, um biomaterial não deve simplesmente preservar a integridade das células, mas também propiciar vantagens com sua utilização. Estes testes são os primeiros indicativos de que o látex de mangabeira mostrou ter potencial aplicação como biomaterial.

6. Conclusões

Este trabalho de pesquisa mostrou a preparação, caracterização físico-química, análise fotoluminescente e testes biológicos de biomembranas de látex de mangabeira visando aplicações biomédicas e tecnológicas.

Foi possível obter biomembranas de forma controlada, de acordo com a quantidade de látex *in natura* empregada. No que diz respeito à composição química, as biomembranas de mangabeira foram comparadas às de seringueira e foi verificada a grande similaridade entre elas, onde o poli-isopreno é o principal componente de ambas.

Os resultados obtidos a partir dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade mostram que a biomembrana de látex de mangabeira não apresenta características tóxicas às células e nem ao DNA. As biomembranas preparadas com água apresentaram proliferação aumentada e não ocasionaram danos ao DNA das células. Entretanto, as biomembranas produzidas com a presença de amônia induziram, em escala reduzida, morte celular, bem como causaram danos ao DNA das células empregadas.

As imagens de MEV mostraram que as biomembranas obtidas a 40°C apresentam superfícies lisas e homogêneas, com pouca porosidade e rugosidade. Os resultados das análises fotoluminescentes indicam ainda que a biomembrana de látex de mangabeira é um material luminescente e que, além disso, pode ser empregado como matrizes hospedeiras para compostos luminescentes tanto de origem orgânica quanto inorgânica.

7. Referências

- [1] JUDAS, F.; FIGUEIREDO, H.; DIAS, R. Biomateriais em cirurgia ortopédica construtiva. Clínica Universitária de Ortopedia, HUC, Coimbra, 2009.
- [2] GUTIERRES, M. et al. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual. *Arquivos de medicina*, Porto, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.
- [3] MORAES, P. C. et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. *Acta Cir Bras.* v. 19. n. 4, p. 351-359, Jul-Ago. 2004
- [4] ORÉFICE, R. L.; PERERIRA, M.; MANSUR, H. S. In. Biocompatibilidade, Bioatividade e Engenharia de Tecidos. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. 1 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.
- [5] AZEVEDO, V. et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v. 3, n. 1, p. 31-39, 2008.
- [6] BALABANIAN, C. et al. Biocompatibility of natural látex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science*. v. 48, n. 4, p. 201-215, 2006.
- [7] MRUÉ, F. *Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex: Estudo experimental em cães*. 1996. Dissertação. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 1996
- [8] Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *International Journal of Dermatology*. v. 40, p. 238-240, 2001.
- [9] TATHE, A.; GHODKE, M.; NIKALJE, A. A brief review: biomaterials and their application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 2, n. 4, p. 19-23, 2010.
- [10] WILLIAMS, D. *So What are Biomaterials?* International Society for Applied Cardiovascular Biology (ISACB). Disponível em: <http://www.isacb.org/so_what_are_biomaterials.asp>. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

- [11] AGOSTINI, D. L. S. *Caracterização dos Constituintes do Látex e da borracha natural que estimulam angiogênese*. 2009. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente. 2009.
- [12] VULCANI, V. A. S; MACORIS, D. G; PLEPIS, A. M. G. Biomateriais para reparação cirúrgica da parede abdominal em animais domésticos revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 12, n. 2, p. 141-147, jul./dez. 2009.
- [13] KIM, J.; EVANS, G. Applications of Biomaterials in Plastic Surgery. *Clin Plastic Surg.* v. 39, p. 359–376, 2012.
- [14] PAN, W. et al. Evaluation of the potential application of three different biomaterials combined with bone morphological proteins for enhancing tendon–bone integration. *Injury, Int. J. Care Injured.* v. 44, p. 550–557, 2013.
- [15] KUNDU, B. et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 65, p. 457–470, 2013.
- [16] LIANG, Y.; KIICK, K. Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomaterialia.* 2013
- [17] GUIDELLI, E. et al. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. *J. Nanopart Res.* 2013.
- [18] HERCULANO, R. et al. Metronidazole Release Using Natural Rubber Latex as Matrix. *Materials Research.* v. 13. n.1, p. 57-61, 2010.
- [19] HERCULANO R. et. Al. Nitric Oxide Release Using Natural Rubber Latex as Matrix. *Materials Research* v. 14, n. 3, p. 335-359, 2011.
- [20] SU, R.; KIM, Y.; LIU, J. Resilin: Protein-based elastomeric biomaterials. *Acta Biomaterialia.* 2013.
- [21] HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; ERENO, C. GUIMARÃES, S. A. C.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery

System in Guided Bone Regeneration (GBR). *Materials Research*, v. 12, n. 2, p. 253-256, 2009.

[22] STEBBINS, D. et al. In: Cactus Mucilage as an Emergency Response Biomaterial to Provide Clean Drinking Water. *Monitoring Water Quality: Pollution Assessment, Analysis, and Remediation*. p. 249-260, 2013.

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

[24] KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* v. 26, p. 1561-1603, 2001.

[25] BODIN, A. et al. In: Bacterial Cellulose as Biomaterial. *Comprehensive Biomaterials*. v. 2, p. 405-410, 2011.

[26] KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*.v. 37, p. 370-378, 2004.

[27] ALMEIDA, L. et al. Hancornia speciosa latex: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Artigo a ser publicado.**

[28] Jom Salva. Disponível em: <<http://www.jomsalva.com/caucho/caucho2.html>>. Acesso em 05 de março de 2012.

[29] COSTA, H.; VISCONTE, L.; NUNES, R. Aspectos Históricos da Vulcanização. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v. 13, n. 2, p. 125-129, 2003

[30] FERREIRA, M. et al. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*. v. 39, n. 3, 2009.

[31] WANG, J. et al. Bone marrow mononuclear cells exert long-term neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by promoting arteriogenesis and angiogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013

- [32] SCHULTZ, G. et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*. v. 11, p. 11-28, 2003.
- [33] SHEN, J.; FALANGA, V. Innovative Therapies in Wound Healing. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. v. 7, n. 1, 2003.
- [34] FRADE, M. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An Bras Dermatol*. v.87, n. 1, p. 45-51, 2012.
- [35] ISSA, J. et al. Bone Repair Investigation Using rhBMP-2 and Angiogenic Protein Extracted From Latex. *Microscopy Research and Technique*. v. 75, p. 145–152, 2012.
- [36] OLIVEIRA, J. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. v. 69, n. 5, p. 649-55, set./out. 2003.
- [37] CARVALHO, B. et al. Molde de látex natural (*Hevea brasiliensis*) para neovaginoplastia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v. 30, n. 1, p. 31-35. 2007.
- [38] ARAUJO, M.; MASSUDA, E.; HYPPOLITO, M. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural látex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 27 , n. 8, p. 566-570, 2012.
- [39] Pele Nova Biotecnologia. *História*. Disponível em: <<http://www.pelenova.com.br/historia.php>>. Acesso em 13 de março de 2012.
- [40] VERDOLIN, B.; BOAS, W.; GOMEZ, R. Alergia ao Látex: Diagnóstico Acidental após Procedimento Urológico. Relato de Caso. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 53, n. 4, p. 496 – 500, 2003.
- [41] EBO, D.; STEVENS, W. IGE-Mediated natural rubber látex allergy: na update. *Acta Clinica Belgica*. v. 57, n. 2, p. 58-70, 2002.
- [42] YAGAMI, T. Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. v. 135, p. 3–11, 2004.

- [43] WILKINSON, S.; BURD, R. Latex: A cause of allergic contact eczema in users of natural rubber gloves. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v. 39, n. 1, p. 36-42, 1998.
- [44] ALLARCON, J. et al. Alergia ao Látex. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 53 n. 1, p. 89-96, Jan./Fev. 2003.
- [45] ROLLAND, J.; O'HEHIR, R. Latex allergy: a model for therapy. *Clinical and Experimental Allergy*. v. 38, p. 898–912, 2008.
- [46] MALMONGE, J. et al. Comparative Study on the Technological Properties of Latex and Natural Rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *Journal of Applied Polymer Science*. v. 111, p. 2986–2991, 2009.
- [47] GOYAL, M.; NAGORI, B.; SASMAL, D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 144, p. 786–790, 2012.
- [48] FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. v. 27, p. 1–93, 2006.
- [49] SILVA, T. et al. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 99, p. 523–532, 2012.
- [50] MORAES, T. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 120, p. 161-168, 2008.
- [51] PEREIRA, A. et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. *Journal of Chromatography B*. v. 887-888, p. 133-137, 2012.
- [52] MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 135 p. 530-537. 2011.

[53] SANTOS, A. K. et al. Análise da composição centesimal da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Piauiense de Saúde*. v. 1, n. 1, p. 23-26, 2012.

[54] SILVA, G. et al.. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE an increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 137 p. 709-713, 2011.

[55] FERREIRA, H. et al. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 109, p. 161–164, 2007.

[56] FERREIRA, H. et al. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*. v. 14, p. 473–478, 2007.

[57] CARRAZZA, T. G.; CANABRAVA, H. A. N.; CARRAZZA L. G.; SANT'ANA, D. S.; ALVES, L. R. Atividade antimicrobiana de extratos da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). *PUBVET*, Londrina, v. 5, n. 7, Ed. 154, Art. 1034, 2011.

[58] ROGERO, S. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320. 2003

[59] International Standard: ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 1999.

[60] MARTINS, M. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). *ConScientiae Saúde*. v. 8, n. 1, p. 99-104, 2009.

[61] OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. *Mutation Research*, v. 504, n.5, p. 17-36, 2004.

[62] CHENG, S. et al. Preparation of electrospun luminescent polyimide/europium nanofibers by simultaneous in situ sol–gel and imidization processes. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 356, p. 92–99, 2011.

[63] LV, Y. et al. Electrospun nanofibers of porphyrinated polyimide for the ultra-sensitive detection of trace TNT. *Sensors and Actuators B*. v. 184, p. 205– 211, 2013.

- [64] BABIJ, M.; MONDRY, A. Synthesis, structure and spectroscopic studies of europium complex with S(+)-mandelic acid. *Journal of Rare Earths*. v. 29, n. 12, p. 1188-1191, 2011.
- [65] CARAVAN, P.; ELLISON, J.J.; MCMURRY, T.J.; LAUFFER, R.B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics and applications. *Chem. Rev.*, v. 99, p.2293, 1999.
- [66] PARKER, D. Luminescent lanthanide sensors for pH, pO₂ and selected anions. *Coord. Chem. Rev.*, v. 205, p. 109, 2000.
- [67] FERREIRA, M. et al. Avaliação dos Parâmetros fisiológicos do látex de clones de seringueiras da região de Presidente Prudente (SP). *Boletim de Pesquisa*. ISSN 1517-476X, Ago., 1999.
- [68] Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. *Radioesterilização*. Disponível em: <<https://www.ipen.br/sitio/>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2012.
- [69] International Standard: ISO 1113. Sterilization of health care. Products – Radiation. Part 1: Requirements for development validation and routine control of a sterilization on process for medical devices. 2006.
- [70] MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: Aplicações Industriais e Tecnológicas. *Química Nova*. v. 28 n. 1, p. 111-117, 2005.
- [71] SINGH, S.; KUMAR, K.; RAI, S. Er³⁺/Yb³⁺ codoped Gd₂O₃ nano-phosphor for optical thermometry. *Sensors and Actuators A*. v. 149, p. 16–20, 2009.
- [72] LI, C. et al. Er³⁺–Yb³⁺ co-doped silicate glass for optical temperature sensor. *Chemical Physics Letters*. v. 443, p. 426–429, 2007.
- [73] TEIXEIRA, L. S. *Estudos das propriedades ópticas dos complexos Európio Tetraciclina e suas aplicações na detecção de lipoproteínas*. 2010. Dissertação. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. 2010.
- [74] CAPECCHI, S. et al. High-efficiency organic electroluminescent devices using an organoterbium emitter. *Adv. Mater*, v.12, p.1591, 2000.

- [75] YAM, V.W.W.; LO, K.K.W. Recent advances in utilization of transition metal complexes and lanthanides as diagnostic tools. *Coord. Chem. Rev.*, v. 184, p. 57, 1999.
- [76] MOURA, A. P. Estudos das Propriedades Térmicas e Luminescentes de Blendas de PC/PMMA Dopados com complexos de Er^{3+} , Tb^{3+} e Eu^{3+} . Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá. 2006.
- [77] SILVA, R. R. *Estudo da preparação de nanocompósitos magneto-luminescentes unidimensionais baseados em telúrio*. 2012. Universidade Estadual Paulista. Campus Araraquara. 2012.
- [78] CHARLES, R.; OHLMENN, R. Europium thenoyltrifluoroacetate, preparation and fluorescence properties. *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*. v. 27, n. 1, p. 255-266, 1965.
- [79] REIS, R.G.C.S. *Fotoluminescência de Eu/Tb e de complexos Eu/Tb com ligantes tta ou acac incorporados em sílica mesoporosa*. 2012. Dissertação. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2012.
- [80] BINNEMANS, K. Rare-earth beta-diketonates. In.: GSCHNEIDNER, K. A. Jr.; PECHARSKY, V. K.; BUNZLI, J-C. G. *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*, Amsterdam: Elsevier, 2005. v. 37, p. 107-272.
- [81] LI, J. et al. Bionic catalysis of porphyrin for electrochemical detection of nucleic acids. *Electrochimica Acta*. v. 83, p. 73–77, 2012.
- [82] RAO, D.N. Excited state dynamics in porphyrins in relevance to third-order nonlinearity and optical limiting. *Optical Materials*. v. 21, p. 45–49, 2002.
- [83] THANOPULOS, I.; PASPALAKIS, E.; YANNOPAPAS, V. Optical switching of electric charge transfer pathways in porphyrin: a light-controlled nanoscale current router. *Nanotechnology*. v. 19, n. 44, 2008.
- [84] SALA, O Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996.
- [85] ALCANTARA JR, P. Espectroscopia Molecular. Curso Física Moderna II, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002.

[86] PAVIA, D et al. Introdução à espectroscopia. 4 ed. Brasil: Cengage Learning, 2010. Tradução da 4ª edição americana.

[87] CRUZ, J. F. M., *Caracterização de Gasolinas por Espectroscopia FT- Raman*. 2003. Tese. Pontifícia Universidade Católica – Rio de Janeiro. 2003.

[88] SOTOMAYOR, M. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

[89] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Trad. Ignez Caracelli *et al*. Princípios de Análise Instrumental. 5ª edição – Porto Alegre: Bookman. 2002.

[90] SILVESTEIN, R.; BASSLER, G.; MORRILL, T. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. United States of America: John Wiley & Sons, 1991.

[91] BLASSE, G.; GRABMAIER, B. *Luminescent Materials*. Berlin: Springer-Verlag. 1994.

[92] SOLÉ, J.; BAUSÁ, L.; JAQUE, D.. *An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*. England: John Wiley & Sons, 2005.

[93] PEREIRA, M. et al. Caracterização por análise termogravimétrica e análise elementar de CHN matriz de sílica gel organofuncionalizada com n-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenotriamina e tetraetilortosilicato, em meio ácido. *IV Congresso Norte-Nordeste de Química*. Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2011.

[94] MALISKA, A. M. *Microscopia Eletrônica de Varredura*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC. LABORATÓRIO DE CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E ANÁLISE DE IMAGENS – LCMAI.

[95] PAOLO, C. *Aplicação do Ensaio Cometa a estudos de dano ao DNA, de robalos, centropomus parallelus (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona*. Dissertação. 2006. Universidade de São Paulo, 2006.

[96] GRUMANN, C. *Eletroforese*.

- [97] GUIDELLI, E. et al. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. *Spectrochimica Acta Part A*. v. 82, p. 140–145, 2011.
- [98] POLOVKOVÁ, J. et al. FTIR Study of Gamma-Irradiated cis-1,4-Polyisoprene. *Chem. Pap.* v. 60, n. 5, p. 327-332, 2006.
- [99] CIBULKOVÁ, Z. et al. DSC and FTIR Study of the Gamma Radiation Effect on cis-1,4-Polyisoprene. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 84, n. 3, p. 709-713, 2006.
- [100] MEDEIROS, E. et al. A comparative study of the non-isothermal degradation of natural rubber from Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) and Seringueira (*Hevea brasiliensis*). *J. Therm Anal Calorim.* v. 100, p. 1045–1050, 2010.
- [101] HERCULANO, R. D. *Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas*. Tese. 2008. Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto, 2009.
- [102] ZAIA, D.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*. v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
- [103] CAMPBELL, I.; DWEK, R. *Biological Spectroscopy*. California: Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1984
- [104] PICHAYAKORN, W. et al. Deproteinised natural rubber used as a controlling layer membrane in reservoir-type nicotine transdermal patches. *Chemical engineering research and design*. v. 9 I, p. 520–529, 2013.
- [105] KEKWICH R. et al. The allergenic properties of fresh and preserved *Hevea brasiliensis* latex protein preparations. *Clin. Exp. Immunol.* 337-342, 1996.
- [106] GRUTTA, S. et al. Comparison of ammoniated and nonammoniated extracts in children with latex allergy. *Allergy*, v. 58, p. 814-818, 2003.